PREDOMINÂNCIA DE MORFOTIPOS DO BACTERIOMA NATIVO DE SEMENTES E ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MILHO (*Zea mays* L.) EM RESPOSTA AO TRATAMENTO DE TERMOTERAPIA

BEATRIZ ELISA BARCELOS CYRÍACO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO – 2021

PREDOMINÂNCIA DE MORFOTIPOS DO BACTERIOMA NATIVO DE SEMENTES E ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MILHO (*Zea mays* L.) EM RESPOSTA AO TRATAMENTO DE TERMOTERAPIA

BEATRIZ ELISA BARCELOS CYRÍACO

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Fabio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO – 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C997 Cyríaco, Beatriz Elisa Barcelos.

PREDOMINÂNCIA DE MORFOTIPOS DO BACTERIOMA NATIVO DE SEMENTES E ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MILHO (*Zea mays* L.) EM RESPOSTA AO TRATAMENTO DE TERMOTERAPIA / Beatriz Elisa Barcelos Cyríaco. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

49 f.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022. Orientador: Fabio Lopes Olivares.

1. Ecofisiologia microbiana. 2. Microbioma. 3. Bactérias endofíticas. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

PREDOMINÂNCIA DE MORFOTIPOS DO BACTERIOMA NATIVO DE SEMENTES E ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MILHO (*Zea mays* L.) EM RESPOSTA AO TRATAMENTO DE TERMOTERAPIA

BEATRIZ ELISA BARCELOS CYRÍACO

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia Vegetal

Aprovada em 30 de julho de 2021

Comissão Examinadora:

Dr. Fabio Bueno dos Reis Junior - EMBRAPA

Dr. Alessandro Coutinho Ramos – UVV

Dr. Willian Pereira – UFRRJ

Prof. Dr. Fabio Lopes Olivares – UENF

(Orientador)

Dedico este trabalho ao meu avô, Seu Barcelos *(in memoriam)*.

“ As sementes representam a conexão entre o passado e o futuro. Contêm a experiência genética acumulada no passado e o potencial para perpetuação no futuro. ”

Julio Marcos Filho

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual pela estrutura para a realização deste trabalho, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e todo seu corpo docente pelos ensinamentos compartilhados.

À minha família, especialmente minha mãe Roselise que sempre lutou e se esforçou muito para me dar uma vida digna, me apoiando e me ajudando a todo momento.

Ao meu orientador, professor e amigo Fabio Lopes Olivares, por toda a paciência e persistência em mim. Agradeço por sempre acreditar no meu potencial e me despertar o amor pela ciência. Desculpe a vidraria quebrada.

Aos colegas de laboratório, que foram fundamentais no meu dia a dia de trabalho em meio a uma pandemia, em especial Letícia Rocha, Mariana Freitas, Jaqueline Oliveira, Márcia Caetano, Aline Souza, Eduardo Souza, Mariana Barduco, Saulo Pireda, Letícia Cespom, Brunna Xavier, Antônio Jesus, Mariana Ramos, Prof. Renato DaMatta e Prof. Jorge Petretski.

À secretária Margareth Paes, às técnicas Adriana e Beatriz, às funcionárias da limpeza e aos vigilantes da UENF.

Todos que colaboraram direta ou indiretamente com este trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO vi
ABSTRACT viii
Introdução 1
1. Revisão Bibliográfica 3
1.1. Interações planta-bactéria 3
1.2. Bactérias nativas de sementes 4
1.3. O desafio das sementes “germ-free" 5
2. Objetivo Geral 8
2.1. Objetivos específicos 8
3. Material e Métodos 9
3.1. Teste de germinação 9
3.2. Determinação de umidade das sementes 10
3.3. Teste de vigor das sementes 10
3.4. Quantificação bacteriana 11
3.5. Formação de biofilme 11
3.6. Curva de crescimento bacteriano 12
3.7. Cultivo em casa de vegetação 12
3.8. Extração de DNA e amplificação do gene 16S rDNA por qPCR 13
3.9. Microscopia óptica de campo claro 13
4. Resultados e Discussões 14
5. Conclusão 33
Referências Bibliográficas 34

RESUMO

Cyríaco, Beatriz Elisa Barcelos, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 30 de julho de 2021. Título: Predominância de morfotipos do bacterioma nativo de sementes e aclimatação de plântulas de milho (*Zea mays* L.) em resposta ao tratamento de termoterapia. Orientador: Prof. Fabio Lopes Olivares.

O estudo do microbioma das sementes vem ganhando cada vez mais espaço entre as pesquisas microbiológicas de plantas. Comunidades bacterianas podem ser transmitidas horizontalmente, através do ambiente em que a planta está inserida, ou verticalmente, através da planta-mãe. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento de termoterapia na microbiota nativa de sementes de milho considerando a qualidade fisiológica das plântulas em resposta aos tempos e temperaturas propostos. Para isto, sementes de milho *Zea mays* L. cv. DKB 177 foram tratadas com termoterapia a seco nas temperaturas de 60ºC e 70ºC, e nos tempos de 72 e 96 horas. Após o tratamento, as sementes foram incubadas em BOD por 7 dias e o vigor das sementes foi determinado pelo teste bioquímico de tetrazólio. Para quantificação de bactérias totais e diazotróficas, foi realizada contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e análise da Tabela de McCraddy (NMP), respectivamente. A avaliação de formação de biofilme foi realizada através do método de coloração de safranina. A curva de crescimento bacteriano foi medida através da densidade óptica em meio líquido. As sementes foram cultivadas em casa de vegetação, com posterior avaliação dos parâmetros biométricos das plantas. O DNA das sementes foi extraído e quantificado por qPCR com amplificação do gene 16S rDNA. Segmentos das raízes foram coradas com tetrazólio para visualização de células bacterianas e nichos por elas ocupados. A termoterapia modificou a predominância das populações bacterianas das sementes de milho, em função do binômio tempo-temperatura. Nos tratamentos 60°C-96h, 70°C-72h e 70°C-96h,

um isolado bacteriano com alta produção de EPS foi predominante. De acordo com o ensaio de densidade óptica e parâmetros biométricos das plantas, o tratamento de 70°C-72h foi o mais eficiente na redução do microbioma das sementes, apresentando menor dano fisiológico às plântulas comparado ao controle. O tratamento de 60°C-96h foi o mais prejudicial quando colocado em condições normais de casa de vegetação. Este trabalho é pioneiro no estudo de bactérias nativas das sementes aliado ao uso da termoterapia, abrindo novas possibilidades para estudos e aplicações biotecnológicas com isolados bacterianos resistentes a altas temperaturas e com grande produção de EPS, característica desejável em bioinsumos para condições de estresse hídrico.

Palavras-chave: Ecofisiologia microbiana, microbioma, bactérias endofíticas.

ABSTRACT

Cyríaco, Beatriz Elisa Barcelos, State University of Norte Fluminense Darcy Ribeiro, July 30, 2021. Title: Morphotypes predominance of native seed bacteriome and maize seedlings acclimatization (*Zea mays* L.) in response to dry heat treatment. Advisor: Prof. Dr. Fabio Lopes Olivares.

The study of the seed microbiome has been gaining space among plant microbiological research. Bacterial communities can be transmitted horizontally through the environment in which the plant is inserted or vertically through the mother plant. This work aimed to evaluate the effect of dry heat treatment on the native microbiota of maize seeds considering the seedling's physiological quality in response to the proposed times and temperatures. For this, maize seeds (*Zea mays* L. cv. DKB 177) were treated with dry heat at temperatures of 60ºC and 70ºC for 72 and 96 hours. After treatment, the seeds were incubated in BOD for seven days and seed vigor was determined by the tetrazolium biochemical test. For quantification of total and diazotrophic bacteria, colony-forming units (CFU) counting and McCraddy Table (NMP) analysis were performed, respectively. The evaluation of biofilm formation was performed using the safranin staining method. The bacterial growth curve was measured by optical density in a liquid medium. The seeds were grown in greenhouse conditions with subsequent evaluation of the plant biometric parameters. Seed DNA was extracted and quantified by qPCR with amplification of the 16S rDNA gene. Segments of roots were stained with tetrazolium to visualize bacterial cells and the niches occupied. Dry heat treatment modified the predominance of bacterial populations in maize seeds as a function of the time-temperature binomial. The treatments 60°C-96h, 70°C-72h and 70°C-96h presented a predominance of a bacterial isolate with high EPS production. According to the optical density assay and plant biometric parameters, the 70°C-72h treatment efficiently reduced the seed microbiome and presented less physiological damage to the seedlings than the control. The 60°C-96h treatment

was the most harmful for plants under standard greenhouse conditions. This work is a pioneer study of native bacteria from seeds combined with the use of thermotherapy, opening new possibilities for biotechnological applications and studies with bacterial isolates resistant to elevated temperatures and high production of EPS, a desirable trait in bio inputs for water stress conditions.

Keywords: Microbiota ecophysiology, microbiome, endophytic bacteria.

Introdução

Uma das maiores biodiversidades do planeta compreende seres que não são identificados a olho nu, mas estão presentes em sua maioria no solo: os microrganismos. Também chamado de microbioma, um grande grupo composto por bactérias, fungos, arqueas, vírus e protozoários que vivem em comunidade interagindo entre si e com o ambiente em que se encontram, participam ativamente dos ciclos biogeoquímicos e, consequentemente, dão suporte à vida macroscópica (Jansson & Hofmockel, 2020). O estudo de microrganismos se tornou peça fundamental no que tange às práticas sustentáveis de cultivo e conservação do solo, uma vez que há necessidade em modificar o manejo convencional, criando alternativas para reduzir o uso de fertilizantes minerais na agricultura, mantendo a alta produtividade diante do aumento da população e das mudanças climáticas (Compant et al., 2019).

Estudos envolvendo microbiomas vegetais em sistemas de produção vegetal têm dado ênfase a comunidades microbianas nativas do solo que colonizam a rizosfera, região do solo com intensa atividade microbiana que circunda as raízes das plantas. Esta região apresenta diferenças em sua microfauna de acordo com a espécie vegetal, genótipos da planta, o tempo de plantio e as técnicas de manejos agrícolas implementadas, como rotação de culturas ou monocultivo (Compant et al., 2019; Donn et al., 2014). A partir da exsudação de uma gama de metabólitos radiculares primários e secundários, ocorre o chamado efeito rizosfera, que modula a comunidade microbiana desta região (Guyonnet et al., 2018; Compant et al., 2019).

Um grupo de microrganismos que também podem se associar às plantas, porém pouco explorados na literatura são os microrganismos residentes das sementes. Estes microrganismos interagem com as plantas principalmente em seu estágio inicial, podendo permanecer nos estágios vegetativos subsequentes (Hardoim et al. 2015). Isto pode ser explicado pela ubiquidade destes seres e a capacidade das plantas de fornecerem nichos favoráveis ao seu crescimento

(Nelson, 2017). Por consequência, a microbiota das sementes pode ser herdada da planta-mãe, por transferência vertical, ou pelo ambiente em que a planta está inserida, por transferência horizontal. Esta última pode ser pelo solo, água, agentes dispersantes ou polinizadores, como demonstrado no estudo de Prado et al. (2020) em que houve modulação na estrutura microbiana de flores e sementes de colza após a polinização, com introdução de táxons associados às abelhas.

Uma técnica muito utilizada para o estudo da fração culturável da microbiota das sementes é a desinfestação destas. Com a desinfestação, é possível comparar plantas com microbiota nativa e plantas com microbiota reduzida, no intuito de entender melhor a função destes seres no crescimento e desenvolvimento vegetal. A técnica de desinfestação mais utilizada entre os pesquisadores é o método químico utilizando hipoclorito de sódio (NaOCl), principalmente para desinfestação superficial e estudo de microrganismos endofíticos (Chowdhury et al., 2019).

A termoterapia, já amplamente utilizada no controle de diversos fitopatógenos, surge então como método físico de desinfestação promissor para estudo do microbioma de sementes. O principal foco do presente trabalho é estabelecer um protocolo de termoterapia a seco em que haja uma considerável redução da microbiota nativa de sementes considerando o tratamento que proporcione menores danos fisiológicos à semente. Este é um estudo de base para entendimento da ecologia bacteriana de sementes e possíveis aplicações biotecnológicas com microrganismos isolados no futuro.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Interações planta-bactéria

A microbiota bacteriana pode estabelecer relações simbióticas ou associativas com plantas, com interações de comensalismo, parasitismo ou mutualismo. A interação mutualística é alvo de pesquisas para produtos biotecnológicos, uma vez que os microrganismos se beneficiam dos exsudados vegetais enquanto auxiliam plantas a crescerem e se desenvolverem (Bulgarelli et al., 2013). Um exemplo de simbiose bactéria-planta de grande importância agronômica é a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio, principalmente dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em leguminosas. Esta simbiose ocorre nos nódulos das raízes das plantas, onde bactérias diazotróficas transformam o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3) por meio da enzima nitrogenase, tornando este nitrogênio assimilável para as plantas (Simpson e Burris, 1984). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) representa 80% da fonte de N que supre a grande demanda do nutriente na cultura da soja brasileira, o que representa uma economia nacional de aproximadamente 15 bilhões de dólares por ano (Hungria & Mendes, 2015).

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) podem se associar às plantas epifiticamente, colonizando a superfície vegetal, ou endofiticamente, colonizando o interior da planta. Os mecanismos de promoção de crescimento podem ser diretos e indiretos. Como exemplo de mecanismos diretos, podemos citar: a FBN, solubilização de fosfato, produção de fitormônios reguladores de crescimento vegetal e indução à resistência a fatores abióticos, como estresse hídrico, salino ou por metais pesados. Dentre os mecanismos indiretos, destaca-se a atuação de bactérias no controle biológico como ação antagônica contra fitopatógenos (Vejan et al., 2016; Oliveira et al., 2003).

A bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae* é um exemplo já descrito na literatura como BPCV, colonizando predominantemente gramíneas (Olivares et al., 1996) mas também apresentando resultados positivos na

promoção de crescimento em dicotiledôneas, como no estudo de Leandro et al. (2019). Neste estudo foi observado um incremento significativo em plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas. Curá et al. (2017) demonstraram que a inoculação de *H. seropedicae* em consórcio com *Azospirillum brasilense* foi capaz de mitigar os efeitos de estresse hídrico em plantas de milho, sendo esta última espécie bacteriana já utilizada em inoculantes comerciais.

Diversos microrganismos com potencial biotecnológico são isolados através de metodologias para obtenção da fração culturável da microbiota, como plaqueamento em meio de cultura Nutrient Broth ou meios de cultura específicos para bactérias diazotróficas, como o meio semi-sólido isento de nitrogênio JNFb (Baldani et al., 1992). Técnicas biomoleculares, como análise metagenômica, têm permitido a identificação desta comunidade microbiana, abrangendo também a fração não culturável deste microbioma (Turner et al., 2013).

As interações planta-microrganismos são complexas, difíceis de serem reproduzidas fielmente em laboratório e sempre demandam novas pesquisas para preencherem as lacunas ainda existentes, sendo uma área de grandes possibilidades para novas descobertas que auxiliam no cultivo agronômico sustentável.

1.2. Bactérias nativas de sementes

Sementes ou material propagativo vegetativo podem abrigar uma comunidade microbiana, cujo papel é ainda pouco explorado (Schlaeppi & Bulgarelli, 2015). Segundo Berg & Raaijmakers (2018), a microbiota associada às sementes era desconsiderada, acreditando-se que sementes saudáveis eram estéreis após tratamentos contra fitopatógenos. Com o avanço dos estudos das ômicas nas últimas décadas, pesquisadores têm demonstrado que as sementes possuem uma comunidade microbiana benéfica que pode ser transmitida verticalmente, de geração para geração, ou horizontalmente pelo solo, água, agentes dispersantes ou polinizadores (Nelson, 2017; Berg & Raaijmakers, 2018).

Estas comunidades bacterianas podem exercer papel determinante para o crescimento e desenvolvimento vegetal. As bactérias provenientes das sementes influenciam em todo o ciclo vegetativo, principalmente no momento de maior

vulnerabilidade, entre a germinação até formação das plântulas (Nelson, 2017). Porém, a dificuldade de erradicar totalmente os microrganismos das sementes, principalmente a microbiota endofítica, dificulta a compreensão do papel destes nas plantas. Outro obstáculo no estudo destes microrganismos é que parte da população não é culturável, impossibilitando a realização de diversos experimentos para elucidar sua funcionalidade (Verma et al., 2019).

Verma et al. (2017) demonstraram como bactérias endofíticas de sementes de arroz influenciam não só no crescimento e desenvolvimento das plântulas como no biocontrole do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*. Dentre as espécies bacterianas isoladas nesse estudo estão *Enterobacter asburiae*, *Pantoea dispersa* e *Pseudomonas putida*. Verma et al. (2017) relataram o reestabelecimento dos parâmetros de crescimento das plântulas com a reinoculação destas espécies em sementes desinfestadas (NaOCl 4% e sulfato de estreptomicina).

A utilização de comunidades sintéticas compostas por microrganismos isolados de sementes vem ganhando cada vez mais espaço entre as pesquisas com microrganismos, uma vez que a maior probabilidade de estabelecimento destes na formulação de bioinsumos tem sido considerada. Um recente estudo de Akimoto-Tomiyama (2021) constatou que bactérias isoladas das sementes de arroz, sendo três estirpes da espécie *Pseudomonas putida* e uma estirpe de *Stenotrophomonas maltophilia* controlaram a virulência da bactéria fitopatogênica *Burkholderia glumae*, causadora de podridão de sementes e plântulas de arroz. Verma et al. (2019) relataram que bactérias endofíticas das sementes podem atuar também no processo de aquisição de nutrientes pela relação de parte dessa comunidade com a rizosfera. Grande parte das pesquisas tem identificado o bacterioma das sementes, mas estudos sobre sua função nas plantas ainda são escassos. A aplicabilidade biotecnológica destas comunidades surge então como área de estudo promissora nos próximos anos.

1.3. O desafio das sementes “germ-free"

Métodos físicos, químicos e biológicos são empregados no controle de microrganismos em sementes, como fungos e bactérias, com o objetivo de diminuir ou erradicar um determinado grupo de patógenos. Estas técnicas podem

ser aplicadas não somente para controle fitossanitário, mas também no estudo da funcionalidade da microbiota da semente, uma vez que permite a comparação entre sementes desinfestadas e não desinfestadas e a aclimatação de plantas a essas condições. Verma & White (2017) isolaram bactérias endofíticas de sementes de milheto que se apresentaram fundamentais na germinação quando removidas das sementes por ação de antibiótico, identificando as espécies *Curtobacterium* sp*., Microbacterium* sp*., Methylobacterium* sp*.* e *Bacillus amyloliquefaciens*, apresentando características de promoção de crescimento vegetal como produção de compostos indólicos, solubilização de fosfato e controle biológico do fungo *Fusarium oxysporum*.

No estudo de Santos et al. (2021b) foi constatada uma redução na velocidade de germinação em sementes de milho tratadas com hipoclorito NaClO 1,25% por 30 min, com redução da população de bactérias residentes associadas a radícula de sementes germinadas e aumento na diversidade bacteriana quando comparada com sementes do mesmo genótipo não desinfestadas. Foi observada maior colonização bacteriana nas sementes não desinfestadas, com formação de biofilmes. A recomposição parcial do microbioma culturável da semente de milho, foi capaz de reverter o fenótipo de redução da velocidade de germinação, bem como exerceu papel de biocontrole sobre um fungo do gênero *Penicillium* (Santos et al., 2021b).

A termoterapia é um método físico de desinfestação, podendo ser realizado em semente em ambiente úmido ou seco. Este método consiste em submeter as sementes a diferentes temperaturas por diferentes intervalos de tempo. É alternativa de redução de populações microbianas, tanto epifíticas como endofíticas, e que não deixa resíduos potencialmente tóxicos (Santos et al., 2016). Segundo Menten (1995), o tratamento de termoterapia úmida, em que dispõe as sementes em água quente ou vapor, pode causar danos à fisiologia das sementes como o rompimento do tegumento, comprometendo sua viabilidade.

Mendes et al. (2001) compararam tratamentos térmicos úmido e seco para erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa, tendo redução na taxa de germinação com o tratamento úmido enquanto o tratamento seco eliminou o fungo sem comprometer a viabilidade das sementes. Silva et al. (2002) demonstraram a eficiente erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

em sementes de tomate por termoterapia a seco nas condições de 70ºC por 96 horas sem comprometer a germinação das sementes.

Neste cenário, o método de termoterapia se apresenta como coadjuvante no estudo da influência do microbioma bacteriano de sementes no crescimento e desenvolvimento vegetal uma vez que a redução do microbioma por meio da termoterapia a seco se dá não apenas para fitopatógenos como também para a microbiota benéfica.

2. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento de termoterapia na microbiota nativa de sementes de milho (*Zea mays* L.) cv. DKB177 concomitante à germinação e desenvolvimento inicial das plântulas em resposta aos tempos e temperaturas propostos.

2.1. Objetivos específicos

- Analisar viabilidade e vigor das sementes após o tratamento termoterápico;
- Quantificar níveis populacionais de bactérias em sementes e plântulas cultivadas em condições axênicas;
- Avaliar o efeito do tratamento térmico sobre o microbioma das sementes através de técnicas de microscopia;
- Avaliar a influência da redução do microbioma na germinação e desenvolvimento vegetal em condições axênicas;
- Analisar o desenvolvimento das plântulas de milho tratadas e crescidas em casa de vegetação.

3. Material e Métodos

3.1. Teste de germinação

Sementes de milho (*Zea mays* L.) cv. DKB 177 foram tratadas por meio de termoterapia a seco. Foi aplicado um pré tratamento em estufa a 35 ºC por 48 horas. Posteriormente foram transferidas para estufas nas temperaturas de 60ºC e 70ºC, nos intervalos de tempo de 72h e 96h, sendo estes critérios adaptados a partir do estudo de Silva et al. (2002). Neste processo as sementes foram mantidas em recipiente de vidro vedado com algodão para manter as condições axênicas para posterior análises. Após o tratamento, as sementes foram embebidas de duas maneiras: (1) em papel filtro autoclavado umedecido com 2,5x o peso do papel de água destilada autoclavada e (2) por imersão em água destilada autoclavada por 5 horas. Após embebição, um total de 12 sementes foram dispostas em placas de petri grandes (150 mm de diâmetro) com meio de cultura ágar-água 0,5% para germinação, com 5 repetições para cada tratamento, sendo incubadas em BOD com temperatura a 30ºC e fotoperíodo de 12/12 horas por 7 dias. Foi realizada a contagem diária de sementes germinadas (com radícula maior que 0,5 cm) com a finalidade de calcular a porcentagem de germinação (% G), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) (Maguire, 1962; Borghetti & Ferreira, 2004). Foram avaliadas massa fresca e seca de parte aérea e massa fresca e seca das raízes das plântulas.

O tempo médio de germinação foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\bar{t} = \sum n_i \, . \, t_i \, / \sum n_i$$

Onde:

n_i = número de sementes germinadas;

t_i = tempo em dias em que foi realizada a contagem

O índice de velocidade de germinação (IVG), através da contagem diária das sementes e calculado pela fórmula:

$$IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \ldots G_n/N_n$$

Onde:

G_n = número de sementes germinadas

N_n = número de dias de incubação em BOD

A VMG foi calculada pelo inverso do tempo médio de germinação, com a fórmula:

$$\bar{v} = 1 / \bar{t} = \sum ni / \sum ni.ti$$

3.2. Determinação de umidade das sementes

A porcentagem de umidade das sementes de milho foi determinada pelo método descrito pelas Regras de Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009). As sementes foram dispostas em sacos de papel previamente pesados, distribuídas em 4 repetições de 25 sementes e colocadas em estufa a 105ºC por 24 horas para avaliar a umidade total das amostras sem tratamento e umidade após cada tratamento de termoterapia. A porcentagem de umidade foi então calculada pela fórmula:

$$\text{\% de Umidade (U)} = \frac{100\,(P-p)}{P-t}$$

Onde:

P = Peso inicial da amostra em recipiente

p = Peso final da amostra em recipiente

t = Tara, peso do recipiente

3.3. Teste de vigor das sementes

O vigor das sementes foi avaliado através do teste bioquímico de tetrazólio de acordo com as RAS (Brasil, 2009). As sementes foram submetidas a um pré-umedecimento entre papel por 18h a 25ºC, passaram por bissecção longitudinal ao longo do embrião e foram coradas com solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio 0,1% por 3 horas a 30ºC. Estas então foram lavadas e mantidas em água destilada até a visualização das superfícies coradas em estereomicroscópio de luz acoplado a uma câmera digital (Zeiss Stemi SV 11) utilizando o aumento de 1,0x. Foram consideradas viáveis as sementes com área máxima de tecido não corado, flácido ou necrosado na raiz primária e até 1/3 das extremidades do escutelo. Foram analisadas 5 sementes por repetição, com 5 repetições de cada tratamento.

3.4. Quantificação bacteriana

Foram testados três métodos: sem embebição prévia das sementes, com embebição em água destilada estéril com imersão das sementes por 5 horas e embebição entre papel filtro por 48h a 25°C (até a protusão de radícula de todas as sementes). Sementes e radículas de plântulas tratadas e germinadas após 7 dias em condições axênicas foram maceradas em 9mL de solução salina NaCl 0,85%. Foram realizadas diluições seriadas nas concentrações 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, sendo pipetadas alíquotas de 100 µL em meio semi-sólido JNFb (Baldani et al., 1992) para cultivo de bactérias fixadoras de nitrogênio, com a quantificação dos níveis populacionais expressa pelo número mais provável, consultando a tabela de McCrady. Bactérias totais foram cultivadas utilizando meios ricos Nutrient Broth (8 g de caldo nutritivo, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada), com sua população sendo estimada pelo cálculo de UFC (Unidades formadoras de colônia).

3.5. Formação de biofilme

Para avaliação de formação de biofilme, o isolado bacteriano de sementes que passaram pelos tratamentos de 70°C 72h e 70°C 96h foi crescido em meio NB líquido por 48h em shaker a 30°C e 170 rpm como pré-inóculo. Deste, uma

alíquota de 20µL foi transferida para meio líquido NB contendo 0,1g de lã de vidro (Sigma-Aldrich) e incubado em shaker nas condições já descritas. Após 48h, a lã de vidro foi transferida para placas de Petri e corada com solução de safranina 1% por 30 minutos. Após lavagem em água destilada por 3 vezes, a lã de vidro corada foi transferida para uma lâmina e as imagens do biofilme observadas em microscópio óptico Zeiss Axioplan com uma câmera AxioCam acoplada.

3.6. Curva de crescimento bacteriano

Sementes de milho tratadas e não tratadas por termoterapia foram dispostas em papel filtro umedecido com 2,5 vezes o peso do papel de água destilada autoclavada e mantidas em placas de petri 150mm em BOD a 25°C por 48 horas. Após esse período, as sementes que apresentaram protrusão de radícula foram dispostas em meio líquido NB (Nutrient Broth), sendo 1 semente por repetição, 5 repetições para cada tratamento e utilizado apenas o meio NB como branco (controle). Alíquotas de 100 µL foram transferidas para placas de 96 poços nos intervalos de 4, 6 e 12 horas, até 128 horas de incubação em shaker a 30°C e 170 rpm. O crescimento bacteriano foi medido através dos valores de absorbância em espectrofotômetro Hidex Chameleon Multilabel Detection Platform a 600nm analisados pelo programa MikroWin 2000.

3.7. Cultivo em casa de vegetação

O experimento foi instalado em casa de vegetação, com sementes tratadas e não tratadas (controle) embebidas por 48h em papel germitest e dispostas em tubetes de 280 cm^3 preenchidos com substrato comercial Basaplant® não autoclavado. O substrato utilizado apresenta as seguintes propriedades físico-químicas: pH (4,9); N (g/Kg): 5,04; P (g/Kg): 3,77; K (g/Kg): 2,10; Ca (g/Kg): 5,20; Mg (g/Kg): 0,40; C (g/Kg): 249,6; S (g/Kg): 0,54; Fe (mg/Kg): 8855; Cu (mg/Kg): 26; Zn (mg/Kg): 90; Mn (mg/Kg): 182; B (mg/Kg): 104,80; U (%): 30,64. Após 13 dias em casa de vegetação, foram avaliados os parâmetros biométricos das plantas, como comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e diâmetro do colmo, massa fresca e seca de parte aérea e massa fresca e seca de raiz.

3.8. Extração de DNA e amplificação do gene 16S rDNA por qPCR

As sementes tratadas e controle foram maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C para posterior extração do material genético vegetal. Para a extração do DNA total das amostras, foi utilizado o método CTAB (Doyle & Doyle, 1990), sendo quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific. A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada por qPCR, utilizando os primers 926F (5'-AAACTCAAAKGAATTGACGG-3') e 1062R (5'-CTCACRRCACGAGCTGAC-3') com os componentes da reação de PCR sendo 7,5 µL de SYBR green buffer contendo taq polymerase, 0,5 µL de cada primer, 100 ng do DNA molde e água até completar o volume de 15 µL (De Gregoris, et al. 2011). As condições de amplificação foram: 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto em StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A quantificação bacteriana foi calculada de acordo com o CT (cycle threshold) utilizando curva padrão.

3.9. Microscopia óptica de campo claro

Após sete dias de crescimento em BOD, segmentos de aproximadamente 1cm das raízes foram coradas com 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio 0,1% por 2 horas. Subsequentemente foi feita a imersão destes seguimentos em hidróxido de potássio (KOH 2,5%) por 40 minutos para redução da coloração dos tecidos vegetais e melhor visualização de células bacterianas e nichos por elas ocupadas nas raízes. Os segmentos de raízes corados foram dispostos em lâmina com água destilada para visualização em microscópio óptico Zeiss Axioplan com câmera AxioCam acoplada.

4. Resultados e Discussão

As sementes de milho que foram previamente tratadas por termoterapia e embebidas por imersão em água destilada apresentaram um comprometimento na germinação de acordo com maiores temperaturas e tempos testados (Figura 1). Esta metodologia foi utilizada com sucesso em estudos anteriores do nosso grupo por ocasião de desinfestação química com hipoclorito de sódio (Santos et al. 2021a,b), não se demonstrando adequada para estudos envolvendo tratamento térmico de sementes de milho.

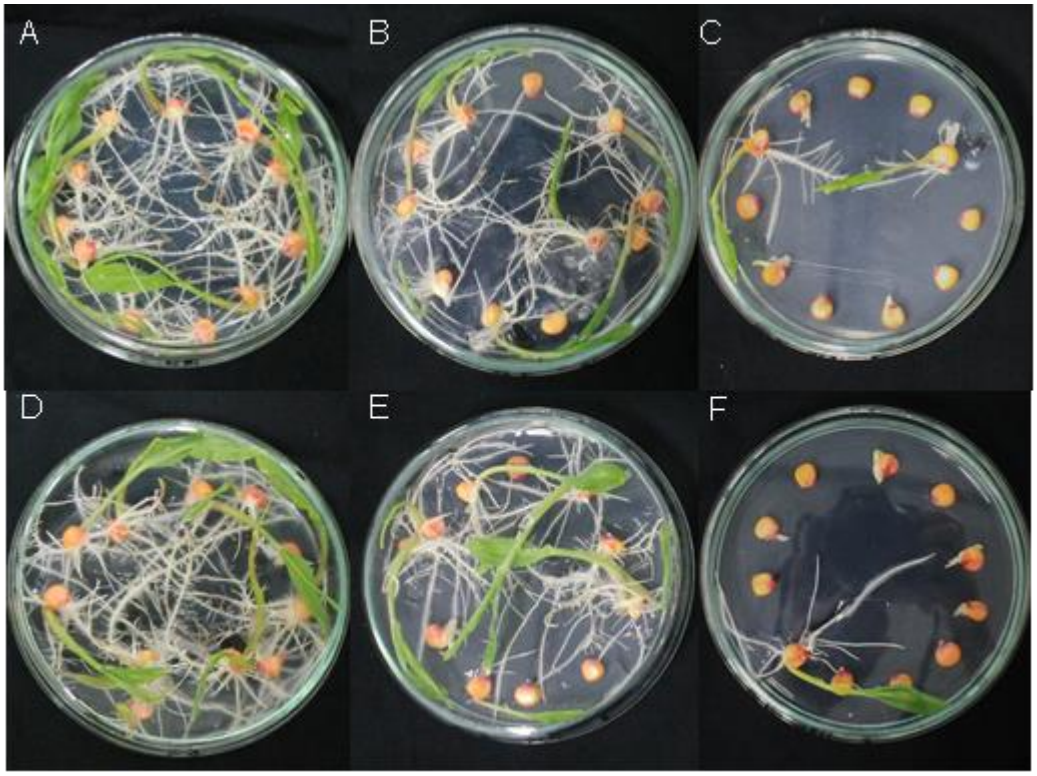


Figura 1. Plântulas de milho embebidas por imersão em água destilada e germinadas em meio ágar-água 0,5% por 5 dias a 30°C em BOD. As letras na figura correspondem aos seguintes tratamentos: A e D – Controle; B – 60°C 72h; C – 60°C 96h; E – 70°C 72h; F – 70°C 96h.

Este fenótipo foi contornado quando foi realizada a embebição entre papel filtro, onde a semente pôde absorver a água mais lentamente e assim não ter sua germinação comprometida após o tratamento termoterápico (Figura 2).

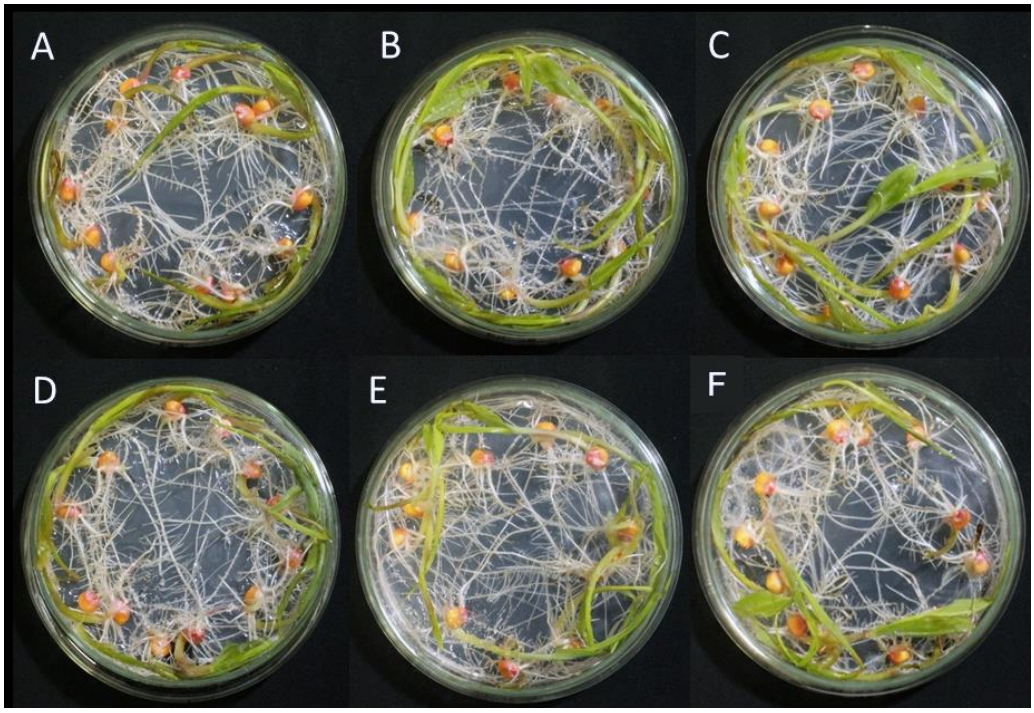


Figura 2. Plântulas de milho embebidas em papel filtro e germinadas em meio ágar-água 0,5% por 7 dias a 30°C em BOD. As letras na figura correspondem aos seguintes tratamentos: A e D – Controle; B – 60°C 72h; C – 60°C 96h; E – 70°C 72h; F – 70°C 96h.

A embebição é uma fase muito importante no processo germinativo. De acordo com Bewley et al. (2013), o gradiente de potencial hídrico quando uma semente seca entra em contato com a água é muito alto, tendo um fluxo hídrico muito intenso. Segundo os autores, quando este fluxo é rápido demais pode ocorrer danos fisiológicos às sementes, com perda da integridade celular. Esta pode ser uma explicação para a diminuição drástica de germinação das sementes que foram embebidas por imersão após termoterapia.

Marinho et al. (2020) testaram diferente métodos de embebição para milho doce, comparando diferentes volumes de água em papel filtro e imersão em água. Neste estudo, foi demonstrado que um volume de até mesmo 0,5 mL de água a mais no papel filtro interferiu nos resultados de germinação, tendo seu volume

ótimo em 2,5 mL de água, volume também indicado pelas RAS (Brasil, 2009). No estudo de Marinho et al. (2020), as sementes embebidas em papel filtro apresentaram menor condutividade elétrica que as embebidas por imersão, indicando melhor qualidade destas sementes. O método de embebição entre papel filtro foi então repetido e os resultados de germinação apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Média ± desvio padrão para parâmetros de germinação, sendo: G% - porcentagem de germinação, TMG - tempo médio de germinação em dias, IVG - índice de velocidade de germinação e VMG - velocidade média de germinação em dias.

Dados médios de germinação				
Tratamento	G%	TMG	IVG	VMG
Controle	100.0 ± 0.00 [a]	1.0 ± 0.00 [b]	12.0 ± 0.00 [a]	1.0 ± 0.00 [a]
60°C-72h	100.0 ± 0.00 [a]	1.28 ± 0.13 [ab]	10.37 ± 0.79 [ab]	0.79 ± 0.08 [b]
60°C-96h	96.67 ± 4.56 [ab]	1.60 ± 0.06 [a]	8.17 ± 0.37 [b]	0.63 ± 0.02 [b]
70°C-72h	96.67 ± 4.56 [ab]	1.36 ± 0.20 [ab]	9.57 ± 1.15 [b]	0.75 ± 0.11 [b]
70°C-96h	90.00 ± 6.97 [b]	1.49 ± 0.37 [a]	8.27 ± 2.20 [b]	0.71 ± 0.19 [b]

Tratamentos com letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para valores de porcentagem de germinação de sementes (G%), o tratamento de 60°C-72h apresentou porcentagem de 100% assim como o controle. Os demais tratamentos tiveram a porcentagem de germinação reduzida, porém apenas 70°C-96h apresentou diferença significativa, com 90% das sementes germinadas. Quanto ao tempo médio de germinação, houve diferença significativa para os tratamentos de 60°C-96 h e 70°C-96h em relação aos demais, sendo estes os tratamentos em que as sementes demoraram mais tempo para germinar.

Os tratamentos 60°C-96 h e 70°C-96h apresentaram os menores valores para índice de velocidade de germinação (IVG), com grande diferença

significativa em relação ao controle. Todos os tratamentos apresentaram diferença significativa para velocidade média de germinação (VMG) em relação ao controle, com o tratamento 60°C-96 h apresentando menor velocidade de germinação em relação aos demais tratamentos. A redução dos parâmetros de germinação pode estar relacionada à diminuição da microbiota nativa com os tratamentos termoterápicos propostos. Em um estudo de Holland (2016) com bactérias PPFM (Pink-Pigmented Facultatively Methylotrophic) do gênero *Methylobacterium*, foi utilizado o método de termoterapia a 50°C por 48h para redução destes microrganismos em sementes de soja. Neste trabalho foi constatada uma redução na germinação e na velocidade no desenvolvimento das plântulas, o que foi contornado quando foram reinoculadas as bactérias PPFM em sementes tratadas.

No trabalho de Santos et al. (2021a), após desinfestação de sementes de milho com hipoclorito de sódio 1,25%, foi relatada uma redução bacteriana, principalmente bactérias do gênero *Burkholderia*, com consequente diminuição na porcentagem e velocidade de germinação. Com parcial recomposição da microbiota das sementes, Santos et al. (2021a) observaram que os parâmetros de germinação tiveram incremento significativo, com porcentagem de germinação se equiparando ao controle.

Após cada tratamento de termoterapia, as sementes foram pesadas e sua porcentagem de umidade calculada com valores médios definidos na Tabela 2. O teor de umidade inicial das sementes foi definido pelo método de estufa a 105°C, apresentando valor médio de 12.38% de umidade.

Tabela 2. Teor de umidade das sementes com e sem tratamento termoterápico em porcentagem.

Tratamento	Teor de Umidade (%)
Controle	12,38
60°C-72h	9.61
60°C-96h	9.69
70°C-72h	8.25
70°C-96h	9.38

Foram mensuradas as massas frescas e secas da parte aérea e raiz das plântulas crescidas em condições axênicas em BOD após 7 dias. Para valores de massa seca de raiz, houve diferença significativa do tratamento 70°C 96h em relação ao controle, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Figura 3). Os demais parâmetros não apresentaram diferença estatística.

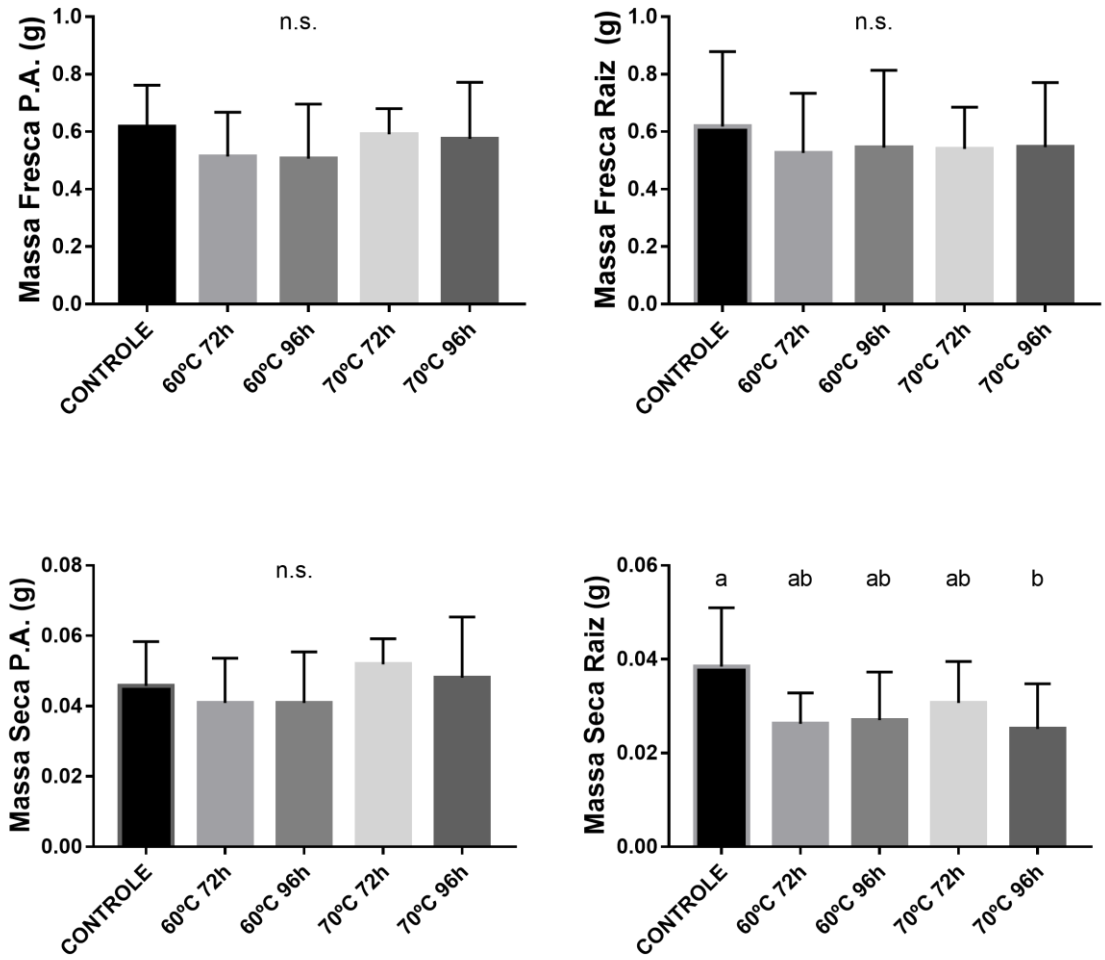


Figura 3. Massa seca e fresca de parte aérea e raiz (g) de plântulas de milho crescidas em placa de petri 150mm em BOD por 7 dias. Tratamentos com letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, sendo n.s. - parâmetro que não apresentou diferença significativa. Barras acima de cada valor representando erro padrão.

Para verificar viabilidade e vigor das sementes após os tratamentos de termoterapia, foi realizado o teste bioquímico de tetrazólio, que consiste na

imersão das sementes em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, que reage com os íons de H^+ liberados na respiração das células, colorindo os tecidos vivos na forma de um composto de cor avermelhada chamado formazona (Brasil, 2009). Foram avaliadas 5 sementes por repetição, com 5 repetições de cada tratamento, e todas se apresentaram viáveis e vigorosas. O tratamento de 70°C 96h apresentou a extremidade inferior do escutelo pouco corada, porém não ultrapassou o limite determinado de até 1/3 das extremidades desta região sem a coloração avermelhada (Figura 4), sendo qualificada, junto aos outros tratamentos, como sementes viáveis e vigorosas.

Figura 4. Sementes com bissecção longitudinal através do embrião e endosperma. As letras na figura correspondem aos seguintes tratamentos: A – Controle; B - 60°C 72h; C - 60°C 96h; D - 70°C 72h; E - 70°C 96h. Todos os tratamentos com embrião e escutelo corados. Na figura E, tratamento 70°C 96h, a extremidade do escutelo apresenta-se pouco corada, porém não ultrapassa o limite de 1/3 da região.

Para contagem da fração culturável bacteriana, foram testados os seguintes métodos: sem embebição prévia das sementes, com embebição por imersão de 5 horas e com embebição entre papel. Primeiro foi avaliada a contagem sem embebição das sementes e não foi possível considerar os valores pois o resultado foi menor que 100 $UFC.mL^{-1}$ para todos os tratamentos. Foi testada então a contagem de bactérias totais das sementes após imersão em água destilada autoclavada por 5 horas. Houve crescimento bacteriano em todos os tratamentos, variando de 10^5 a 10^7 $UFC.mL^{-1}$. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5). Após germinação em BOD das sementes embebidas por imersão, foi realizada contagem de bactérias totais das raízes das

plântulas e apenas o tratamento 60°C 72h apresentou crescimento bacteriano em placa com 10^8 UFC.mL^{-1}.

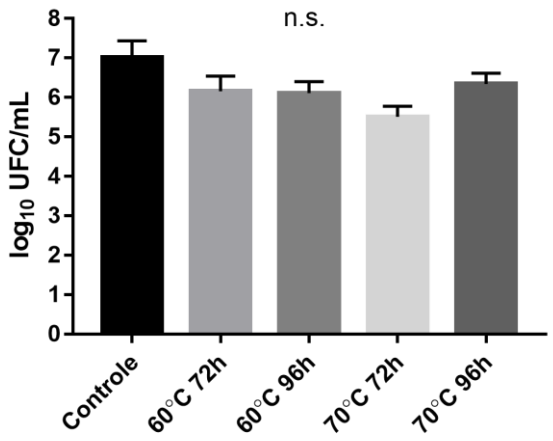


Figura 5. Contagem bacteriana pelo cálculo de UFC (Unidade Formadora de Colônia) das sementes embebidas por imersão em água destilada. Barras acima de cada valor representando erro padrão, sendo n.s. - não apresentou diferença significativa.

Foi realizada a contagem de bactérias totais e diazotróficas para as sementes embebidas entre papel e para plântulas após 7 dias em BOD (Figura 6). A contagem de bactérias das sementes em meio sólido NB apresentou valores médios de 10^4 UFC.mL^{-1} para Controle, 10^7 UFC.mL^{-1} para 60°C-72h, 10^6 UFC.mL^{-1} para 70°C-72h e 10^2 UFC.mL^{-1} para 60°C-96h e 70°C-96h. Os tratamentos 60°C-72h e 70°C-72h apresentaram valores maiores de UFC/mL em relação ao controle na contagem das sementes enquanto, na contagem bacteriana das raízes, os tratamentos 60°C-96h e 70°C-96h apresentaram maior crescimento bacteriano em placa.

Santos et al. (2020), na tentativa de isolar novamente e contar colônias bacterianas de *Azospirillum brasilense* inoculadas em sementes de milho, não tiveram sucesso utilizando o método de obtenção inicial de diluição 10^0 com solução salina 0,85%. Neste estudo, também foi constatada a importância da embebição das sementes de milho por pelo menos 2 horas e a necessidade de obter a diluição 10^0 utilizando água destilada ou meio DYGs antes da diluição seriada com solução salina 0,85%. A hipótese de Santos et al. (2020), que poderia explicar a dificuldade de isolamento a partir das sementes no presente

estudo, é que a solução salina poderia contribuir para a manutenção de agregação ou floculação de células bacterianas em situação de estresse hídrico pelo baixo teor de umidade das sementes, dificultando assim o cultivo de colônias em placa de petri e consequente cálculo de UFC.mL^{-1}.

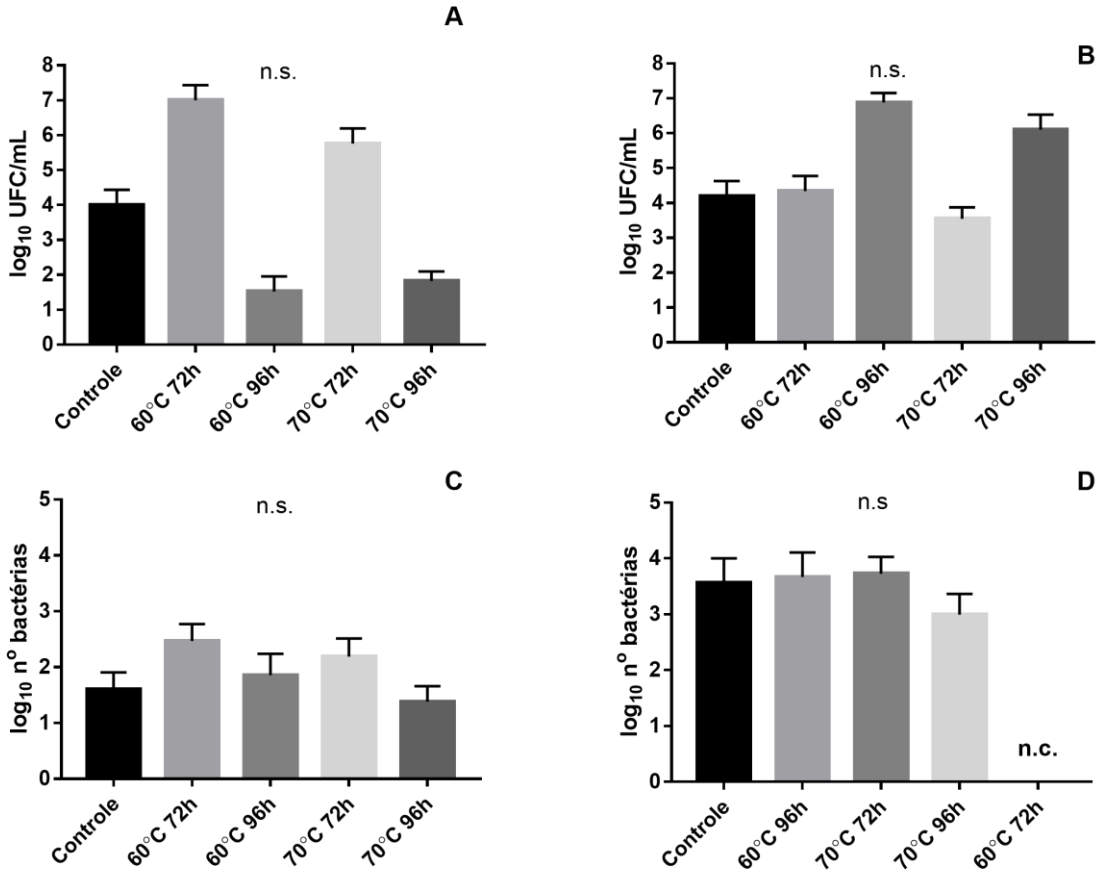


Figura 6. A e B - Contagem de bactérias totais pelo cálculo de UFC (Unidade Formadora de Colônia) das sementes embebidas em papel filtro (A) e em 1g de raízes das plântulas (B); C e D – contagem de bactérias diazotróficas pelo NMP (Número Mais Provável) das sementes (C) e em 1g de raízes das plântulas (D). Tratamento 60°C-72h na Figura D (n.c.) não apresentou formação de película aerotáxica em nenhuma repetição. Barras acima de cada valor representando erro padrão, sendo n.s. - não apresentou diferença significativa

Os tratamentos 60°C-96h, 70°C-72h e 70°C-96h apresentaram crescimento de isolados bacterianos de sementes muito parecidos, com colônias translúcidas e bordas irregulares o que dificultou a contagem. O isolado bacteriano do

tratamento 70°C-72h foi disposto em lâmina para visualização por microscopia óptica de contraste de fase (Figuras 7 A e B). Foram observadas células no formato de bastões, formando grandes agregados bacterianos envoltos por uma matriz, característico de bactérias formadoras de biofilme (Figura 7 C). A formação de biofilme foi então confirmada com o crescimento do isolado em meio NB líquido contendo de lã de vidro o qual foi corada com solução de safranina 1% para então ser visualizada por microscopia óptica de campo claro (Figura 7 D).

Os grupos bacterianos formadores de biofilme produzem substâncias poliméricas extracelulares (EPS), como polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, que constituem a matriz que envolve estes agregados, promovendo coesão celular e adesão às superfícies (Flemming & Wingender, 2010). A capacidade em formar biofilme vem sendo estudada como característica em bactérias promotoras do crescimento vegetal, uma vez que o biofilme apresenta funções como manutenção da estrutura dos agregados bacterianos, maior estabilidade e comportamento coordenado bacteriano, sorção e ciclagem de nutrientes e retenção de água, esta última sendo importante em pesquisas com interações benéficas para resistência de plantas à seca (Flemming & Wuertz, 2019; Caddell et al., 2019).

Niu et al. (2018) isolaram bactérias de painço, planta resistente a estresses hídricos, em que foram identificadas como *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter hormaechei*, e *Pseudomonas migulae*. Estes isolados se apresentaram como produtores de ACC deaminase e EPS. A estirpe isolada de *P. fluorescens* neste estudo teve os maiores valores de produção de exopolissacarídeos, colonizando o solo rizosferico e aumentando a umidade do solo em condições de estresse hídrico.

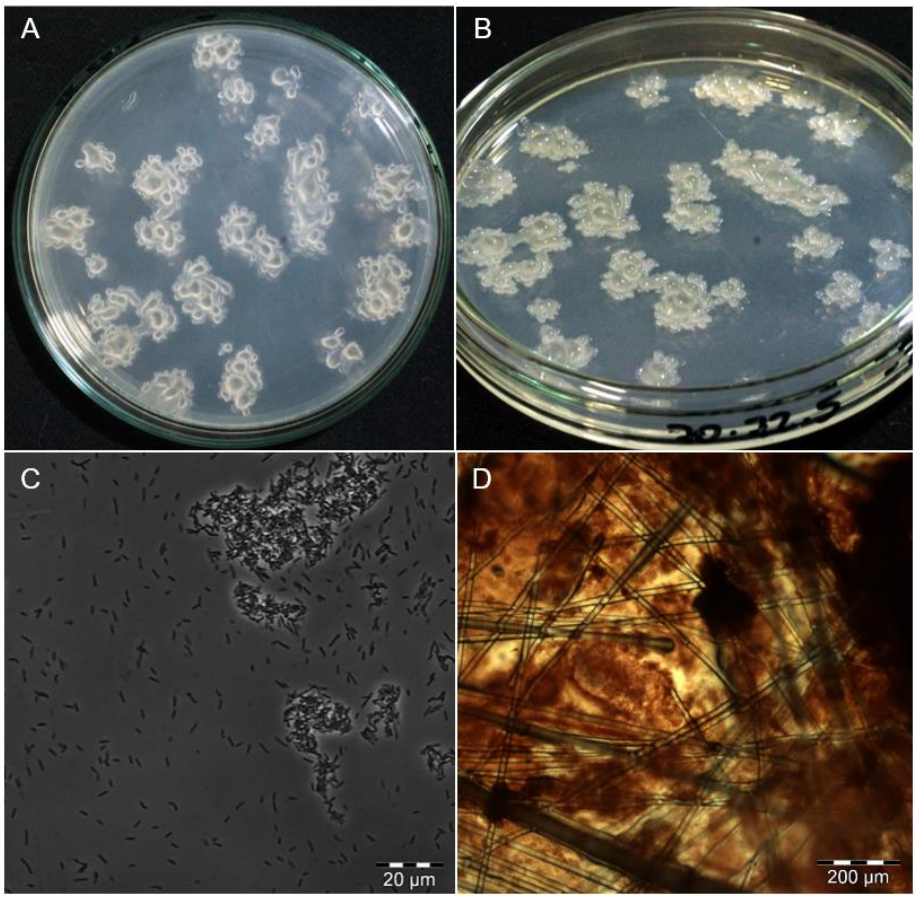


Figura 7. A e B – Colônias bacterianas do tratamento 70°C-72h em placa de petri contendo meio sólido NB. C – Microscopia de contraste de fase apresentando agregados bacterianos com células formato bastão envoltos por matriz de exopolissacarídeos. D – Intensa produção de biofilme bacteriano em lã de vidro, corado com safranina após incubação por 48h em shaker.

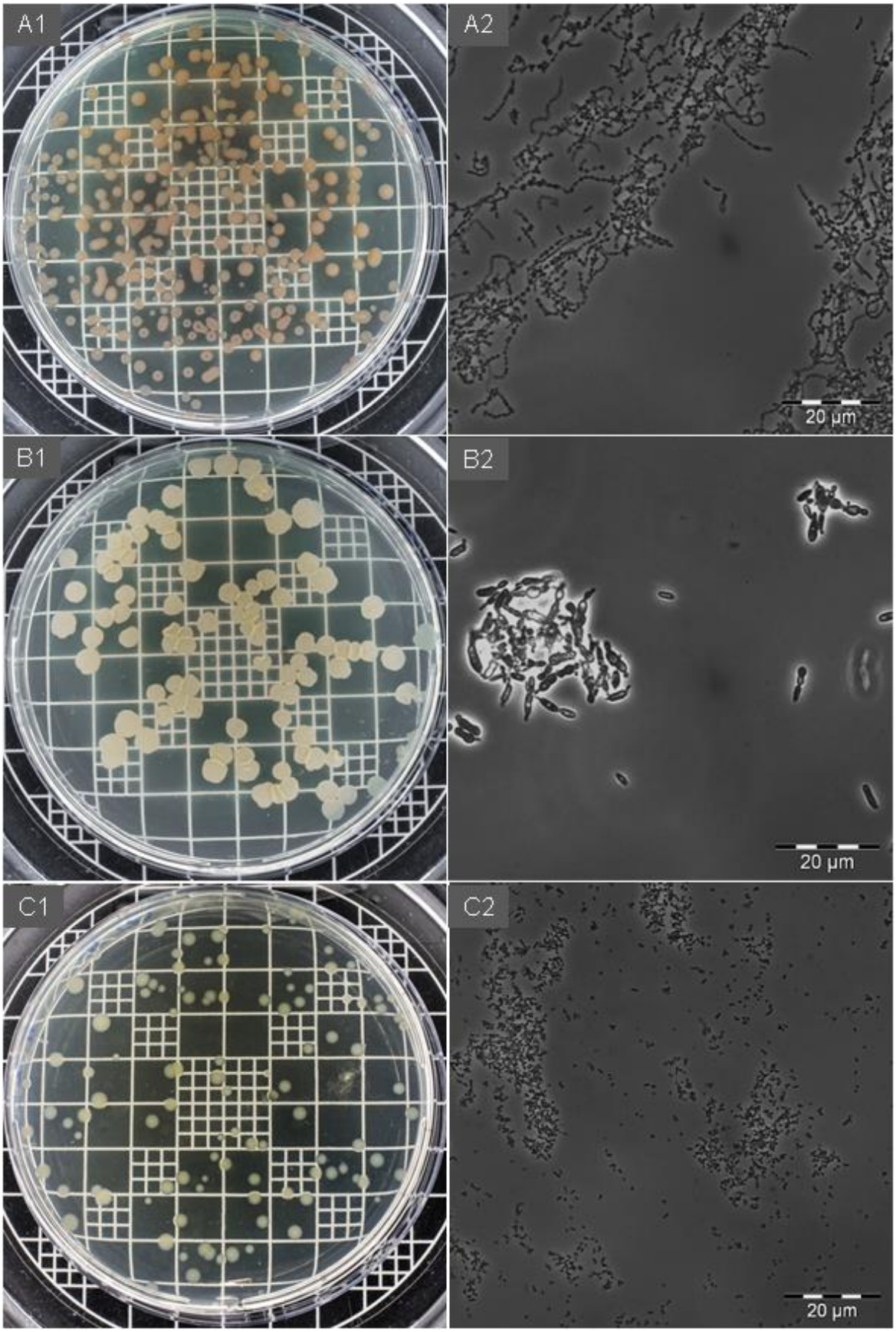
Os isolados bacterianos das raízes, ao contrário dos isolados da semente, apresentaram grande diferença morfológica de acordo com cada tratamento (Figura 8). Foi possível identificar, por meio de microscopia de contraste de fase, isolados com formato celular de estreptococos no controle, cocos no tratamento 60°C-96h e os tratamentos 60°C-72h, 70°C-72h e 70°C-96h apresentaram estruturas celulares bacterianas parecidas morfologicamente, porém com um gradual crescimento fúngico com o aumento de temperatura e tempo. Podemos notar uma similaridade de colônias nas figuras 8 B1 e D1, esta última com crescimento fúngico e similaridade nas formas celulares nas figuras 8 B2, D2 e E2, esta última não apresentando a colônia bacteriana visível em placa, porém com a presença das células bacterianas visíveis em microscopia. O crescimento

do fungo foi, aparentemente, inversamente proporcional ao crescimento bacteriano, este último sendo reduzido de acordo com maiores tempos e temperaturas utilizados.

Santos et al. (2021b) relataram que, com a remoção parcial do microbioma das sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1,25%, houve maior susceptibilidade das sementes desinfestadas ao fungo do gênero *Penicillium* sp., prejudicando o desenvolvimento das sementes no ensaio de germinação. Neste estudo, foi constatada uma significativa redução de grupos de bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Acinetobacter* e f_Enterobacteriaceae_922761 nas sementes, que poderiam estar atuando como organismos chaves no controle deste fungo nas sementes.

A termoterapia é uma ferramenta já conhecida e eficaz ferramenta no controle fitossanitário de sementes. Vieira et al. (2019) observaram a diminuição de incidência fúngica dos gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. em sementes de milho roxo tratadas por termoterapia úmida. Neste estudo foram testadas as temperaturas de 50, 60 e 70°C por 1, 2 e 3 minutos, com o tratamento de 60°C por 1 e 2 minutos sendo mais eficiente na redução destes microrganismos nas sementes sem comprometer sua viabilidade e vigor. Para além do controle de fitopatógenos, a comunidade microbiana como um todo é influenciada por fatores bióticos e abióticos.

A modulação de comunidades bacterianas de acordo com o fator temperatura vem sendo estudado por diversos grupos de pesquisa, principalmente por causa das mudanças climáticas com o aquecimento global (Santoyo et al., 2017). Os resultados do presente estudo contribuem então para o estudo inicial de como microrganismos da semente de milho respondem a estresses por temperatura, com redução de umidade das sementes, e o isolamento de bactérias produtoras de EPS tem importância na caracterização de bactérias com potencial biotecnológico para produção de bioinoculantes que auxiliem na tolerância vegetal a estresses hídricos e altas temperaturas.


A1
A2
20 µm
B1
B2
20 µm
C1
C2
20 µm

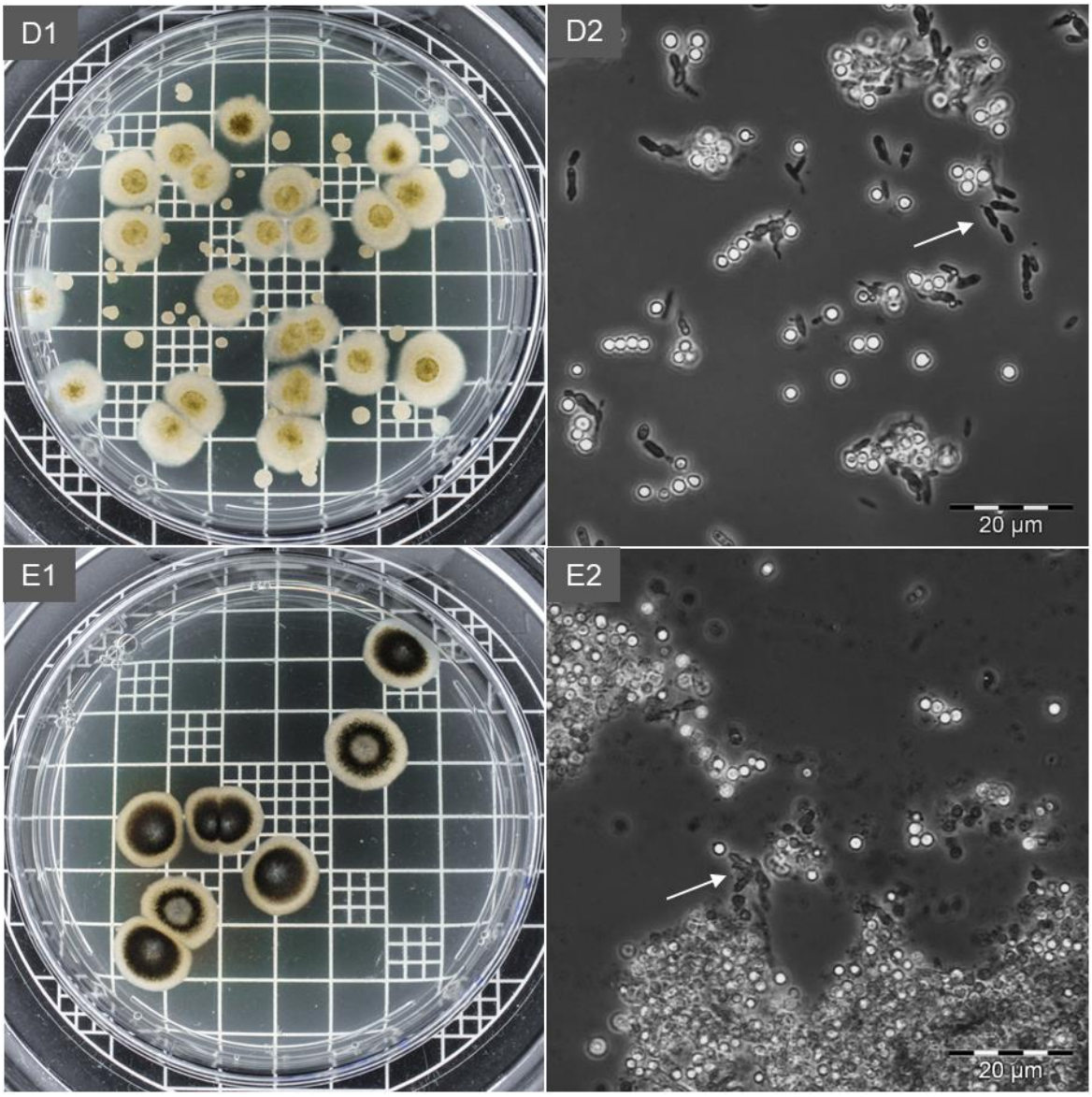


Figura 8. Culturas bacterianas e fúngicas isoladas de raízes das plântulas tratadas e não tratadas (controle) e suas respectivas imagens em microscopia óptica de contraste de fase. A – Controle; B - 60°C 72h; C - 60°C 96h; D - 70°C 72h; E - 70°C 96h.

A curva de crescimento da comunidade bacteriana em sementes imersas em meio líquido e incubadas em agitadores orbitais, após tratamento termoterápico foi obtida pelo incremento da densidade óptica por turbidez do meio de cultura NB líquido, em função das populações de bactérias remanescentes nas sementes. O tratamento 60°C-72h iniciou seu crescimento com 20 horas de incubação, seguido pelas sementes sem tratamento, com 28 horas de incubação. Na figura 9 observa-se o efeito dos tratamentos da termoterapia na microbiota das

sementes, com aparente redução da população bacteriana de acordo com os crescentes tempos e temperaturas utilizados. Os tratamentos mais severos, de 70°C-72h e 70°C-96h, só apresentaram crescimento bacteriano com 58 e 70 horas de incubação, respectivamente. Porém, nos momentos seguintes, estes tratamentos apresentaram um crescimento exponencial em que alcançaram os valores de crescimento dos demais tratamentos. O tratamento 70°C-72h se destacou, ultrapassando os demais a partir de 100 horas de incubação.

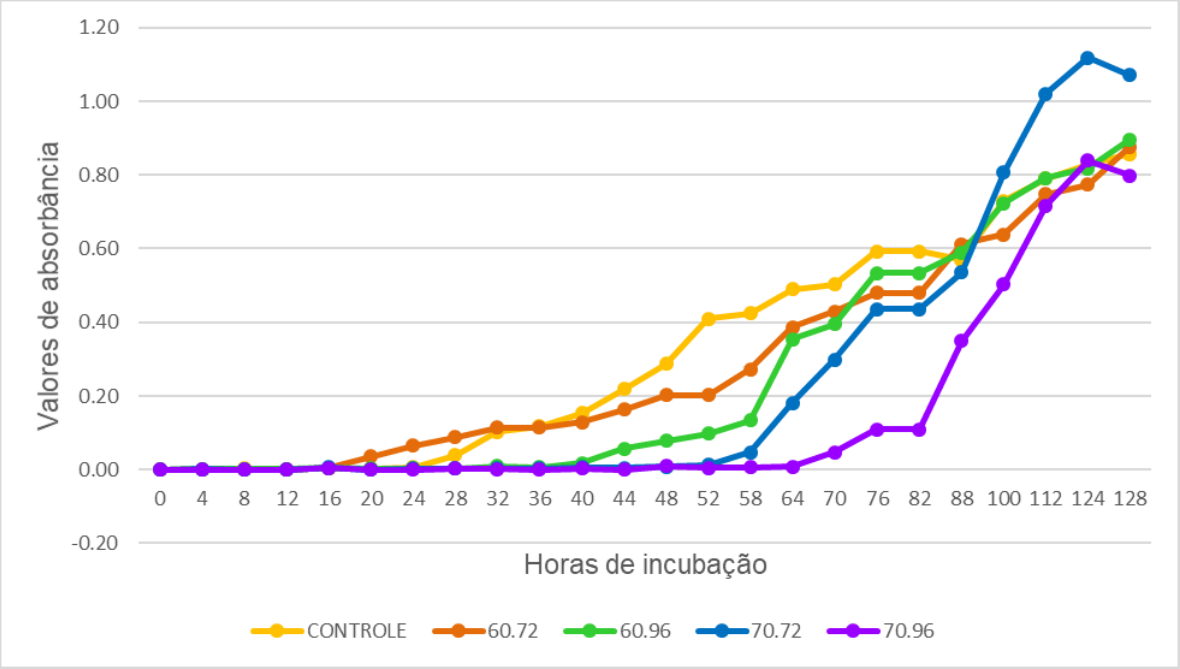


Figura 9. Efeito dos tratamentos de termoterapia no crescimento bacteriano das sementes. Valores de absorbância obtidos em espectrofotômetro em 600 nm;

Ensaios de curva de crescimento podem ser utilizados para analisar o crescimento bacteriano em condições de perturbação de meio, seja por estresse hídrico, salino, temperatura ou metais pesados. Niu et al. (2018) analisaram a curva de crescimento de quatro isolados bacterianos resistentes a estresse hídrico em diferentes potenciais matriciais utilizando PEG 6000 e avaliando por densidade óptica a 600 nm. Os pesquisadores constataram que a espécie *Pseudomonas fluorescens* apresentou maior densidade óptica em condições de -0,05 MPa do que em condições sem estresse aplicado. A amplitude da curva de

crescimento bacteriano foi decaindo de acordo com maiores valores de estresse hídrico, com -0,30 MPa e -0,73 MPa (Niu et al., 2018).

As sementes termicamente tratadas e não tratadas foram cultivadas em casa de vegetação com substrato não autoclavado para avaliação da performance das plantas após redução do microbioma. Após 13 dias de cultivo, foram mensurados os parâmetros biométricos e valores de massa fresca e seca (Figura 10). Os tratamentos 60°C-96h e 70°C-96h apresentaram menor comprimento de parte aérea que os demais tratamentos. Em relação a comprimento de raiz, não houve diferença significativa em relação ao controle, porém o tratamento 70°C-72h apresentou maior valor para este parâmetro, com diferença significativa deste para o tratamento 70°C-96h.

Para diâmetro do colmo, apenas 60°C-72h não teve diferença significativa em relação ao controle, mas apresentou diferença significativa em relação a 60°C 96h, sendo este último tratamento o mais prejudicial para este parâmetro. Para os parâmetros de massa fresca de parte aérea e raiz, os tratamentos 60°C 96h e 70°C 96h os menores valores, com diferença significativa em relação ao controle. Para massa seca de parte aérea, apenas 60°C 96h apresentou menor valor significativo, porém para massa seca de raiz, 60°C 96h, 70°C 96h, 70°C 72h apresentaram menores valores nesta ordem de significância estatística.

Os efeitos do tratamento de termoterapia (seca ou úmida) e o binômio tempo x temperatura a ser empregado varia de acordo com a espécie vegetal a ser trabalhada para que haja desinfestação das sementes com menor dano fisiológico às plântulas. Cardoso et al. (2020) testaram o tratamento de 70ºC por 24, 48, 72 e 96 horas para diminuir a ocorrência do fungo *Alternaria brassicicola* em sementes de couve, porém esta temperatura foi letal para as sementes. Lanna et al. (2018) avaliou a resposta vegetal de sementes de abobrinha ao tratamento por termoterapia também a 70ºC por 24, 48, 72 e 96 horas e constatou que não afetou a germinação nem o vigor das sementes.

Vieira et al. (2019) obtiveram menores valores de comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e massa seca de parte aérea utilizando termoterapia úmida a 60ºC por 2 e 3 minutos em milho roxo. Neste estudo, para valores de massa seca de raiz, os tratamentos a 70ºC por 2 e 3 minutos que foram mais afetados negativamente. Comparando resultados de sementes de milho tratadas

por termoterapia úmida e seca a 60 ºC, Peixoto et al. (2018) constataram que a termoterapia por calor seco foi menos eficiente no controle do fungo *Fusarium* sp. em relação ao tratamento úmido, porém danificou menos a qualidade fisiológica das sementes.

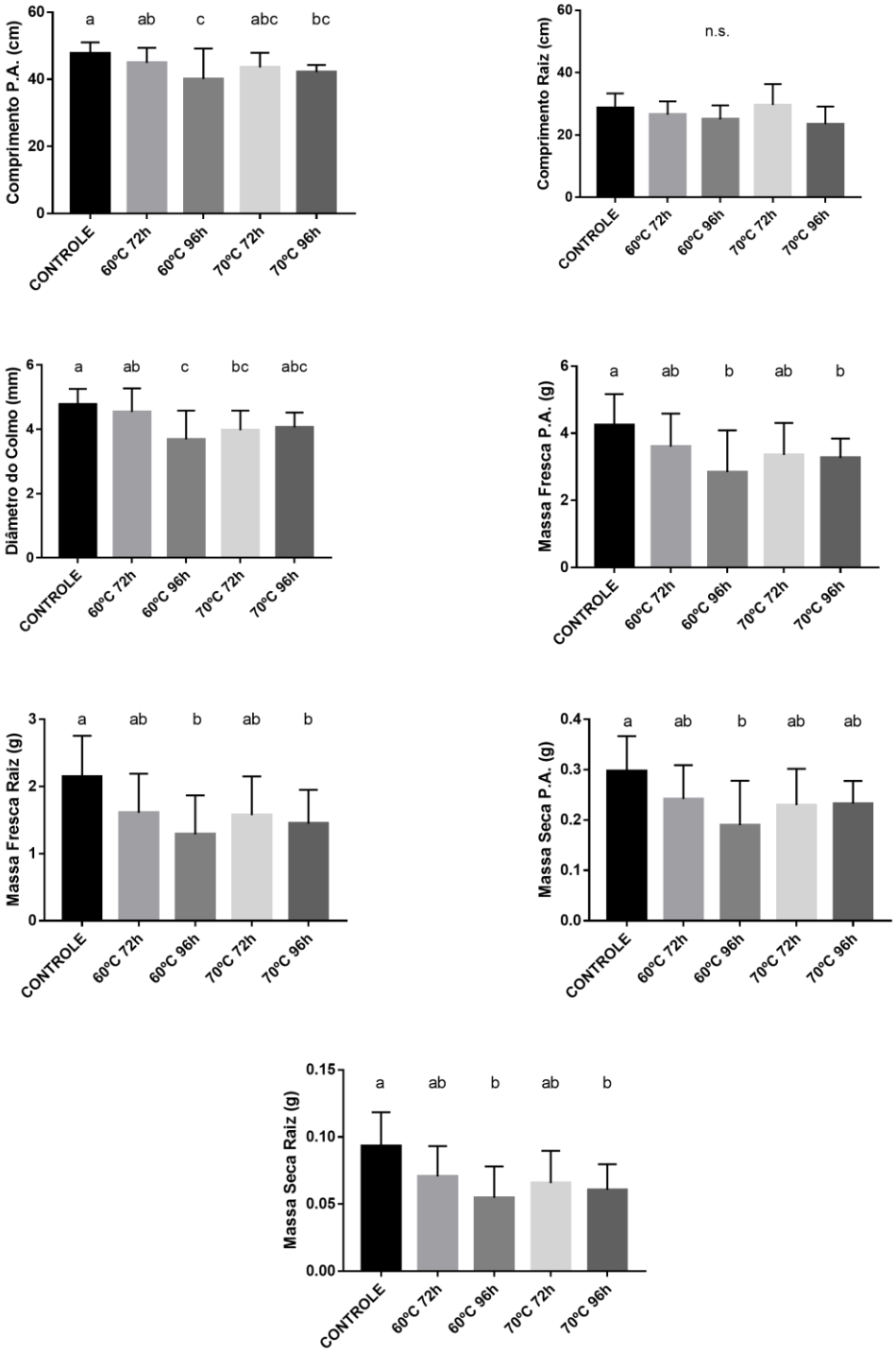


Figura 10. Parâmetros biométricos e massa de plantas tratadas e não tratadas por termoterapia após 13 dias de cultivo em casa de vegetação. Tratamentos com

letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, sendo n.s. - parâmetro que não apresentou diferença significativa.

As sementes que foram embebidas entre papel filtro e as não embebidas tiveram seu DNA extraído com amplificação do gene 16S rDNA e quantificação por qPCR. Os tratamentos não apresentaram diferença significativa e as médias de CT (cycle threshold) estão representadas na Figura 11. Uma das hipóteses para este resultado é que, no intervalo de 48 horas em que as sementes ficaram em embebição e as sementes sem embebição ficaram armazenadas nas mesmas condições e mesmo tempo, a população bacteriana remanescente pode ter ocupado os nichos desocupados pelo tratamento de desinfestação por termoterapia. Esta hipótese é fundamentada no estudo de Hardoim et al. (2015) em que relataram a ocupação bacteriana em novos nichos disponíveis, também demonstrado por Santos et al. (2021a), com aumento da diversidade microbiana após desinfestação com hipoclorito.

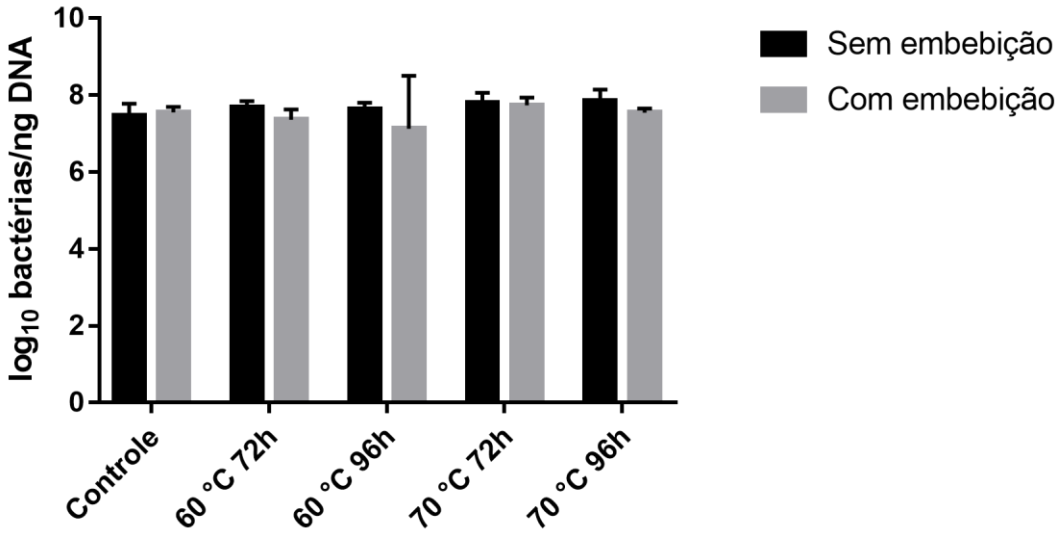


Figura 11. Quantificação bacteriana pela amplificação do gene 16S rDNA por PCR em tempo real (qPCR) de sementes tratadas e não tratadas (controle), com e sem embebição entre papel filtro.

Agregados bacterianos foram visualizados nas raízes das plântulas de milho crescidas em BOD (condições axênicas), com colonização principalmente em nos sítios mitótico, como a região da coifa e pontos de emissão de raízes laterais (Figura 12). Esta característica de colonização de bactérias endofíticas das sementes de milho cultivadas em condições axênicas foi previamente descrita por Santos et al. (2021a). O tratamento 60°C-96h apresentou aparente redução de colonização microbiana nas raízes das plântulas.

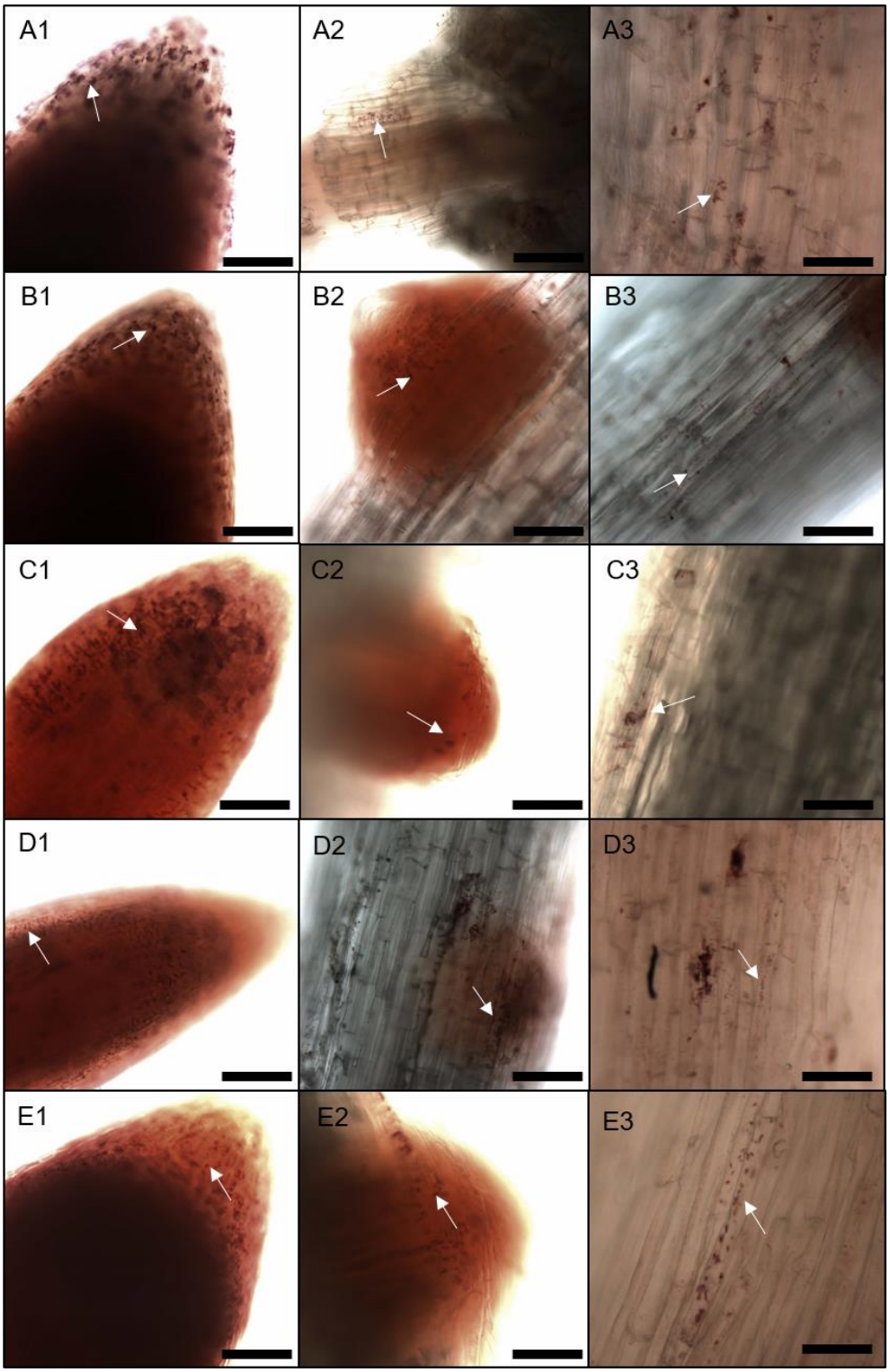


Figura 12. Microscopia óptica de campo claro de segmentos de raízes das plântulas com células bacterianas coradas com 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio. Sendo, A – Controle; B - 60°C-72h; C - 60°C-96h; D - 70°C-72h; E - 70°C-96h. Setas indicam presença de agregados bacterianos na coifa (1), nos sítios mitóticos de raízes laterais (2) e ao longo da raiz (3). Barra de escala = 100µm.

5. Conclusão

- A embebição das sementes de milho, bem como o método em que esta embebição é realizada influencia tanto na resposta fisiológica das plântulas tratadas por termoterapia como no posterior isolamento da microbiota destas plântulas.
- O método de termoterapia ocasionou uma predominância de morfotipos da comunidade bacteriana das sementes de milho de acordo com cada temperatura e tempo utilizados. De acordo com o ensaio de densidade óptica e parâmetros biométricos das plantas, o tratamento mais eficaz na redução do microbioma das sementes com menor impacto fisiológico nas plântulas foi o tratamento de 70°C 72h.
- O tratamento de 60°C 96h foi o mais prejudicial quando colocado em condições normais de casa de vegetação.
- Este é um estudo pioneiro sobre o efeito da termoterapia no microbioma e germinação de sementes de milho. Os resultados apresentados abrem margem para pesquisas futuras com bactérias resistentes a altas temperaturas e produtoras de EPS, características desejáveis em uma produção de bioinsumos voltados para condições de estresse hídrico.

Referências Bibliográficas

AKIMOTO-TOMIYAMA, C. (2021) Multiple endogenous seed-borne bacteria recovered rice growth disruption caused by *Burkholderia glumae* **Nature Scientific Reports**, 11:4177.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans.* **Symbiosis**, 19:65–73.

BERG, G.; RAAIJMAKERS, J.M. (2018) Saving seed microbiomes. **The ISME Journal**, 12:1167-1170.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. (2013) **Seeds - Physiology of Development, Germination and Dormancy**, 3 ed. Springer.

BORGHETTI, F. & FERREIRA, A.G. (2004) Interpretação de resultados de germinação. In Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (orgs.) **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre. 209-222.

BRASIL (2009) Regras para análise de sementes. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 395 p.

BULGARELLI, D., SCHLAEPPI, K., SPAEPEN, S., VAN THEMAAT, E. V.L., SCHULZE-LEFERT, P. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, 64:807-838.

CADELL, D.F.; DENG, S.; COLEMAN-DERR, D. (2019) Role of the Plant Root Microbiome in Abiotic Stress Tolerance *In:* VERMA,S.K.; WHITE,J.F. (orgs.), **Seed Endophytes**. 1. ed. Springer Nature Switzerland, 273-311.

CARDOSO, A.I.I.; PIACENTI, L.Z.; LINO, P.R.; PADOVAN, I.M.; KRONKA, A.Z. (2020) Control of *Alternaria brassicicola* with thermotherapy and propolis and effect on the physiological quality of kale seeds. **Horticultura Brasileira** 38(4).

CHOWDHURY,S.; LATA, R.; KHARWAR, R.N.; GOND, S.K. (2019) Microbial endophytes of maize seeds and their application in crop improvements *In:* VERMA,S.K.; WHITE,J.F. (orgs.), **Seed Endophytes**. 1. ed. Springer Nature Switzerland, 449-463.

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H.; SESSITSCH, A. (2019) A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, 19:29-37.

CURÁ, J.A.; FRANZ, D.R.; FILOSOFÍA, J.E.; BALESTRASSE, K.B.; BURGUEÑO, L.E. (2017) Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. **Microorganisms**, 5:41.

DE GREGORIS, T.B.; ALDRED, N.; CLARE, A.S.; BURGESS, J.G. (2011) Improvement of phylum- and class- specific primers for real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**. 86:351-356.

DONN, S.; KIRKEGAARD, J.A.; PERERA, G.; RICHARDSON, A.E.; WATT, M. (2014) Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere. **Environmental Microbiology**, 17(3):610-21.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15.

FLEMMING, H. C. & WINGENDER, J. (2010) The biofilm matrix. **Nature Rev. Microbiol**. 8, 623–633.

FLEMMING, H.C. & WUERTZ, S. (2019) Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nature Rev. Microbiol**. 17, 247–260.

GUYONNET, J.P.; GUILLEMET, M.; DUBOST, A.; SIMON, L.; ORTET, P.; BARAKAT, M.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W.; HAICHAR, F.Z. (2018) Plant nutrient resource use strategies shape active rhizosphere microbiota through root exudation. **Frontiers in Plant Science**, 9:1662.

HARDOIM, P.R. et al. (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. Microbiol Mol Biol Rev 79:293–320

HOLLAND, M.A. (2016) Probiotics for plants? What the PPFMs told us and some ideas about how to use them. **Journal of the Washington Academy of Sciences** 102(1):31-42.

HUNGRIA, M.; MENDES, I.C. (2015) Nitrogen fixation with soybean: The perfect Symbiosis? In: BRUIJN, F. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixations**, p.1009-1021.

JANSSON, J.K. & HOFMOCKEL, K.S. (2020) Soil microbiomes and climate change. **Nature Reviews Microbiology**, 18:35-46.

LANNA, N.B.L.; BARDIVIESSO, E.M.; AGUILAR, A.S.; PÉREZ, C.P.A.; CONTRERAS, S.; NAKADA-FREITAS, P.G.; CARDOSO, A.I.I. (2020) Use of temperature and propolis in the alternative treatment of zucchini seeds. **Idesia**, 4(38):83-88.

LEANDRO, M.R.L.; RANGEL, P.L.; SANTOS, T.C.; ANDRADE, L.F.; VESPOLI, L.S.; RANGEL, A.L.S.; SOUZA, S.A.; BARBOSA, R.R.; PASSAMANI, L.Z.; SILVEIRA, V.; FILHO, G.A.S. (2019) Colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Herbaspirillum seropedicae* promotes its growth and changes its proteomic profile. **Plant Soil**, 443:429-447.

MAGUIRE, J. (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, 2:176-177.

MARINHO, J.L.; FONSECA, I.C.B.; ZUCARELI, C. (2020) Hydration methods and physiological potential of sweet corn seeds. **Bioscience Journal**, 36(4):1283-1291.

MENTEN, J.O.M. (1995) **Patógenos em Sementes: Detecção, danos e controle químico**. São Paulo. Ciba Agro.

MENDES, M. A. S.; LIMA, P. M. M. P.; FONSECA, J. N. L.; SANTOS, M. F. (2001) Erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa utilizando termo e quimioterapia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 148-152.

NELSON, E.B. (2017) The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. **Plant Soil**, 422:7-34.

NIU, X.; SONG, L.; XIAO, Y.; GE, W. (2018) Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid agroecosystem and their potential in alleviating drought stress. **Frontiers in Microbiology**, 8:2580.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biol Fertil Soils**, 21:197–200.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. (2003) Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. **Embrapa Agrobiologia Documentos**, 161, 40p.

PEIXOTO, L.S.; SILVA, G.M.; FUJII, A.K.; PARISI, J.J.D.; AGUIAR; R.H.; FRACAROLLI, J.A. (2018) Maize seeds submitted to thermotherapy and analyzed by dynamic speckle. **Journal of Agricultural Science and Technology** (8):115-121.

PRADO, A.; MAROLLEAU, B.; VAISSIÈRE, B.E.; BARRET, M.; TORRES-CORTES,G. (2020) Insect pollination: an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota. **Nature Scientific Reports**, 10:3575.

SANTOS, L.A.; FARIA, C.M.D.R.; MAREK, J.; DUHATSCHEK, E.; MARTINICHEN, D. (2016) Radioterapia e Termoterapia como tratamentos de sementes de Soja. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, 9(2):37-44.

SANTOS, M.S.; RODRIGUES, T.F.; FERREIRA, E.; MEGIAS, M.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. (2020) Method for recovering and counting viable cells from maize seeds inoculated with *Azospirillum brasilense*, **J. Pure Appl. Microbiol**.14(1):195-204.

SANTOS, L.F.; SOUTA, J.F.; SOARES, C.P.; ROCHA, L.O; SANTOS, M.L.C.; MATOS, C.G.G.; ROESCH, L.F.W.; OLIVARES, F.L. (2021a) Insights into the structure and role of seed-borne bacteriome during maize germination. **FEMS Microbiol Ecol**., 97(4).

SANTOS, L.F.; SOUTA, J.F.; ROCHA, L.O.; SOARES, C.P.; SANTOS, M.L.C.; MATOS, C.G.G.; ROESCH, L.F.W.; OLIVARES, F.L. (2021b) Altered bacteria community dominance reduces tolerance to resident fungus and seed to seedling growth performance in maize (*Zea mays* L. cv. DKB 177). **Microbiological Research**, 243.

SANTOYO, G.; PACHECO, C.H.; SALMERÓN, J.H.; LEÓN, R.H. (2017) The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. **Spanish Journal of Agricultural Research**, 15(1):15 p.

SCHLAEPPI, K. & BULGARELLI, D. (2015) The Plant Microbiome at Work. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 28(3):212-217.

SILVA, A. M. S.; CARMO, M. G. F.; OLIVARES, F. L.; PEREIRA, A. J. (2002) Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, 27(6):586-593.

SIMPSON, F.B., BURRIS, R.H. (1984) A Nitrogen Pressure of 50 Atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, 224:1095-1097.

TURNER, T.R.; JAMES, E.K.; POOLE, P.S. (2013) The plant microbiome. **Genome Biol**. 14:209.

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; BOYCE, A.N. (2016) Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review. **Molecules**, 21, 573.

VERMA, S.K.; KINGSLEY, K.; IRIZARRY, I.; BERGEN, M.; KHARWAR, R.N.; WHITE, J.F (2017) Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. **Journal of Applied Microbiology** 122:1680-1691.

VERMA, S.K.; WHITE, J.F. (2017) Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in browntop millet (*Urochloa ramosa* L.) **Journal of Applied Microbiology**. 124:764-778.

VERMA, S.K.; KHARWAR, R.N.; WHITE, J.F. (2019) The role of seed-vectored endophytes in seedling development and establishment. **Symbiosis** 78: 12.

VIEIRA, H.; MARTINS, J.V.S.; BARRETO, G.G., GOMES, R.S.S.; SILVA, E.C.; NASCIMENTO, L.C. (2019) Sanitary and physiological quality of ‘purple’ corn (*Zea mays* L.) seeds submitted to thermotherapy. **Arq. Inst. Biol**., 86:1-7.