

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**STELLA JORGE DE CARVALHO NETA**

**AMENIZAÇÃO DO ESTRESSE SALINO EM MILHO INOCULADO  
COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE  
PLANTAS E FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR**

**RECIFE  
2022**

Stella Jorge de Carvalho Neta  
Engenheira Agrônoma

**Amenização do estresse salino em milho inoculado com bactérias promotoras de crescimento de plantas e fungo micorrízico arbuscular**

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

Orientadora: Profa. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto

Coorientador: Prof. Dr. Edivan Rodrigues de Souza

**Recife  
2022**

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

---

N469a

Neta, Stella Jorge de Carvalho

Amenização do estresse salino em milho inoculado com bactérias promotoras de crescimento de plantas e fungo micorrízico arbuscular / Stella Jorge de Carvalho Neta. - 2022.  
83 f. : il.

Orientadora: Giselle Gomes Monteiro Fracetto.

Coorientador: Edivan Rodrigues de Souza.

Inclui referências e anexo(s).

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

1. Estresse salino. 2. Rizosfera. 3. Bactérias promotoras de crescimento de plantas. 4. Fungo micorrizico arbuscular. 5. Simbiose tripartite. I. Fracetto, Giselle Gomes Monteiro, orient. II. Souza, Edivan Rodrigues de, coorient. III. Título

---

CDD 631.4

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

STELLA JORGE DE CARVALHO NETA

**Amenização do estresse salino em milho inoculado com bactérias promotoras de crescimento de plantas e fungo micorrízico arbuscular**

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

---

Profa. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto  
Orientadora  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Arthur Prudêncio de Araujo Pereira  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Edivan Rodrigues de Souza  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Ao meu amado esposo e companheiro de todas as horas, Fillipe Oliveira, e ao nosso filho, Miguel Oliveira de Carvalho. Sem vocês nada disso seria possível

DEDICO

À minha querida mãe, Maria de Fátima Carvalho de Souza, que orou por mim e acreditou no meu potencial desde o dia do meu nascimento

OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua infinita bondade, não permitiu que eu desistisse e me manteve de pé até o final dessa jornada. “Tu me dás o teu escudo de livramento; a tua ajuda me fez forte” (2 Samuel 22:36)

A minha orientadora, Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto, por todo o ensinamento adquirido, pelas inúmeras palavras de incentivo, pela paciência e pela extrema empatia e respeito as dores que se somaram a mim nesse percurso, pelo papelzinho que guardo com zelo, escrito: “Valorize sempre suas vitórias! Lembre-se: você conseguiu!” Sem a compreensão e colaboração de todas as horas esse trabalho nunca teria sido finalizado.

A minha família, especialmente a meus pais, Maria de Fátima Carvalho de Souza e Valdemir Bezerra de Souza, pelo esforço diário de manter a mim e aos meus irmãos sob proteção e cuidados ímpares, fornecendo educação de qualidade e incentivo para alcançarmos nossos objetivos. Aos meus irmãos, Valdemir Júnior, Valesck de Fátima e Valdemar Neto pelo amor incondicional e apoio vital, pelas risadas e brincadeiras que permanecem desde a infância até os dias atuais. Aos meus cunhados Cláudia Regina, Wemerson Cristiano e Maria Eduarda, por acrescentar mais amor e alegria aos nossos dias. Aos tios e primos queridos e estimados, da família Lolaia, que torceram por mim e me fortaleceram a confiança.

Ao meu alicerce e casa de cura, Fillipe Cesar Oliveira da Silva, que me deu mais uma razão para viver: nosso amado “rádio de pilha”, Miguel Oliveira, que alegria meus dias com sua infinita curiosidade e enche ainda mais de amor a nossa casa.

A minha família adquirida por casamento, Maria Hilda de Oliveira, Evaldo Oliveira da Silva, Vanessa Oliveira da Silva, Danillo Oliveira e Thais Cristina que me acolheram calorosamente e fizeram possível o sonho de um diploma universitário e mantém o apoio e incentivo para dias melhores.

A meus queridos sobrinhos, Mateus Oliveira, Davi Oliveira, Marina Carvalho, Ana Cecília Oliveira e Arthur Carvalho, por toda alegria proporcionada, que essa pesquisa sirva de inspiração para um futuro próximo.

A Cíntia Caroline, amiga de todas as horas, pelas doses diárias de força e incentivo a quem eu nunca vou ter palavras suficientes para agradecer.

Aos meus companheiros de laboratório que alegraram dias nebulosos em tempos de pandemia e me deram todo suporte emocional e científico: Danilo Rodrigues, Cybelle Souza, Adriana Bezerra, Cíntia Caroline, Yure Romero, Lucía Nuñez e William Ramos.

Aos alunos de PIBIC e PIC, essenciais para a realização desse trabalho, Yure Romero, Marina Isabel, Gabriella e Matheus Veiga.

A Victor Lucas Vieira Prudêncio pelo belíssimo e refinado trabalho de isolamento das bactérias isoladas para a realização desse trabalho.

Ao IPA pelo fornecimento das sementes e inóculo micorrízico.

A Socorro Santana, secretária da Pós-graduação em Ciência do Solo, que desde meu primeiro ingresso me ofereceu suporte e atenção, resolvendo todos os transtornos burocráticos da melhor forma e ainda oferecendo boas risadas.

A todos os meus professores, do ensino básico até o mestrado.

A UFRPE por ser minha casa nesses anos de graduação e mestrado, pela estrutura de laboratórios e assistência estudantil.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

A todos que torceram por mim e colaboraram, de alguma forma, para a realização desse trabalho.



O que mereço

Canção de Zélia Duncan

Composição: Juliano Holanda

(...)

E eu só quero o que mereço  
Nem um mar a mais, nem uma gota a menos  
Nem um grão a mais, nem um deserto a menos

Faz um tempo e eu espero  
Que esse nó desate, desate  
Quem não sabe o doce sabe o fel

E eu só quero o que mereço  
Nem um dia a mais, nem um segundo a menos  
Nem um choro a mais, nem um sorriso a menos  
Nem qualquer palavra, nem um sentimento  
Nem olhar para trás, nem arrependimento

É uma pena que nós só nos conhecemos hoje  
Já faz tempo que eu procuro por você

E eu só quero o que mereço  
Nem final feliz, nem triste recomeço  
Nem andar pensando em dar o outro passo  
Nem ter que ficar medindo o meu abraço  
Nem olhar para o lado e ver a porta aberta  
Nem pensar se eu escolhi a estrada certa

(...)

## Amenização do estresse salino em milho inoculado com bactérias promotoras de crescimento de plantas e fungo micorrízico arbuscular

### RESUMO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é um dos grãos mais consumidos no mundo, e além de serem usados para alimentação humana e animal, se destaca na indústria de matriz energética. Diante da degradação e salinização dos solos, é necessário a busca de tecnologias sustentáveis que ajude a adaptação e tolerância do milho e de demais plantas de interesse econômico as vastas condições edafoclimáticas limitantes. Em face aos problemas limitantes do solo salino, essa pesquisa objetivou estudar o comportamento de 24 cepas de bactéria promotoras de crescimento de plantas (BPCP), isoladas de uma lagoa temporário do semiárido, em diminuir danos causados por estresse salino, beneficiando o desempenho agrônômico das plantas de milho e favorecendo a associação simbiótica tripartite entre o fungo micorrízico arbuscular (FMA) (*Rhizophagus clarus*) e planta de milho (IPA CMS 36). Para isso, as BPCP foram testadas em meio halofílico para confirmar seu potencial de tolerância a salinidade, selecionando os 10 isolados que apresentaram melhor desempenho. Posteriormente, foi realizado um experimento em substrato autoclavado em casa de vegetação por 60 dias a fim de verificar o potencial de promoção de crescimento *in vivo*, bem como, os teores de pigmentos fotossintéticos foliares e parâmetros da emissão da fluorescência da clorofila a (Fluorescência inicial [F0]; Fluorescência variável [Fv]; Fluorescência máxima [Fm]; Fluxo de elétrons do PSII [Fv/Fm]; Eficiência quântica por centro de reação [Et0/CR]) das bactérias selecionadas do teste de halotolerância em diferentes concentrações salina (0, 40, 80 mM). Desse experimento, foram selecionadas as bactérias 28-7; 43; 46-1; 70; e 79-1, as quais demonstraram maiores parâmetros biométricos e as bactérias 24-1; 46-1; 52; e 70, as quais apresentaram os melhores desempenhos de parâmetros fotossintéticos. As bactérias 28-7; 43; 46-1; 70; e 79-1 foram utilizadas em um segundo experimento com duração de 49 dias, obedecendo o mesmo padrão do primeiro experimento e submetendo os tratamentos a diferentes concentrações salinas (0, 40, 80 mM). Neste experimento, foi realizado a co-inoculação de *Rhizophagus clarus*, a fim de avaliar a biomassa das plantas, os teores de nutrientes acumulados no tecido vegetal e taxa de colonização das raízes pelo FMA. O maior acréscimo de biomassa foi observado para as bactérias 41-6; 70 e; 79-1 em consórcio com o fungo. Para os teores de nutrientes, os resultados sugerem uma maior tolerância das plantas de milho ao estresse salino por meio da osmoregulação mediada pelos microrganismos proporcionados pelas bactérias 28-7; 46-1; 70; 79-1 co-inoculadas com o fungo *R. clarus*. Os resultados alcançados por essa pesquisa aceitam a hipótese inicial levantada que BPCP ajudam a aliviar os sintomas causados pelo estresse salino e favorecem a simbiose entre planta-fungo, estabelecendo uma relação de sinergia tripartite entre planta-fungo e bactéria. Dessa forma, evidencia o potencial biotecnológico dos microrganismos para a bioproteção e biofertilização de plantas em solos afetados por sais.

Palavras-chave: Estresse abiótico. Salinidade. Rizosfera. Fitomicrobioma. Bioproteção. Simbiose tripartite

## Alleviation of saline stress in corn inoculated with plant growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungus

### GENERAL ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is one of the most consumed grains in the world, and in addition to being used for human and animal food, it stands out in the energy matrix industry. Faced with the degradation and salinization of soils, it is necessary to search for sustainable technologies that help the adaptation and tolerance of corn and other plants of economic interest to the vast limiting edaphoclimatic conditions. In view of the limiting problems of saline soil, this research aimed to study the behavior of 24 plant growth-promoting bacteria (PGPB) strains, isolated from a temporary semi-arid pond, in reducing damage caused by saline stress, benefiting the agronomic performance of the plants. corn plants and favoring the tripartite symbiotic association between the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) (*Rhizophagus clarus*) and the corn plant (IPA CMS 36). For this, the PGPB were tested in a halophilic medium to confirm their salinity tolerance potential, selecting the 10 isolates that presented the best performance. Subsequently, an experiment was carried out in an autoclaved substrate in a greenhouse for 60 days in order to verify the potential for promoting growth in vivo, as well as the levels of leaf photosynthetic pigments and parameters of chlorophyll a fluorescence emission (Initial Fluorescence [F<sub>0</sub>]; Variable fluorescence [F<sub>v</sub>]; Maximum fluorescence [F<sub>m</sub>]; PSII electron flux [F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>]; Quantum efficiency per reaction center [Et<sub>0</sub>/CR]) of bacteria selected from the halotolerance test at different saline concentrations (0, 40, 80 mM). From this experiment, bacteria 28-7 were selected; 43; 46-1; 70; and 79-1, which showed higher biometric parameters and bacteria 24-1; 46-1; 52; and 70, which showed the best performance of photosynthetic parameters. Bacteria 28-7; 43; 46-1; 70; and 79-1 were used in a second experiment lasting 49 days, following the same pattern as the first experiment and submitting the treatments to different saline concentrations (0, 40, 80 mM). In this experiment, the co-inoculation of *Rhizophagus clarus* was carried out in order to evaluate the plant biomass, the levels of nutrients accumulated in the plant tissue and the rate of colonization of the roots by AMF. The greatest increase in biomass was observed for bacteria 41-6; 70 and; 79-1 in consortium with the fungus. For nutrient contents, the results suggest a greater tolerance of corn plants to salt stress through osmoregulation mediated by microorganisms provided by bacteria 28-7; 46-1; 70; 79-1 co- inoculated with the fungus *R. clarus*. The results achieved by this research accept the initial hypothesis raised that PGPB help to alleviate the symptoms caused by saline stress and favor the symbiosis between plant-fungus, establishing a tripartite synergy relationship between plant-fungus and bacteria. Thus, it highlights the biotechnological potential of microorganisms for the bioprotection and biofertilization of plants in soils affected by salts.

Keywords: Abiotic stress. Salinity. Rhizosphere. Phytomicrobiome. Bioprotection. Tripartite symbiosis

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Localização da lagoa temporária e pontos de coletas de amostras do solo rizosférico e do solo adjacente do *Mimosa bimucronata* no município de Parnamirim-PE (ARAÚJO et al., 2020) .....39
- Figura 2.** Taxa de sobrevivência de bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil, em teste in vitro em meio halofílico.....45
- Figura 3.** Média e desvio padrão da altura de plantas de milho (IPA CMS-36) inoculados com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil, submetidas a estresse salino.....47
- Figura 4.** Média e desvio padrão de parâmetros biométricos de plantas de milho (IPA CMS-36) inoculados com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil, e submetidas a estresse salino.....48
- Figura 5.** Plantas de milho de (*Zea mays* L) inoculadas com BPCP. (A) Plantas controle e inoculadas com bactérias 43 e 52 (0 mM); (B) Plantas controle e inoculadas com bactérias 70 e 28-7 (40 mM); (C) Plantas controle e inoculadas com bactérias 59-3 e 70 (80 mM).....49

### CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Esporos do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* .....64
- Figura 2.** Imagem ampliadas 70 vezes em microscópio estereoscópico de raízes de milho com presença (B) e ausência (A) de estruturas fúngicas.....68
- Figura 3.** Biomassa vegetal de plantas de milho (*Zea mays* L) inoculado com *Rhizophagus clarus* e BPCP.....69
- Figura 4.** Plantas de milho de (*Zea mays* L) inoculadas *Rhizophagus clarus* e co-inoculadas com BPCP. (A) Plantas controle, micorrizada e co-inoculadas com bactéria 79-1 (0 mM); (B)

Plantas controle, micorrizada e co-inoculadas com bactéria 43 (40 mM); (C) Plantas controle, micorrizada e co-inoculadas com bactéria 43 (80 mM).....71

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Critérios e limites para classificação de solos salinos.....21

**Tabela 2.** Atributos diagnósticos para solos halomórficos.....21

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Características dos isolados selecionados (24) para os testes de tolerância a salinidade, obtidos do solo rizosférico e do solo adjacente de *Mimosa bimucronata* em uma lagoa temporária.....40

**Tabela 2.** Teste de resistência a salinidade in vitro com 24 cepas de BPCP obtidos do solo rizosférico e do solo adjacente de *Mimosa bimucronata* em uma lagoa temporária.....41

**Tabela 3.** Teores de Clorofila a em plantas de milho (IPA CMS-36) submetidas a estresse salino e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.....50

**Tabela 4.** Teores de Clorofila b em plantas de milho (IPA CMS-36) submetidas a estresse salino e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.....51

**Tabela 5.** Teores de carotenóides em plantas de milho (IPA CMS-36) submetidas a estresse salino e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.....52

**Tabela 6.** Médias do parâmetro de eficiência na absorção de fótons ( $F_v/F_m$ ) de plantas de milho (IPA CMS-36) submetidas a estresse salino e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.....53

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1.</b> Características bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de <i>Mimosa bimucronata</i> de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil, selecionadas para compor experimento em casa de vegetação.....	65
<b>Tabela 2.</b> Colonização micorrízica de <i>Rhizophagus clarus</i> em plantas de milho co-inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de <i>Mimosa bimucronata</i> de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.....	68
<b>Tabela 3.</b> Biomassa vegetal (g planta <sup>-1</sup> ) de plantas de milho inoculadas com <i>Rhizophagus clarus</i> e bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de <i>Mimosa bimucronata</i> de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.....	70
<b>Tabela 4.</b> Teores de nutriente extraídos de plantas de milho inoculadas com <i>Rhizophagus clarus</i> e bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de <i>Mimosa bimucronata</i> de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.....	72
<b>Tabela 5.</b> Dados detalhados dos teores de nutrientes extraídos da biomassa vegetal de plantas de milho inoculadas com <i>Rhizophagus clarus</i> e bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de <i>Mimosa bimucronata</i> de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.....	74

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.1 Hipóteses .....	18
1.2 Objetivos.....	18
1.2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	18
1.2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1 Estrutura de estudo .....	19
2.2 Salinidade do solo e o panorama mundial .....	20
2.3 Estresse salino e sua influência na interface solo-planta .....	22
2.4 Uso de microrganismos como alternativa no alívio de estresse salino.....	24
2.5 Cultura do milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	26
Referências Bibliográficas .....	27
3 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E FOTOSSINTÉTICOS DE PLANTAS DE MILHO ( <i>Zea mays</i> L.) INOCULADAS COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS SOB ESTRESSE SALINO.....	35
Resumo .....	35
Abstract.....	36
3.1 Introdução.....	37
3.2 Material e Métodos .....	39
3.2.1 <i>Seleção de cepas de BPCP</i> .....	39
3.2.2 <i>Seleção de cepas para compor o teste de promoção de crescimento em plantas de milho (<i>Zea mays</i> L.)</i> .....	41
3.2.3 <i>Inoculação de BPCP em sementes de milho (<i>Zea mays</i> L.) para teste de promoção de crescimento</i> .....	42
3.2.4 <i>Montagem e condução do experimento em casa de vegetação</i> .....	43
3.2.5 <i>Parâmetros de crescimento vegetal e parâmetros fotossintéticos</i> .....	43
3.2.6 <i>Delineamento experimental e análise estatística</i> .....	44
3.3 Resultados e Discussão.....	44
3.3.1 <i>Halotolerância</i> .....	44
3.3.2 <i>Efeito de promoção de crescimento de BPCP em plantas de milho (<i>Zea mays</i> L.) submetidas a estresse salino</i> .....	46
3.3.3 <i>Pigmentos fotossintético e parâmetros de emissão da fluorescência da Clorofila a de plantas de milho (<i>Zea mays</i> L.) submetidas a estresse salino e inoculadas com BPCP</i> .....	50
3.4 Conclusões.....	54



Referências Bibliográficas.....	55
4 ALÍVIO DO ESTRESSE SALINO EM PLANTA DE MILHO ( <i>ZEA MAYS L.</i> ) POR CO-INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS .....	60
Resumo.....	60
Abstract .....	61
4.1 Introdução.....	62
4.2 Material e Métodos.....	64
4.2.1 Propagação de inóculo micorrizico.....	64
4.2.2 Seleção de cepas de BPCP para compor a dupla inoculação e preparação das sementes de milho ( <i>Zea mays L.</i> ) para teste de promoção de crescimento.....	65
4.2.3 Montagem e condução do experimento em casa de vegetação.....	66
4.2.4 Biomassa vegetal e teor de nutrientes.....	66
4.2.5 Coloração das raízes e taxa de micorrização.....	66
4.2.6 Delineamento experimental e análise estatística.....	67
4.3 Resultados e Discussão.....	67
4.3.1 Taxa de micorrização.....	67
4.3.2 Biomassa vegetal e teores de nutrientes na parte aérea.....	70
4.4 Conclusões.....	75
Referências Bibliográficas.....	76
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	80
ANEXO 1.....	82
ANEXO 2.....	82
ANEXO 3.....	82

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O solo é único, de caráter intrínseco. Sua extrema importância passa por características óbvias e visíveis, como a de simples sustentação; até as imperceptíveis a olho nu e de grande valia, como a ciclagem de nutrientes.

No ambiente edáfico ocorrem os principais ciclos regulatórios presentes na natureza, o que o torna peça fundamental para os principais processos de manutenção da vida na Terra; destacando principalmente a agricultura, indispensável para a evolução e perpetuação da espécie humana.

Sendo vital, o ambiente do solo é intrigante e complexo, em razão das inúmeras reações e interações que ocorrem de forma simultânea em seu corpo tridimensional, que de modo preponderante determina as propriedades do solo e influencia o crescimento e atividade das plantas e organismos dependentes deste meio.

Muito dessa sinergia se deve a diversidade microbiana do solo. Esses microrganismos tiveram uma influência intensa em todo o planeta durante bilhões de anos, e essa capacidade de influenciar processos importantes e regulatórios na Terra e na biodiversidade vem sendo progressivamente reconhecida.

Ultimamente, há um interesse crescente na abundância e diversidade microbiológica do solo, porque ele abriga populações de microrganismos que podem ser aproveitadas e usadas em uma abordagem ecologicamente correta em diversas áreas da biotecnologia.

De forma promissora, essas populações de microrganismos podem ser usadas em larga produção de medicamentos para humanos e animais. Além disso, a microbiota do solo vem sendo utilizada como aporte para novas tecnologias na agricultura, servindo como agentes de biocontrole, biorremediação e biofertilização, melhorando a saúde e a fertilidade do solo, o rendimento das colheitas, e garantindo a sustentabilidade do meio ambiente, reduzindo os danos causados pelo uso de agroquímicos.

A produtividade agrícola, a qualidade da água e as mudanças climáticas são muito influenciadas pelo fluxo de nutrientes, pelo carbono e pela energia trocados entre a matéria orgânica do solo, a hidrosfera, a atmosfera e o próprio solo. Dessa forma, é importante que o solo se mantenha saudável e sempre em reparação.

Contudo, as mudanças climáticas, o uso indiscriminado de agroquímicos, e práticas agrícolas inadequadas estão levando a perdas expressivas do potencial produtivo do solo agricultável juntamente com o efetivo biotecnológico, pouco ou minimamente explorados, e ocasionando um desequilíbrio ecológico.

Atualmente, agentes estressores (bióticos e abióticos) estão em evidência em pesquisas científicas por agravar a degradação dos ecossistemas e exaurir áreas agrícolas ao redor do globo, colocando em perigo a segurança alimentar e a biodiversidade. Dentre os agentes estressores mais importantes, está a salinidade do solo que limita a absorção de água pelas plantas, reduzindo o potencial osmótico, tornando mais difícil para a planta a extração de água através das raízes, além de causar efeitos de toxicidade de íons específicos, perturbando também o equilíbrio nutricional das plantas.

As atuais abordagens de reabilitação do solo salino, como lixiviação ou aplicação de aditivos orgânicos/inorgânicos, que são usualmente empregadas na tentativa de recuperar solos afetados por sais, levantam preocupações ambientais por exigirem água de alta qualidade em grandes volumes e ter elevados custos financeiros.

Entre as abordagens alternativas, as usadas frequentemente para remediar solos salinos, estão sendo estudadas a utilização de microrganismos isolados da rizosfera das plantas. Esta abordagem mais ecológica é adequada para a recuperação simultânea do solo salino e da produtividade agrícola. Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) e Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) utilizam vários mecanismos que melhoram as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares das plantas para lidar com o estresse salino. Esses mecanismos incluem vários ajustes osmóticos e oxidativos e mantêm os parâmetros de crescimento da planta através da síntese de fitohormônios e outros metabólitos.

Como as BPCP e os FMA são tolerantes ao sal e induzem uma melhor sobrevivência das plantas sob salinidade, eles também possuem potencial para aumentar a produtividade e a viabilidade agrícola em áreas afetadas por sais ou irrigadas com água salobra ou com propensão a salinização.

Seguindo essa abordagem ecológica, o presente estudo pretende avaliar e discutir o uso de um microcosmo formado entre bactérias promotoras de crescimento de plantas e um fungo micorrízico arbuscular, observando os mecanismos que esses microrganismos propiciam em sinergia com plantas de milho (IPA CMS-36) expostas a estresse salino.

Essa dissertação será dividida em três capítulos:

- 1 - Revisão bibliográfica
- 2 - Parâmetros biométricos e fotossintéticos de plantas de milho (*Zea mays* L.) inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas sob estresse salino;
- 3 - Alívio do estresse salino em planta de milho (*Zea mays* L.) por co-inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias promotoras de crescimento de plantas.

## 1.1 Hipóteses

- a. A inoculação de BPCP produtoras da enzima ACC deaminase alivia os efeitos causados pelo estresse salino.
- b. O alívio dos sintomas de estresse causado pela salinidade, promovida pela produção de ACC deaminase pelas BPCP, favorece o desenvolvimento da micorriza em plantas de milho.
- c. O estabelecimento da simbiose planta-fungo micorrízico contribui para o alívio do estresse causado pelo sal, favorecendo o desenvolvimento das plantas.
- d. A interação planta-bactéria-fungo micorrízico favorece o desenvolvimento de plantas de milho sob estresse salino.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

Verificar se plantas de milho (*Zea mays* L.) inoculadas com BPCP, que sintetizam a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC deaminase), têm o potencial de diminuir danos causados por estresse salino, beneficiando o desempenho agrônômico das plantas de milho e favorecendo a associação simbiótica tripartite entre fungo micorrízico arbuscular (*Rhizophagus clarus*), planta de milho e as BPCP selecionadas para o desenvolvimento desse trabalho.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar se BPCP produtoras de ACC deaminase se adaptam a ambientes salinos, por meio de testes em meios de culturas adaptados;
- b. Avaliar se BPCP são capazes de diminuir sintomas nocivos produzidos a partir de estímulos causados por estresse salino, facilitando o estabelecimento da simbiose do FMA com as plantas de milho;
- c. Analisar parâmetros biométricos e fotossintéticos das plantas de milho inoculadas com BPCP submetidas ao estresse salino;
- d. Verificar o papel do FMA no desenvolvimento das plantas e no alívio de sintomas causados pelo estresse salino.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Estrutura de estudo

Os solos afetados por sais são um problema global. Dados recentes mostram que mais de 1000 milhões de hectares de terra ao redor do mundo são afetados por sais (FAO, 2021). Dentre os estresses abióticos, a salinidade vem influenciando severamente a qualidade dos alimentos por interferir diretamente no rendimento e produtividade das culturas agrícolas (SINGH et al., 2018); ameaçando a segurança alimentar, impactando diretamente o preço de commodities e aumentando o risco de migração de povos das áreas afetadas (FAO, 2021).

A remoção de sais do solo salino é um processo intensivo e requer muito tempo e dinheiro (QADIR et al., 2014). Muitas variedades de culturas agrícolas tolerantes ao sal estão sendo desenvolvidas por meio de técnicas transgênicas e de melhoramento genético. No entanto, essas abordagens são trabalhosas e demoradas (KUMAR et al., 2020a). Abordagens alternativas de reparação de áreas degradadas pela salinidade estão sendo amplamente estudadas e, na última década, muitas pesquisas levam em consideração o fitomicrobioma em busca de alternativas sustentáveis, rápidas e viáveis financeiramente.

Os microrganismos do solo têm o potencial de melhorar a tolerância das plantas ao estresse salino (YUAN et al., 2019) e o uso de bioinoculantes, incluindo bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e fungos micorrízicos arbusculares (FMA), podem ajudar no crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições ambientais estressantes, produzindo substâncias promotoras de crescimento, aumentando a absorção de nutrientes e regulando a absorção de íons (NADEEM et al., 2014).

Atualmente, vários pesquisadores estão fortemente engajados com a eficácia e aplicabilidade de bactérias e fungos isolados do microcosmo rizosférico com o intuito de aliviar os efeitos dos estresses abióticos. Kumar et al. (2020b) relataram que o crescimento e a produtividade do feijão são otimizados pela aplicação de um consórcio com BPCP contra o estresse salino; Ali et al. (2022) evidenciaram a melhoria do crescimento das plantas de milho, incremento na biomassa e aumento nos pigmentos fotossintéticos sob estresse salino após a inoculação da *Enterobacter cloacae* PM23; Parvin et al. (2020) observaram os efeitos de um consórcio de FMA inoculados em arroz, propiciando o aumento de massa da raiz, aumento de pigmentos fotossintéticos e do rendimento geral da cultura; Wang et al. (2022) mostraram a eficiência de FMA de aumentar a tolerância de *Gleditsia sinensis* a salinidade e melhorar parâmetros bioquímicos e biométricos.

Embora existam muitos estudos sobre a aplicação de microrganismos do solo no alívio de estresse salino, poucos estudos exploraram o potencial de co-inoculação de BPCP e FMA de forma simultânea e sinérgica. Nesse sentido, se faz necessário a busca por mais informações sobre o comportamento das plantas em uma simbiose tripartite.

## **2.2 Salinidade do solo e o panorama mundial**

O acúmulo de sais nos solos somados a problemas de má drenagem tem assolado a agricultura irrigada ao longo dos séculos. Registros históricos dos últimos 6.000 anos revelam que numerosas sociedades baseadas na agricultura irrigada tiveram problemas relacionados a salinidade, como a antiga Mesopotâmia, agora Iraque (JACOBSEN; ADAMS, 1958; SHAHID; ZAMAN; HENG, 2018). Após 5000 anos de agricultura irrigada bem sucedida, a civilização suméria entrou em colapso, e esse declínio foi atribuído a inundações, irrigação excessiva, infiltração, assoreamento e o aumento do lençol freático (GELBURD 1985; SHAHID; ZAMAN; HENG, 2018), que associados ao material de origem e ao clima árido, causaram a salinização da área (JACOBSEN; ADAMS, 1958).

Nos dias atuais, segundo o Global Map of Salt-affected Soils (GSASmap), mais de 424 milhões de hectares de solo superficial (0-30 cm) e 833 milhões de hectares de subsuperfície (30-100 cm) são afetados por sais (FAO, 2021). De acordo com o banco de dados alimentado por 118 países, cerca de 37 % desses solos estão localizados em desertos e outros 27 % são distribuídos em áreas de clima semiárido (FAO, 2021). No Brasil, são poucas as informações sobre as áreas salinizadas, porém há estimativas de que 20 a 25 % das áreas irrigadas, sobretudo as que se encontram em solos aluviais, apresentam problemas de salinidade e/ou de drenagem (MOTA et al., 2012; PEDROTTI et. al., 2015). As áreas mais susceptíveis à salinização estão localizadas no Semiárido brasileiro por apresentar irregularidade na distribuição de chuvas associadas a elevadas taxas de evapotranspiração e temperatura, produzindo longos períodos secos (FERREIRA et al., 2016). Além disso, essa região tem uma forte ocorrência de solos rochosos com caráter sódico e solos solódicos de drenagem deficiente (SOUZA et al., 2014; COSTA; HERRERA, 2016), favorecendo grandes riscos de salinização do solo em perímetros irrigados (HOLANDA et al., 2016).

Por definição, os solos afetados por sais são aqueles que contém sais solúveis ou seus íons em pelo menos um de seus horizontes em quantidades que estão acima do limite de toxicidade. Os principais solutos que compreendem os sais minerais dissolvidos são os cátions: sódio ( $\text{Na}^+$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e os ânions: cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), sulfato

( $\text{SO}_4^{2-}$ ), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (TANJI, 1990; FERREIRA et al., 2016). Nos solos brasileiros, predominam cloretos e sulfatos de cálcio, magnésio e sódio (FREIRE et al., 2016).

Os critérios mais utilizados para diagnóstico e caracterização do risco de salinidade são os descritos nos livros “Classification and Diagnostics of Soils of the USSR, 1977” e “Diagnosis and improvement of saline and alkali soils, USDA Agriculture Handbook, 1954”. Segundo o USDA Agriculture Handbook (1954), os solos afetados por sais são caracterizados por uma condutividade elétrica (CE) específica, obtida através da leitura do extrato de saturação do solo. Quando essa leitura é acima de 4 deciSiemens por metro (dS/m), a uma temperatura de 25 °C, o solo é considerado salino. A percentagem de saturação por sódio trocável (PST) e a relação de adsorção de sódio (RAS) são inferiores a 13 e 15, respectivamente. O pH também é aferido e tomado para fins de classificação. A CE de solos sódicos pode variar, mas geralmente é inferior a 4 dS/m a 25 °C. Solos sódicos têm percentagem de sódio trocável (ESP) superior a 15, enquanto o pH pode ser de 8,2 a 10,5 (Tabela 1) (USDA, 1954).

**Tabela 1.** Critérios e limites para classificação de solos salinos.

Critérios	Tipos de solos			
	Normal	Salino	Sódico	Salino-Sódico
CE dS m <sup>-1</sup> 25°C	< 4	> 4	< 4	> 4
PST (%)	< 15	< 13	> 15	> 15
RAS	< 13	< 15	> 13	> 13
pH	< 8,5	< 8,5	> 8,5	> 8,5

USDA Agriculture Handbook, 1954

Para o Sistema Brasileiro de Classificação do Solo (EMBRAPA, 2018), o solo tem caráter Salino quando a condutividade elétrica (CE) for igual ou maior que 4 dS/m e menor que 7 dS/m, a 25 °C (Tabela 2).

**Tabela 2.** Atributos diagnósticos para solos halomórficos.

Tipos de Solos	Atributos
Sálico*	CE ≥ 7 dS m <sup>-1</sup>
Salino*	CE ≥ 4 < 7 dS m <sup>-1</sup>
Solódico	PST 6 – 15%
Sódico	PST ≥ 15%

\*Propriedade referente à presença de sais mais solúveis em água fria que o CaSO<sub>4</sub>. EMBRAPA, 2018

Existem muitas causas para a salinidade e as fontes podem ser naturais e/ou antropogênicas. As mais comuns são: intemperismo do material de origem, água de irrigação salobra e salina, intrusão de água do mar em terras costeiras, drenagem ineficiente e lençol freático ascendente, evapotranspiração excessiva, uso excessivo de fertilizantes, uso de lodo de esgoto e/ou efluente de esgoto tratado (SHAHID; ZAMAN; HENG, 2018)

Segundo Oppenheimer et al. (2019), os últimos relatórios do IPCC revelam que as mudanças climáticas também estão contribuindo para a salinização dos solos através da elevação do nível do mar e consequente intrusão de água salgada nas águas subterrâneas.

Por fim, os danos causados pelo aumento da salinidade do solo podem gerar perdas na biodiversidade e perturbação do ecossistema, conjuntamente com o aumento do risco de erosão e abandono de terras agrícolas anteriormente produtivas, causando o declínio da produtividade das culturas (SHAHID, 2013).

### **2.3 Estresse salino e sua influência na interface solo-planta**

A aptidão agrícola de um solo depende muito da formação e estabilidade de agregados do solo, teor de umidade, porosidade, taxa de infiltração de água, drenagem, biota e fertilidade do solo. A salinidade pode afetar o crescimento das plantas indiretamente pelo efeito do sódio na degradação das condições químicas, como o aumento do pH, biológicas, e principalmente físicas.

Em solos salinos, geralmente as propriedades físicas são normais. No entanto, em solos sódicos, as reações físico-químicas afetam a estrutura do solo aumentando a densidade, causando a impermeabilização da superfície e/ou subsuperfície, diminuindo a condutividade hidráulica (SEELIG, 2000). Além disso, a flocculação das argilas nesses solos podem apresentar estrutura maciça (prismática ou colunar) que tende a acentuar a dispersão de argila e inibir a organização das partículas em agregados (RIBEIRO; RIBEIRO; JACOMINE, 2016).

Esse efeito acontece por ação dos íons de sódio (monovalentes, carregados positivamente e com maior raio hidratado), cuja atração pela partícula de argila carregada negativamente, em razão do raio hidratado maior, causa repulsão das demais partículas (vide camada de Stern e Dupla camada difusa). Uma vez que os solos sódicos são dominados por cátions monovalentes, as partículas de argila são dispersas, reduzindo assim, o tamanho dos poros e eliminando macroporos, consequentemente, reduzindo a percolação de água (SEELIG, 2000). Segundo Pedrotti et al. (2015), quanto maior for a presença de sódio trocável na solução



do solo em relação a outros cátions, principalmente os divalentes, maior será a tendência à dispersão de argila.

Além de afetar as propriedades físico-químicas do solo, a matéria orgânica, o nitrogênio, o carbono orgânico e o carbono da biomassa microbiana são altamente afetados pela salinidade (XU et al., 2020). Ademais, a respiração, a decomposição de resíduos, a nitrificação, a desnitrificação, a biodiversidade do solo e a atividade microbiana sofrem um declínio pela presença excessivas de sais no solo (SCHIRAWSKI; PERLIN, 2018). Assim, a salinização do solo é reconhecida como uma grande ameaça à atividade agrícola, recursos humanos e saúde (SHRIVASTAVA; KUMAR, 2015).

Para as plantas, uma maior concentração de sal no solo pode apresentar um duplo efeito: osmótico e iônico. Quando a concentração de sal atinge níveis altos, ocorre a restrição da absorção de água e nutrientes essenciais pelas raízes das plantas, causando o estresse osmótico (AKYOL et al., 2020). Além disso, o excesso de sais dentro da célula causa vários distúrbios fisiológicos e bioquímicos, podendo reduzir a germinação de sementes, o crescimento de plântulas, floração e frutificação, levando as plantas a morte (SINGH et al., 2015). O efeito osmótico, conjuntamente com o iônico, causa a diminuição do conteúdo de pigmento de clorofila das folhas, a área foliar e a eficiência fotossintética, em decorrência da inibição da atividade do fotossistema I e II, que é um dos principais sítios da cadeia de transporte de elétrons (KALAJI et al., 2016; SHAHID et al., 2020). O estresse salino também induz indiretamente o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), radicais livres, superóxidos e  $H_2O_2$ , sendo a cadeia de transporte de elétrons no cloroplasto e nas mitocôndrias, os principais locais de produção de ERO sob condições de estresse salino (HAMEED et al., 2021).

As plantas podem ser classificadas como glicófitas ou halófitas e, dependendo da sua capacidade de crescer em ambientes salinos, a sua resposta ao estresse difere em termos de absorção de íons tóxicos, compartimentação e/ou exclusão de íons, regulação osmótica, assimilação de  $CO_2$ , transporte de elétrons, conteúdo de clorofila e fluorescência, geração de ERO e defesas antioxidantes (TANG et al., 2015; ACOSTA-MOTOS et al., 2017). Essa tolerância das plantas ao sal pode ser medida por meio de um limiar de salinidade (CEt) (MAAS; HOFFMAN., 1977) e a produtividade relativa da cultura não é afetada até que o limiar de salinidade seja excedido. Para a maioria das culturas, esse limiar pode variar de 0,4 a 11,4 dS/m (MISHRA; MISHRA; ARORA, 2021). O efeito nocivo da salinidade nas plantas ainda sofre variação através das condições climáticas, intensidade da luz, espécies de plantas ou condições do solo (TANG et al., 2015).

## 2.4 Uso de microrganismos como alternativa no alívio de estresse salino

Lundberg et al. (2012) sugerem que uma planta crescendo em condições de campo não são apenas um indivíduo e sim uma comunidade complexa. As plantas, por sua vez, estão sempre associadas a uma comunidade bem estruturada e regulada de microrganismos (BULGARELLI et al., 2015), dando origem ao fitomicrobioma (SMITH et al., 2017).

O estabelecimento do fitomicrobioma ajudou as plantas terrestres a enfrentarem desafios diversos, como o auxílio na aquisição de nutrientes, aclimação a condições novas e desfavoráveis e a resistir a ataques de patógenos (SMITH et al., 2015), levando ao entendimento que o crescimento geral das plantas, a produtividade e a fitossanidade, dependem da relação planta-microrganismos (HTWE et al., 2019; MASOOD et al., 2020).

Nesse sentido, o uso de microrganismos halotolerantes para aumentar o crescimento de culturas sob estresse salino é uma estratégia alternativa às práticas convencionais para melhorar a tolerância das plantas ao sal (KUMAR et al., 2020a). As arqueias, bactérias e fungos são capazes de se adaptar a uma faixa variável de níveis de osmolaridade externa (RUPPEL et al., 2013), podendo promover benefícios para plantas expostas ao estresse salino.

As BPCP podem estimular o crescimento das plantas por meio de mecanismos diretos e indiretos, estabelecendo, dessa forma, relações favoráveis ao crescimento e desenvolvimento das plantas hospedeiras (EGAMBERDIEVA et al., 2016). Os mecanismos diretos incluem fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, síntese de ácidos orgânicos e substâncias quelantes (sideróforos), modulação da síntese de fitohormônios e atividade da enzima aminociclopropano-1-carboxílico deaminase (GLICK, 2012). Os mecanismos indiretos incluem a inibição do crescimento de fitopatógenos, antibiose, compostos orgânicos voláteis e enzimas líticas, indução do sistema de defesa das plantas e melhoria das propriedades físico-químicas do solo (SANTOYO et al., 2021).

Durante condições de estresse, a BPCP também tem potencial para aumentar a imunidade das plantas, induzindo a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI), através da sinalização de hormônios tradicionalmente associados ao crescimento vegetal, incluindo auxinas, ácido abscísico (ABA), citocininas, giberelinas, etileno e ácido jasmônico (BUKHAT et al., 2020).

Além de atuar na modulação de hormônios, ajudam as plantas a acumular metabólitos que auxiliam a mitigar o estresse (açúcares solúveis, glicina betaína, prolina), e auxiliam na regulação positiva de enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidase (APX), catalase

(CAT), superóxido dismutase (SOD), ácido ascórbico, glutathiona,  $\alpha$ -tocoferol e glutathiona reductase (AGAMI et al., 2016; BUKHAT et al., 2020).

Na presença excessiva de sais no solo, as BPCP ainda promovem a absorção de nutrientes e a homeostase dos íons, além de aumentar a atividade antioxidante, ao mesmo tempo em que promove o crescimento das plantas (HASHEM et al., 2016).

Diversas pesquisas têm mostrado a eficiência do uso de BPCP para melhoria e beneficiamento das práticas agrícolas sustentáveis. Bioinoculantes de *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Micromonospora*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Serratia*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* aumentaram a produção em diversas culturas agrícolas (MARTÍNEZ-HIDALGO et al., 2014; ZAHEER et al., 2016; HTWE et al., 2019; HAKIM et al., 2021).

Já a inoculação de FMA pode aumentar significativamente a concentração de vários macronutrientes e micronutrientes, elevando a produção de seiva elaborada (fotossintatos) e, conseqüentemente, aumentando o acúmulo de biomassa vegetal (CHEN et al., 2017; MITRA et al., 2019). Além disso, a simbiose com FMA aumenta o acúmulo de osmoprotetores, regula a atividade de enzimas antioxidantes e promove mudanças no ecossistema da rizosfera (BÁRZANA et al., 2015; CALVO-POLANCO et al., 2016; YIN et al., 2016; BEGUM et al., 2019).

Em relação ao estresse salino, os FMA podem dispor de inúmeros mecanismos para aumentar a tolerância das plantas ao sal: mantem a relação K/Na mais favoráveis, diminuindo os efeitos dos íons tóxicos (ESTRADA et al., 2013); facilita a absorção de água e nutrientes através de hifas extra-radiculares (CHANDRASEKARAN et al., 2014); acumula mais prolina e outros solutos orgânicos reduzindo o estresse osmótico (PORCEL et al., 2015); aumenta a síntese e eficiência de algumas enzimas para mitigar os danos oxidativos (RUIZ-LOZANO et al., 2012); induz a expressão gênica de proteínas relacionados ao estresse (AROCA et al., 2009); melhora a qualidade do solo facilitando a retenção de água, sendo essenciais em solos arenosos e regiões áridas (CHEN et al., 2018).

Várias respostas já foram observadas à inoculação de FMA em plantas expostas a estresses abióticos, destacando seus inúmeros benefícios na saúde do solo e na produtividade das culturas agrícolas. Diferentes gêneros foram usados em biofertilizantes: *Funneliformes*, *Paraglomus*, *Rhizophagus*, *Septoglomus*, *Gigaspora*, *Glomus* e *Claroideoglomus* (GRÜMBERG et al., 2015; PAL; PANDEY, 2016; ZHANG et al., 2018; HASHEM et al., 2018; BEGUM et al., 2019).

O estudo das interações sinérgicas entre as BPCP e os FMA podem levar a uma maior tolerância das plantas quando se encontram em ambientes estressantes e conseqüentemente aumentar seu potencial produtivo (MOREIRA et al., 2016).

## **2.5 Cultura do milho (*Zea mays* L.)**

A cultura do milho foi domesticada pela primeira vez a cerca de 7.000 a 10.000 anos atrás no centro-sul ou sudoeste do México. Após a domesticação, o milho se espalhou rapidamente pelas Américas, chegando ao nordeste dos EUA e sudeste do Canadá um pouco antes dessa área ser colonizada pela Europa. Dados históricos sugerem que a introdução do milho na Europa se deu por Colombo em seu retorno à Espanha depois da primeira viagem as Américas na primavera de 1493 (GOODMAN; GALINAT, 1988).

Desde então, o milho é considerado um alimento básico em muitas partes do mundo, com consumo mundial próximo a 1,2 bilhão de toneladas (USDA - safra 2021/22). No Brasil, a área plantada é estimada em 20.895,6 mil hectares, com produtividade próxima a 112.342,8 mil toneladas (CONAB – safra 2021/22), totalizando um valor estimado de R\$156.624,5 milhões (MAPA, 2022).

Devido à presença de nutrientes e fitoquímicos benéficos a saúde humana, o milho é um alimento saudável. Rico em vitaminas do complexo B, vitaminas A, C e K, que juntos ao beta-caroteno e selênio ajudam a melhorar o sistema imunológico, podendo agir até mesmo com atividade anti-HIV devido à presença de galanthus nivalis aglutinin (GNA), uma lectina de aglutinina conhecida como GNA do milho (SHAH; PRASAD; KUMAR, 2016).

Sendo uma importante matéria prima para a indústria, aproximadamente 70-80 % do total de grãos de milho cultivados no mundo é usado para produção de ração animal (SAH et al., 2016). O grão também é usado para extração comercial de amido, farinha de milho, extração de óleo de milho, flocos de milho e preparação de xarope de milho, enquanto o pó de sabugo de milho é aproveitado na fabricação de plásticos, colas, adesivos, resina, vinagre e couro artificial (SAH et al., 2020).

Os rendimentos das culturas do milho são fortemente afetados por estresses bióticos e abióticos, e com o advento das mudanças climáticas esse quadro pode se tornar mais preocupante (JACKSON; TIAN; ZHANG, 2022). Nesse sentido, é necessário a pesquisa e desenvolvimento de tecnologias sustentáveis que visem o aumento da produção sem extensão das áreas agrícolas existentes e aproveitamento das áreas abandonadas por degradação do solo. Uma boa abordagem para contornar o problema seria o uso de microrganismos isolados da rizosfera, como descrito nessa dissertação.

## Referências Bibliográficas

ACOSTA-MOTOS, J.R.; ORTUÑO, M.F.; BERNAL-VICENTE, A.; DIAZ-VIVANCOS, P.; SANCHEZ-BLANCO, M.J.; HERNANDEZ, J.A. Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. **Agronomy** 7, 18. 2017. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>

AGAMI, R.A.; MEDANI, R.A.; ABD EL-MOLA, I. A. ; TAHA, R.S. Exogenous application with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) or proline induces stress tolerance in basil plants (*Ocimum basilicum* L.) exposed to water stress. **International Journal of Environmental & Agriculture Research.**, V. 2 , p. 78. 2016.

AKYOL, T. Y.; YILMAZ, O.; UZİLDAY, B.; UZİLDAY, R.; TÜRKAN, İ. Plant response to salinity: an analysis of ROS formation, signaling, and antioxidant defense, **Turkish Journal of Botany**: Vol. 44. 2020. <https://doi.org/10.3906/bot-1911-15>

ALI, B.; WANG, X.; SALEEM, M.H.; SUMAIRA; HAFEEZ, A.; AFRIDI, M.S.; KHAN, S.; ZAIB-UN-NISA; ULLAH, I.; AMARAL JÚNIOR, A.T.D.; ALATAWI, A.; ALI, S. PGPR-mediated salt tolerance in maize by modulating plant physiology, antioxidant defense, compatible solutes accumulation and bio-surfactant producing genes. **Plants**. V.11. P. 345. <https://doi.org/10.3390/plants11030345>

ALLISON, L. E. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Soil and Water Conservation Research Branch. Salinity Laboratory Staff. **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. Nº 60. Washington, DC, 1954. 160 p.

BÁRZANA, G.; AROCA, R.; RUIZ-LOZANO, J.M. Localized effects of AM symbiosis under drought., 38: 1613-1627. **Plant Cell Environment**. 2015. <https://doi.org/10.1111/pce.12507>

BEGUM, N.; QIN, C.; AHANGER, M. A.; RAZA, S.; KHAN, M. I.; ASHRAF, M.; AHMED, N.; ZHANG, L. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. **Frontiers in Plant Science**. V. 10. P. 1068. 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068>

BUKHAT, S.; IMRAN, A.; JAVAID, S.; SHAHID, M.; MAJEED, A.; NAQQASH, T. Communication of plants with microbial world: Exploring the regulatory networks for PGPR mediated defense signaling, **Microbiological Research**, V. 238. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126486>.

BULGARELLI, D.; GARRIDO-OTER, R.; MUNCH, P. C.; WEIMAN, A.; DROGE, J.; PAN, Y.; McHARDY, A. C.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 3, p. 392-403, 2015. doi: 10.1016/j.chom.2015.01.011

CALVO-POLANCO, M.; SÁNCHEZ-ROMERA, B.; AROCA, R.; ASINS, M J.; DECLERCK, S.; DODD, I. C.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C.; ALBACETE, A.; RUIZ-LOZANO, J M. Exploring the use of recombinant inbred lines in combination with beneficial microbial inoculants (AM fungus and PGPR) to improve drought stress tolerance in tomato,

**Environmental and Experimental Botany.** V.131. P. 47-57. 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.06.015>

CHANDRASEKARAN M.; BOUGHATTAS, S.; HU, S.; OH, S.; SA, T. A meta-analysis of arbuscular mycorrhizal effects on plants grown under salt stress. **Mycorrhiza**, v. 24, n. 8, p.611–625, 2014. DOI: 10.1007/s00572-014-0582-7

CHEN, M.; ARATO, M.; BORGHI, L.; NOURI, E.; REINHARDT, D. Beneficial Services of Arbuscular Mycorrhizal Fungi – From Ecology to Application. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1270, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01270>

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2021/2022. 9º. Levantamento. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos>.

COSTA, C. S.B.; HERRERA, O. B. Halófitas brasileiras: Formas de cultivo e usos. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. 2. Ed. Fortaleza: INCTSal, Cap 16. P 243-258. 2016

EGAMBERDIEVA, D.; JABBOROVA, D.; BERG, G. Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress. **Plant and Soil**, v. 405, n. 1, p. 35–45, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2661-8>

EGOROV, V. V.; FRIDLAND, V. M.; IVANOVA, E. N.; ROZOV, N. N.; NOSIN, V. A.; FRIEV, T. A. **Classification and diagnostics of soils of the USSR**. Moscow, Kolos, 1977, p. 224.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2018, 355p.

ESTRADA, B.; AROCA, R.; BAREA, J. M.; RUÍZ-LOZANO, J. M. Native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from a saline habitat improved maize antioxidant systems and plant tolerance to salinity. **Plant Science**, v. 201, p. 42–51, 2013. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.11.009

FAO. 2021. Halt soil salinization, boost soil productivity – Proceedings of the Global Symposium on Salt-affected Soils. **Food and Agriculture Organization of the United Nations** 2021. <https://doi.org/10.4060/cb9565en>

FERREIRA, P. A.; SILVA, J. B. L.; RUIZ, H. A. Aspectos físicos e químicos de solos em regiões áridas e semiáridas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. 2. Ed. Fortaleza: INCTSal, 2016, cap. 3, p. 17-34.

FREIRE, M. B. G. S.; PESSOA, L. G. M.; GHEYI, H. R. Métodos de análises químicas para solos afetados por sais. In: In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. 2. Ed. Fortaleza: INCTSal, 2016, cap.4, p. 123-148

GELBURD, D. E. Managing salinity lessons from the past. **Journal of Soil and Water Conservation**. V. 40. N 4. P. 329-331. 1985.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 15, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

GOODMAN, M. M.; GALINAT, W. C. The history and evolution of Maize. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 7, n. 3, p. 197–220, 1988. <https://doi.org/10.1080/07352688809382264>

GRÜMBERG, B.C.; URCELAY, C.; SHROEDER, M.A.; VARGAS-GIL, S.; LUNA, C. M. The role of inoculum identity in drought stress mitigation by arbuscular mycorrhizal fungi in soybean. **Biology and Fertility of Soils** V. 51, 1–10. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0942-7>

HAMEED, A.; AHMED, M.Z.; HUSSAIN, T.; AZIZ, I.; AHMAD, N.; GUL, B.; NIELSEN, B.L. Effects of Salinity Stress on Chloroplast Structure and Function. **Cells**, 2021, 10, 2023. <https://doi.org/10.3390/cells10082023>

HASHEM, A.; ABD\_ALLAH, E. F.; ALQARAWI, A. A.; AL-HUQAIL, A. A.; WIRTH, S.; EGAMBERDIEVA, D. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic bacteria enhances plant growth of *Acacia gerrardii* under salt stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1089, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01089>

HOLANDA, J. S.; AMORIM, J. R. A.; NETO, M. F.; HOLANDA, A. C.; SÁ, S. V. S. Qualidade da Água para Irrigação. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. 2. Ed. Fortaleza:INCTSal, 2016, cap.4, p. 35-50.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Projeções do agronegócio. Brasil 2020/21 a 2030/31. 12ª edição, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-de-2022-e-estimado-em-r-1-2-trilhao>

HAKIM, S., IMRAN, A. & MIRZA, M.S. Phylogenetic diversity analysis reveals *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Ensifer aridi* as major symbionts of mung bean (*Vigna radiata* L.) in Pakistan. **Braz J Microbiol** 52, 311–324. **Brazilian Journal of Microbiology** 2021. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00397-9>

HTWE, A. Z.; MOH, S. M.; MOE, K.; YAMAKAWA, T. Biofertilizer production and application for enhancing plant growth, nodulation, nitrogen fixation, nutrient uptake and seed yield of soybeans. **Agronomy**. V. 9. N. 4. P. 162. 2019.

HTWE, A. Z.; MOH, S. M.; SOE, K. M.; MOE, K.; YAMAKAWA, T. Effects of biofertilizer produced from *Bradyrhizobium* and *Streptomyces griseoflavus* on plant growth, nodulation, nitrogen fixation, nutrient uptake, and seed yield of mung bean, cowpea, and soybean. **Agronomy**, v. 9, n. 2, p. 77, 2019. <https://doi.org/10.3390/agronomy9020077>

IPCC, 2019: **Summary for Policymakers**. In: IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate. H.-O. PÖRTNER, D.C. ROBERTS, V. MASSON-

DELMOTTE, P. ZHAI, M. TIGNOR, E. POLOCZANSKA, K. MINTENBECK, A. ALEGRÍA, M. NICOLAI, A. OKEM, J. PETZOLD, B. RAMA, N.M. WEYER (eds.). [https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/sites/3/2019/11/03\\_SROCC\\_SPM\\_FINAL.pdf](https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/sites/3/2019/11/03_SROCC_SPM_FINAL.pdf)

JACKSON, D.; TIAN, F.; ZHANG, Z. Maize genetics, genomics, and sustainable improvement. **Molecular Breeding**, v. 42, n. 2, p. 1-3, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11032-021-01266-5>

JACOBSON, T.; ADAMS, R. M. Salt and silt in ancient Mesopotamian agriculture. **Science**, v. 128, n. 3334, p. 1251–1258, 1958.

KALAJI, H. M.; JAJOO, A.; OUKARROUM, A.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I A.; CETNER, M. D.; ŁUKASIK, I.; GOLTSEV, V.; LADLE, R. J.. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**. V. 38, 102. 2016. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>

aKUMAR, A.; SINGH, S.; GAURAV, A. K.; SRIVASTAVA, S.; VERMA, J. P. Plant Growth-promoting Bacteria: Biological Tools For The Mitigation Of Salinity Stress In Plants. **Frontiers in Microbiology**, v.11, p. 1216, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01216>

bKUMAR, V.; KUMAR, P.; KHAN, A. Optimization of PGPR and silicon fertilization using response surface methodology for enhanced growth, yield and biochemical parameters of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under saline stress. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101463, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101463>

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

MARTÍNEZ-HIDALGO, P., GALINDO-VILLARDÓN, P., TRUJILLO, M.; IGUAL, J. M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Micromonospora from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising Plant Probiotic Bacteria.. **Scientific Reports** 4, 6389. 2014. <https://doi.org/10.1038/srep06389>

MASOOD, S.; ZHAO, X. Q.; SHEN, R. F. *Bacillus pumilus* promotes the growth and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization. **Scientia Horticulturae**, v. 272, p. 109581, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109581>

MASS, E. V.; HOFFMAN, G. J. Crop Salt Tolerance—Current Assessment. **Journal of the Irrigation and Drainage Division**, v.103, n. 2, p. 115-134, 1977. <https://doi.org/10.1061/JRCEA4.0001137>

MISHRA, P.; MISHRA, J.; ARORA, N. K. Plant growth promoting bacteria for combating salinity stress in plants – Recent developments and prospects: A review. **Microbiological Research**, V. 252. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126861>.



MITRA, D.; MONDAL, R.; KHOSHROU, B.; SENAPATI, A.; RADHA, T. K.; Bhaswatimayee MAHAKUR, B.; UNİYAL N.; MYO, E. M.; BOUTAJ, H.; GUERRA SIERRA, B G.; PANNEERSELVAM, P.; GANESHAMURTHY, A. N.; ANĐJ ELKOVIĆ, S.; VASIĆ, T.; RANI, A.; DUTTA, S.; DAS MOHAPATRA, P K. Actinobacteria-enhanced plant growth, nutrient acquisition, and crop protection: Advances in soil, plant, and microbial multifactorial interactions, **Pedosphere**, V. 32, Issue 1, P.149-170. 2022. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60042-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60042-5).

MOREIRA, H.; PEREIRA, S. I. A.; MARQUES, A. P. G. C.; RANGEL, A. O. S. S.; CASTRO, P. M. L. Mine land valorization through energy maize production enhanced by the application of plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 6940–6950, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5914-4>

MOTA, L. H. S. O.; GOMES, A. S.; VALLADARES, G. S.; MAGALHÃES, R. M. F.; LEITE, H. M. F.; SILVA, T. A. da. Risco de salinização das terras do baixo Acaraú (CE). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, n. 4, p. 1203-1209, ago. 2012.

NADEEM, S. M.; AHMAD, M.; ZAHIR, Z. A.; JAVAID, A.; ASHRAF, M. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology Advances**. v.32, n.2, p.429-448, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.005>

OMUTO, C. T.; VARGAS, R. R.; EL MOBARAK, A. M.; MOHAMED, N.; VIATKIN, K.; YIGINI, Y. **Mapping of salt-affected soils: Technical manual**. 2020 FAO <https://doi.org/10.4060/ca9215en>

PAL, A.; PANDEY, S. Role of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and reclamation of barren soil with wheat (*Triticum aestivum* L.) crop. **International Journal of Soil Science**. 12, 25–31. 2016. doi: 10.3923/ijss.2017.25.31

PARVIN, S.; VAN GEEL, M.; YEASMIN, T.; VERBRUGGEN, E.; HONNAY, O. Effects of single and multiple species inocula of arbuscular mycorrhizal fungi on the salinity tolerance of a Bangladeshi rice (*Oryza sativa* L.) cultivar. **Mycorrhiza**, v. 30, n. 4, p. 431–444, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00957-9>

PEDROTTI, A.; CHAGAS, R.; RAMOS, V. C.; PRATA, A. P. N.; LUCAS, A. A. T.; SANTOS, P. B. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. Revista Eletrônica em Gestão, **Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 1308-1324, 2015. doi:105902/2236117016544

PORCEL, R.; REDONDO-GÓMEZ, S.; MATEOS-NARANJO, E.; AROCA, R.; GARCIA, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis ameliorates the optimum quantum yield of photosystem II and reduces non-photochemical quenching in rice plants subjected to salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 185, n. 185, p. 75–83, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.006>

QADIR, M.; QUILLÉROU, E.; NANGIA, V.; MURTAZA, G.; SINGH, M.; THOMAS, R.; DRECHSEL, P.; NOBLE, A. Economics of salt-induced land degradation and restoration. **Natural Resources Forum**. V. 38: 282-295. 2014 <https://doi.org/10.1111/1477-8947.12054>

RIBEIRO, M.R.; RIBEIRO FILHO, M. R.; PAULO K. T. JACOMINE, P K T. Origem e classificação dos solos afetados por sais. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. 2. Ed. Fortaleza: INCTSal, 2016. Cap 2. P 9-16.

RUIZ-LOZANO, J. M.; PORCEL, R.; AZCÓN, C.; AROCA, R. Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 11, p. 4033–4044, 2012. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers126>

RUPPEL, S.; FRANKEN, P.; WITZEL, K. Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. **Functional Plant Biology** V. 40, 940-951. 2013 <https://doi.org/10.1071/FP12355>

SAH, R. P.; AHMED, S.; MALAVIYA, D. R; SAXENA, P. Identification of consistence performing dual purpose maize (*Zea mays* L.) genotypes under semi-arid condition. **Range Management and Agroforestry**, v. 37, n. 2, p. 162–166, 2016.

SAH, R.P.; CHAKRABORTY, M.; PRASAD, K.; PANDIT, M.; TUDU, C. K.; CHAKRAVARTY, M. K.; NARAYAN, S. C.; RANA, M.; MOHARANA, D. Impact of water deficit stress in maize: Phenology and yield components. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59689-7>

SANTOYO, G.; GAMALERO, E.; GLICK, B. R. Mycorrhizal-Bacterial Amelioration of Plant Abiotic and Biotic Stress. **Frontiers in Sustainable Food Systems** V. 5:672881. 2021 doi: 10.3389/fsufs.2021.672881

SCHIRAWSKI, J.; PERLIN, M.H. Plant–Microbe Interaction 2017—The Good, the Bad and the Diverse. **International Journal of Molecular Sciences**. 2018, 19, 1374. <https://doi.org/10.3390/ijms19051374>

SEELIG, B. D.; Salinity and Sodicity in North Dakota Soils NDSU Extension Service, North Dakota State University of Agriculture and Applied Science, Fargo, ND (2000), p. 16

SHAH, T. R.; PRASAD, K.; KUMAR, P. Maize—A potential source of human nutrition and health: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1166995, 2016. DOI: 10.1080/23311932.2016.1166995

SHAHID S. A.; ZAMAN, M.; HENG, L. Soil Salinity: Historical Perspectives and a World Overview of the Problem. In: ZAMAN, M; SHAHID, S. A.; HENG, L. **Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques**. Springer Nature, cap. 2, p.43-53, 2018. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3_2)

SHAHID, M.; AHMED, T.; NOMAN, M.; Javed, M. T.; JAVED, M. R.; MUHAMMAD TAHIR, M.; SHAH, S. M. Non-pathogenic *Staphylococcus* strains augmented the maize growth through oxidative stress management and nutrient supply under induced salt stress. **Annals of Microbiology** . V.69, 727–739. 2019. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01464-9>

SHAHID, S. A.; ABDELFAH, M. A.; TAHA, F. K. Developments in salinity assessment, modeling, mapping, and monitoring from regional to submicroscopic scales. In: SHAHID, S. A.; ABDELFAH, M. A.; TAHA, F. K. (eds) **Developments in soil salinity assessment and reclamation – innovative thinking and use of marginal soil and water resources in irrigated agriculture**. Springer: Dordrecht, 2013, p. 3–43. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5684-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5684-7_13)

SHRIVASTAVA, P.; KUMAR, R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. **Saudi Journal of Biological Sciences**. V. 22, 123–131. 2015 doi: 10.1016/j.sjbs.2014.12.001

SINGH, B. K.; TRIVEDI, P.; SINGH, S.; MACDONALD, C. A.; VERMA, J. P. Emerging microbiome technologies for sustainable increase in farm productivity and environmental security. **Microbiology Australia**, v. 39, n. 1, p. 17-23, 2018. <https://doi.org/10.1071/MA18006>

SINGH, B. K.; TRIVEDI, P.; SINGH, S.; MACDONALD, C. A.; VERMA, P. J. Emerging microbiome technologies for sustainable increase in farm productivity and environmental security. **Microbiology Australia** 39 (1) 17-23. 2018. <https://doi.org/10.1071/MA1800639:17-23>.

SINGH, R. P.; JHA, P.; E JHA, P. N. The plant-growth-promoting bacterium *Klebsiella* sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 184, p. 57–67, 2015. doi: 10.1016/j.jplph.2015.07.002

SMITH, D. L.; GRAVEL, V.; YERGEAU, E. Editorial: signaling in the phytomicrobiome. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 611, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00611>

SMITH, D. L.; PRASLICKOVA, D.; ILANGUMARAN, G. Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p. 722, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00722>

SOUZA, E. R.; FREIRE, M. B. G. S.; MELO, D. V. M.; MONTENEGRO, A. A. A. Management of *Atriplex nummularia* Lindl. in a salt affected soil in a semi arid region of Brazil. **International Journal of Phytoremediation**, v.16, n. 1, p.73-85, 2014. doi: 10.1080/15226514.2012.759529

TANG, X.; MU, X.; SHAO, H.; WANG, H.; BRESTIC, M. Global plant-responding mechanisms to salt stress: Physiological and molecular levels and implications in biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology** . V. 35, 425–437. 2015. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.889080>

TANJI, K. K. Nature and extent of agricultural salinity. In: Tanji, K. K. (ed) **Agricultural salinity assessment and management, ASCE manuals and reports on engineering practice No 71**. New York: ASCE, 1990, pp 1–17.

U.S.D.A. Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils. **Agriculture Handbook No. 60**; Richards, L.A., Ed.; U.S. Department of Agriculture: Washington, DC, USA, 1954; Volume 120, p. 800

U.S.D.A - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Grain: World Markets and trade; Production, Supply and Distribution (PSD) on line. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>.

WANG, J.; FU, Z.; REN, Q.; ZHU, L.; LIN, J.; ZHANG, J.; CHENG, X.; MA, J.; YUE, J. Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth, Photosynthesis, and Nutrient Uptake of *Zelkova serrata* (Thunb.) Makino Seedlings under Salt Stress. **Forests**, v. 10, n. 2, p.186, 2019. <https://doi.org/10.3390/f10020186>

WANG, J.; YUAN, J.; REN, Q.; ZHANG, B.; ZHANG, J.; HUANG, R.; WANG, G. G. Arbuscular mycorrhizal fungi enhanced salt tolerance of *Gleditsia sinensis* by modulating antioxidant activity, ion balance and P/N ratio. **Plant Growth Regulation**, v. 97, p. 33-49, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10725-021-00792-8>

XU, H.; LU, Y.; TONG, S. Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence of Maize Seedlings under Salt Stress. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 30, n. 3, p. 199-204, 2018. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i3.1642>

XU, Y.; LI, Y.; LONG, C.; HAN, L. Alleviation of salt stress and promotion of growth in peanut by *Tsukamurella tyrosinosolvens* and *Burkholderia pyrrocinia*. **Biologia**. p. 1-11, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01073-z>

YIN, N.; ZHANG, Z.; WANG, L.; QUIAN, K. Variations in organic carbon, aggregation, and enzyme activities of gangue-fly ash-reconstructed soils with sludge and arbuscular mycorrhizal fungi during 6-year reclamation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 17, p. 17840–17849, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6941-5>

YUAN, Z.; PAN, X.; JIN, W. Tree-associated symbiotic microbes and underlying mechanisms of ecological interactions: a case study of poplar. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, n. 1, p. 381-397, 2019. DOI:10.5846/stxb201710251909

ZAHEER, A.; MALIK, A.; SHER, A.; QAISRANI, M. M.; MEHMOOD, A.; KHAN, S U.; ASHRAF, M.; MIRZA, Z.; KARIM, S.; RASOOL, M. Isolation, characterization, and effect of phosphate-zinc-solubilizing bacterial strains on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, **Saudi Journal of Biological Sciences**, V.26. I. 5. P.1061-1067. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.04.004>.

### 3 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E FOTOSSINTÉTICOS DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.) INOCULADAS COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS SOB ESTRESSE SALINO

#### Resumo

A salinidade do solo emergiu como uma das maiores restrições de produtividade das culturas agrícolas ao redor do mundo. Nas últimas décadas, as atividades antrópicas exacerbaram a taxa de salinização do solo, colocando em risco a segurança alimentar e a biodiversidade. Uma fonte alternativa para aumentar o rendimento e as chances de sobrevivência das culturas agrícolas em ambientes estressores é a utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). Essas bactérias associadas às raízes são adaptadas a flutuações ambientais desfavoráveis e oferecem condições de sobrevivência às plantas hospedeiras contra flutuações ambientais e outros estresses abióticos, como seca, salinidade ou poluição por metais pesados. Sendo assim, 24 cepas de BPCP isoladas do solo rizosférico de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido foram inoculadas em plantas de milho com o objetivo de comprovar o potencial de promoção de crescimento sob estresse salino. Inicialmente, as BPCP foram testadas *in vitro* para assegurar a característica de halotolerância. Posteriormente, dez isolados foram escolhidos com os melhores desempenhos de sobrevivência ao meio halofílico para serem inoculadas em plantas de milho (IPA CMS-36): 24-1; 28-7; 28-10; 43; 46-1; 52; 59-3; 70; 79-1; 85. As plantas inoculadas foram submetidas a gradientes de concentração de solução salina distintas (0 mM, 40 mM e 80 mM de NaCl) para simular o estresse salino. O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, obedecendo o arranjo experimental de blocos ao acaso, com 5 repetições, além dos controles sem inoculação para cada dose, totalizando 165 unidades experimentais. Os parâmetros biométricos, os teores de pigmentos fotossintéticos foliares e parâmetros da emissão da fluorescência da clorofila a (Fluorescência inicial [F0]; Fluorescência variável [Fv]; Fluorescência máxima [Fm]; Eficiência Quântica do PSII [Fv/Fm]; Eficiência quântica por centro de reação [Et0/CR]) foram avaliados aos 60 dias após o início do experimento. Todos os parâmetros foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando o teste Skott-Knott a 5 % de probabilidade, por meio do programa SISVAR versão 5.1. Como resultado foi observado um incremento na altura das plantas associado a inoculação das bactérias em 41,01 % (40 mM) e 36 % (80 mM). Para a biomassa seca da parte aérea o estímulo da inoculação foi de 65,76 % e 75,20 % para a concentração 40 mM e 80 mM, respectivamente. A massa radicular teve um aumento de 23,77 % para a concentração de NaCl de 40 mM e 32,74 % para a maior concentração (80 mM). Nos parâmetros do diâmetro do caule a contribuição positiva da inoculação foi de 95,15 % (80 mM) e 88,19 % (40 mM). O número de folhas teve um aumento de 3 a 4 folhas por planta inoculada em relação ao controle nas duas doses de NaCl aplicadas como rega, se aproximando de um total de 134 % de incremento na maior concentração e 171,5 % na dose de 40 mM. As BPCP 28-7; 43; 46-1; 70 e 79-1 foram as mais promissoras, promovendo o crescimento do milho em condições de estresse salino, sendo indicadas para experimentos posteriores. As bactérias 24-1; 46-1; 52; e 70 demonstraram boa performance na proteção do aparato fotossintético quando promoveram o acúmulo de carotenóides na ordem de 110,07 %; 227,13 %; 289,92 %; e 117,82 %, indicando a possibilidade de aproveitamento em biotecnologias voltadas para mitigação de estresses bióticos e abióticos de maneira sustentável.

Palavras-chave: Salinidade. Fotossíntese. Rizosfera.

### **3 BIOMETRIC AND PHOTOSYNTHETIC PARAMETERS OF CORN PLANTS (*Zea mays* L.) INOCULATED WITH GROWTH-PROMOTING BACTERIA OF PLANTS UNDER SALINE STRESS**

#### **Abstract**

Soil salinity has emerged as one of the biggest productivity constraints of agricultural crops around the world. In recent decades, human activities have exacerbated the rate of soil salinization, putting food security and biodiversity at risk. An alternative source to increase the yield and the chances of survival of agricultural crops in stressful environments is the use of plant growth-promoting bacteria (PGPB). These root-associated bacteria are adapted to unfavorable environmental fluctuations and provide host plants with conditions for survival against environmental fluctuations and other abiotic stresses such as drought, salinity or heavy metal pollution. Therefore, 24 strains of PGPB isolated from the rhizospheric soil of *Mimosa bimucronata* from a temporary lake in the semiarid region were inoculated in corn plants with the objective of proving the potential for promoting growth under saline stress. Initially, the PGPB were tested in vitro to ensure the halotolerance characteristic. Subsequently, ten isolates were chosen with the best survival performances in the halophilic medium to be inoculated in corn plants (IPA CMS-36): 24-1; 28-7; 28-10; 43; 46-1; 52; 59-3; 70; 79-1; 85. Inoculated plants were subjected to distinct saline concentration gradients (0 mM, 40 mM and 80 mM NaCl) to simulate saline stress. The experiment was carried out under greenhouse conditions, following the experimental arrangement of randomized blocks, with 5 replications, in addition to the controls without inoculation for each dose, totaling 165 experimental units. Biometric parameters, leaf photosynthetic pigment content and chlorophyll a fluorescence emission parameters (initial fluorescence [F<sub>0</sub>]; variable fluorescence [F<sub>v</sub>]; maximum fluorescence [F<sub>m</sub>]; PSII electron flux [F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>]; Efficiency quantum per reaction center [Et<sub>0</sub>/CR]) were evaluated at 60 days after the beginning of the experiment. All parameters were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means compared using the Skott-Knott test at 5% probability, using the SISVAR version 5.1 program. As a result, an increase in plant height associated with bacterial inoculation was observed in 41.01% (40 mM) and 36 % (80 mM). For shoot dry biomass, the inoculation stimulus was 65.76% and 75.20% for the 40 mM and 80 mM concentrations, respectively. Root mass increased by 23.77% for NaCl concentration of 40 mM and 32.74% for the highest concentration (80 mM). In the stem diameter parameters, the positive contribution of inoculation was 95.15% (80 mM) and 88.19 % (40 mM). The number of leaves had an increase of 3 to 4 leaves per inoculated plant in relation to the control in the two doses of NaCl applied as irrigation, approaching a total of 134% increase in the highest concentration and 171.5% in the dose of 40 mm BPCP 28-7; 43; 46-1; 70 and 79-1 were the most promising, promoting maize growth under saline stress conditions, being indicated for further experiments. Bacteria 24-1; 46-1; 52; and 70 showed good performance in protecting the photosynthetic apparatus when they promoted the accumulation of carotenoids in the order of 110.07%; 227.13%; 289.92%; and 117.82%, indicating the possibility of using biotechnologies aimed at mitigating biotic and abiotic stresses in a sustainable way.

**Keywords:** Salinity. Photosynthesis. Rhizosphere

### 3.1 Introdução

A rizosfera é um ambiente edáfico, descrito por Hiltner (1904) pela primeira vez como a porção de solo em torno das raízes das plantas que é habitada por uma população singular de microrganismos influenciados pelos exsudatos radiculares resultantes da atividade metabólica das plantas. Sendo assim, é um ambiente dinâmico, autossustentável e heterogêneo no qual uma comunidade diversificada de microrganismos pode coexistir (ARORA et al., 2020), representando um ponto crítico (*hotspot*) para as transformações biogeoquímicas que estão incluídas no processo de formação do solo, no ciclo de elementos, e na produtividade final dos ecossistemas terrestres (ZHALNINA et al., 2018).

O microbioma que se forma na rizosfera é fortemente dependente dos metabólitos derivados das plantas (exsudatos radiculares) (HANEY et al., 2015; MAHMUD et al., 2021). A partir desses metabólitos, as plantas conseguem modular a comunidade microbiana no local, recrutando ou repelindo microrganismos alvo (GLICK, 2015).

Em contrapartida, os microrganismos na rizosfera também beneficiam as plantas por meio de compostos bioquímicos, que juntos aos exsudatos radiculares, formam os rizodépósitos, onde são encontrados proteínas, lipídios, carboidratos, fitohormônios e outros metabólitos primários e secundários como vitaminas, compostos fenólicos, derivados de esteroides e antibióticos (MASHABELA et al., 2022).

Entre os microrganismos associados as plantas, as BPCP (Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas) têm se mostrado muito eficazes para aumentar a resistência dos vegetais aos estresses bióticos e abióticos, além de ser um recurso ecologicamente correto (GLICK, 2014). Dessa forma, a inoculação de BPCP em plantas agrícolas, pode resultar no desenvolvimento de mecanismos diretos e indiretos de promoção de crescimento das plantas, produzindo compostos estimulantes, melhorando a absorção de nutrientes do solo e protegendo as plantas da infecção por patógenos (OROZCO-MOSQUEDA et al., 2018).

O uso de BPCP em ambientes estressados vem ganhando atenção de pesquisadores há décadas, devido à sua capacidade de melhorar o desenvolvimento das plantas (KHATOON et al., 2020). Em solos afetados por sais, culturas agrícolas apresentam sinais de deficiência de nutrientes, toxicidade iônica, estresse oxidativo, atividade fotossintética reduzida e taxa de germinação diminuída, resultando em menor produtividade (KUMAR et al., 2020).

Segundo Zhu et al. (2015), as plantas estressadas inoculadas por BPCP preferem a absorção de osmólitos liberados pelas BPCP quando expostas a condições de alto teor de sal.

Assim, muitos simbiontes microbianos podem ser usados como biofertilizantes, liberando nutrientes adicionais para a planta por meio de mecanismos sinérgicos, que incluem a fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, atividade celulolítica, acidificação do solo e produção de sideróforos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; OROZCO-MOSQUEDA et al., 2021), produção de fitohormônios, exopolissacarídeos, compostos orgânicos voláteis e enzimas antioxidantes, desencadeando genes responsivos ao estresse sob altas concentrações de sal (BHAT et al., 2020).

Em pesquisas recentes, cepas de vários gêneros bacterianos, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Tsukamurella* e *Burkholderia*, demonstraram seu potencial em diminuir os efeitos do estresse salino e promovendo o crescimento de várias plantas, incluindo soja, alface, arroz, milho e amendoim (YASMIN et al., 2020; VERMA et al., 2020; FÁTIMA et al., 2020; ABDEL LATEF et al., 2020; XU et al., 2022).

Sabe-se que a salinização do solo em áreas agricultáveis é um dos principais fatores de restrição ao desenvolvimento das plantas e da produtividade agrícola (particularmente em áreas áridas e semiáridas do mundo), representando assim, uma séria ameaça à segurança alimentar, ao meio ambiente e à biodiversidade (ARORA et al., 2021). Sendo assim, se faz necessário mais pesquisas e aplicações do uso de BPCP prospectadas de solos de regiões áridas e semiáridas do mundo, visando o aumento da produtividade e remediação de áreas degradadas por salinidade por meio de biotecnologias que garantam sustentabilidade dos sistemas naturais.

Dessa forma, bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas de uma lagoa temporária de uma região semiárida do Brasil, foram inoculadas em plantas de milho com o objetivo de se avaliar seu desempenho na mitigação dos efeitos do estresse salino.

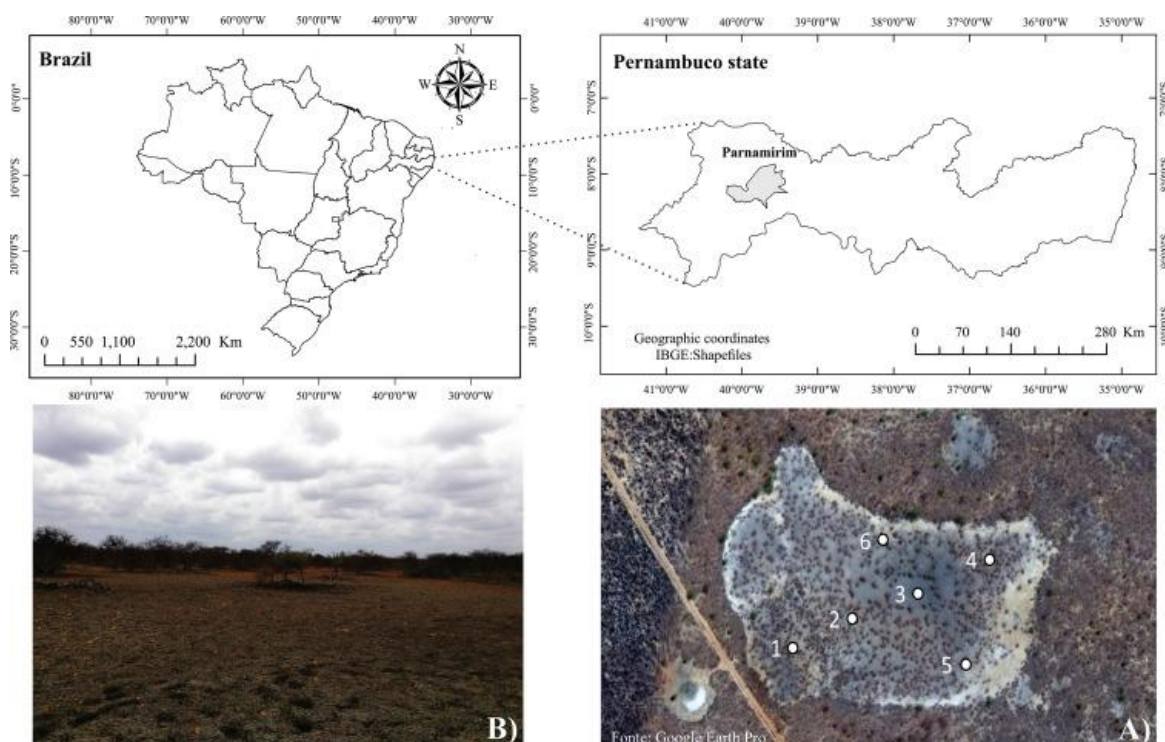


## 3.2 Material e Métodos

### 3.2.1 Seleção de cepas de BPCP

Para a realização desse estudo, foram utilizadas cepas de BPCP isoladas anteriormente de um solo coletado em uma lagoa temporária sem alteração antrópica, localizada no distrito de Veneza, pertencente ao município de Parnamirim – PE, Brasil (Figura 1) (ARAÚJO et al., 2020).

**Figura 1.** Localização da lagoa temporária e pontos de coletas de amostras do solo rizosférico e do solo adjacente do *Mimosa bimucronata* no município de Parnamirim –PE



Localização geográfica do município de Parnamirim, Pernambuco, Brasil. (A) Distribuição dos pontos de amostragem (B) em lagoa temporária. Fonte: Araújo et al. (2020)

Para a realização desse trabalho, foram escolhidas 24 BPCP (Tabela 1), e todas elas apresentaram produção da enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato deaminase (ACC deaminase), ácido indol-3-acético (AIA) e também considerados xerotolerantes (crescimento

em meio com atividade de água reduzida - Aw) em testes conduzidos em laboratório (ARAÚJO, et al., 2020).

**Tabela 1.** Características de bactérias promotoras de crescimento de planta para os testes de tolerância a salinidade, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil

Isolados	AIA	ACC	Aw
13-3	Média	Produtor	0,957
16-2	Média	Produtor	0,957
24	Média	Produtor	0,957
24-1	Elevada	Produtor	0,957
28-7	Elevada	Produtor	0,957
28-10	Elevada	Produtor	0,844
38	Alta	Produtor	0,957
43	Média	Produtor	0,957
43-1	Média	Produtor	0,957
46-1	Elevada	Produtor	0,844
52	Alta	Produtor	0,957
59	Elevada	Produtor	0,897
59-3	Elevada	Produtor	0,844
59-6	Alta	Produtor	0,957
66-1	Média	Produtor	0,957
66-2	Alta	Produtor	0,957
66-3	Alta	Produtor	0,957
67-1	Alta	Produtor	0,844
70	Alta	Produtor	0,844
76-1	Média	Produtor	0,957
79-1	Elevada	Produtor	0,957
82	Alta	Produtor	0,957
84	Alta	Produtor	0,897
85	Elevada	Produtor	0,957

AIA; 1 - 11 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (média); 11 - 50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (alta) e > 50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (elevada); IS: x (não solubiliza); IS < 2 (baixo); IS 2 - 4 (médio) e IS > 4 (alto); ACC: produtor; Aw: crescimento em meio com reduzida atividade de água (ARAÚJO et al., 2020)

Após seleção inicial, levando em consideração os critérios de nível de produção de AIA; produção de ACC deaminase e restrição de água no meio de cultura (AIA, ACC e Aw, respectivamente) (Tabela 1), as bactérias isoladas foram testadas em Meio Ágar-Halofílico segundo metodologia proposta por Vinothini, Hussain, Jayaprakashvel (2014) (Anexo 2), com suplementação de NaCl nas seguintes concentrações: 0M; 0,1M; 0,5M e 2,5 M. O objetivo do ensaio foi testar o nível de tolerâncias das cepas a salinidade.

O crescimento das bactérias em meio halofílico foi verificado após 72 horas de crescimento em BOD a 30 °C e avaliado conforme a capacidade de sobrevivência dos isolados em cada concentração de NaCl, seguindo o critério de: crescimento ótimo (+++), crescimento médio (++) , crescimento fraco (+) e nenhum crescimento (-) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Teste de resistência a salinidade *in vitro* com 24 cepas de bactérias promotoras e crescimento de plantas isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil, em teste *in vitro* em meio halofílico.

Isolados	0 M	0,1M	0,5M	2,5M
13-3	+++	+++	++	-
16-2	+++	++	++	-
24	++	+	-	-
24-1	+++	+++	++	-
28-7	+++	++	+	-
28-10	+++	++	+	-
38	++	+	+	-
43	+++	+++	+++	-
43-1	+++	++	+	-
46-1	+++	++	++	-
52	+++	++	++	-
59	+++	++	+	-
59-3	+++	++	++	+
59-6	+++	++	+	-
66-1	+++	+++	++	-
66-2	+++	++	+	-
66-3	+++	+	+	-
67-1	+++	++	++	-
70	+++	+++	+++	-
76-1	+	-	-	-
79-1	+++	+++	++	-
82	+++	+	++	-
84	+++	+++	+++	-
85	+++	++	+++	-

Crescimento ótimo (+++); Crescimento médio (++); Crescimento fraco (+); Nenhum crescimento (-)

### 3.2.2 Seleção de cepas para compor o teste de promoção de crescimento em plantas de milho (*Zea mays L.*)

Após o teste *in vitro* para avaliar o crescimento das bactérias, foram selecionadas 10 cepas para compor o primeiro experimento em casa de vegetação, a fim de avaliar os parâmetros

biométricos. Além disso, foram coletados dados de fluorescência da clorofila e pigmentos fotossintéticos.

A princípio, foram escolhidas as estirpes com o crescimento ótimo ou médio em meio agar-halofílico. Posteriormente, foi observado as bactérias que apresentaram produção de AIA elevada ou alta. Diante desses fatores, as bactérias escolhidas para o teste de promoção de crescimento em plantas de milho (IPA CMS-36) foram: 24-1; 28-7; 28-10; 43; 46-1; 52; 59-3; 70; 79-1 e 85. Todas as cepas eram produtoras da enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato deaminase (ACC deaminase).

### ***3.2.3 Inoculação de BPCP em sementes de milho (*Zea mays* L.) para teste de promoção de crescimento***

As sementes de milho (IPA CMS-36) passaram por um procedimento de limpeza para desinfestação de possíveis microrganismos que pudessem interferir nos resultados. Foi realizada a imersão das sementes de milho em álcool 70 % por 3 min; em seguida foram colocadas em hipoclorito de sódio 2,5 % (v/v) por um período de tempo de 7 min; ao passar esse tempo foram novamente mergulhadas em álcool 70 % por 1 min; por fim, as sementes foram lavadas em água destilada estéril.

Depois de devidamente desinfestadas, as sementes foram colocadas em placa de petri com meio de cultura Ágar-Água com objetivo de verificar o crescimento de algum microrganismo contaminante. Ao decorrer de cinco dias, as placas foram observadas sem indícios de contaminantes.

Para preparação do inóculo, as cepas de BPCP escolhidas foram adicionadas em meio King B líquido (Anexo 1) e ficaram sob agitação dentro de erlenmeyer em mesa agitadora em uma rotação de 150 rpm por 48 horas.

Quando atingiram uma densidade ótica de  $10^8$  ( $DO_{550nm} = 0,1$ ), as sementes previamente desinfestadas foram colocadas dentro dos erlenmeyer e agitadas por duas horas em mesa agitadora (BISEN et al., 2015; KAVAMURA et al., 2013). Após duas horas de agitação, foi realizada a semeadura das sementes inoculadas em substrato estéril (areia lavada e vermiculita autoclavadas (1:1) (v/v)). Ao decorrer 15 dias após a semeadura, foi realizada a re-inoculação das BPCP aplicando 1 mL de inóculo o mais próximo possível da raiz das plantas de milho.

### ***3.2.4 Montagem e condução do experimento em casa de vegetação***

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) durante o período de 19 de outubro de 2020 a 18 de dezembro de 2020, totalizando 60 dias de experimento.

O plantio foi realizado em vasos de 2 litros de capacidade, utilizando substrato estéril de vermiculita e areia na proporção de 1:1 (v/v), com 3 sementes por vaso. Um desbaste foi realizado 15 dias após a semeadura (DAS) deixando apenas uma planta por vaso.

A irrigação foi realizada duas vezes por semana com água salina em duas concentrações de NaCl: 40 mM e 80 mM, seguindo o critério de necessidade da cultura. A rega de algumas unidades experimentais foi feita com água destilada com condutividade hidráulica aferida e monitorada a quem foi atribuído, para fins de identificação, a nomenclatura de 0 mM. Toda a água destilada usada no experimento passou pelo processo de esterilização em autoclave por 1 hora a 120 °C.

Junto a rega salina, era feita também a administração de solução nutritiva completa (HOAGLAND; ARNON, 1950) para garantir a nutrição das plantas de milho durante a condução do experimento (Anexo 3).

### ***3.2.5 Parâmetros de crescimento vegetal e parâmetros fotossintéticos***

Durante a condução do experimento, a cada quinze dias foram medidos os parâmetros para estimar a altura de planta (AP) (cm), diâmetro do caule (DC) (cm), número de folhas (NF). No final do experimento, a planta foi recolhida e a parte aérea separada da raiz. As folhas, caules e raízes foram secos em estufa de circulação forçada a 65 °C e depois pesadas em balança analítica para obtenção da biomassa seca da parte aérea (BSPA) e biomassa seca da raiz (BSR).

Aos 60 DAS, foi realizada a avaliação dos parâmetros da emissão da fluorescência da clorofila a (Fluorescência inicial [F0]; Fluorescência variável [Fv]; Fluorescência máxima [Fm]; Eficiência quântica do fotossistema II [Fv /Fm]; Fluxo de elétrons por centro de reação [ET0/CR]), com auxílio do fluorômetro FluorPen, modelo F100 (Photon Systems Instruments).

Todas as medições foram realizadas na segunda folha superior totalmente expandida e saudável. Foi feita uma aclimação da folha selecionada no escuro por 30 minutos, para oxidação da cadeia de elétrons do fotossistema II (STRASSER; STRASSER, 1995).

As folhas recolhidas para a análise de pigmentos foram colocadas em nitrogênio líquido e levadas ao laboratório para a extração química dos teores de pigmentos fotossintéticos

(Clorofila a, b e Carotenoides) de acordo com a metodologia proposta por Lichtenthaler e Buschmann (2001).

### ***3.2.6 Delineamento experimental e análise estatística***

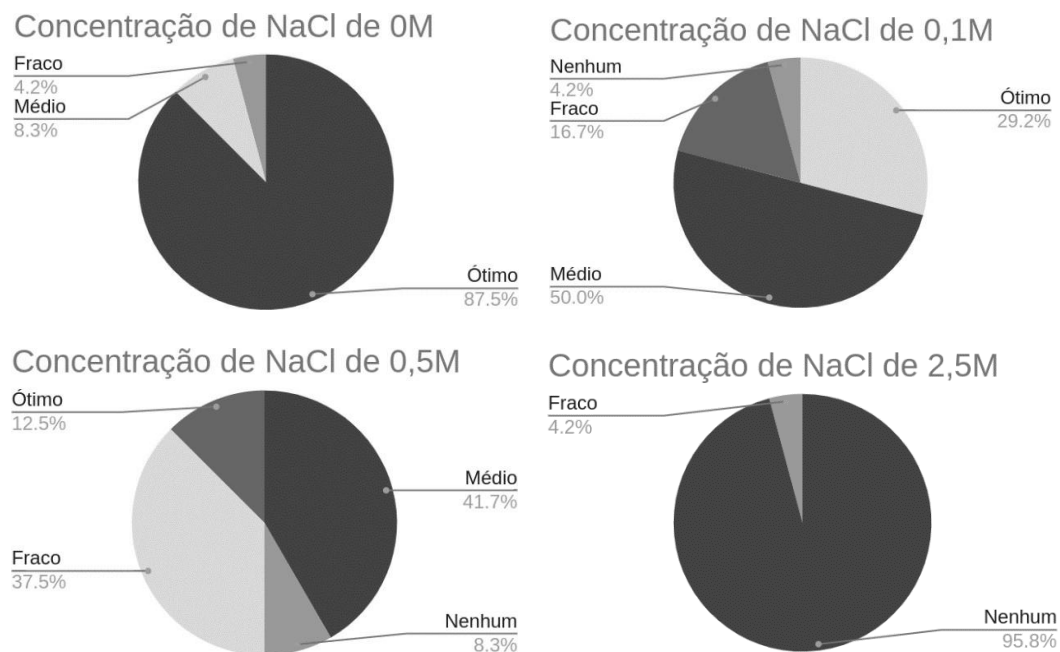
O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com cinco repetições e um controle absoluto para cada concentração da solução salina (0 mM; 40 mM; 80 mM). Na configuração de cada bloco (cinco blocos no total) continha vasos inoculados com as dez bactérias (tratamentos) em separado e um controle absoluto sem inoculação; e cada unidade experimental recebia a rega com solução salina (0 mM; 40 mM; 80 mM) específica. Ao todo, o experimento contou com 165 unidades experimentais. Todos os parâmetros foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando o teste Skott-Knott a 5 % de probabilidade, por meio do programa SISVAR versão 5.1

## **3.3 Resultados e Discussão**

### ***3.3.1 Halotolerância***

As 24 BPCP escolhidas para o desenvolvimento desse trabalho apresentaram diferentes graus de crescimento quando submetidas a um gradiente de concentração salina variando de 0 a 2500 mM de NaCl (2,5 M). Apenas uma das cepas sobreviveu a maior concentração (2,5 M) denotando natureza halotolerantes e não halofílicas, já que cresceram a uma salinidade menor (VINOTHINI et al., 2014). Na concentração de 500 mM (0,5 M de NaCl), 22 cepas demonstraram caráter de tolerância à salinidade, das quais, 10 (41,7 %) alcançaram um desenvolvimento considerado médio; 3 (12,5 %) crescimento ótimo; 9 crescimento fraco (37,5 %); e 2 (8,3 %) nenhum crescimento (Figura 2).

**Figura 2.** Taxa de sobrevivência de bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil, em teste *in vitro* em meio halofílico.



O comportamento das bactérias em meio salino foi satisfatório, apesar das cepas usadas nesse trabalho serem oriundas de prospecção em um solo do semiárido e passarem por períodos prolongados de seca. Isso pode ser explicado pelos mecanismos de resistência a seca e salinidade empregados por esses organismos se assemelharem (MISHRA; ARORA, 2018; BULGARI; FRANZONI; FERRANTE, 2019; ARORA et al., 2020). Muitas vezes, em regiões áridas e semiáridas, seca e salinidade ocorrem simultaneamente dentro dos agrossistemas, causando sintomas de estresse que se sobrepõe nas plantas (ARORA et al., 2020).

O baixo desempenho com o aumento da concentração de NaCl é justificado pela mudança no potencial osmótico do meio. Os sais solúveis presentes no meio aumentam o potencial osmótico ocasionando a retirada da água das células bacterianas. Esse ambiente hipertônico leva a diminuição do metabolismo e, conseqüentemente, a uma baixa produção de enzimas. O choque osmótico pode causar a morte celular e uma reversão desse quadro tem um alto custo energético, reduzindo o crescimento e atividade dos microrganismos sobreviventes (BENSIDHOUM; BESSAI; NABTI, 2019)

As estratégias empregadas para sobreviver a habitats salinos são diversas e envolvem desde mecanismos celulares complexos, como o alto teor de guanina-citosina, a propriedades de composição da membrana ou parede celular. Essas modificações ajudam a regular as concentrações de íons intracelulares bombeando íons tóxicos para fora da célula promovendo

o ajuste osmótico; acumulando solutos compatíveis como sacarose, trealose, e glicina betaína por biossíntese endógena que ajudam a sobrevivência em ambientes estressores; produzindo exopolissacarídeos (EPS) que evitam a perda de água para o meio de maior concentração de sais (GUNDE-CIMERMAN et al., 2018).

As bactérias halotolerantes têm a capacidade de se desenvolver em ambientes de alta concentração de sais podendo manter suas atividades metabólicas se retiradas de seu habitat salino (KHAN et al., 2016). Diante da forte habilidade de adaptação, como demonstrando pelas cepas de BPCP, fica evidente o potencial destas para uso na agricultura como bioproteção e biofertilização.

As bactérias escolhidas para o teste de promoção de crescimento em plantas de milho (IPA CMS-36) foram: 24-1; 28-7; 28-10; 43; 46-1; 52; 59-3; 70; 79-1 e 85.

### ***3.3.2 Efeito de promoção de crescimento de BPCP em plantas de milho (*Zea mays. L*) submetidas a estresse salino***

Os sintomas do estresse sentido pelas plantas de milho mantidas sob rega com solução salina repercutiu diretamente nos parâmetros biométricos. A altura das plantas sofreram uma redução de 27 % - 28 % se comparados os dados do controle absoluto (0 mM) com os demais controles (40 mM e 80 mM).

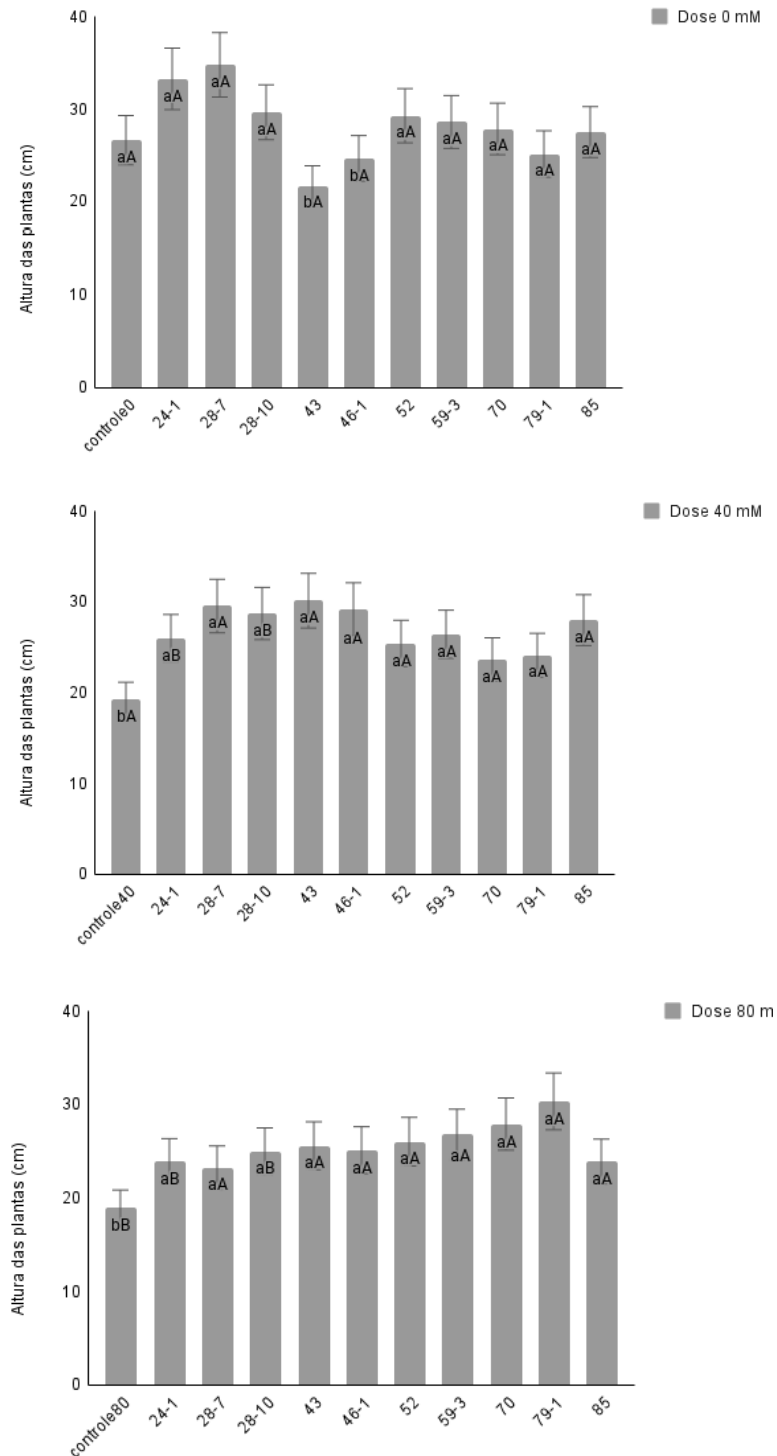
A altura das plantas de milho variou de 21,69 cm a 34,7 cm na ausência de solução de NaCl. Nas concentrações de 40 mM e 80 mM, o comprimento da parte aérea variou entre 19,23 cm e 30,12 cm e entre 18,96 cm e 30,33 cm, respectivamente (Figura 3).

No geral, o incremento associado a inoculação das bactérias em relação ao controle dentro da mesma concentração salina foi de 41,01 % para a dose de 40 mM e 36 % para a dose de 80 mM. Os tratamentos apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, exceto para as bactérias que não foram submetidas ao estresse salino (solução de rega sem adição de sal).

Os melhores resultados obtidos individualmente na variável de altura de plantas foram observados nas bactérias 28-7; 43; 46-1; 70; 79-1, onde na maior concentração (80 mM) tiveram os maiores desempenhos. Um recorte do experimento em casa de vegetação pode ser observado na figura 5.



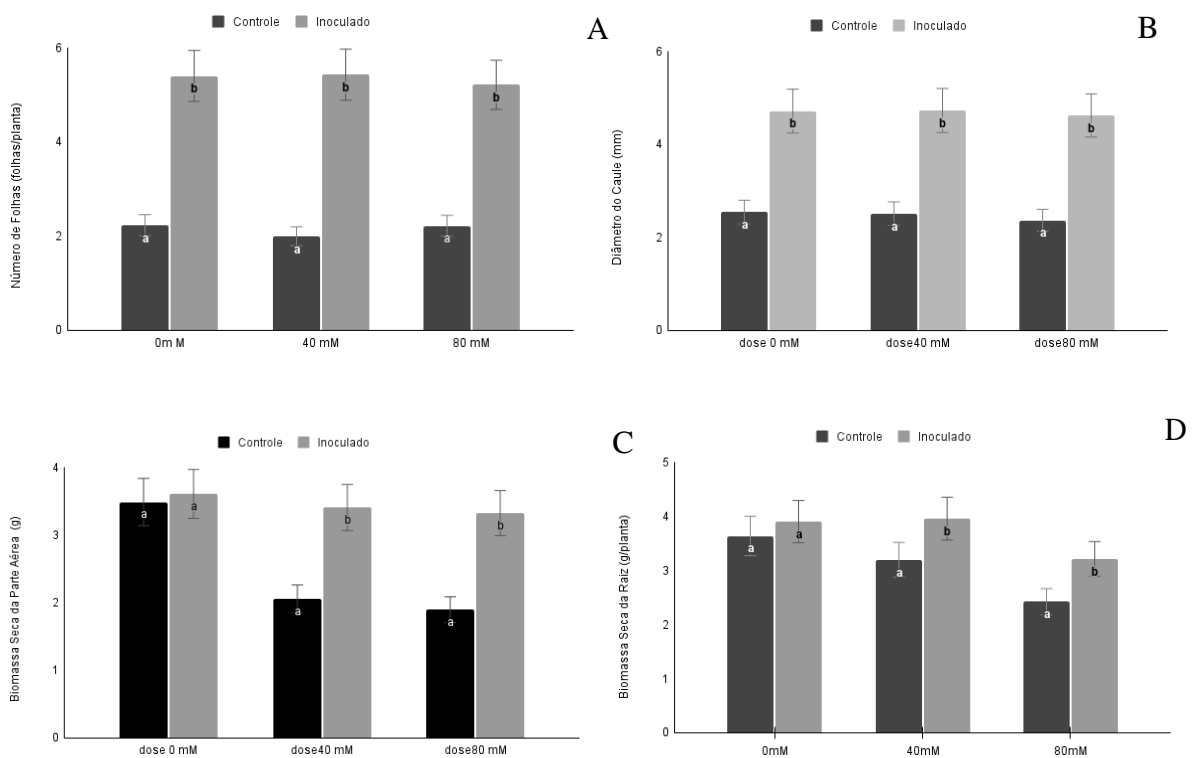
**Figura 3.** Média e desvio padrão da altura de plantas de milho (IPA CMS-36) inoculados com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil, submetidas a estresse salino



Letras minúsculas comparam entre os tratamentos com a inoculação das bactérias; Letras maiúsculas comparam entre as concentrações da solução salina de rega (0 mM, 40 mM, 80 mM). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ )

Apesar dos sintomas do estresse terem interferido no crescimento das plantas, a inoculação das bactérias influenciou positivamente o número de folhas, diâmetro do caule, biomassa seca da raiz e da parte aérea em comparação ao controle não inoculado (Figura 4).

**Figura 4.** Média e desvio padrão de parâmetros biométricos de plantas de milho (IPA CMS-36) inoculados com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil, e submetidas a estresse salino



(A) Número de folhas por planta; (B) Diâmetro do caule (mm); (C) Biomassa seca da parte aérea (g); (D) Biomassa seca de raiz (g). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ )

Mesmo não sendo observada interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre as bactérias inoculadas *versus* concentração da solução salina para os parâmetros biométricos da Figura 3, quando comparados de forma isoladas dentro de cada concentração, é possível visualizar o efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da inoculação das bactérias nas plantas de milho (Figura 5).

O incremento da inoculação na biomassa seca da parte aérea foi de 65,76 % e 75,20 % para a concentração 40 mM e 80 mM, respectivamente. Houve também um sensível aumento da massa radicular de 23,77 % para menor concentração de NaCl (40 mM) e 32,74 % para a maior concentração (80 mM). Nos parâmetros do diâmetro do caule e número de folhas foram observados os maiores acréscimos em relação ao controle, estimando uma contribuição positiva

de 95,15 % no diâmetro do caule na maior concentração (80 mM) e 88,19 % na concentração de 40 mM.

Para o número de folhas, o acréscimo aconteceu de 3 a 4 folhas por planta inoculada em relação ao controle nas duas doses de NaCl aplicadas como rega, se aproximando de um total de 134 % de incremento na maior concentração e 171,5 % na dose de 40 mM.

A inibição do crescimento das plantas é devido a lesão osmótica e iônica, bem como distúrbios nutricionais induzidos pelo NaCl em excesso (ZHOU et al., 2018). Para manter a taxa de crescimento, a planta necessita da expansão e divisão celular, porém, em contato com acentuadas concentrações de sal, a divisão celular diminui (ZELM et al., 2020). As cepas selecionadas para realização desse trabalho são produtoras de AIA e ACC deaminase, e como tal, podem proteger as plantas de milho através da diminuição dos níveis de etileno e, simultaneamente, permitir que o AIA promova a expansão e divisão celular (GLICK, 2012), justificando o acréscimo nos parâmetros biométricos.

Estudos recentes demonstram achados semelhantes. Dixit et al., (2020) associam cepas de *Alcaligenes* e *Bacillus* produtoras de AIA e ACC deaminase a uma melhor promoção do crescimento de plantas de milho, aumentando a área e o comprimento da superfície radicular melhorando a tolerância ao estresse salino. Fatos equivalentes foram observados por Azeem et al., (2022), quando plantas de milho inoculadas com uma bactéria halotolerante reduziu o efeito deletério do estresse salino e aumentou o comprimento da raiz e da parte aérea das plantas em várias concentrações de sal.

**Figura 5.** Plantas de milho de (*Zea mays* L) inoculadas com BPCP. (A) Plantas controle e inoculadas com bactérias 43 e 52 (0 mM); (B) Plantas controle e inoculadas com bactérias 70 e 28-7 (40 mM); (C) Plantas controle e inoculadas com bactérias 59-3 e 70 (80 mM)



Foto pelo autor

### 3.3.3 Pigmentos fotossintético e parâmetros de emissão da fluorescência da Clorofila a de plantas de milho (*Zea mays. L*) submetidas a estresse salino e inoculadas com BPCP

Para os pigmentos fotossintéticos, a análise de variância mostrou valores significativos de interação dos tratamentos com as concentrações salinas da água de irrigação.

Tanto nas plantas inoculadas, como nas não inoculadas foi percebido o declínio dos pigmentos fotossintéticos no aumento do gradiente de concentração da solução de NaCl. Portanto, o sal induziu uma diminuição significativa da concentração de clorofila deste parâmetro nas folhas (Tabelas 3, 4 e 5), bem como os valores de Fv/Fm ( Tabela 6 ).

No entanto, os dados mostram também que o efeito do sal no teor de clorofila foi mais acentuado nas plantas não inoculadas. Nos dados de clorofila a (Tabela 3), o acréscimo estimado foi de 138 %, comparando o maior valor apresentado pela cepa 28-10 na dose 0 mM com o controle não inoculado. Na dose 40 mM, a bactéria 24-1 se destacou em relação as demais com um acréscimo estimado de 170,86 % de clorofila a em relação ao controle não inoculado. Na maior concentração salina (80 mM), as bactérias 24-1; 46-1; 52 e 59-3 mostraram uma tendência a um maior acúmulo de pigmentos, padrão que se repetiu em clorofila b e carotenóides ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Teores de Clorofila a em plantas de milho (IPA CMS-36) submetidas a estresse salino e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.

Isolados	Clorofila a (mg g <sup>-1</sup> )		
	0 mM	40 mM	80 mM
24-1	1,4489 bB	1,9781 aA	1,0731 cC
28-7	1,4333 bA	1,4344 bA	0,5367 eB
28-10	2,4091 aA	0,9495 cB	0,9613 cB
43	1,5400 bA	1,5817 bA	0,5231 eB
46-1	1,0347 cB	1,0917 cB	1,6109 bA
52	1,4235 bB	1,4439 bB	1,8503 aA
59-3	0,9848 cB	0,6612 dB	1,0308 cA
70	0,7902 dB	0,9472 cA	0,7955 dB
79-1	1,0594 cA	0,9095 cA	0,5593 eB
85	1,5442 bA	1,4676 bA	0,7813 dB
Controle	1,0094 cA	0,7303 dB	0,4363 eC
CV%	9,76		

Letras minúsculas comparam entre os tratamentos com a inoculação das bactérias; Letras maiúsculas comparam entre as concentrações da solução salina de rega (0 mM, 40 mM, 80 mM). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ )

Para os teores de clorofila b as cepas que se destacaram foram: 46-1; 52 e 70 (Tabela 4). Estas aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) o teor de pigmentos com o aumento do

gradiente de concentração. O incremento que essas bactérias proporcionaram na dose máxima de NaCl, foram respectivamente, 215,67 %; 279,99 %, 124,30 %.

**Tabela 4.** Teores de Clorofila b em plantas de milho (IPA CMS-36) submetidas a estresse salino e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.

Isolados	Clorofila b (mg g <sup>-1</sup> )		
	0 mM	40 mM	80 mM
24-1	0,9121 fB	1,1020 cA	0,7228 dC
28-7	1,4279 bA	1,4308 aA	0,3960 gB
28-10	1,7638 aA	0,6956 fB	0,6967 dB
43	1,3365 cA	1,2116 bB	0,5751 fC
46-1	1,0863 dC	0,6593 fB	1,1377 bA
52	1,0132 eB	0,7040 fC	1,3695 aA
59-3	0,7102 gA	0,5482 gA	0,6458 eB
70	0,6822 gB	0,7757 eA	0,8084 cA
79-1	1,0979 dA	0,9422 dB	0,5840 fC
85	1,0340 eB	1,1225 cA	0,6619 eC
Controle	1,0277 eA	0,7209 fB	0,3604 gC
CV%		4,10	

Letras minúsculas comparam entre os tratamentos com a inoculação das bactérias; Letras maiúsculas comparam entre as concentrações da solução salina de rega (0 mM, 40 mM, 80 mM). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ )

Os teores de carotenóides (Tabela 5) foram aumentados na concentração 80 mM por quatro cepas: 24-1; 46-1; 52; e 70, quando estas são comparadas ao controle não inoculado na mesma dose. O acréscimo para cada bactéria em relação ao controle não inoculado foi de 110,07 %; 227,13 %; 289,92 %; e 117,82 %, respectivamente. Porém com o aumento da dose de NaCl, as bactérias 46-1; 52; e 70 diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ), aumentando o teor de carotenóide da dose 0 mM para 80 mM em 12,23 %; 34,13 %; e 11,95 %, respectivamente.

Esse comportamento sugere uma maior proteção ao aparato fotossintético por meio da influência das bactérias. As plantas utilizam antioxidantes de baixo peso molecular, como carotenóides, flavonóides e ascorbato, assim como sistemas antioxidantes compostos por SOD, CAT, APX, formando uma via alternativa de dissipação de energia pela eliminação do ROS (ZHANG et al., 2015) ,e os resultados apresentados sugerem um aumento desses antioxidantes pelas bactérias inoculadas.

**Tabela 5.** Teores de carotenóides em plantas de milho (IPA CMS-36) submetidas a estresse salino e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.

Isolados	Carotenóides (mg g <sup>-1</sup> )		
	0 mM	40 mM	80 mM
24-1	0,0498 eB	0,0432 bA	0,0271 cC
28-7	0,0498 bA	0,0499 aA	0,0145 gB
28-10	0,0650 aA	0,0256 fB	0,0257 dB
43	0,0477 cA	0,0442 bB	0,0197 fC
46-1	0,0376 dB	0,0253 fC	0,0422 bA
52	0,0375 dB	0,0285 eC	0,0503 aA
59-3	0,0254 fA	0,0197 gB	0,0246 eA
70	0,0251 fB	0,0279 eA	0,0281 cA
79-1	0,0381 dA	0,0327 dB	0,0202 fC
85	0,0388 dB	0,0410 cA	0,0237 eC
Controle	0,0357 eA	0,0252 fB	0,0129 hC
CV%	2,29		

Letras minúsculas comparam entre os tratamentos com a inoculação das bactérias; Letras maiúsculas comparam entre as concentrações da solução salina de rega (0 mM, 40 mM, 80 mM). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ )

Quando todos os centros de reação do Fotossistema II (FSII) estão abertos pode-se estimar a eficiência quântica máxima da atividade fotoquímica ( $F_v/F_m$ ). Essa relação tem sido utilizada em pesquisas para observar perturbações no sistema fotossintético causada por estresses bióticos e abióticos, pois sua diminuição indica a inibição da atividade fotoquímica.

De acordo com os dados da eficiência quântica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ) (Tabela 6) obtidas nesse trabalho, observa-se que as folhas de plantas da concentração 0 mM de NaCl, tratadas com BPCP ou não tratadas, mantiveram seus níveis altos no parâmetro, mas não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) dentro da mesma dose. Para as demais concentrações, 40 mM e 80 mM observa-se um declínio nos valores das plantas não inoculadas, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si. A inoculação foi responsável por um acréscimo de 104,59 % na dose de 40 mM e de 100,91 % promovidas pelas bactérias 70 e 85, respectivamente.

O estresse hiperiônico e hiperosmótico surge devido ao acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  causando diminuição drástica na fotossíntese e aumento das ROS, frequentemente associado a danos na membrana e morte celular (ZELM et al., 2020). Concentrações mais altas de sal também impõem estresse hídrico nas plantas e o acúmulo intracelular de íons de sal pode causar danos extensos às mitocôndrias e cloroplastos afetando a homeostase redox celular (ACOSTA-MOTOS et al., 2017).

**Tabela 6.** Médias do parâmetro de eficiência na absorção de fótons (Fv/Fm) de plantas de milho (IPA CMS-36) submetidas a estresse salino e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.

Isolados	Fv/Fm		
	0 mM	40 mM	80 mM
24-1	0,7500 aA	0,7266 aA	0,7100 aA
28-7	0,7233 aA	0,7366 aA	0,7466 aA
28-10	0,7300 aA	0,7366 aA	0,7400 aA
43	0,7066 aA	0,6666 aA	0,7133 aA
46-1	0,7666 aA	0,7366 aA	0,7333 aA
52	0,7366 aA	0,7400 aA	0,7433 aA
59-3	0,6866 aA	0,7366 aA	0,7233 aA
70	0,7466 aA	0,7433 aA	0,7166 aA
79-1	0,7300 aA	0,6466 aA	0,7300 aA
85	0,7600 aA	0,7266 aA	0,7500 aA
Controle	0,7500 aA	0,3633 bB	0,3733 bB
CV%	21,95		

Letras minúsculas comparam entre os tratamentos com a inoculação das bactérias; Letras maiúsculas comparam entre as concentrações da solução salina de rega (0 mM, 40 mM, 80 mM). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ )

Em geral, o  $\text{Na}^+$  influencia a fotossíntese, interrompendo a força próton-motriz necessária para a produção de energia nos cloroplastos e interferindo nas enzimas fixadoras de  $\text{CO}_2$  (ZELM et al., 2020), porém, inúmeros trabalhos já correlacionam a produção e acúmulo de osmólitos e fitohormônios no cloroplasto em resposta a sinais de estresse, protegendo as enzimas e lipídios que são necessários para manter o fluxo de elétrons através das membranas dos tilacóides e a assimilação contínua de  $\text{CO}_2$  (KUREPIN et al., 2017).

Algumas BPCP são capazes de produzir enzimas antioxidantes, osmoprotetores, e auxiliar as plantas a acumular osmólitos podendo induzir várias alterações químicas nas plantas, e aumentar a tolerância ao estresse (SARKAR et al., 2018). Em pesquisa recente, Ali et al. (2022), associaram *Enterobacter cloacae* PM23 produtoras de ACC deaminase, AIA e outras substâncias promotoras de crescimento, a níveis elevados de enzimas antioxidantes e osmoprotetores (aminoácidos livres, glicina betaína e prolina), melhorando o crescimento das plantas, biomassa e pigmentos fotossintéticos sob estresse salino, corroborando os resultados observados nessa pesquisa. As BPCP usadas para a realização desse trabalho produziram *in vitro* substâncias promotoras de crescimento, AIA e ACC deaminase, compatível com os resultados obtidos nos ensaios de casa de vegetação.

Shahid et al. (2019) encontraram bons resultados no manejo do estresse oxidativo causado por salinidade em plantas de milho com a inoculação de cepas de *Staphylococcus*. Os autores descreveram que as cepas demonstraram potencial substancial para solubilização de

fosfato, atividade de ACC deaminase e produção de AIA, responsáveis pelo bom desempenho no crescimento de plantas de milho, juntamente com aumento da atividade de enzimas antioxidantes e diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio, enfatizando o potencial de BPCP em mitigar os efeitos causados pelo estresse salino.

Taj e Challabathula (2021) discutiram sobre a inoculação de *Staphylococcus sciuri* ET101 halotolerante em plantas de tomate e arroz, promovendo maiores taxas de fotossíntese, aumento da eficiência quântica ( $\Phi$ PSII) e máxima produtividade quântica (Fv/Fm) do fotossistema II em plantas inoculadas durante o estresse salino, resultados semelhantes ao encontrados no presente estudo.

Para os demais parâmetros de fluorescência da clorofila a, fluorescência inicial (F0), fluorescência máxima (Fm) e fluxo de elétrons por centro de reação (ET0/ CR), não houve interação significativa ( $p < 0,05$ ) para nenhum dos tratamentos analisados.

### 3.4 Conclusões

O presente estudo demonstrou o potencial halotolerantes de bactérias isoladas da rizosfera de *Mimosa bimucronata* em uma lagoa temporária no Semiárido do Brasil. As cepas apresentaram um notável potencial de promoção de crescimento em plantas milho em condições controladas de estresse salino, principalmente as cepas 28-7; 43; 46-1; 70; 79-1.

As cepas 24-1; 46-1; 52; e 70 demonstraram boa performance na proteção do aparato fotossintético elevando os níveis dos parâmetros e indicando a viabilidade de aproveitamento para fins biotecnológicos na busca por alívio de estresses bióticos e abióticos



## Referências Bibliográficas

ALI, B.; WANG, X.; SALEEM, M.H.; SUMAIRA; HAFEEZ, A.; AFRIDI, M.S.; KHAN, S.; ZAIB-UN-NISA; ULLAH, I.; AMARAL JÚNIOR, A.T.D.; ALATAWI, A.; ALI, S. PGPR-Mediated Salt Tolerance in Maize by Modulating Plant Physiology, Antioxidant Defense, Compatible Solutes Accumulation and Bio-Surfactant Producing Genes. **Plants**, 11, 345, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11030345>

ACOSTA-MOTOS, J.R.; ORTUÑO, M.F.; BERNAL-VICENTE, A.; DIAZ-VIVANCOS, P.; SANCHEZ-BLANCO, M.J.; HERNANDEZ, J.A. Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. **Agronomy** 2017, 7, 18. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>

ARORA, N. K.; EGAMBERDIEVA, D.; MEHNAZ, S.; LI, W. J.; MISHRA, I. Editorial: Salt Tolerant Rhizobacteria: For Better Productivity and Remediation of Saline Soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 660075, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660075>

ARORA N. K.; FATIMA, T.; MISHRA, J.; MISHRA, I.; VERMA, S.; VERMA, R.; VERMA, M.; BHATTACHARYA, A.; VERMA, P.; MISHRA, P.; BHARTI, C. Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. **Journal of Advanced Research**, v. 26, p. 69-82, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.07.003>

ARAÚJO, V. L. V. P., JUNIOR, M. A. L., DE SOUZA JÚNIOR, V. S., DE ARAÚJO FILHO, J. C., FRACETTO, F. J. C., ANDREOTE, F. D., FRACETTO, G. G. M. Bacteria from tropical semiarid temporary ponds promote maize growth under hydric stress. **Microbiological Research**, v. 240, p. 126564, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126564>

AZEEM, M. A.; SHAH, F. H.; ULLAH, A.; ALI, K.; JONES, D. A.; KHAN, M. E. H.; ASHRAF, A. Biochemical Characterization of Halotolerant *Bacillus safensis* PM22 and Its Potential to Enhance Growth of Maize under Salinity Stress. **Plants**, v. 11, n. 13, p. 1721, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11131721>

BENSIDHOUM, L.; AIT BESSAI, S.; NABTI, E. Restoration of Plant Growth Under Saline Soil by Halotolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). In: Kumar, M.; Etesami, H.; Kumar, V. **Saline Soil-based Agriculture by Halotolerant Microorganisms**. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019. v. 13 p. 23-51. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9_2)

BISEN, K., KESWANI, C., MISHRA, S., SAXENA, A., RAKSHIT, A., SINGH, H. B. Unrealized potential of seed biopriming for versatile agriculture. In: Nutrient use efficiency: from basics to advances. Rakshit, A., Singh, H. B., & Sen, A. (Eds.). New Delhi: **Springer India**. p. 193-206, 2015. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2169-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2169-2_13)

BHAT, M. A.; KUMAR, V.; BHAT, M. A.; WANI, I. A.; DAR, F. L.; FAROOQ, I.; BHATTI, F.; KOSER, R.; RAHMAN, S.; JAN, A. T. Mechanistic Insights of the Interaction of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) With Plant Roots Toward Enhancing Plant Productivity by Alleviating Salinity Stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1952, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.01952

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal Microbiology. Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012. doi: 10.1007/s11274-011-0979-9

BULGARI, R.; FRANZONI, G.; FERRANTE, A. Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. **Agronomy**, v. 9, n. 6, p. 306, 2019. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>

DIXIT, V. K.; MISRA, S.; MISHRA, S. K.; TEWARI, S. K.; JOSHI, N.; CHAUHAN, P. S. Characterization of plant growth-promoting alkalotolerant *Alcaligenes* and *Bacillus* strains for mitigating the alkaline stress in *Zea mays*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 113, p. 889–905, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01399-1>

FATIMA, T.; MISHRA, I.; VERMA, R.; ARORA, N. K. Mechanisms of halotolerant plant growth promoting *Alcaligenes* sp. involved in salt tolerance and enhancement of the growth of rice under salinity stress. **3 Biotech**, v. 10, n. 361, p. 12, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02348-5>

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

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, p. 30–39, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>

GUNDE-CIMERMAN, N.; PLEMENITAŠ, A.; OREN, A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 3, p. 353–375, 2018. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>

HANEY, C. H.; SAMUEL, B. S.; BUSH, J.; AUSUBEL, F. M. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. **Nature Plants**, v. 1, p.15051, 201. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.51>

HILTNER, L. Ueber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. **Soil Biology and Biochemistry**. Alemanha, v. 98, p.59-78, 1904.

KHAN, M. A.; ASAF, S.; KHAN, A. L.; ULLAH, I.; ALI, S.; KANG, S. M.; LEE, I. Alleviation of salt stress response in soybean plants with the endophytic bacterial isolate *Curtobacterium* sp. SAK1. **Annals of Microbiology**, v. 69 n.8, p. 797-808, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01470-x>

KHATOON, Z.; HUANG, S.; RAFIQUE, M.; FAKHAR, A.; KAMRAN, M. A.; SANTOYO, G. Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. **Journal of Environmental Management**, v. 273, p. 111118, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111118>

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. S. da; PARMA, M. M.; ÁVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T.D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. de. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought.

**Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>

KUMAR, A.; SINGH, S.; GAURAV, A. K.; SRIVASTAVA, S.; VERMA, J. P. Plant Growth-Promoting Bacteria: Biological Tools for the Mitigation of Salinity Stress in Plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1216, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01216>

KUREPIN, L.V., IVANOV, A.G., ZAMAN, M., PHARIS, R.P., HURRY, V., HÜNER, N.P.A. Interaction of Glycine Betaine and Plant Hormones: Protection of the Photosynthetic Apparatus During Abiotic Stress. In: Hou, H., Najafpour, M., Moore, G., Allakhverdiev, S. (eds) **Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications**. Springer. 2017 [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48873-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48873-8_9)

LATEF, A. A. H. A.; ALHMAD, M. F. A.; KORDROSTAMI, M.; ABO-BAKER, A. A.; ZAKIR, A. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* or *Azotobacter chroococcum* Reinforces Maize Growth by Improving Physiological Activities Under Saline Conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 1293-1306, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10065-9>

LICHTENTHALER, H. K., BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v.1, p.1-8, 2001. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>

MAHMUD, K.; MISSAOUI, A.; LEE, K.; GHIMIRE, B.; PRESLEY, H. W.; MAKAJU, S. Rhizosphere microbiome manipulation for sustainable crop production. **Current Plant Biology**, v. 27, p.100210, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100210>

MASHABELA, M. D.; PIATER, L. A.; DUBERY, I. A.; TUGIZIMANA, F.; MHLONGO, M. I. Rhizosphere Tripartite Interactions and PGPR-Mediated Metabolic Reprogramming towards ISR and Plant Priming: A Metabolomics Review. **Biology**, v. 11, n. 3, p. 346, 2022. <https://doi.org/10.3390/biology11030346>

MISHRA, J.; ARORA, N. K. Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. **Applied Soil Ecology**, v. 125, p. 35-45, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.004>

MONCADA A.; VETRANO F.; MICELI, A. Alleviation of Salt Stress by Plant Growth-Promoting Bacteria in Hydroponic Leaf Lettuce. **Agronomy**, v. 10, n. 10, p. 1523, 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101523>

OROZCO-MOSQUEDA, M. D. C.; ROCHA-GRANADOS, M. D. C.; GLICK, B. R.; SANTOYO, G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms, **Microbiological Research**, v. 208, p. 25-31, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.005>.

OROZCO-MOSQUEDA, M.; FLORES, A.; ROJAS-SÁNCHEZ, B.; URTIS-FLORES, C. A.; MORALES-CEDEÑO, L. R.; VALENCIA-MARIN, M. F.; CHÁVEZ-AVILA, S.; ROJAS-SOLIS, D.; SANTOYO, G. Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: attributes and challenges for sustainable crop improvement. **Agronomy**, v. 11, n. 6, p.1167, 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061167>

SARKAR A.; GHOSH, P. K.; PRAMANIK, K.; MITRA, S.; SOREN, T.; PANDEY, S.; MONDAL, M. H. MAITI, T. K. A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. **Research in Microbiology**, v. 169, n. 1, p. 20-32, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.08.005>

SHAHID, M.; AHMED, T.; NOMAN, M.; JAVED, M. T.; JAVED, M. R.; TAHIR, M.; SHAH, S. M. Non-pathogenic *Staphylococcus* strains augmented the maize growth through oxidative stress management and nutrient supply under induced salt stress. **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 727–739, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01464-9>

STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. – In: MATHIS, P. (ed.): **Photosynthesis: From Light to Biosphere**, 1995, p. 977-980. [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-0173-5\\_1142](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-0173-5_1142)

TAJ, Z.; CHALLABATHULA, D. Protection of Photosynthesis by Halotolerant *Staphylococcus sciuri* ET101 in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) and Rice (*Oryza sativa*) Plants During Salinity Stress: Possible Interplay Between Carboxylation and Oxygenation in Stress Mitigation. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 547750, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.547750>

VERMA, M.; SINGH, A.; DWIVEDI, D. H.; ARORA, N. K. Zinc and phosphate solubilizing *Rhizobium radiobacter* (LB<sub>2</sub>) for enhancing quality and yield of loose leaf lettuce in saline soil. **Environmental Sustainability**, v. 3, p. 209–218, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00110-4>

VINOTHINI, S., HUSSAIN, A. J., JAYAPRAKASHVEL, M. Bioprospecting of Halotolerant Marine Bacteria from the Kelambakkam and Marakkanam Salterns, India for Wastewater Treatment of Plant Growth Promotion. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 11, p. 313-321, 2014. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/1425>

XU, Y.; LI, Y.; LONG, C.; HAN, L. Alleviation of salt stress and promotion of growth in peanut by *Tsukamurella tyrosinosolvens* and *Burkholderia pyrrocinia*. **Biologia**, p. 1-11, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01073-z>

YASMIN, H.; NAEEM, S.; BAKHTAWAR, M.; JABEEN, Z.; NOSHEEN, A.; NAZ R.; KEYANI, R.; MUMTAZ, S.; HASSAN, M. N. Halotolerant rhizobacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Bacillus subtilis* mediate systemic tolerance in hydroponically grown soybean (*Glycine max* L.) against salinity stress. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4 p. e0231348, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231348>

ZELM, E. V.; ZHANG, Y.; TESTERINK, C. Salt tolerance mechanisms of plants **Annual Review of Plant Biology**, v.71, p. 403-433, 2020. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100005>

ZHALNINA, K.; LOUIE, K. B.; HAO, Z.; MANSOORI, N.; ROCHA, U. N.; SHI, S.; CHO, H.; KARAOZ, U.; LOQUÉ, D.; BOWEN, B. P.; FIRESTONE, M. K.; NORTHEN, T. R.; BRODIE, E. L. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. **Nature Microbiology**, v. 3, p. 470-480, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0129-3>

ZHANG, X.; ZHAO, X.; WANG, Z.; SHEN, W.; XU, X. Protective effects of hydrogen-rich water on the photosynthetic apparatus of maize seedlings (*Zea mays* L.) as a result of an increase in antioxidant enzyme activities under high light stress. **Plant Growth Regulation**, v. 77, p. 43–56, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0033-2>

ZHOU, Y.; TANG, N.; HUANG, L.; ZHAO, Y.; TANG, X.; WANG, K. Effects of salt stress on plant growth, antioxidant capacity, glandular trichome density, and volatile exudates of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 252, 2018. doi: 10.3390/ijms19010252

ZHU, M.; ZHOU, M.; SHABALA, L.; SHABALA, S. Linking osmotic adjustment and stomatal characteristics with salinity stress tolerance in contrasting barley accessions. **Functional Plant Biology**, v. 42, n. 3, p. 252-263, 2015. <https://doi.org/10.1071/FP14209>

#### 4 ALÍVIO DO ESTRESSE SALINO EM PLANTA DE MILHO (*Zea mays* L.) POR CO-INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

##### Resumo

O crescente avanço da salinização dos solos agricultáveis pelo mundo impacta negativamente a produção agrícola, representando uma grave ameaça à segurança alimentar. Diante do problema causado por esse e outros estresses abióticos, formou-se uma necessidade urgente por tecnologias focadas na melhoria da qualidade e fertilidade do solo em prol do aumento do rendimento agrícola. Explorar o potencial biotecnológico do solo tem sido uma alternativa sustentável para mitigar sintomas de estresse salino e elevar a produção agrícola, como o uso de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). Os FMA facilitam o crescimento vigoroso das plantas hospedeiras sob condições estressantes, mediando uma série de eventos complexos de comunicação entre a planta e o fungo, elevando a quantidade de água e nutrientes nos tecidos; enquanto as BPCP sintetizam enzimas, proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e outros que desempenham papéis importantes na planta, favorecendo a tolerância ao estresse. Diante do exposto, esse trabalho tem como objetivo avaliar a inoculação de FMA e BPCP como meios do alívio do estresse salino em plantas de milho (IPA CMS-36). Um experimento foi instalado em casa de vegetação, em delineamento de blocos ao acaso, mantendo as plantas por 49 dias submetidas a gradientes de concentração de solução salina distintas (0 mM, 40 mM e 80 mM de NaCl) para simular o estresse salino. Ao todo, o experimento contou com 105 unidades experimentais. Os tratamentos consistiram na inoculação de cinco isolados de BPCP e do FMA *Rhizophagus clarus*, além dos controles apenas com micorriza e um controle absoluto sem inoculação. Foram analisados os teores de nutrientes nos tecidos da parte aérea, acúmulo de biomassa vegetal e taxa de colonização dos tecidos radiculares pelo fungo. Todos os parâmetros foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando o teste Skott-Knott a 5 % de probabilidade, por meio do programa SISVAR versão 5.1. Os resultados revelaram que as bactérias usadas na co-inoculação junto com o FMA auxiliaram o processo de simbiose tripartite, podendo ser classificadas como bactérias auxiliares da micorriza (MHB), pois houve intensificação da colonização em todas as concentrações de NaCl com um aumento na ordem 47,09 % na concentração 0 mM; 15,61 % na concentração 40 mM; e 45,45 % na concentração 80mM A biomassa acumulada aumentou nos tratamentos em que houve a co-inoculação de FMA e BPCP, com destaque para as bactérias 41-6; 70; e 79-1 se mostraram mais eficientes junto ao FMA em acumular biomassa vegetal no aumento das doses de sal. Em relação a dose controle de 0 mM, as bactérias citadas apresentaram adição de 36,38-47,50 %; 40,57-20,66 %; 36,57-27,41 %, respectivamente. O controle micorrizado também aumentou o conteúdo de material vegetal produzido pelas plantas de milho, crescendo em 18-50 – 21,17 % a biomassa vegetal. O teor dos nutrientes nos tecidos das plantas inoculadas com FMA e BPCP sugerem que houve osmoregulação mediada pelos microrganismos, com destaque para as bactérias 28-7; 46-1; 70; 79-1 co-inoculadas com o fungo *R. Clarus* mostraram os melhores valores da relação  $Na^+/K^+$  na dose 80 mM, elevando a relação em 155,30 % em comparação com o controle não inoculado e de 142,71 % em relação aos demais consórcios. Esses resultados sugerem o aumento da tolerância das plantas de milho ao estresse salino mediada pelos microrganismos inoculados.

Palavras-chave: Bactérias auxiliares da micorriza. Promoção de crescimento. Osmoregulação.

## RELIEF OF SALT STRESS IN CORN (*Zea mays* L.) BY CO-INOCULATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA

### Abstract

The growing advance of salinization of arable soils around the world has a negative impact on agricultural production, representing a serious threat to food security. Faced with the problem caused by this and other abiotic stresses, there was an urgent need for technologies focused on improving soil quality and fertility in order to increase agricultural yield. Exploring the biotechnological potential of soil has been a sustainable alternative to mitigate saline stress symptoms and increase agricultural production, such as the use of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth promoting bacteria (PGPB). AMF facilitate the vigorous growth of host plants under stressful conditions, mediating a series of complex communication events between the plant and the fungus, increasing the amount of water and nutrients in the tissues; while PGPB synthesize enzymes, proteins, lipids, carbohydrates, vitamins and others that play important roles in the plant, favoring stress tolerance. Given the above, this work aims to evaluate the inoculation of AMF and PGPB as a means of relieving saline stress in corn plants (IPA CMS-36). An experiment was installed in a greenhouse, in a randomized block design, keeping the plants for 49 days subjected to different saline concentration gradients (0 mM, 40 mM and 80 mM NaCl) to simulate saline stress. In all, the experiment had 105 experimental units. The treatments consisted of inoculation of five isolates of PGPB and AMF *Rhizophagus clarus*, in addition to controls with only mycorrhiza and an absolute control without inoculation. Nutrient contents in shoot tissues, plant biomass accumulation and rate of colonization of root tissues by the fungus were analyzed. All parameters were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means compared using the Skott-Knott test at 5% probability, using the SISVAR version 5.1 program. The results revealed that the bacteria used in the co-inoculation together with the AMF helped the process of tripartite symbiosis, and can be classified as mycorrhizal auxiliary bacteria (MAB), as there was an intensification of colonization at all concentrations of NaCl with an increase in the order 47.09% at 0 mM concentration; 15.61% at 40 mM concentration; and 45.45% at 80mM concentration. The accumulated biomass was increased in treatments in which AMF and BPCP were co-inoculated, with emphasis on bacteria 41-6; 70; and 79-1 proved to be more efficient together with AMF in accumulating plant biomass in increasing salt doses. In relation to the control dose of 0 mM, the mentioned bacteria presented addition of 36.38-47.50%; 40.57-20.66%; 36.57-27.41%, respectively. Mycorrhizal control also increased the content of plant material produced by corn plants, adding 18-50 – 21.17% to plant biomass. The nutrient content in the tissues of plants inoculated with AMF and PGPB suggest that there was osmoregulation mediated by microorganisms, especially bacteria 28-7; 46-1; 70; 79-1 co-inoculated with the fungus *R. Clarus* showed the best values of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio at the 80 mM dose, increasing the ratio by 155.30% compared to the non-inoculated control and 142.71% compared to the other consortia. These results suggest an increase in the tolerance of corn plants to saline stress mediated by the inoculated microorganisms.

Keywords: Mycorrhiza helper bacteria. Growth promotion. Osmoregulation.

## 4.1 Introdução

Diante das descobertas mais importantes na pesquisa biológica da última década está a contribuição massiva das comunidades microbianas que, associadas ao hospedeiro, proporciona mudanças na saúde dos organismos multicelulares (HANEY et al., 2015). No solo não é diferente, a diversidade de microrganismos associados às raízes das plantas chega a ordem de dezenas de milhares de espécies, formando uma complexa comunidade e se mostrando crucial para a sanidade das plantas (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012).

Em ambientes naturais é comum a presença de várias condições de estresse abiótico e deficiência de alguns nutrientes minerais. Diante desse contexto, muitas pesquisas corroboram o fato de que as plantas que apresentam associações micorrízicas tem uma vantagem seletiva em relação aos indivíduos não micorrizados da mesma espécie quando encontradas em situações de estresse (CHEN et al., 2018). Essa vantagem seletiva se dá pelo auxílio dos fungos às plantas hospedeiras na regulação dos mecanismos de tolerância e na prevenção de danos nas principais vias metabólicas (BEGUM et al., 2019).

O termo micorriza é derivado do grego, significando “fungos-raízes”, sendo introduzido em 1885 por Albert Bernard Frank para descrever a interação simbiótica mutualista entre plantas e fungos do solo. Atualmente, sete tipos de micorrizas são conhecidas e dentre elas, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (VALADARES; MESCOLOTTI; CARDOSO, 2016). O FMA se associa com a maioria das espécies de vegetais terrestres, representando quase 80 % de todas as espécies e que dependem desses fungos principalmente para aumentar a captação de nitratos e fosfatos quando esses estão com disponibilidade reduzida no solo (VAN DER HEIJDEN et al., 2015).

Alguns estudos mostram evidências geológicas sugerindo que a relação benéfica entre fungos e plantas é anterior ao surgimento da água, indicando que a simbiose envolvendo FMA permitiu várias adaptações importantes durante a evolução das plantas terrestres (SELOSSE; LE TACON, 1998; FADIJI et al., 2022). Além disso, sua aplicabilidade na agricultura aumenta o rendimento das culturas induzindo mudanças no metabolismo secundário, levando a melhores valores nutracêuticos, influenciando o desenvolvimento da planta como biorreguladores e induzindo tolerância a estresses por meio de bioproteção (CHEN et al., 2018).

Entretanto, plantas estressadas tendem a acionar seu sistema de defesa e também produzir fitohormônios acima dos níveis basais, prejudicando o crescimento fúngico e o estabelecimento da simbiose (FRACETTO et al., 2013). Por sorte, as plantas hospedam um conjunto diversificado de microrganismos em todos os seus compartimentos formando



interações mutualísticas tripartidas benéficas. Esses microrganismos podem interagir diretamente com a planta hospedeira ou indiretamente, por meio de modificações em um dos parceiros, ou ainda, modulando o habitat em comum entre os parceiros (AFKHAMI et al., 2020). Dessa forma, algumas bactérias são capazes de promover o estabelecimento da simbiose de FMA com as plantas hospedeiras sendo chamadas de bactérias auxiliares da micorriza (MHB). Esse processo se dá através da produção de fatores de crescimento, desintoxicação de substâncias nocivas e inibição de competidores e/ou antagonistas, resultando no aumento do contato entre planta-fungo, aumento na extensão micelial e elevando a chance de sobrevivência do FMA em condições adversas (FREY-KLETT; GARBAYE; TARKKA, 2007).

Os mecanismos utilizados pelas bactérias que estimulam o crescimento do FMA ainda são pouco conhecidos, porém, existem evidências de que a síntese da enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato deaminase (ACC deaminase) pode diminuir os níveis de etileno nos tecidos das plantas, fortalecendo o estabelecimento da micorrização (GAMALERO et al. 2008). O fitohormônio AIA também exerce um fator positivo na micorrização, estimulando a colonização das raízes (GUILLOTIN et al., 2016) e a formação de arbúsculos (ETEMADI et al., 2014).

Pesquisas recentes revelam o papel desempenhado pela simbiose tripartite (planta-fungo-bactéria) na produção abundante de proteínas e metabólitos envolvidos no estresse oxidativo que resultou na reprogramação de várias vias relacionadas à melhoria do crescimento das plantas e da produtividade das culturas (YADAV; CHAKRABORTY; RAMAKRISHNA, 2022), sugerindo que o uso desses microrganismos em conjunto pode minimizar os danos causados pelo estresse salino. Moreira et al. (2020) descreve que a inoculação de *Pseudomonas reactans* EDP28 e *Pantoea alli* ZS 3-6 junto ao fungo micorrizico *Rhizoglossum irregulare* mitigaram os desequilíbrios iônicos em plantas de milho submetidos a um gradiente de NaCl, promovendo o crescimento do milho e melhoria do estado nutricional.

Além da aplicabilidade de mitigação de efeitos deletérios em condições de estresse, existem evidências de que a combinação de FMA e BPCP pode melhorar o estado nutricional das plantas, otimizando seu desenvolvimento, se mostrando uma alternativa viável e ecológica ao uso de fertilizante químico (MASSA et al., 2020).

Diante do exposto, esse capítulo objetivou explorar a interação sinérgica planta-BPCP-FMA a fim de contribuir para o estabelecimento de uma comunidade de microrganismos potencialmente benéficos para as plantas de milho, induzindo o aumento da tolerância à salinidade, e por sua vez, ao estresse sistêmico. A aplicação dessa biotecnologia pretende

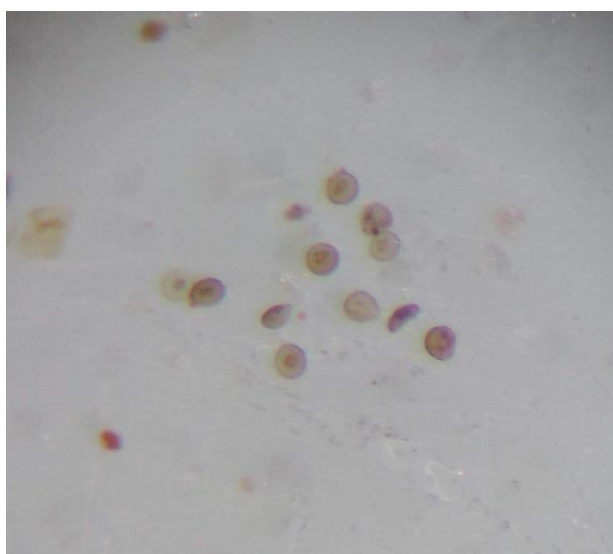
potencializar a produção agrícola de forma limpa e sustentável, perturbando minimamente os sistemas naturais.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Propagação de inóculo micorrízico

A produção do inóculo micorrízico foi realizada a partir de material propagativo da espécie de FMA *Rhizophagus clarus* (figura 1), cedido pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA. A areia utilizada para preenchimento dos vasos foi lavada e esterilizada junto com vermiculita (2:1, v/v) em autoclave a 120 °C por 1 hora, sendo o processo repetido após 24 horas. Após o resfriamento, o substrato foi distribuído em vasos de plástico, com capacidade aproximada de 3 Kg, previamente desinfestados com hipoclorito de sódio a 0,5 % por 20 minutos. Em cada vaso foi colocado cinco sementes de milho da variedade CMS-36 fornecida pelo IPA, para servirem como planta hospedeira. As sementes do milho foram limpas e desinfestadas em álcool 70 % por 3 min; em seguida foram colocadas em hipoclorito de sódio 2,5 % (v/v) por um período de 7 min; ao passar esse tempo foram novamente mergulhadas em álcool 70 % por 1 min; por fim, as sementes foram lavadas em água destilada estéril. Após a emergência das folhas verdadeiras do milho foi realizado a inoculação com dez gramas do material cedido pelo IPA contendo material propagativo de *R. clarus*.

**Figura 1.** Esporos do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus*



O cultivo foi conduzido em casa de vegetação e permaneceu por três meses sendo regado com água destilada e solução nutritiva completa (HOAGLAND; ARNON, 1950) (Anexo 3). Ao final desse período, o corte da parte aérea da planta hospedeira e a suspensão da irrigação foram feitos a fim de estimular a esporulação. Após 15 dias, o inóculo foi armazenado em geladeira até a montagem e condução do experimento. Posteriormente, foi realizada a observação dos esporos, com a finalidade de conferir a viabilidade do material, pelo método de peneiramento úmido seguindo a metodologia descrita por Gerdemann e Nicolson (1963).

#### 4.2.2 Seleção de cepas de BPCP para compor a dupla inoculação e preparação das sementes de milho (*Zea mays L.*) para teste de promoção de crescimento

Para seleção das cepas de BPCP, as quais foram testadas com a inoculação conjunta com o FMA, foram levados em consideração os dados de biomassa e biometria das plantas do experimento descrito no Capítulo 2 dessa dissertação (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil, selecionadas para compor experimento em casa de vegetação

Isolados	ACC	Aw	AIA	0 M	0,1M	0,5M	2,5M
28-7	Produtor	0,957	Elevada	+++	++	+	-
43	Produtor	0,957	Média	+++	+++	+++	-
46-1	Produtor	0,844	Elevada	+++	++	++	-
70	Produtor	0,844	Alta	+++	+++	+++	-
79-1	Produtor	0,957	Elevada	+++	+++	++	-

AIA; 1 - 11µg.mL<sup>-1</sup> (média); 11 - 50µg.mL<sup>-1</sup> (alta) e > 50µg.mL<sup>-1</sup> (elevada); IS: x (não solubiliza); IS < 2 (baixo); IS 2 - 4 (médio) e IS > 4 (alto); ACC: produtor; Aw: crescimento em meio com reduzida atividade de água (ARAÚJO, 2019). Crescimento ótimo (+++); Crescimento médio (++); Crescimento fraco (+); Nenhum crescimento (-)

As cepas de BPCP escolhidas foram cultivadas em meio King B líquido (Anexo 2) e permaneceram sob agitação dentro de erlenmeyer de 250 mL em mesa agitadora por 48 horas em rotação de 150 rpm. Quando o meio de cultivo contendo as bactérias multiplicadas atingiu densidade ótica de 10<sup>8</sup> (DO550nm = 0,1), as sementes de milho, anteriormente desinfestadas, foram colocadas dentro dos erlenmeyer e agitadas por duas horas em mesa agitadora para fins de contato e inoculação (BISEN et al., 2015; KAVAMURA et al., 2013).

Decorridas as duas horas de agitação, as sementes inoculadas foram semeadas em substrato estéril (areia lavada e vermiculita autoclavadas (1:1) (v/v)). Sete dias após a semeadura (DAS), foi realizada a re-inoculação das BPCP aplicando 1 mL de inóculo o mais próximo possível da raiz das plantas de milho

### ***4.2.3 Montagem e condução do experimento em casa de vegetação***

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) durante o período de 19 de abril de 2021 a 07 de junho de 2021, totalizando 49 dias de experimento.

O plantio foi realizado em vasos de 2 litros de capacidade, utilizando substrato estéril de vermiculita e areia na proporção de 1:1 (v/v), com 3 sementes de milho IPA CMS-36 por vaso. Quando o experimento completou 7 DAS foi realizado a co-inoculação com o FMA e a reaplicação de 1 mL de suspensão dos tratamentos de BPCP. Um desbaste foi realizado 15 DAS deixando uma planta por vaso.

A irrigação foi realizada duas vezes por semana com água salina em duas concentrações de NaCl: 40 mM e 80 mM, para induzir o estresse salino. A rega de algumas unidades experimentais era feita com água destilada com condutividade elétrica aferida e monitorada a quem foi atribuído, para fins de identificação, a nomenclatura de 0 mM. Toda a água destilada usada no experimento passou pelo processo de esterilização em autoclave por 1 hora a 120 °C.

Junto a rega salina, também foi aplicado solução nutritiva completa duas vezes por semana (HOAGLAND; ARNON, 1950) para garantir a nutrição das plantas de milho durante a condução do experimento (Anexo 3).

### ***4.2.4 Biomassa vegetal e teor de nutrientes***

Após 49 dias, ao final do experimento, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz e secos em estufa de circulação forçada a 65 °C e para pesagem posterior em balança analítica, onde se obteve a biomassa seca da parte aérea (BSPA). As plantas foram moídas e submetidas a extração dos elementos químicos presentes no tecido vegetal por um processo sem digestão utilizando solução de HNO<sub>3</sub> a 1mol/L (EMBRAPA, 2009). As amostras resultantes da extração foram analisadas por meio de técnicas de determinação de elementos químicos distintas, conforme descritas no Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes (EMBRAPA, 2009). A determinação de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foi realizada por fotômetro de chama e as leituras de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> foram obtidas pelo espectrofotômetro de absorção atômica.

### ***4.2.5 Coloração das raízes e taxa de micorrização***

Para avaliação da colonização micorrízica, as raízes das plantas de milho foram tratadas com solução de KOH 10 % a 90 °C em banho maria por 20 min e transferidas para uma solução

de 5 % de tinta de caneta diluída em solução de ácido acético 5 % a 90 °C durante 1 min, lavadas e armazenadas com lactoglicerol (BRUNDRETT et al., 1996). Após a coloração, as raízes foram observadas em placas reticuladas usando um microscópio estereoscópico para determinação da taxa de colonização através da presença de estruturas fúngicas no tecido cortical, segundo método descrito por Giovanetti e Mosse (1980).

#### ***4.2.6 Delineamento experimental e análise estatística***

Os vasos foram inoculados com os tratamentos e sorteados totalmente ao acaso obedecendo o delineamento experimental de blocos ao acaso, com cinco repetições e um controle absoluto para cada concentração da solução salina (0 mM; 40 mM; 80 mM). Em cada bloco havia vasos inoculados apenas com o FMA; e plantas inoculadas com as cinco cepas de BPCP em separado com adição da co-inoculação de FMA, todos submetidos as três concentrações da solução salina; controles sem inoculação que recebia a rega com solução salina em todas as concentrações (0 mM; 40 mM; 80 mM). Ao todo, o experimento contou com 105 unidades experimentais. Todos os parâmetros foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando o teste Skott-Knott a 5 % de probabilidade, por meio do programa SISVAR versão 5.1.

### **4.3 Resultados e Discussão**

#### ***4.3.1 Taxa de micorrização***

A taxa de micorrização das raízes do milho revelaram, de forma geral, que as bactérias auxiliaram no estabelecimento da simbiose tripartite. A figura 2 apresenta imagem ampliadas de raízes de milho com presença e ausência de estruturas fúngicas.

Os dados da Tabela 2 mostram uma interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos *versus* concentração salina da água de rega, apesar de não representar abundância na colonização radicular por apresentar taxas inferiores a 70 % sugerindo uma possível limitação de crescimento entre os microrganismos ou de sinalização entre as partes.

Investigando isoladamente a associação das bactérias ao fungo usadas no experimento, percebe-se uma intensificação da colonização em todas as concentrações de NaCl com um aumento na ordem 47,09 % na concentração 0 mM; 15,61 % na concentração 40 mM; e 45,45 % na concentração 80mM.

Os tratamentos 28-7; 70 e 79-1 aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a porcentagem da colonização das células das raízes das plantas ao longo do gradiente de concentração salina

e se destacaram em relação aos demais tratamentos. O acréscimo em relação a dose 0 mM foram na ordem de 19,40%; 44,79%; e 29,09%, respectivamente.

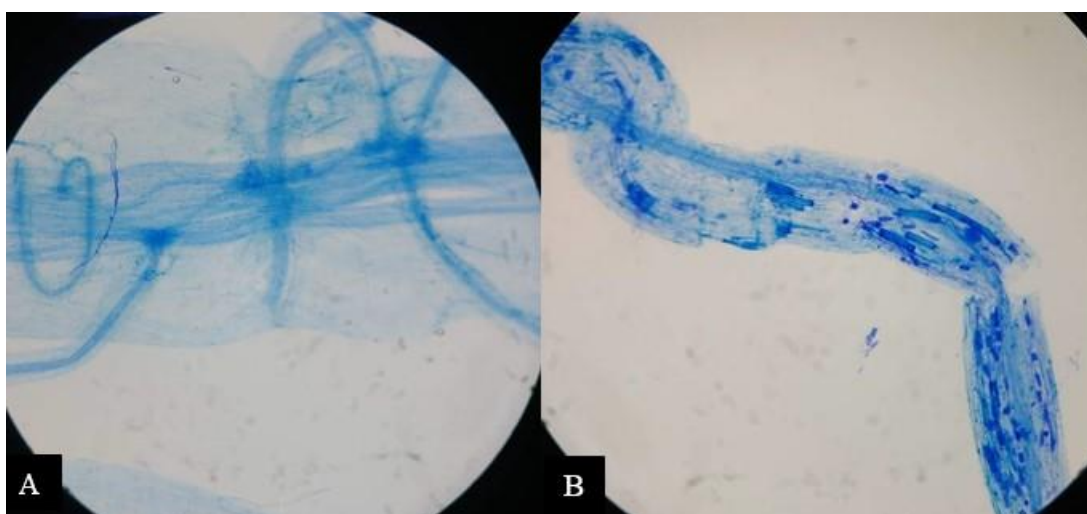
**Tabela 2.** Colonização micorrízica de *Rhizophagus clarus* em plantas de milho co-inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.

Tratamentos	0 mM	40 mM	80 mM
<b>28-7+M</b>	54,05% aA	55,82% aA	44,99% aA
<b>43+M</b>	53,51% aA	48,15% aA	32,12% bB
<b>46-1+M</b>	53,60% aA	60,16% aA	33,21% bB
<b>70+M</b>	65,40% aA	60,28% aA	49,97% aA
<b>79-1+M</b>	59,78% aA	43,04% aA	54,27% aA
<b>Controle</b>	44,46% aA	52,14% aA	37,31% bB
<b>CV%</b>	26.58		

Letras minúsculas comparam entre os tratamentos com a inoculação das bactérias; Letras maiúsculas comparam entre as concentrações da solução salina de rega (0 mM, 40 mM, 80 mM). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ )

Muitos estudos evidenciam que componentes específicos exsudados pelas raízes de plantas estressadas favorecem o recrutamento de microrganismos benéficos. Esta remodelação da rizosfera envolve múltiplos mecanismos visando produzir substratos para o crescimento microbiano, provocando respostas quimiotáticas e facilitando a colonização das raízes pelos organismos recrutados (ROLFE; GRIFFITHS; TON, 2019).

**Figura 2.** Imagem ampliadas 70 vezes em microscópio estereoscópico de raízes de milho com presença (B) e ausência (A) de estruturas fúngicas



No caso de FMA, as estrigolactonas mediam a interação planta-fungo induzindo a ramificação das hifas, processo necessário e que precede a colonização de raízes (BEGUM et al., 2019). As estrigolactonas são um hormônio vegetal derivado de carotenóides, responsável por ramificação de brotos e arranjo da arquitetura radicular, em interação com outros hormônios, como auxina, ácido abscísico e citocinina (WATERS et al., 2017; KIM et al., 2022). Sabendo que o estresse salino afeta diretamente os pigmentos da fotossíntese, como discutido anteriormente, a baixa dos teores de carotenóides nas plantas podem ter ocasionado declínio na sinalização entre planta-fungo ocasionando a baixa taxa de colonização das raízes. Othman et al. (2022) observaram resultados semelhantes encontrados nesse trabalho, em inoculação de plantas de gérberas. Os autores observaram a diminuição de colonização de raízes e estruturas fúngicas com o aumento do gradiente de concentração salina, junto com diminuição dos teores de clorofila.

Hou et al. (2021) em estudo realizado para explorar a diversidade e a estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas do solo em solos salinos coletados em campos de milho, observaram uma maior suscetibilidade de declínio da comunidade fúngica em relação as bactérias. O artigo sugere que a maior sensibilidade dos fungos aos gradientes de salinidade se dá pela dificuldade de aclimação das células a pressão osmótica exercida pela maior concentração salina. Foi observado também que as estruturas fúngicas diminuíram ao longo do aumento das concentrações salinas, fato que corrobora os resultados encontrados nessa dissertação.

**Figura 3.** . Biomassa vegetal de plantas de milho (*Zea mays* L) inoculado com *Rhizophagus clarus* e BPCP.



### 4.3.2 Biomassa vegetal e teores de nutrientes na parte aérea

A co-inoculação de BPCP e FMA promoveu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da biomassa vegetal (Tabela 3) entre os gradientes de concentração salina. Nas doses de 40 mM e 80 mM, os acréscimos do material vegetal em relação ao controle não inoculado foi de 53,38 % e 132,77 %, respectivamente. Na dose de 0 mM, o maior valor de matéria seca se deu no controle micorrizado.

As bactérias 41-6, 70 e 79-1 se mostraram mais eficientes junto ao FMA em acumular biomassa vegetal no aumento das doses de sal. Em relação a dose controle de 0 mM, as bactérias citadas apresentaram adição de 36,38-47,50 %; 40,57-20,66 %; 36,57-27,41 %, respectivamente. O controle micorrizado também aumentou o conteúdo de material vegetal produzido pelas plantas de milho, crescendo em 18-50 – 21,17 % a biomassa vegetal.

Curiosamente, os acréscimos foram observados ao longo do gradiente de concentração, ou seja, com o aumento das doses para todos os tratamentos.

O efeito positivo da co-inoculação na biomassa vegetal pode ser explicado pela produção de AIA e ACC deaminase pelas bactérias utilizadas no experimento.

**Tabela 3.** Biomassa vegetal ( $\text{g planta}^{-1}$ ) de plantas de milho inoculadas com *Rhizophagus clarus* e bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.

Tratamentos	0 mM	40 mM	80 mM
28-7+M	12,16 aA	15,08 aA	14,90 aA
43+M	12,73 aA	15,94 aA	15,51 aA
46-1+M	12,23 aB	16,68 aA	18,04 aA
70+M	12,10 aB	17,01 aA	14,60 aA
79-1+M	10,58 aB	14,45 aA	13,48 aA
Controle Micorrizado	13,08 aA	15,50 aA	15,83 aA
Controle	12,47 aA	11,09 bA	7,75 bB
CV%		18,48	

Letras minúsculas comparam entre os tratamentos com a inoculação das bactérias; Letras maiúsculas comparam entre as concentrações da solução salina de rega (0 mM, 40 mM, 80 mM). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ )

Para os teores de nutrientes extraídos do tecido vegetal de plantas de milho inoculadas com FMA e BPCP foram observados a eficiência da sinergia entre planta-fungo-bactéria no que diz respeito ao balanço nutricional. Na Tabela 5, os dados mostram que em comparação ao controle na maior dose salina (80 mM) não inoculado que recebeu rega salina, todas as plantas inoculadas com a dupla de microrganismos tiveram a alta absorção de  $\text{Na}^+$  inibida, e os tratamentos diferiram estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).



As plantas inoculadas apenas com as micorrizas apresentaram menores valores de acúmulo de sódio em comparação ao controle sem inoculação que recebeu nas duas doses salinas, mostrando interação significativa entre doses diferiram estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). Com o aumento da concentração de sal de 40 mM para 80 mM houve uma sensível diminuição do acúmulo de  $\text{Na}^+$  nos tecidos nas plantas com a dupla inoculação e nas plantas apenas com a inoculação micorrizica, sugerindo uma seleção de íons por parte do fungo *Rhizophagus clarus*.

A relação  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  (Tabela 4) das bactérias 28-7 e 43 co-inoculadas com FMA sugerem um maior efeito na homeostase de íons, quando comparados ao controle não inoculado na dose 80 mM, diferindo estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ), elevando a relação em 11,49 % e 14,94 % em comparação com o controle não inoculado. O tratamento composto apenas com o FMA apresentou o maior valor na dose 80 mM em comparação ao controle sem inoculação, mostrando o melhor resultado em relação aos demais tratamentos. Em comparação com o controle não inoculado o acréscimo foi de 47,12 % na maior concentração.

**Figura 4.** Plantas de milho de (*Zea mays* L) inoculadas *Rhizophagus clarus* e co-inoculadas com BPCP. A – Plantas controle, micorrizada e co-inoculadas com bactéria 79-1 (0 mM); B – Plantas controle, micorrizada e co-inoculadas com bactéria 43 (40 mM); C - Plantas controle, micorrizada e co-inoculadas com bactéria 43 (80 mM)

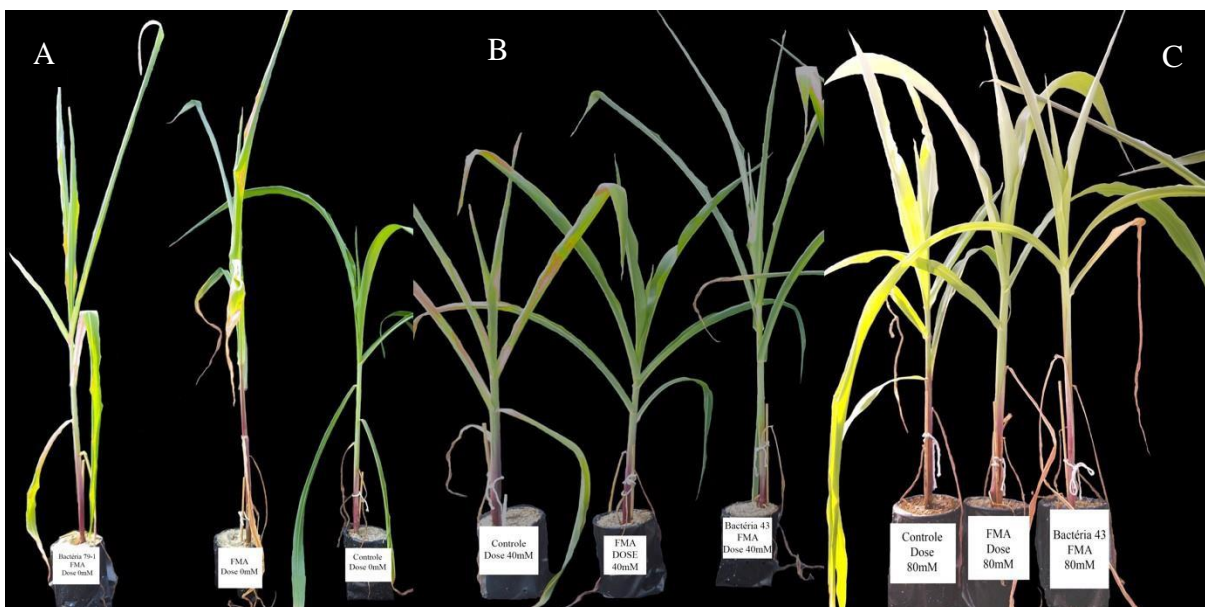


Foto do autor

**Tabela 4.** Relação de nutriente extraídos de plantas de milho inoculadas com *Rhizophagus clarus* e bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.

Tratamentos	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )			Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )		
	0 mM	40 mM	80 mM	0 mM	40 mM	80 mM
<b>28-7</b>	10,12 bA	0,97 aB	0,97 bB	14,00 aA	13,94 aA	17,04 aA
<b>43</b>	5,42 dA	0,69 cC	1,00 bB	16,25 aA	10,57 aA	12,01 aA
<b>46-1</b>	8,38 cA	0,50 cC	0,88 cB	14,22 aA	12,08 aA	11,35 aA
<b>70</b>	8,50 cA	0,74 bB	0,79 dB	13,17 aA	17,18 aA	14,10 aA
<b>79-1</b>	10,27 bA	1,05 aB	0,80 dB	11,65 aA	13,73 aA	15,16 aA
<b>Controle</b>	15,13 bA	1,09 aB	0,87 cB	14,03 aA	13,15 aA	15,49 aA
<b>Controle Mic</b>	22,11 aA	0,99 aB	1,28 aC	12,80 aA	14,02 aA	15,25 aA
<b>CV%</b>	22,37			16,03		

Letras minúsculas comparam entre os tratamentos com a inoculação das bactérias; Letras maiúsculas comparam entre as concentrações da solução salina de rega (0 mM, 40 mM, 80 mM). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ )

As concentrações de cálcio e magnésio (tabela 5) foram semelhantes entre os tratamentos, diferindo sensivelmente apenas nos teores de cálcio para o conjunto da bactéria 79-1 com o FMA. Analisando os tratamentos separadamente, observa-se um aumento dos teores em relação ao controle não inoculado.

Os resultados desse estudo sugerem que a colonização das raízes das plantas com BPCP e FMA aumenta a tolerância das plantas à salinidade por meio da indução da osmorregulação e modulação do impacto do estresse salino, repercutindo principalmente no aumento da biomassa vegetal, pois a razão K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> pode ser usada como um indicador fisiológico de tolerância ao sal (GARG; PANDEY, 2014)

Uma menor relação K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> pode levar a baixa pressão de turgescência, toxicidade iônica e mau funcionamento de proteínas necessárias para o crescimento (GARG; PANDEY, 2014). As maiores razões K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> em halófitas são uma das características proeminentes para uma maior tolerância ao limitar de absorção excessiva de íon sódio e distribuição desses íons dentro da planta (SHABALA et al., 2016).

Os FMA podem absorver seletivamente elementos, como K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, evitando a absorção em excesso de Na<sup>+</sup>. Vários estudos mostraram que a simbiose com FMA pode impedir a transferência de Na<sup>+</sup> para os tecidos da parte aérea em condições salinas, enquanto sistematicamente aumenta a captação de K<sup>+</sup> (ESTRADA et al., 2013).

Chang et al. (2018) observaram achados semelhantes ao desse estudo, onde a biomassa das plântulas de *E. angustifolia* foi aumentada pela inoculação com *Rhizophagus irregularis*. Os autores apontaram ainda o potencial do FMA em proteger a plantas contra

danos causados pelos efeitos deletérios do estresse salino aumentando o acúmulo de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ .

Moreira et al. (2019) relacionou o aumento do crescimento de plantas de milho em condições salinas ao efeito sinérgico entre FMA e BPCP, corroborando os resultados do presente estudo. Porém, os autores associaram o acréscimo na biomassa vegetal ao aumento no teor de  $K^+$  acompanhado por uma diminuição efetiva de  $Na^+$  nos tecidos vegetais.

Chen et al. (2022) associa bactérias do solo a *Rhizophagus irregularis* para alívio de estresse salino em plantas de milho. Os autores encontraram uma correlação positiva entre a taxa de colonização de FMA e a biomassa da parte aérea evidenciando uma contribuição positiva de *R. irregularis* para o crescimento das plantas de milho e evidenciam o papel sinérgico entre as bactérias e o FMA usados no trabalho.

**Tabela 5.** Dados detalhados dos teores de nutrientes extraídos da biomassa vegetal de plantas de milho inoculadas com *Rhizophagus clarus* e bactérias promotoras de crescimento de plantas, isoladas da rizosfera e solo de *Mimosa bimucronata* de uma lagoa temporária do Semiárido do Brasil.

Tratamentos	Na <sup>+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )			K <sup>+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )			Ca <sup>2+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )			Mg <sup>2+</sup> (g kg <sup>-1</sup> )		
	0 mM	40 mM	80 mM	0 mM	40 mM	80 mM	0 mM	40 mM	80 mM	0 mM	40 mM	80 mM
<b>28-7+M</b>	3,90 aB	30,30 aA	23,80 bA	39,50 aA	29,50 aB	23,30 bB	14,69 aA	12,40 aA	14,15 aA	1,07 aA	0,89 aA	0,90 aA
<b>43+M</b>	5,90 aC	40,90 aA	19,60 bB	32,00 aA	28,40 aA	19,60 bB	12,31 aA	11,21 aA	10,73 aA	0,86 aA	1,06 aA	0,96 aA
<b>46-1+M</b>	4,40 aB	34,50 aA	26,30 bA	36,90 aA	17,40 aB	23,20 bB	13,09 aA	11,90 aA	10,55 aA	0,96 aA	1,04 aA	0,95 aA
<b>70+M</b>	4,20 aB	32,80 aA	27,50 bA	35,70 aA	24,30 aB	21,80 bB	12,74 aA	13,40 aA	10,87 aA	0,98 aA	0,81 aA	0,81 aA
<b>79-1+M</b>	3,60 aB	24,00 aA	38,10 aA	37,00 aA	25,20 aA	30,50 aA	12,03 aA	13,11 aA	9,28 aB	1,06 aA	0,95 aA	0,61 aA
<b>Controle</b>	2,30 aB	37,50 aA	43,90 aA	34,80 aA	40,90 aA	38,30 aA	14,12 aA	10,72 aA	10,66 aA	1,00 aA	0,92 aA	0,70 aA
<b>Controle Mic</b>	1,80 aB	31,30 aA	23,70 bA	39,80 aA	31,20 aA	30,40 aA	9,70 aA	11,40 aA	11,26 aA	0,83 aA	0,86 aA	1,72 aA
<b>CV%</b>	22,40			16,16			10,27			11,48		

Letras minúsculas comparam entre os tratamentos com a inoculação das bactérias; Letras maiúsculas comparam entre as concentrações da solução salina de rega (0 mM, 40 mM, 80 mM). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ )

#### 4.4 Conclusões

As bactérias usadas na co-inoculação junto com o FMA auxiliaram o processo de simbiose tripartite podendo ser classificadas como bactérias auxiliares da micorriza (MHB).

A co-inoculação de FMA e BPCP aumentaram a biomassa das plantas, com destaque para as bactérias 46-1; 70 e; 79-1.

O teor dos nutrientes nos tecidos das plantas inoculadas com FMA e BPCP sugere o aumento da tolerância das plantas de milho ao estresse salino por meio da osmoregulação mediada pelos microrganismos. Destacando as bactérias 28-7 e 43 co-inoculadas com o fungo *Rhizophagus clarus*.

A inoculação do fungo solteiro também apresentou resultados positivos, evidenciando uma característica de seleção de íons pelo fungo.

## Referências Bibliográficas

AFKHAMI, M. E.; ALMEIDA, B. K.; HERNANDEZ, D. J.; KIESEWETTER, K. N.; REVILLINI, D. P. Tripartite mutualisms as models for understanding plant–microbial interactions. **Current Opinion in Plant Biology**. V. 56. P. 28–36. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.02.003>

BEGUM, N.; QIN, C.; AHANGER, M. A.; RAZA, S.; KHAN, M. I.; ASHRAF, M.; AHMED, N.; ZHANG, L. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. **Frontiers in Plant Science**. V. 10. P. 1068. 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068>

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M.; BAKKER, P. A. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, V. 17. P. 478-486. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>

BISEN, K., KESWANI, C., MISHRA, S., SAXENA, A., RAKSHIT, A., SINGH, H. B. Unrealized potential of seed biopriming for versatile agriculture. In: **Nutrient use efficiency: from basics to advances**. Rakshit, A., Singh, H. B., & Sen, A. (Eds.). New Delhi: Springer India. p. 193-206, 2015. [doi.org/10.1007/978-81-322-2169-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2169-2_13)

BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR monograph 32. **Mycorrhizas for forestry and agriculture**. Australian Centre for International Agricultural Research, 1996

CHANG, W.; SUI, X.; FAN, X-X.; JIA, T-T.; SONG, F-Q. Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Modulates Antioxidant Response and Ion Distribution in Salt-Stressed *Elaeagnus angustifolia* Seedlings. **Frontiers in Microbiology**. V. 9. P.652. 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00652>

CHEN, M.; ARATO, M.; BORGHI, L.; NOURI, E.; REINHARDT, D. Beneficial Services of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. From Ecology to Application. **Frontiers in Plant Science**. V.9. P.1270. 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01270>

CHEN, Q.; DENG, X.; ELZENGA, J. T. M.; ELSAS, J. D-V. Effect of soil bacteriomes on mycorrhizal colonization by *Rhizophagus irregularis*—interactive effects on maize (*Zea mays* L.) growth under salt stress. **Biology and Fertility of Soils**. V. 58. P. 515–525. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00374-022-01636-x>

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Manual de métodos de análise de solo. 5. Ed. Ver. Atual. Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2018.

ESTRADA, B.; AROCA, R.; MAATHUIS, F. J.; BAREA, J. M.; RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal fungi native from a Mediterranean saline area enhance maize tolerance to salinity through improved ion homeostasis. **Plant, Cell & Environment**. V. 36. P.1771–1782. 2013. <https://doi.org/10.1111/pce.12082>

ETEMADI, M.; GUTJAHR, C.; COUZIGOU, J.; ZOUINE, M.; LAURESSERGUES, D.; TIMMERS, A.; AUDRAN, C.; BOUZAYEN, M.; BÉCARD, G.; COMBIER, J. P. Auxin Perception Is Required for Arbuscule Development in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. **Plant Physiology**, V. 1. P. 281–292. 2014. <https://doi.org/10.1104/pp.114.246595>

FRACETTO, G. G. M.; PERES, L. E. P.; MEHDY, M. C.; LAMBAIS, M. R. Tomato ethylene mutants exhibit differences in arbuscular mycorrhiza development and levels of plant defense-related transcripts. **Symbiosis**. v.60, p.155–167, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13199-013-0251-1>

FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O.; SANTOYO, G.; PERAZZOLLI, M. The Potential Role of Microbial Biostimulants in the Amelioration of Climate Change-Associated Abiotic Stresses on Crops. **Frontiers in Microbiology**. V. 12:829099. 2022. doi: 10.3389/fmicb.2021.829099

FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. **New Phytologist**. V. 176. P. 22–36. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x>

GAMALERO, E.; BERTA, G.; MASSA, N.; GLICK, B. R.; LINGUA, G. Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. **FEMS Microbiology Ecology**. V. 64. P. 459–467. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00485.x>

GARG, N.; PANDEY, R. Effectiveness of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi on nutrient uptake and ion homeostasis in salt-stressed *Cajanus cajan* L. (Millsp.) genotypes. **Mycorrhiza**. V. 25. P. 165–180. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0600-9>

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions British Mycological Society**. V. 46:235–244. 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, New York, v. 84, p. 489–500, 1980.

GUILLOTIN, B.; ETEMADI, M.; AUDRAN, C.; BOUZAYEN, M.; BÉCARD, G.; COMBIER, J. P. *Sl-IAA27* regulates strigolactone biosynthesis and mycorrhization in tomato (var. *MicroTom*). **New Phytologist**. V. 213. P.1124–1132. 2017. <https://doi.org/10.1111/nph.14246>

HANEY, C. H.; SAMUEL, B. S.; BUSH, J.; AUSUBEL, F. M. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. **Nature Plants**, v. 1, p.15051, 201. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.51>

HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California agricultural experiment station**, California, v. 347, 2 ed. 1950. 32 p.

HOU, Y.; ZENG, W.; HOU, M.; WANG, Z.; LUO, Y.; LEI, G.; ZHOU, B.; HUANG, J. Responses of the Soil Microbial Community to Salinity Stress in Maize Fields. **Biology**. P. 10. V.1114. 2021. <https://doi.org/10.3390/biology1011114>

JACOTT, C.N.; MURRAY, J.D.; RIDOUT, C.J. Trade-offs in arbuscular mycorrhizal symbiosis: disease resistance, growth responses and perspectives for crop breeding. **Agronomy**. V. 7. P. 75. 2017. <https://doi.org/10.3390/agronomy7040075>

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. S. da; PARMA, M. M.; ÁVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T.D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. de. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013. [doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002](https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002)

KIM, B.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; FLOKOVÁ, K.; SULEIMAN, AFNAN, K. A.; KURAMAE, E. E.; BOUWMEESTER, H. J.; ZANCARINI, A. Effect of strigolactones on recruitment of the rice root-associated microbiome. **FEMS Microbiology Ecology**, V. 98, Issue 2, 2022. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac010>

KRISHNAMOORTHY, R.; ROY CHOUDHURY, A.; WALITANG, D.I.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; SA, T. Salt Stress Tolerance-Promoting Proteins and Metabolites under Plant-Bacteria-Salt Stress Tripartite Interactions. **Applied Sciences**. 2022, 12, 3126. <https://doi.org/10.3390/app12063126>

MASSA, N.; BONA, E.; NOVELLO, G.; V. TODESCHINI, L.; BOATTI, F.; MIGNONE, E.; GAMALERO, G.; LINGUA, G. B.; P. CESARO. AMF communities associated to *Vitis vinifera* in an Italian vineyard subjected to integrated pest management at two different phenological stages. **Scientific Reports**. V. 10: 9197. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66067-w>

MOREIRA, H.; PEREIRA, S.I.A.; MARQUES, A.P.G.C.; RANGEL, A. O. S S.; P. M. L.; MARQUES. Mine land valorization through energy maize production enhanced by the application of plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. **Environmental Science and Pollution Research** V. 23, 6940–6950. 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5914-4>

MOREIRA, H.; PEREIRA, I. A. S.; VEGA, A.; CASTRO, P. M. L.; MARQUES, A. P. M. L. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria benefit maize growth under increasing soil salinity. **Journal of Environmental Management**. V. 257. ISSN 0301-4797. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109982>

OTHMAN, Y.A.; TAHAT, M.; ALANANBEH, K.M.; AL-AJLOUNI, M. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Inoculation Improves Flower Yield and Postharvest Quality Component of Gerbera Grown under Different Salinity Levels. **Agriculture** 2022, 12, 978. <https://doi.org/10.3390/agriculture12070978>

SELOSSE, M. A.; LE TACON, F. The land flora: a phototroph-fungus partnership? **Trends in Ecology & Evolution**. V. 13. P. 15-20. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01230-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01230-5)



SHABALA, S.; BOSE, J.; FUGLSANG, A. T.; POTTOSIN, I. On a quest for stress tolerance genes: Membrane transporters in sensing and adapting to hostile soils. **Journal of Experimental Botany**. V. 67 (4). P.1015–1031. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv465>

ROLFE, S. A.; GRIFFITHS, J.; TON, J. Crying out for help with root exudates: adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes. **Current Opinion in Microbiology**. V. 49, P. 73-82, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.003>.

VALADARES, R. B. S.; MESCOLOTTI, D. L. C.; CARDOSO, E. J. B. N Micorrizas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. (Eds) **Microbiologia do solo**. Piracicaba: Editora ESALQ, 2016, p. 178-196

VAN DER HEIJDEN, M. G., MARTIN, F. M., SELOSSE, M. A. & SANDERS, I. R. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. **New Phytologist**. V. 205. P. 1406–1423. 2015. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>

WATERS, M. T.; GUTJAHR, C.; BENNETT, T.; DAVID, C. N. Strigolactone signaling and evolution. **Annual Review of Plant Biology**. V. 68. P. 291–322 <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040925>

YADAV, R.; CHAKRABORTY, S.; RAMAKRISHNA, W. Wheat grain proteomic and protein–metabolite interactions analyses provide insights into plant growth promoting bacteria–arbuscular mycorrhizal fungi–wheat interactions. **Plant Cell Reports**. V. 41. P. 1417–1437. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02866-x>

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do cenário atual de grandes transformações ambientais devido as mudanças climáticas é cada vez mais latente a busca de ferramentas que possam elevar a segurança alimentar, aumentando a produção de alimentos com tecnologias limpas e que promovam o equilíbrio entre os ecossistemas.

Para isso, é necessário elucidar os mecanismos do aumento de tolerância dos vegetais as intempéries através de estudos multidisciplinares no campo dos conhecimentos fisiológicos, bioquímicos e moleculares.

Ao decorrer dessa pesquisa foi possível identificar que o uso de bactérias isoladas da rizosfera de plantas do semiárido podem contribuir para o alívio de estresse salino quando aplicadas a uma cultura de interesse econômico. As cepas 28-7; 43; 46-1; 52; 59-3; 70; e 79-1 demonstraram potencial de promoção de crescimento em condições controladas de estresse salino e, ainda, apresentaram boa performance na proteção do aparato fotossintético, indicando a viabilidade de aproveitamento para fins biotecnológicos na busca por alívio de estresses bióticos e abióticos.

Quando as bactérias foram consorciadas com o FMA *Rhizophagus clarus* mostraram uma tendência a aumentar a colonização das raízes do hospedeiro, sendo classificadas como bactérias auxiliares da micorriza (MHB). A co-inoculação de FMA e BPCP levaram ao aumento da matéria seca vegetal, destacando os efeitos sinérgicos das cepas 41-6; 70 e; 79-1 junto com o FMA.

O efeitos sinérgicos da co-inoculação se estendem ainda ao teor dos nutrientes nos tecidos vegetais das plantas, sugerindo o aumento da tolerância das plantas de milho ao estresse salino por meio da osmoregulação mediada pelos microrganismos. Nessa função se destacam as bactérias 28-7; 46-1; 70; 79-1 co-inoculadas com o fungo *Rhizophagus clarus*.

Para melhor explanação e entendimento dos resultados alcançados nessa pesquisa, faz-se necessária o uso de técnicas de abordagens ômicas. As abordagens ômicas ganharam destaque nas pesquisas nos últimos anos, dando luz a mecanismos de expressão gênica, rotas bioquímicas e sinalização, ajudando a um esforço mais direcionado e eficiente na seleção de tecnologias ecologicamente viáveis como seleção de melhores espécies através do melhoramento genético e seleção de microrganismos benéficos no ambiente edáfico.

Por fim, é possível indicar as cepas de BPCP e FMA usados nesse trabalho como recurso biotecnológico para trabalhos posteriores ou até mesmo para o desenvolvimento de produtos como biofertilizantes e bioprotetores contra possíveis ambientes estressores.

**ANEXO 1****Meio King B (KING et al., 1954)**

Para confecção de 1 Litro de meio de cultura:

Peptona bacteriológica - 20 g

Sulfato de Magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) - 1,5 g

Fosfato de potássio monobásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) - 1,5 g

Ágar bacteriológico - 15 g

Glicerina - 10 ml

**ANEXO 2****Meio Ágar - Halofílico (VINOTHINI et al., 2014)**

Para confecção de 1 Litro de meio de cultura:

Peptona bacteriológica - 20 g

Sulfato de Magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) - 6 g

Extrato de levedura - 3 g

Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) - 0,1 g

Cloreto de Sódio ( $\text{NaCl}$ ) - 30 g

Cloreto de Potássio ( $\text{KCl}$ ) - 5 g

Ágar - 20 g

**ANEXO 3****Solução Nutritiva (Hoagland e Arnon, 1951)**

Para confecção da Solução estoque - 1000 mL

SOLUÇÃO ESTOQUE	CONCENTRAÇÃO ( $\text{g L}^{-1}$ )	PIPETAR ( $\text{mL L}^{-1}$ )
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136,09	1
KCl	74,56	5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,02	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	247,47	2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132,14	2
Micronutrientes	*	1
FeEDTA	*	1

\*Preparação da solução estoque de micronutrientes e FeEDTA – Solução estoque 1000 mL

**Micronutrientes** (pipetar 1mL para fazer 1L)

$\text{H}_3\text{BO}_3$  - 2,86g

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 1,55g

$\text{ZnCl}_2$  - 0,1g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,08g

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  - 0,02g

**FeEDTA** (pipetar 1mL para fazer 1L)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 24,9g

EDTA - 33,2g

$\text{NaOH}$  [ $1 \text{ mol L}^{-1}$ ] – 89g