

## **Efeito de promotores de crescimento bacterianos em plântulas de milho crescidas em cultivo hidropônico com estresse induzido por polietilenoglicol<sup>1</sup>**

**Chainheny Gomes Carvalho<sup>2</sup>, Camila Cristina Vieira Velloso<sup>3</sup>, Bárbara Temponi Vilarino Godinho<sup>4</sup>, Vitória Palhares Ribeiro<sup>5</sup>, Christiane Abreu de Oliveira Paiva<sup>6</sup>, Eliane Aparecida Gomes<sup>6</sup>, Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>7</sup>, Sylvia Morais de Sousa<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo CNPq

<sup>2</sup>Estudante do Curso de Ciências Biológicas Bacharelado do Centro Universitário de Sete Lagoas, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq

<sup>3</sup> Bolsista de Mestrado

<sup>4</sup> Bolsista de Doutorado

<sup>5</sup> Bolsista de Doutorado

<sup>6</sup>Pesquisador (a) da Embrapa Milho e Sorgo

<sup>7</sup>Analista de Laboratório da Embrapa Milho e Sorgo

### **Introdução**

Alterações nos índices pluviométricos provocadas pelas mudanças climáticas globais têm tornado os períodos de seca cada vez mais acentuados. Dentre os estresses abióticos, o estresse hídrico é o que mais limita a produtividade agrícola, uma vez que ocasiona danos em todos os estágios de desenvolvimento das culturas (Cavalcante et al., 2009). Em plantas, a indisponibilidade de água propicia a redução no alongamento celular, no desenvolvimento da área foliar e no ganho de biomassa (Pezzopane et al., 2015), já que interfere no processo de fotossíntese, em razão do fechamento dos estômatos e da perda da turgescência (Taiz; Zeiger, 2013; Benešová et al., 2012). O mecanismo de tolerância ao stress hídrico apresenta, por natureza, complexidade fisiológica, pois é fortemente influenciado pelas condições do ambiente (Cortés et al., 2013). Nesse contexto, as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) surgem como uma alternativa sustentável capaz de amenizar os efeitos negativos desse tipo de stress em vegetais. As BPCPs são microrganismos que colonizam a rizosfera e/ou tecidos internos da planta (endofíticas) e promovem direta ou indiretamente o seu crescimento. Essas bactérias podem produzir fito-hormônios e substâncias osmorreguladoras, que levam à proteção e ao aumento do sistema radicular, e, conseqüentemente, a uma maior absorção de água e nutrientes do solo (Cohen et al., 2015; Bashan et al., 2014).

A execução de experimentos com plantas sob deficiência hídrica em câmara de crescimento e o uso do cultivo hidropônico são estratégias que minimizam a interferência de outros estresses, como luminosidade e baixa fertilidade do solo, além de controlar o consumo de água pelas plantas e permitir a avaliação do desenvolvimento do sistema radicular de forma individual. Viabiliza também a indução controlada de

estresse hídrico e contribui para a reprodução de condições similares em ensaios conduzidos em diferentes períodos (Machado; Furlani, 1985).

O agente osmótico polietilenoglicol 6000 é muito utilizado em cultivo hidropônico para simulações de deficiência hídrica, pois é um composto químico inerte, solúvel em água e não tóxico às plantas. Esse polímero não penetra no apoplasto da raiz, em razão do seu alto peso molecular (Tambelini; Perez, 1998). Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de duas cepas bacterianas como potenciais promotoras de crescimento em plântulas de milho crescidas em solução nutritiva sob estresse induzido por polietilenoglicol (PEG).

## Material e Métodos

Foram utilizadas duas cepas de *Bacillus* (B116 e B119) do banco de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos e o genótipo de milho L521236/CMSM036 do programa de melhoramento Embrapa Milho e Sorgo, responsivo a inoculação bacteriana (Sousa et al., 2018).

As sementes de milho foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 0,5% por cinco minutos, lavadas e embebidas durante quatro horas em água deionizada e germinadas em papel germitest em câmara de crescimento. Após a germinação das sementes por quatro dias, quatro plântulas uniformes para cada tratamento foram transplantadas para sistema hidropônico contendo oito litros de solução nutritiva Hoagland meia força pH 5,65 (Liu et al., 1998). Esse sistema foi mantido em câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura, luminosidade e aeração. Após sete dias de aclimação, as raízes das plântulas foram mantidas em contato com culturas bacterianas de cada cepa por seis horas em temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C). Cada cultura era composta por  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) mL<sup>-1</sup> ressuspendidas em solução salina 0,85%. O controle negativo foi imerso apenas em solução salina. Em seguida, as plântulas foram recolocadas em solução nutritiva onde foram mantidas por mais sete dias seguidos de mais três de indução de estresse por 10% polietilenoglicol (PEG) 6000. Posteriormente, o sistema radicular foi separado da parte aérea, fotografado com a câmera digital (Nikon D300S SLR), e a análise das imagens foi realizada com o auxílio dos softwares RootReader2D e WinRhizo v. 4.0 (Régent Systems, Quebec, Canadá). Características de morfologia radicular como área de superfície radicular total (AS) (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes com diâmetro subdividido entre 0-1 mm, 1-2 mm e > 2 mm (cm<sup>2</sup>), volume total de raízes (V) (cm<sup>3</sup>) e volume de raízes com diâmetro entre 0-1 mm, 1-2 mm e > 2 mm (cm<sup>3</sup>) (Sousa et al., 2012) foram avaliadas. O teor de clorofila na parte aérea das plântulas foi determinado pelo índice SPAD (*Soil Plant Analysis Development*). Finalmente, a raiz e a parte aérea foram secas em estufa com circulação forçada a 65 °C até adquirirem peso constante, para obtenção do peso seco de parte aérea (PSPA) (g), peso seco de raiz (PSR) (g) e peso seco total (PST) (g).

## Resultados e Discussão

A análise dos dados mostrou que o fator cepa foi significativo para área de superfície de raízes com diâmetro >2 mm (cm<sup>2</sup>), volume de raízes com diâmetro entre 0-1 mm (cm<sup>3</sup>) e maior que 2 mm (cm<sup>3</sup>) e peso seco da raiz (g). O fator PEG foi significativo para volume de raízes com diâmetro entre 0-1 mm (cm<sup>3</sup>), peso seco total (g) e índice SPAD. A interação dos tratamentos Cepa x PEG foi significativa somente para o volume de raízes com diâmetro entre 0-1 mm (cm<sup>3</sup>). O coeficiente de variação (CV) foi de baixo a médio, indicando boa precisão experimental (Sousa et al., 2018; Oliveira; Sousa, 2016) (Tabela 1).

**Tabela 1. Análise de variância das características morfofisiológicas de plântulas de milho inoculadas com as cepas B116 e B119 com e sem o estresse com 10% PEG.**

FV	GL	AS (cm <sup>2</sup> )	AS1 (cm <sup>2</sup> )	AS2 (cm <sup>2</sup> )	AS3 (cm <sup>2</sup> )	V (cm <sup>3</sup> )	V1 (cm <sup>3</sup> )	V2 (cm <sup>3</sup> )	V3 (cm <sup>3</sup> )	PSPA (g)	PSR (g)	PST (g)	ÍNDICE SPAD
Cepa	2	328,92 <sup>ns</sup>	62,42 <sup>ns</sup>	331,2 <sup>ns</sup>	18,59*	0,21 <sup>ns</sup>	0,02*	0,49 <sup>ns</sup>	0,72**	0,00131 <sup>ns</sup>	0,00046**	0,00097 <sup>ns</sup>	1,41 <sup>ns</sup>
PEG	1	220,57 <sup>ns</sup>	143,14 <sup>ns</sup>	8,81 <sup>ns</sup>	1,11b <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0,04*	0,02 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0,00980**	0,00002 <sup>ns</sup>	0,00888**	12,88**
CepaxPEG	2	19,54 <sup>ns</sup>	91,57 <sup>ns</sup>	88,02 <sup>ns</sup>	9,87 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>	0,03*	0,17 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,00071 <sup>ns</sup>	0,00008 <sup>ns</sup>	0,0012 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>
Erro	12	204,62	18,39	121,88	3,39	0,2	0,004	0,17	0,09	0,00044	0,00003	0,00053	0,88
Média		152,84	59,21	60,47	16,85	3,82	0,97	2,21	1,77	0,21	0,05	0,25	32,33
CV%		9,36	7,24	18,26	10,93	11,77	7,23	18,92	16,64	10,2	13,36	9,2	2,91

Legenda: Fator de variação (FV), grau de liberdade (GL), área de superfície radicular total (AS) (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 e 1,0 mm (AS1) (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes com diâmetro entre 1,0 e 2,0 mm (AS2) (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes com diâmetro maior que 2 mm (AS3) (cm<sup>2</sup>), volume total de raízes (V) (cm<sup>3</sup>), volume de raízes com diâmetro entre 0 e 1,0 mm (V1) (cm<sup>3</sup>), volume de raízes com diâmetro entre 1,0 e 2,0 mm (V2) (cm<sup>3</sup>), volume de raízes com diâmetro maior que 2 mm (cm<sup>3</sup>), peso seco de parte aérea (PSPA) (g), peso seco de raiz (PSR) (g), peso seco total (g), polietilenoglicol (PEG), coeficiente de variação (CV%), ns – não significativo, \*= significativo a 5%, \*\*= significativo a 1% de probabilidade pelo Teste F.

As cepas de *Bacillus* B116 e B119 foram previamente isoladas da rizosfera de milho e são solubilizadoras de fontes pouco solúveis de fósforo (Oliveira et al., 2009). As duas cepas produzem AIA a partir de triptofano (Sousa et al., 2018), e esse mecanismo pode proporcionar o desenvolvimento radicular e, conseqüentemente, aumentar o acúmulo de matéria seca da raiz e da parte aérea (Ikeda et al., 2013; Wahyudi et al., 2011; Mehnaz; Lazarovits, 2006).

O PEG é utilizado como agente indutor de estresse hídrico em solução hidropônica, pois reduz o potencial osmótico da solução nutritiva e impossibilita a absorção de água pelas plantas (Steuter et al., 1981). As plantas inoculadas com as cepas B116 sob estresse de PEG mostraram menor área de superfície e volume de raízes com diâmetro entre 0-1 mm. Já aquelas inoculadas com as cepas B116 e B119 apresentaram maior área de superfície de raízes com diâmetro maior do que 2 mm e maior peso seco da raiz e as inoculadas com a cepa B119 maior volume de raízes com diâmetro maior do que 2 mm (Tabela 2). Nas plantas não inoculadas, as características

área de superfície de raízes com diâmetro  $> 2$  mm, peso seco da parte aérea, peso seco total e índice SPAD foram significativamente maiores na ausência de estresse do que na presença de 10% PEG (Tabela 2). Os resultados indicaram que as plântulas de milho inoculadas e submetidas ao estresse com PEG tiveram maior redução da superfície de raízes finas e aumento das raízes mais grossas, o que resultou no maior peso seco de raiz em comparação ao controle. Esse remodelamento do sistema radicular foi responsável por uma menor perda do peso seco total das plantas inoculadas quando comparadas ao controle não inoculado. As BPCPs podem intensificar sua atividade nas membranas celulares das plantas e estimular alterações na parede celular das raízes. Plantas de *Arabidopsis* na ausência de estresse hídrico, expostas aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *Bacillus subtilis* GB03, aumentaram seu crescimento, por causa da ação moduladora dos COVs na expressão de genes envolvidos com a expansão e o relaxamento da parede celular (Dimkpa et al., 2009; Zhang et al., 2007).

A inoculação das plântulas de milho com as cepas B116 e B119 sob déficit hídrico, permitiu maior tolerância aos efeitos negativos do estresse para a área de superfície radicular total, área de superfície de raízes com diâmetro entre 1-2 mm ( $\text{cm}^2$ ) (AS2), volume total de raízes ( $\text{cm}^3$ ), volume de raízes entre 1-2 mm ( $\text{cm}^3$ ) (V2), peso seco de parte aérea e total (g) e índice SPAD, pois não mostraram diferenças significativas em relação ao controle.

**Tabela 2. Médias das características morfofisiológicas de plântulas de milho inoculadas com as cepas B116 e B119 com e sem o estresse com 10% PEG.**

		Não inoculado	B116	B119
AS (cm <sup>2</sup> )	sem peg	164,88Aa	147,03Aa	157,12Aa
	com peg	155,94Aa	144,19Aa	147,90Aa
AS1 (cm <sup>2</sup> )	sem peg	58,70Aa	59,51Aa	67,89Aa
	com peg	61,73Aa	51,70Bb	55,75ABb
AS2 (cm <sup>2</sup> )	sem peg	73,94Aa	54,29Aa	55,27Aa
	com peg	64,09Aa	59,36Aa	55,85Aa
AS3 (cm <sup>2</sup> )	sem peg	16,60Aa	17,11Aa	17,58Aa
	com peg	13,24Bb	17,40Aa	19,16Aa
V (cm <sup>3</sup> )	sem peg	4,22Aa	3,63Aa	3,79Aa
	com peg	3,81Aa	3,68Aa	3,75Aa
V1 (cm <sup>3</sup> )	sem peg	0,96Ba	0,97Ba	1,12Aa
	com peg	1,02Aa	0,85Ba	0,91ABb
V2 (cm <sup>3</sup> )	sem peg	2,76Aa	1,98Aa	1,97Aa
	com peg	2,31Aa	2,15Aa	2,06Aa
V3 (cm <sup>3</sup> )	sem peg	1,57Aa	1,79Aa	2,14Aa
	com peg	1,29Ba	1,70ABa	2,11Aa
PSPA (g)	sem peg	0,253Aa	0,203Ba	0,233ABa
	com peg	0,183Ab	0,177Aa	0,190Ab
PSR (g)	sem peg	0,040Aa	0,047Aa	0,050Aa
	com peg	0,033Ba	0,053Aa	0,057Aa
PST (g)	sem peg	0,293Aa	0,250Aa	0,280Aa
	com peg	0,217Ab	0,227Aa	0,247Aa
ÍNDICE SPAD	sem peg	32,92Aa	33,64Aa	33,09Aa
	com peg	30,89Ab	31,55Ab	32,09Aa

Legenda: Área de superfície radicular total (AS) (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 e 1,0 mm (AS1) (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes com diâmetro entre 1,0 e 2,0 mm (AS2) (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes com diâmetro maior que 2 mm (AS3) (cm<sup>2</sup>), volume total de raízes (V) (cm<sup>3</sup>), volume de raízes com diâmetro entre 0 e 1,0 mm (V1) (cm<sup>3</sup>), volume de raízes com diâmetro entre 1,0 e 2,0 mm (V2) (cm<sup>3</sup>), volume de raízes com diâmetro maior que 2 mm (V3) (cm<sup>3</sup>), peso seco de parte aérea (PSPA) (g), peso seco de raiz (PSR) (g), peso seco total (g). As médias seguidas pelas mesmas letras indicam que os tratamentos não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p <0,05). As letras maiúsculas indicam a comparação entre as cepas e as minúsculas a comparação entre o tratamento com e sem PEG.

## Conclusão

A seca é um dos estresses abióticos mais limitantes para a produtividade agrícola, e a utilização de bactérias promotoras de crescimento pode ser uma alternativa sustentável promissora para minimizar os efeitos desse tipo de estresse. Neste trabalho, plântulas de milho inoculadas com as cepas B116 e B119 e submetidas ao estresse com PEG mostraram maior redução da superfície de raízes finas, aumento das raízes mais grossas, e, subsequentemente, maior peso seco de raiz e menor perda de peso seco total em relação ao controle. Esses resultados indicam que as cepas B116 e B119 são potenciais bioinoculantes de plantas, especialmente sob restrição hídrica, porém, estudos adicionais serão necessários.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Gislene Rodrigues Braga Cristeli, pela ajuda na condução dos experimentos, e à Embrapa e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

## Referências

BASHAN, Y.; DE-BASHAM, L. F.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J.-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1/2, p. 1-33, 2014.

BENEŠOVÁ, M.; HOLÁ, D.; FISCHER, L.; JEDELSKÝ, P. L.; HNILIČKA, F.; WILHELMOVÁ, N.; ROTHOVÁ, O.; KOČOVÁ, M.; PROCHÁZKOVÁ, D.; HONNEROVÁ, J.; FRIDRICHOVÁ, L.; HNILIČKOVÁ, H. The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, e38017, June 2012.

CAVALCANTE, A. C. R.; CAVALLINI, M. C.; LIMA, N. R. C. B. **Estresse por déficit hídrico em plantas forrageiras**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. 50 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 89).

COHEN, A. C.; BOTTINI, R.; PONTIN, M.; BERLI, F. J.; MORENO, D.; BOCCANLANDRO, H.; TRAVAGLIA, C. N.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Plant Physiology**, v. 153, n. 1, p. 79-90, 2015.

CORTÉS, A. J.; MONSERRATE, F. A.; RAMÍREZ-VILLEGAS, J.; MADRIÑÁN, S.; BLAIR, M. W. Drought tolerance in wild plant populations: the case of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, e62898, 2013.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, n. 12, p. 1682-1694, 2009.

IKEDA, M.; MIURA, K.; AYA, K.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Genes offering the potential for designing yield-related traits in rice. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 2, p. 213-220, 2013.

LIU, C.; MUCHHAL, U. S.; UTHAPPA, M.; KONONOWICZ, A. K.; RAGHOTHAMA, K. G. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissue by phosphorus. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 91-99, 1998.

MACHADO, E. C.; FURLANI, P. R. Deficiência hídrica no consumo de água de dois cultivares de milho crescidos em solução nutritiva. **Bragantia**, v. 44, n. 1, p. 493-504, 1985.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 3, p. 326-335, 2006.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1782-1787, 2009.

OLIVEIRA, I. G. de; SOUZA, R. C. de. **Estatística**. Maringá: UniCesumar, 2016. 170 p.

PEZZOPANE, J. R. M.; SANTOS, P. M.; CRUZ, P. G. da; ALTOÉ, J.; RIBEIRO, F. A.; VALLE, C. B. do. Estresse por deficiência hídrica em genótipos de *Brachiaria brizantha*. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 871-876, 2015.

SOUSA, S. M. de; CLARK, R. T.; MENDES, F. F.; OLIVEIRA, A. C. de; VASCONCELOS, M. J. V. de; PARENTONI, S. N.; KOCHIAN, L. V.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 11, p. 925-935, 2012.

SOUSA, S. M. de; PAIVA, C. A. O.; ANDRADE, D. L.; CARVALHO, C. G. de; RIBEIRO, V. P.; PASTINA, M. M.; MARRIEL, I. E.; LANA, U. G. de P.; GOMES, E. A. **Cepas de Bacillus e Azospirillum aumentam o crescimento e a absorção de nutrientes em milho em condições hidropônicas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 31 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 184).

STEUTER, A.; MOZAFAR, A.; GOODIN, J. Water potential of aqueous polyethylenglycol. **Plant Physiology**, v. 67, n. 1, p. 64-67, 1981.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 526 p.

TAMBELINI, M.; PEREZ, S. C. J. G. Efeitos do estresse hídrico simulado com PEG (6000) ou manitol na germinação de sementes de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 1, p. 226-232, jul. 1998.

WAHYUDI, A. T.; ASTUTI, R. P.; WIDYAWATI, A.; MERYANDINI, A.; NAWANGSIH, A. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 10, p. 406-417, 2011.

ZHANG, H.; KIM, M. S.; KRISHNAMACHARI, V.; PAYTON, P.; SUN, Y.; GRIMSON, M.; FARAG, M. A.; RYU, C. M.; ALLEN, R.; MELO, I. S.; PARÉ, P. W. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 226, n. 4, p. 839-851, 2007.