



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**VALÉRIA PEREIRA ALVES**

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E RIZOFÉRICAS  
ISOLADAS DO MILHO (*Zea mays* L.) MANTIDAS EM CONDIÇÕES  
DE DESIDRATAÇÃO**

**PETROLINA-PE**

**2022**

**VALÉRIA PEREIRA ALVES**

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E RIZOFÉRICAS  
ISOLADAS DO MILHO (*Zea mays* L.) MANTIDAS EM CONDIÇÕES  
DE DESIDRATAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale São Francisco - UNIVASF, *Campus* Petrolina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biociências, para obtenção do título de Mestre em Biociência.

**Área de concentração:** Química e Atividade Biológica  
**Orientador:** D.Sc Paulo Ivan Fernandes Júnior

**PETROLINA-PE**

**2022**

Alves, Valéria Pereira  
A474c Caracterização de bactérias endofíticas e rizoféricas isoladas do milho (*zea mays* L.) mantidas em condições de desidratação / Valéria Pereira Alves. – Petrolina - PE, 2022.  
x, 73 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestre em Biociência) Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina-PE, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Paulo Ivan Fernandes Junior.

1. *Zea mays* L. 2. Gramínea tropical. 3. Bactérias endofíticas e rizoféricas. 4. Cultura enérgica. 5. Milho. I. Título. II. Junior, Paulo Ivan Fernandes. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 633.171

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO PROGRAMA DE  
GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**FOLHA DE APROVAÇÃO  
PARA DISSERTAÇÃO**

**VALÉRIA PEREIRA ALVES**

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E RIZOFÉRICAS ISOLADAS  
DO MILHO (*Zea mays* L.) MANTIDAS EM CONDIÇÕES DE DESIDRATAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título Mestre em Biociências, pela à  
Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovado em: 29 de abril de 2022.

**Banca examinadora**



---

Dr. Prof. Paulo Ivan Fernandes Junior - Embrapa Semiárido

(Orientador)



---

Dra. Prof. Lindete Míria Vieira Martins - UNEB

(Examinador Externo)



---

Dr. Prof. Saulo de Tarso Aidar - Embrapa Semiárido

(Examinador Externo)

Ao meu pai, João Alexandrino Alves, *in*  
*memorian*, o grande amor de minha vida,  
dedico.

## **Agradecimentos**

A Deus, pois tudo que ocorre na minha vida perpassa pela Sua misericórdia;

À Nossa Senhora Aparecida pela proteção de seu manto sagrado, minha devoção.

Ao professor Dr Paulo Ivan Fernandes Júnior, pela disponibilidade de seu conhecimento e de seu laboratório, sem o qual não seria possível a realização desse trabalho, muitíssimo obrigada professor;

A minha mãe Maria Amélia, existência de minha existência, minha gratidão e amor;

Às minhas irmãs Patrícia e Ana Paula, dois anjos que Deus colocou em minha vida, minha referência e admiração;

Um agradecimento especial a minha irmã, Ana Paula, que igualmente passando por uma pós-graduação, Doutorado, estava sempre disponível e pronta a me ajudar, obrigada por tudo irmã amada;

Ao meu sobrinho João Elias, durante esta jornada o seu nascimento a tornou muito mais leve e feliz, amor de titia;

Ao certo alguém, assim carinhosamente me refiro a Adailton Conceição, sua voz e companhia foram de profunda valia para enfrentamento desta etapa de minha vida, obrigada meu amor;

Ao meu gato Gaspar, seu ronronar há doze anos me faz uma pessoa muito mais feliz;

Aos meus familiares tia Maria de Jesus, tia Maria da Conceição, tio Severino, meus primos Jerônimo, Inácio e Manoel, uma família pequena, mas inversamente grande é o meu bem querer por vocês, obrigada;

Um agradecimento especial ao meu tio Severino, que sempre ao caminho da Embrapa vinha sua lembrança e a reflexão sobre homens e mulheres pesquisadores que

buscam melhorar a vida do homem do campo como a do senhor, toda minha admiração e afeto;

À minha amiga Simone, reconhecer no outro a si mesmo é sinônimo de afinidade, obrigada por tudo Si;

Ao meu amigo Dr. Arivaldo Ramos suas palavras de incentivo foram essenciais para o enfrentamento dessa jornada, obrigada;

Ao meu amigo Eric Schade, mesmo pelas circunstâncias e distâncias sempre estava disponível para ajudar, obrigada por tudo;

Aos antigos colegas de CRPT de Euclides da Cunha, em nome do Dr. Wesley Lima, a compreensão de vocês do início dessa caminhada foi essencial;

Igualmente agradeço aos novos colegas da CRPT de Senhor do Bonfim, em nome de Dr Caetano Sampaio, a compreensão de vocês ao final dessa jornada foi de grande importância;

Aos colegas de turma do curso de Pós-graduação em Biociência 2019.1, Ana Carla, Danilo Sales, Eduard David, Geovane Damaceno, Raíra Carine e todos os demais, compartilhar essa experiência com todos vocês foi muito gratificante;

Aos meus professores do curso de Pós-graduação em Biociência 2019.1, Dra Edigênia Cavalcante, Dr Paulo Ivan, Dr. Mateus Matiuzzi, Dr. Wagner Pereira, Dr Luciano Augusto e os demais por oportunizaram novos conhecimentos, muito obrigada;

Aos professores Dr Wagner Pereira e Dra Ana Dolores Freitas pela disponibilidade de fazer parte da banca examinadora da Qualificação dessa pesquisa, obrigada;

À professora Dra Lindete Martins e o pesquisador Dr Saulo de Tarso pela disponibilidade de constituírem a banca examinadora na defesa, muito obrigada.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido, Geovane Damaceno, Raíra Carine, Viviane Lima, Iracema Paiva, Joan Carlos, Jonnathan Whiny, Layane Silva, Ítalo e Leandro Reis, o acolhimento, ajuda e conhecimento de todos vocês foram importantíssimo para realização dessa pesquisa, muito obrigada;

Um muitíssimo obrigada mais que especial, a Geovane Damaceno e Raíra Carine colegas desde início dessa caminhada até o a realização dos experimentos na Embrapa estiveram sempre presente, obrigada Geo e Rairinha;

Aos animais de estimação Fiona, Miúda, Rafael e Picolé, o compartilhamento da existência com outros seres vivos torna a vida muito mais significativa;

A Embrapa Semiárido de Petrolina-PE, sem qual não seria possível a realização desse trabalho, desde ao pessoal de Apoio, Técnicos, Analistas e Pesquisadores sempre muito gentis comigo, muitíssimo obrigada;

Ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biociências em nome da coordenadora Dra Xirly Pereira;

À Universidade Federal do Vale de São Francisco, os valiosos serviços prestados à sociedade tornam possíveis os sonhos, assim como o meu.

“Não sou nada.  
Nunca serei nada.  
Não posso querer ser nada.  
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa

## RESUMO

O milho consiste numas das culturas mais importantes e ocupa o primeiro lugar em países com economias em desenvolvimento. Estresse em plantas é uma condição externa que exerce pressão sobre o seu sistema biológico, resultando em redução do crescimento e na produtividade. A seca e a salinidade são dois importantes fatores de estresses abióticos que afetam negativamente o crescimento das plantas e a produtividade nas principais safras no mundo. No entanto, bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB) são capazes de afetar o metabolismo das mesmas por meio de diferentes mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares atenuando seus efeitos. Neste sentido, o referido trabalho teve como objetivo caracterizar estirpes bacterianas isoladas de tecidos vegetais de três genótipos do milho (BR 5036, BR 5037 e BRS 4107) mantidos em condições de desidratação em sílica gel a fim de selecionar aquelas tolerantes ao estresse hídrico. As amostras foram acondicionadas em meios de cultura semissólidos LGI, BMGM e NFb e isoladas as estirpes que formaram biofilme. Em seguida as estirpes bacterianas foram caracterizadas pelas técnicas moleculares PCR-BOX e ARDRA, tolerância aos estresses hídrico (PEG) e salino (NaCl %) *in vitro* e seus efeitos na germinação de sementes do milho através microbiolização. 41 estirpes bacterianas foram obtidas principalmente da rizosfera, pela análise PCR-BOX resultaram 39 estirpes bacterianas distintas entre si, agrupadas em 3 clusters principais pela ARDRA. Em relação aos testes *in vitro* e microbiolização as estirpes bacterianas (3, 5, 8, 12.2, 14, 19, 38 e 40) apresentaram efeitos significativos em condições de estresses hídrico e salino.

Palavras chave: *Zea mays* L.; PGPB; gramínea tropical; sistema C4; cultura enérgica

## ABSTRACT

Maize is one of the most important crops and occupies the first place in developing economies. In this scenario, plant stress is an external condition that exerts pressure on their biological system, resulting in growth and yield reduction. Drought and salinity are two important abiotic stress factors that negatively affect plant growth and yield in the main crops worldwide. However, plant growth-promoting bacteria (PGPB) can affect plant metabolism through different physiological, biochemical, and molecular mechanisms. From this perspective, this study aimed to characterize bacterial strains isolated from plant tissues of three maize genotypes (BR 5036, BR 5037, and BRS 4107) kept under dehydration conditions in silica gel in order to select bacterial strains tolerant to water stress. The samples were kept in the semi-solid culture media LGI, BMGM, and NFb, where those that formed biofilm were isolated in the respective culture media. Subsequently, the bacterial strains were characterized by the molecular techniques PCR-BOX and ARDRA, tolerance to water (PEG 6000) and salt stress *in vitro* (NaCl %), and effects on maize seeds germination through microbiolization. Forty-one bacterial strains were obtained as a result, especially from the rhizosphere, PCR-BOX analysis resulted thirty-nine distinct bacterial strains, and were grouped in three main clusters by ARDRA. With regard to the *in vitro* tests and microbiolization, the bacterial strains (3, 5, 8, 12.2, 14, 19, 38, and 40) showed significant effects under water and salt stress conditions.

Keywords: *Zea mays* L.; PGPB; tropical grass; C4 system; energy crop

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. OBJETIVOS .....	10
2.1 OBJETIVO GERAL .....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	11
3.1 A cultura do milho ( <i>Zea mays</i> L.) .....	11
3.2 Estresse abiótico.....	13
3.2.1 Déficit hídrico/Osmolaridade.....	13
3.2.2 Salinidade .....	15
3.3 Bactérias promotoras de crescimento em plantas .....	16
3.3.1 Bactérias endofíticas.....	17
3.3.2 Bactérias rizosféricas e a rizosfera .....	18
3.4 Caracterização dos isolados por meio de técnicas moleculares.....	19
4. METODOLOGIA.....	20
4.1 Variedades do milho utilizadas e municípios de coleta .....	20
4.1.1 Variedade BRS 4107 .....	20
4.1.2 Variedade BR 5036.....	20
4.1.3 Variedade BR 5037.....	20
4.1.4 Município de Araripina .....	21
4.1.5 Município de Serra Talhada.....	21
4.2 Tratamento das partes vegetais de milho à desidratação.....	21
4.2.1 Reidratação, isolamento e inoculação de bactérias endofíticas e rizosféricas tolerantes à desidratação.....	22
4.3 Estocagem dos isolados bacterianos.....	23
4.4 Análises moleculares das bactérias endofíticas e rizosféricas.....	23
4.4.1 Extração do DNA .....	23
4.4.2 Reações de BOX-PCR .....	24
4.4.3 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) .....	24
4.5 Análise das estirpes bacterianas à tolerância aos estresses abióticos .....	25
4.5.1 Preparação do inóculo bacteriano .....	25
4.5.2 Avaliação da tolerância das estirpes bacterianas ao déficit hídrico e estresse salino.....	25

4.6 Inoculação das sementes do milho em condições de estresse hídrico e salino .....	26
4.6.1 Caracterização da variedade do milho utilizada para a inoculação .....	26
4.6.2 Determinação do potencial hídrico e salino adequados para as sementes de milho .....	27
4.6.3 Inoculação das sementes do milho em condições de estresse hídrico e salino .....	27
4.7 Análise estatística .....	28
5. RESULTADOS .....	28
5.1 Isolamento e inoculação das bactérias endofíticas e rizosféricas tolerantes à desidratação .....	28
5.2 Caracterização molecular .....	30
5.2.1 Análise das reações de BOX-PCR .....	30
5.2.2 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) .....	31
5.3 Caracterização das estirpes bacterianas a tolerância aos estresses abióticos	33
5.4 Avaliação da inoculação nas sementes de milho .....	36
5.4.1 Avaliação da germinação em condição de estresse salino.....	36
5.4.2 Avaliação da germinação em condição de estresse hídrico .....	39
6. DISCUSSÃO .....	42
7. CONCLUSÕES .....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
9. ANEXO.....	62

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea anual, monóica, que apresenta alta taxa de fotossíntese líquida e alta afinidade pelo CO<sub>2</sub>, devido ao seu sistema fotossintético C4, resultando em alto rendimento de grãos e biomassa. No entanto, sua produção agrícola é afetada pelo déficit hídrico, sendo considerada uma cultura com alta necessidade de água, além de ser classificada como uma planta moderadamente sensível ao sal, sendo uma das principais culturas alimentares na maioria dos países onde existem ou podem surgir problemas de seca e salinidade (HU et al, 2007).

É cada vez mais crescente a incidência de estresses abióticos que afetam negativamente o crescimento das plantas e a produtividade nas principais safras no mundo (ETESAMI e MAHESHWARI, 2018). A alta salinidade afeta 20% do total cultivado e 33% das terras agrícolas irrigadas em todo o mundo (SHRIVASTAVA e KUMAR, 2015) e a redução de aproximadamente 40% na disponibilidade de água pode diminuir em 39% os rendimentos na cultura do milho (AMIN et al, 2019).

Estresses abióticos como seca e salinidade estão entre os principais responsáveis pelos danos causados às plantas, o que acarreta prejuízo à produção agrícola em nível mundial. Estes estresses embora possuam características específicas, ambos apresentam como principal consequência a redução da disponibilidade de água. Teores muito baixos de água levam a desequilíbrio osmótico, iônico e oxidativo e na perda da integridade das membranas celulares, alterando as funções metabólicas e fisiológicas nas plantas (TAFRESHI et al, 2021), culminando com a perda da homeostase, acarretando desidratação excessiva e morte das células.

Apesar de desenvolverem estratégias adaptativas próprias para diminuir e se recuperar dos efeitos nocivos dos estresses abióticos, as plantas, sob condições adversas, são ainda mais dependentes de microrganismos, pois, sabe-se que os mesmos colaboram com as plantas por aumentarem suas atividades metabólicas em combate aos fatores ambientais (KAVAMURA et al., 2013). Muitos desses microrganismos encontram-se associados às raízes cooperando intimamente uns com os outros e podem mediar processos fisiológicos importantes, especialmente aquisição de nutrientes e adequação da planta a estresses abióticos (EGAMBERDIEVA et al., 2017).

Por esse mesmo motivo, durante a última década, a inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas surgiu como uma estratégia potencial para

induzir tolerância aos estresses bióticos e abióticos em plantas, considerada, portanto, uma estratégia promissora para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável (BUKHAT et al, 2020), sendo utilizadas como uma ferramenta para aliviar o estresse em diversas culturas em solos afetados pela degradação ambiental (ETESAMI e MAHESHWARI, 2018).

Para o desenvolvimento de inoculantes com PGPB, faz-se necessário a identificação de microrganismos capazes de promover crescimento vegetal em plantas de interesse produtivo. Um método muito utilizado é o BOX-PCR por ser um método rápido e preciso (HUNGRIA et al, 2008) sendo bastante aplicado em estudos de diversidade genética em isolados bacterianos extraídos das diversas partes de plantas, como nódulos de espécies de leguminosas silvestres (CARDOSO et al, 2018), sementes, folhas, raízes e rizosfera do milho (BONFIM et al, 2020) e dos cactos do deserto (*Euphorbia trigonas* Mill) (EKE et al, 2019). Como também sendo utilizado para individualização dos isolados como em Gao et al (2018) que fez uso dessa técnica para distinguir quatro novos isolados bacterianos endofíticos isolados das raízes do milho.

Para os estudos relacionados à promoção da tolerância de microrganismo à seca, o polietilenoglicol (PEG) é comumente utilizado como indutor de déficit hídrico (GARCÍA et al., 2017; CARDOSO et al., 2018; PATHANIA, BHATIA, KHATRI, 2020; TAFRESHI et al., 2021). Já para indução de desidratação, a sílica gel, (um tipo amorfo de SiO<sub>2</sub>) que apresenta uma estrutura muito porosa e extensivamente utilizada com dessecante (GOMES, FURTADO, SOUZA, 2018). Ambas as substâncias são quimicamente inertes, não tóxicas, dimensionalmente estáveis e impermeáveis na célula (MEDEIROS, 2013; GOMES, FURTADO, SOUZA, 2018).

Entretanto, para apresentarem benefícios às plantas com relação à tolerância a estresses abióticos, os microrganismos precisam apresentar mecanismos de sobrevivência sob condições estressantes (CARDOSO et al, 2018). Desta forma, neste estudo, nós desenvolvemos a hipótese de que bactérias capazes de sobreviverem em tecido vegetal sob condição de dessecação têm potencial para apresentarem mecanismos promotores de crescimento de plantas submetidas a estresse hídrico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar estirpes bacterianas isoladas do milho mantidas em condições de desidratação, a fim de selecionar estirpes tolerantes ao estresse abiótico que sejam capazes de promover o crescimento em plantas.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar a variabilidade genética das estirpes bacterianas obtidas de tecidos desidratados do milho;

Testar a tolerância das estirpes bacterianas ao estresse hídrico e estresse salino *in vitro*;

Verificar o efeito das estirpes bacterianas na germinação de semente do milho sob condição de estresse hídrico e salino.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A cultura do milho (*Zea mays* L.)

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta da família das gramíneas, originário da Mesoamérica, foi domesticado há cerca de 9.000 anos a partir de seu parente selvagem teosinto (*Zea mays* sp. *parviglumis*) no México (MARTINEZ-ROMERO et al., 2020). É uma espécie anual, monoica, pertencente ao grupo das plantas C-4 além de apresentar ampla adaptação a diferentes condições ambientais (LOBO, 2018), resultando em alto rendimento de grãos e biomassa (NAVEED et al., 2014).

Hoje em dia é a terceira cultura de cereal mais importante e cultivado em todos os continentes com quase 185 milhões de hectares (ha) de terras cultiváveis em mais de 160 países (MARAG e SUMAN, 2018). Constitui uma cultura básica em todo o mundo devido ao seu alto valor nutricional e econômico, apresentando uma produção mais alta dentre as principais culturas arroz, trigo e soja (SUN et al., 2020).

Compõe um alimento básico direto para milhões de indivíduos, fonte valiosa de energia e proteína na alimentação humana, o milho, também é utilizado na forragem verde, biocombustível, alimentação animal e produção de energia. Assim como é a matéria-prima para a indústria de bebidas alcoólicas, amido, óleo, proteína, farmacêutica, cosmética, têxteis, papel entre outros (MARAG e SUMAN, 2018).

Constitui o principal cereal cultivado no Brasil, numa área superior a 19 mil ha, com produção de 86,7 mil de toneladas no ano 2020/2021, valor reduzido de 15,5% na produção e de 21,1% na produtividade (Kg/ha), em relação ao alcançado na safra 2019/2020. A redução da produção total de milho em relação ao ano anterior foi devido ao atraso das chuvas e menor disponibilidade hídrica durante o desenvolvimento das lavouras e geadas nos principais estados produtores da região Centro-Sul do país (CONAB, 2021).

Na Região Nordeste houve incremento na área plantada de 5% no período de 2020/2021, estimada em cerca de 1,4 mil de hectares. A produção registrou redução de 0,6% em relação ao período anterior, atingindo cerca de 5,9 mil de toneladas. No estado de Pernambuco, o milho na terceira safra é semeado na mesorregião do Agreste, normalmente entre abril e junho. Dada a crescente necessidade do produto na região e à conseqüente valorização do cereal, alguns produtores se organizaram e vêm investindo no amplo emprego de tecnologia nas lavouras, com utilização de

variedades híbridas e mais produtivas, além de plantio, tratos culturais e colheita mecanizada (CONAB, 2021).

A produção de milho é afetada por fatores abióticos e bióticos causando perdas de rendimento de mais de 20% no milho em todo o mundo (SAVARY et al. 2019). Uma redução de aproximadamente 40% na disponibilidade de água pode diminuir o rendimento na cultura do milho em 39% (DARYANTO, WANG, JACINTHE, 2016). Como também sua produção é severamente afetada pelo estresse salino (KRISHNAMOORTHY et al., 2016), tendo o íon  $\text{Na}^+$  como o principal causador de toxicidade relacionada à salinidade na cultura (FORTMEIER e SCHUBERT, 1995).

O milho é classificado como uma planta moderadamente sensível ao sal (FAROOQ et al., 2015) sendo o crescimento e a produção diretamente afetados (BANO e FATIMA, 2009; SHRIVASTAVA e KUMAR, 2015). No entanto, é considerado uma das principais culturas alimentares na maioria dos países onde existem ou podem surgir problemas de seca e salinidade (HU et al., 2007), porém com alta necessidade de irrigação (ABEDINZADEH, ETASAMI, ALIKHANI, 2018).

O milho possui uma diversidade fenotípica excepcional que é influenciada pelo genótipo, no qual, tem o potencial de influenciar o microbioma da rizosfera (WALTERS et al., 2018), além de conter uma ampla variação genética intraespecífica para resistência à salinidade (FAROOQ et al., 2015) e à seca (MAGALHÃES et al, 2002). Além de fatores genéticos, ajuste osmótico e resistência à desidratação das células, dentre outros, são considerados mecanismos que podem contribuir para a resistência do milho à seca (MAGALHÃES et al, 2002).

Fatores como a seca e a salinidade reduzem o potencial hídrico do solo, mecanismos fisiológicos semelhantes, como o déficit hídrico ou o efeito osmótico nas plantas, podem explicar a redução no crescimento das mesmas (HU et al, 2007). Sendo que o déficit hídrico influencia na germinação, crescimento, absorção e transporte de nutrientes, metabolismo do carbono, desenvolvimento de grãos e produção de milho (FAROOQ et al, 2015) e afeta as atividades bioquímicas nas plantas (VURUKONDA et al, 2016).

Como outros vegetais, o milho estabelece associação com bactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPB, sigla em inglês) sejam rizosféricas e/ou endofíticas (MONTAÑEZ et al., 2012) que podem melhorar a tolerância à salinidade (KRISHNAMOORTHY et al., 2016) e estresse hídrico (GARCÍA et al, 2017). Diversos estudos relatam os benefícios das PGPB, aumentando a capacidade

antioxidante, melhorando a nutrição mineral e promovendo o crescimento por síntese bacteriana de hormônios vegetais ou na regulação dos transportadores de íons de  $K^+$  e  $Na^+$  no milho sob estresse salino (SHENG et al., 2011; ROJAS-TAPIAS et al., 2012; ESTRADA et al., 2013; (KRISHNAMOORTHY et al., 2016; MOREIRA et al., 2020).

Pesquisas realizadas com cepas bacterianas endofíticas *Burkholderia phytofirmans* e *Enterobacter* sp. para melhorar a fisiologia e o crescimento do milho sob estresse hídrico (NAVEED et al., 2014), com *Bacillus* sp. (VARDHARAJULA et al., 2011) e *Pseudomonas* sp. (SANDHYA et al., 2010) mostraram efeitos no crescimento, produção de compostos de efeito osmótico e antioxidante no milho sob estresse hídrico.

### **3.2 Estresse abiótico**

Estresse é um termo que corresponde a qualquer fator físico-químico ou ambiental que produz uma tensão prejudicial num organismo vivo (LEVITT, 1980). No caso de organismos sésseis, como as plantas, as condições externas frequentemente exercem pressão sobre o seu sistema biológico, resultando em redução do crescimento e da produtividade (COLLIER, RENQUIST, XIAO, 2017). Prevê-se que o risco causado por estresses abióticos aumente ainda mais por causa de efeitos das mudanças climáticas em curso associadas ao aumento das atividades antrópicas que afetam gravemente a produtividade agrícola (RANI, KUMAR, SUNEJA, 2021).

Secas, inundações, temperaturas extremas, salinidade, aumento da radiação UV, deficiência de nutrientes, altas concentrações de metais pesados, alta intensidade de luz e poluentes são exemplos de fatores de estresses abióticos (AMIN et al., 2019). Seca/estresse osmótico, estresse salino e estresse de temperatura extrema são considerados os estresses abióticos de maior impacto negativo para as safras (RANI, KUMAR, SUNEJA, 2021).

#### **3.2.1 Déficit hídrico/Osmolaridade**

A seca é um fator limitante no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo uma das principais causas da redução da produtividade, levando perdas econômicas na agricultura (ARORA et al., 2020). A resposta e adaptação das plantas a este estresse ambiental tem alto grau de complexidade biológica, que geralmente envolve inúmeras alterações em níveis fisiológicos, bioquímicos, celulares,

moleculares e morfológicos (TAFRESHI et al, 2021). O déficit hídrico causado pela seca reduz o potencial hídrico do solo, causando desidratação celular, inibindo a expansão e divisão celular, resultando em estresse osmótico (KAUSHAL e WANI, 2016), afetando as plantas em todos os níveis de organização de seu sistema (VARDHARAJULA et al., 2011).

Da mesma forma que as plantas sofrem estresse hídrico quando a disponibilidade de água é baixa, as bactérias também podem ser afetadas por este estresse. As variações osmóticas percebidas pelos microrganismos podem impactar no seu crescimento (GARCÍA et al., 2017). Tanto o potencial osmótico baixo resultam em dificuldades para as plantas e os microrganismos captarem água do solo (KUMAR e VERMA, 2018). Dessa maneira, portanto, a seca é um importante fator abiótico que afeta negativamente o crescimento da safra e a produtividade em todo o mundo das espécies vegetais (NAVEED et al., 2014).

Existem semelhanças notáveis entre as bactérias e as plantas em suas respostas celulares ao estresse osmótico, uma vez que, ambos acumulam conjuntos similares citoplasmáticos após a exposição a condições de hiperosmolaridade (CSONKA, 1989). Logo, o efeito osmótico diminui a energia da água no citosol, o que induz a resposta de aumento da concentração intracelular de sais, entre outros componentes de efeitos osmóticos para evitar a perda de água para o meio (ALLAKHVERDIEV et al., 2000).

No entanto, na rizosfera e nas raízes das plantas são encontradas as PGPB adaptadas a condições adversas que podem proteger as mesmas dos efeitos negativos do estresse hídrico, aumentando assim a produtividade das culturas em áreas áridas ou semiáridas (NAVEED et al., 2014). A exemplo de lavanda (MARULANDA et al., 2007), cana-de-açúcar (MOUTIA et al., 2010), feijão mungu verde (*Vigna radiata*) (SARAVANAKUMAR et al., 2011), trigo (KASIM et al., 2013) e tomate (PATHANIA, BHATIA, KHATRI, 2020).

Os vários efeitos benéficos das PGPB para a tolerância das plantas à seca podem estar relacionados ao aumento da produção de fitohormônios, alteração na morfologia da raiz, componentes de efeito osmótico e emissão de compostos orgânicos voláteis (CARDOSO et al., 2018; VURUKONDA et al., 2016; FINCHEIRA et al., 2016; GARNICA-VERGARA et al., 2015; GUTIÉRREZ-LUNA et al., 2010).

Ademais, sob estresse hídrico, as células bacterianas acumulam solutos compatíveis, como aminoácidos, aminas quaternárias e açúcares que previnem

processos degenerativos e melhoram o crescimento celular em condições osmóticas adversas (POTTS, 1994). Vale destacar a existência de estudos com microrganismos *in vitro*, com intuito de caracterizar cepas de *Azospirillum* sp. (GARCÍA et al., 2017), e rizobactérias isoladas de três cactos brasileiros (KAVAMURA et al., 2013), a fim de selecionar estirpes resistentes ao estresse osmótico e avaliar seus desempenhos no aumento da tolerância do milho ao estresse hídrico.

### 3.2.2 Salinidade

A salinidade é um componente natural presente em ecossistema de regiões áridas e semiáridas podendo ser potencializada por atividades antropogênicas, como irrigação excessiva associadas à problemas de drenagem (ETESAMI e GLICK, 2020). A salinização do solo é comum no Semiárido brasileiro (MOREIRA, TEIXEIRA, GALVÃO, 2014) que enfrenta sérios problemas com o avanço deste processo, definido como um acúmulo de sais solúveis na camada agrícola do solo (PEDROTTI et al., 2015). Quantidades excessivas de  $\text{Na}^+$  no solo são a principal causa de danos às plantas e restringem a restauração da vegetação em regiões áridas e semiáridas (ZHANG, FENG, DECLERCK, 2018).

A salinidade do solo constitui uma séria restrição sobre a produtividade das culturas em nível mundial (ARORA et al., 2020), sendo um dos estresses ambientais de mais difícil reversão em todo o mundo, que transforma terras agronomicamente úteis em áreas improdutivas numa taxa de cerca de 1–2% a cada ano nas zonas áridas e semiáridas (ETESAMI e MAHESHWARI, 2018). O acúmulo de sal no solo apresenta impactos negativos sobre os processos biogeoquímicos do solo, alterando o pH, taxa de decomposição, composição de nutrientes, biodiversidade microbiana e disponibilidade de água, uma vez que diminui sua disponibilidade em função de potencial osmótico mais negativo além de desbalancear o equilíbrio iônico das células vegetais (ARORA e MISHRA, 2016).

O estresse osmótico ocorre imediatamente após a exposição à salinidade devido à criação de condições hipertônicas fora da célula, enquanto o estresse iônico surge após vários dias de exposição como resultado do acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  dentro da célula (VAISHNAV et al., 2019), sendo considerada uma forma de seca fisiológica, devido ao maior acúmulo de sais nas folhas, causando toxicidade iônica em plantas, induzindo a senescência foliar (KAUSHAL e WANI, 2016).

O estresse osmótico e a toxicidade iônica resultam em estresse oxidativo (ABBAS et al., 2019), caracterizado pelo aumento acúmulo de várias espécies reativas de oxigênio (ROS) (BONATELLI et al., 2020). Desse modo, alta concentração de sais em solos causa estresse osmótico, iônico, oxidativo nas plantas que inibem o seu crescimento (ARORA et al., 2020). O processo de degradação de solos causado pelo alto teor de sais dificulta o desenvolvimento da maioria das plantas por pressão osmótica, problemas de intoxicação e degradação das propriedades físicas do solo, implicando em perda de fertilidade (CASTRO, ARAÚJO, SANTOS, 2019).

No entanto, muitas plantas que vivem em habitats salinos desenvolveram diversas adaptações que conferem tolerância à salinidade (KOMARESOFLA et al., 2019), dentre elas: acúmulo de solutos compatíveis, como açúcares solúveis, que afetam a absorção de água e as vias fisiológicas associadas; partição e compartimentação de íons de sal em vacúolos; e regulação positiva do sistema de defesa antioxidante para a rápida remoção de ROS tóxicas (GUO, et al., 2021).

Além do próprio mecanismo de defesa ao estresse salino desenvolvido pelas plantas, existem microrganismos no solo que as auxiliam diretamente e indiretamente as plantas, promovendo seu crescimento, aumentando a tolerância ao estresse e mediando os padrões locais de ciclagem de nutrientes (DUBEY et al., 2019). Neste sentido, PGPB halotolerantes podem aliviar o estresse e melhorar a produtividade das culturas em solos afetados por salinidade (MOREIRA et al., 2020).

Etesami e Glick (2020) destacam entre os gêneros de bactérias halotolerantes relatados na maioria das plantas halofíticas as *Halomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Oceanobacillus* e *Pseudomonas*. Alguns estudos foram realizados com bactérias endofíticas analisando sua eficiência na promoção do crescimento em plantas sob estresse salino, a exemplo de *Sphingomonas zeicaulis* e *Sphingomonas prati* em *Suaeda salsa* (GUO et al., 2021), *Bacillus* em tomate (EKE et al., 2019), cepas SYSU 333322 *Arthrobacter endophyticus* e SYSU 333140 *Nacordiopsis alba* em *Arabidopsis thaliana* (DONG et al., 2019).

### **3.3 Bactérias promotoras de crescimento em plantas**

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB) são principalmente microrganismos não patogênicos que exercem benefícios diretos e indiretos nas plantas (BUKHAT et al, 2020) e podem ser classificadas em dois tipos principais,

nomeadamente bactérias promotoras do crescimento vegetal extracelular (ePGPB) e bactérias promotoras do crescimento vegetal intracelular (iPGPB) (GOUDA, et al 2018).

As PGPB podem estar presentes na rizosfera, rizoplane e no solo, as ePGPB, enquanto as que habitam os tecidos das plantas (endosfera), as iPGPB. Podendo ser classificadas como rizosféricas, endofíticas ou de vida livre e apesar dos diferentes nichos ecológicos os mesmos mecanismos para promover o crescimento das plantas podem ser utilizados (LOBO, 2018). As PGPB também podem ajudar as plantas a tolerar estresses abióticos como sal, seca, excesso ou deficiência de nutrientes (BUKHAT et al., 2020).

As PGPB são capazes de afetar o metabolismo das plantas por meio de diferentes mecanismos moleculares, bioquímicos, interferência nos hormônios vegetais e nos produtos químicos orgânicos voláteis para a promoção do crescimento nas plantas. Entre os mecanismos mais estudados estão a fixação biológica e metabolismo do nitrogênio, solubilização de fósforo, produção de sideróforo, biossíntese de fitohormônios, interferência com o sensor de quórum, produção de compostos antimicrobianos e resistência sistêmica induzida (BULGARELI et al., 2013).

Para a melhoria das plantas quanto à tolerância aos estresses ambientais, alguns estudos apontam os gêneros *Rhizobium* e *Pseudomonas* (BANO e FATIMA, 2009), *Sphingobacterium*, *Achromobacter* e *Ralstonia* (MARQUES et al., 2010), *Azotobacter* (ROJAS-TAPIAS et al., 2012), sob estresse salino. Sob estresse hídrico, já foi relatada a eficiência de *Pseudomonas* (SANDHYA et al., 2010), *Bacillus* e *Azospirillum* (KASIM et al., 2013), *Bacillus* (VARDHARAJULA et al., 2011) e *Azospirillum* (GARCÍA et al., 2017).

### **3.3.1 Bactérias endofíticas**

Bactérias endofíticas são microrganismos que colonizam o tecido interno (os espaços intercelulares) das plantas sem indicar qualquer influência negativa em seu hospedeiro (MONTÁÑEZ et al, 2012; ABEDINZADEH, ETESAMI, ALIKHANI, 2018). Endófitos bacterianos são aquelas bactérias que podem ser isoladas de tecido vegetal desinfestado de superfície ou extraídas de dentro da planta, e que não as prejudiquem

interagindo assintomática entre si e com a planta hospedeira (OVERBEEK e SAIKKONEN, 2016).

Para Abedinzadeh, Etesami, Alikhani (2018) a grande diversidade de bactérias endofíticas constitui um potencial biotecnológico notável, devido seu contato mais íntimo com os tecidos vegetais e exclusão da competição com os microrganismos da rizosfera. Podendo no futuro, serem ainda mais importantes do que as bactérias rizosféricas (NAVEED et al, 2014).

Bonatelli e colaboradores (2021) abordam em seus estudos, o potencial das regiões semiáridas e sazonalmente secas dos biomas brasileiros como fonte de bactérias capazes de promover o crescimento de plantas sob estresse hídrico. Santana et al (2020) utilizaram bactérias endofíticas (*Enterobacter* sp., *Bacilo* sp. e *Rhizobium* sp.) e (*Bacilo* sp. e *Agrobacterium* sp.) isoladas de Caatinga preservada, hiperxerófila e de pastagens de sequeiro, ambas localizadas no estado de Pernambuco, nordeste do brasileiro, para avaliar seus efeitos no *Sorghum bicolor* sob condição de estresse hídrico.

### **3.3.2 Bactérias rizosféricas e a rizosfera**

A rizosfera é definida como uma região do solo influenciada por exsudatos e secreções radiculares onde habita comunidades microbianas (SANTOS e OLIVARES, 2021). De modo geral, a rizosfera é uma zona fina do solo ligada às raízes das plantas, onde ocorrem complexas interações planta-microrganismos (FAN et al., 2017). Bactérias rizosféricas são aquelas que habitam a rizosfera e facilitam o crescimento de plantas por meio de mecanismos diretos e indiretos (GLICK, 2014).

Milhares de bactérias podem habitar a rizosfera, formando uma comunidade complexa que facilita o crescimento e a produtividade das plantas (LIU, SIKORA, PARK, 2020). Estas bactérias também capazes de induzir a tolerância sistêmica induzida (IST), sigla em inglês, em relação a vários estresses abióticos, incluindo seca e salinidade do solo (VURUKONDA et al., 2016).

A maioria desses microrganismos se estabelecem em nichos ricos em nutrientes, como em locais onde as raízes laterais emergem, zonas de pelos radiculares e junções entre as células epidérmicas da raiz (BULGARELLI, et al., 2013). A exsudação das raízes é essencial no recrutamento e modulação do microbioma da

rizosfera, associada a outros fatores bióticos e abióticos que podem também afetar estas comunidades (SANTOS e OLIVARES, 2021).

### **3.4 Caracterização dos isolados por meio de técnicas moleculares**

A caracterização genotípica de bactérias associadas a tecidos vegetais é uma ferramenta útil na identificação dos isolados bacterianos. Os cromossomos bacterianos é constituído de várias sequências repetitivas intercaladas que ocupam regiões intergênicas em locais dispersos por todo o genoma (VERSALOVIC e LUPSKI, 1997). Esses blocos de sequências repetitivas não codificantes podem servir como alvos genéticos múltiplos para sondas oligonucleotídicas, permitindo a geração de perfis de DNA únicos ou “fingerprinting” (impressões digitais) mediadas por reação em cadeia de polimerase (PCR-Polymerase Chain Reaction) (VERSALOVIC, et al, 1994).

Os métodos de fingerprinting são bastante usados para eliminar isolados que possuem o mesmo perfil genético (HUNGRIA et al., 2008), sendo considerados clones. Para obtenção do perfil genético das PGPB o mais recomendado é o BOX-PCR (HUNGRIA e SILVA, 2011). É constituído por três subunidades (boxA, boxB e boxC), sendo que a subunidade boxA é a mais conservada nas espécies bacterianas e resultam num maior número de bandas (VERSALOVIC e LUPSKI, 1997).

Outra técnica utilizada em estudos de diversidade é a ARDRA (análise de restrição do rDNA amplificado) que amplifica o gene ribossômico ou mesmo regiões intergênicas ribossômicas e gera um perfil genético que, com auxílio da bioinformática, traz informações a partir dos dados obtidos (PRIYA, ANEESH, HARIKRISHNAN, 2021). É frequentemente usada para analisar a diversidade bacteriana em diferentes ambientes (TOMER, SUYAL, GOEL, 2016). O gene 16S RNA ribossômico comumente utilizado, por exemplo, foi utilizado para caracterização de isolados da comunidade bacteriana da planta de milho cultivadas em diversas regiões do México (ESTRADA-DE LOS SANTOS, BUSTILLOS-CRISTALES, CABALLERO-MELLADO, 2001) em estudos de associação de diferentes cultivares do milho (MONTEÑAZ, et al, 2012), em diferentes estágio de desenvolvimento de dois genótipos do milho (MARAG e SUMAN, 2018) e diferentes compartimentos do tecido vegetal do milho (BOMFIM et al, 2020).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Variedades do milho utilizadas e municípios de coleta**

Foram utilizadas para realização desta pesquisa 03 variedades do milho (*Zea mays* L.), BRS 4107, BR 5036 e BR 5037 cultivadas nos municípios de Araripina e Serra Talhada, situados no Sertão de Pernambuco, nordeste do Brasil no ano de 2019.

#### **4.1.1 Variedade BRS 4107**

Variedade obtida pela Empresa brasileira de Pesquisa e Agropecuária-Embrapa Amazônia Ocidental, no estado da Amazonas. Possui polinização aberta, tolerância às principais doenças do milho e adaptabilidade produtiva para o Amazonas. Apresenta como características agronômicas ciclo precoce normal, florescimento masculino de 56 dias e feminino de 59 dias, altura da planta de 213 cm, altura da espiga de 107 cm, tipo do grão semidentado, cor do grão amarelo alaranjado, grau de empalhamento alto, acamamento e quebramento de boa resistência (OLIVEIRA et al., 2020).

#### **4.1.2 Variedade BR 5036**

Variedade obtida no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, da Embrapa, e desenvolvida pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA para região da Chapada do Araripe que abrange os estados de Pernambuco, Paraíba e Ceará, nordeste do Brasil. Apresenta boa produtividade em solos ácidos e como características agronômicas possui altura média da planta de 230 cm, altura média da espiga de 125 cm, florescimento de 65 dias, produtividade média da lavoura de 2.300 Kg/ha, tipo do grão meio dente, cor do grão amarela, peso médio de 100 sementes de 32g (EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 1990).

#### **4.1.3 Variedade BR 5037**

Variedade desenvolvida pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte-EMPARN em parceria com a Embrapa Milho e Sorgo. Possui ciclo super precoce e revela bom comportamento produtivo para regiões mais secas do nordeste brasileiro. Constitui como características agrônômicas altura média da planta de 210 cm, altura média da espiga 105 cm, comprimento médio da espiga 18 cm, empalhamento de espiga muito boa, resistência muito boa, cor do grão alaranjado, tipo do grão semidentado, produtividade média 3.500 Kg/ha, potencial de produtividade 5.000 kg/ha (CARVALHO et al., 1999; CARDOSO et al., 1997).

#### **4.1.4 Município de Araripina**

Araripina é um município do estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. Localiza-se na tríplice divisa, Pernambuco-Piauí-Ceará a uma latitude 7°34'34" sul e a longitude 40°29'54" oeste, altitude 639 m. O município está incluído na área geográfica de abrangência do semiárido brasileiro, definida pelo Ministério Nacional em 2005. Compreende a Mesorregião Chapada do Araripe, constituída pelo bioma Caatinga, precipitação pluviométrica de 719 mm/ano e temperatura média anual de 23,7 °C (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2022).

#### **4.1.5 Município de Serra Talhada**

Serra Talhada é um município do estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. Localiza-se a 7°59'9" sul e 38°17'45" oeste, altitude 492 m. É o segundo município mais importante do sertão de Pernambuco e o principal da Mesorregião do Sertão de Pernambuco. Possui clima semiárido, bioma Caatinga, precipitação pluviométrica 686 mm/ano e temperatura média anual de 25 °C (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2022).

## **4.2 Tratamento das partes vegetais de milho à desidratação**

Foram utilizadas pequenas quantidades de tecidos das folhas, de caules e de raízes de cada variedade de milho (BRS 4107, BR 5036 e BR 5037) foram armazenados em frascos contendo sílica gel por um período de 18 meses.

#### **4.2.1 Reidratação, isolamento e inoculação de bactérias endofíticas e rizosféricas tolerantes à desidratação**

Passado o período de armazenamento em sílica gel, os tecidos de folhas, de caules e de raízes, foram reidratados, deixando-os por uma hora em água destilada esterilizada.

Em seguida foi realizada a desinfestação das amostras com álcool 96° GL por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos, seguido de 10 lavagens sucessivas com água destilada esterilizada. Para as estirpes bacterianas da rizosfera, as amostras de raízes e resíduos de solo nela aderidos foram colocados em água destilada esterilizada por um período de 10 minutos e a água residual foi utilizada como inóculo rizosférico.

Para a realização dos isolamentos, cultivos e estocagem das bactérias foram utilizados os seguintes meios de cultura, a saber:

Meio de cultura NFb composto por: 5,0 g de ácido málico; 0,5 g  $K_2HPO_4$ ; 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g de NaCl; 0,02 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,015 g de  $FeSO_4$ ; 4,5 g de KOH; 2 mL de azul de bromotimol (0,5% em 0,2N de KOH); 1,0 mL de vitamina para meio de cultura; 2,0 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura; e 1,0 L de  $H_2O$  destilada, pH 6,5 ajustado com HCl 10% ou NaOH 10% (DÖBEREINER, ANDRADE, BALDANI, 1999), acrescido de 0,05 g de extrato de levedura e autoclavado a 121 °C por 15 minutos;

O meio de cultura LGI constituído por: 5,0 g de sacarose; 0,2 g de  $K_2HPO_4$ ; 0,6 g de  $KH_2PO_4$ ; 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,02 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,002 g de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ; 0,015 g de  $FeSO_4 \cdot 6H_2O$ ; 5,0 mL de azul de bromotimol (0,5% em 0,2N de KOH); 1 mL de vitamina para meio de cultura; e 1,0 L de  $H_2O$  destilada, pH 6,0 ajustado com HCl 10% ou NaOH 10% (DÖBEREINER, ANDRADE, BALDANI, 1999) acrescido de 0,05 g de extrato de levedura e meio autoclavado a 121 °C por 15 minutos;

Meio de cultura BMGM formado por: 1,0 g de glicose; 2,0 de ácido málico; 1,0 g de manitol; 0,4 g de  $K_2HPO_4$ ; 0,4 g de  $KH_2PO_4$ ; 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,02 g de  $CaCl_2$ ; 0,002 g de  $NaMoO_4$ ; 0,01 g de  $FeSO_4$  1,0 L de  $H_2O$  destilada, pH 6,0 ajustado com KOH (ESTRADA-DE LOS SANTOS, BUSTILLOS-CRISTALES, CABALLERO-MELLADO, 2001) acrescido de 0,02g de extrato de levedura e autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Depois da desinfestação os tecidos vegetais de folhas, de caules, de raízes e 15  $\mu$ L de inóculo rizosférico, quando se tratando da rizosfera, foram cultivados em meios semissólidos BMGM, NFB e LGI em frascos de penicilina e mantidos a temperatura ambiente até a formação de película.

Após o período de cultivo dos tecidos vegetais/rizosfera e o surgimento de película, foram retiradas partes dessas películas das amostras que as constituíam e cultivadas em novos frascos de penicilina com meios semissólidos correspondentes aos anteriores (BMGM, LGI e NFB) e incubadas à temperatura ambiente até o surgimento de película. Por fim, partes dessa nova formação de película foram cultivadas em placa de petri com seus respectivos meios e incubadas à temperatura ambiente até o surgimento de colônias, onde sucessivas repicagens foram realizadas até o surgimento das colônias puras, e armazenadas a -10 °C para manipulações futuras.

### **4.3 Estocagem dos isolados bacterianos**

Para a estocagem das estirpes bacterianas, primeiramente foram colocados para crescer em meio líquido correspondentes aos meios que foram isolados como descrito acima. Após o crescimento, 1 mL do caldo de cultivo foi colocado em tubos tipo Eppendorf, e centrifugados em 6000 x *g* por 4 minutos. Descartou-se o sobrenadante e, em seguida, adicionou-se 1 mL do meio correspondente ao cultivo acrescido de glicerol (25%), logo depois homogeneizado em vórtex e armazenado à temperatura -80 °C.

### **4.4 Análises moleculares das bactérias endofíticas e rizosféricas**

#### **4.4.1 Extração do DNA**

Para a extração do DNA, as bactérias foram cultivadas nos meios líquidos BMGM, LGI e NFB, a depender do isolados bacterianos, e mantidas por 72h ou até seu crescimento em mesa agitadora a 100 rpm. Após o período de crescimento, o DNA foi extraído utilizando o kit de extração de DNA genômico Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega), seguindo as instruções do fabricante, com algumas adaptações. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C para manipulações futuras.

#### 4.4.2 Reações de BOX-PCR

A variabilidade genética das estirpes bacterianas foi avaliada a partir da análise do “fingerprinting” molecular, no qual o DNA dos isolados bacterianos foram submetidos à amplificação pela técnica de PCR, utilizando o “primer” BoxA (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGAC-3').

Para a Box-PCR o mix foi preparado utilizando Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 3,0mM, dNTP 1,5mM, 1,0µM do iniciador BOX A e 0,25U Taq DNA polimerase, 2µL de DNA e o volume completado para 20 uL com água ultrapura autoclavada.

As condições de amplificação foram de desnaturação inicial a 95 °C por 6 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento 52°C por 1 minuto e de extensão 72 °C por 2 minutos e 30 segundos e 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos, no aparelho termociclador.

Os produtos da amplificação foram corados com corante de carregamento azul de bromofenol, submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0%, por 3 horas, a 90 V. Em seguida foi visualizado em transiluminador sob luz UV e fotografado. Por fim, os perfis registrados foram avaliados no programa BioNumerics 7.6.

Dessa forma, o grupo das estirpes bacterianas com os genótipos idênticos foram identificados, onde isolados bacterianos que apresentaram padrões de impressões digitais iguais foram descartados e apenas um representante de cada padrão prosseguiu para as análises seguintes.

#### 4.4.3 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

Para a realização do ARDRA foi amplificado o gene 16S rRNA, região de alta conservação nas bactérias de maneira geral, utilizando os iniciadores universais Y1 (TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC) e Y3 (TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC), (YOUNG et al., 1991). Nas reações de amplificação o mix foi preparado com Buffer 1X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP 0,5 mM, 0,20 µM dos iniciadores e 1,0 U Taq DNA polimerase, 3,0 µL de DNA e o volume completado para 30 uL com água ultrapura autoclavada. As condições da reação utilizadas foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento 60°C por 45 seg e de extensão 72 °C por 2 min e 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 5 minutos. O tamanho dos fragmentos foi determinado

utilizando o marcador molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). O produto da amplificação foi digerido utilizando as endonucleases: Hinf I e HhaI. O volume das reações de restrição foi de 10 µL, contendo: 5 µL da reação de PCR e 5 µL do mix das endonucleases. Cada enzima foi preparada adotando-se as recomendações do fabricante. As soluções contendo o DNA e a endonuclease HhaI foram mantidas em estufa tipo BOD a uma temperatura de 37°C e deixadas “overnight”. Enquanto para endonuclease Hinf e as soluções contendo o DNA foram mantidas em banho-maria a temperatura 37 °C por 4 horas.

Os produtos foram corados e submetidos à eletroforese e em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X a 90 V por 3 horas. As imagens dos géis foram analisadas com auxílio do programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica). Foi construído um dendrograma de similaridade, utilizando o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA.

Não foram inclusas nesta metodologia as estirpes bacterianas 21, 26 e 31 devido à dificuldade de amplificação nas reações de PCR.

## **4.5 Análise das estirpes bacterianas à tolerância aos estresses abióticos**

### **4.5.1 Preparação do inóculo bacteriano**

As estirpes bacterianas foram cultivadas em tubos de ensaios com 5 mL dos meios líquidos BMGM, LGI e NFB, a depender do isolado, sob agitação a 100 rpm a temperatura ambiente até o crescimento dos isolados. Após o período de crescimento, 2 mL de cada meio foram transferidos para tubos de 2 mL esterilizado e centrifugado a 10 000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao *pellet* 2 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) ressuspenso por agitação mecânica em vórtex. A densidade optica (DO) da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro à absorbância de 540nm ( $DO_{540} = \frac{1}{n}$  isolados) para uma concentração do menor valor encontrado dentre os meios cultivados. Por fim, foi utilizado como inóculo para todos os testes seguintes.

### **4.5.2 Avaliação da tolerância das estirpes bacterianas ao déficit hídrico e estresse salino**

As estirpes bacterianas foram testadas quanto à sua tolerância a duas condições de estresses abióticos *in vitro*. Todos os testes foram realizados em três repetições em uma microplaca de ELISA de 96 poços e os dados foram representados como valores médios das repetições (PATHANIA, BHATIA, KHATRI, 2020).

Um tratamento com inoculação e sem aditivos indutores de estresse abiótico foi utilizado como controle. Três repetições dos meios não inoculados contendo diferentes quantidades de aditivos indutores de estresse também foram utilizados como base para determinar a DO destes meios.

Foram utilizados 180 µL de meio com diferentes concentrações de aditivos indutores de estresse abiótico e inoculado com 5 µL do inóculo. A placa de microtitulação foi mantida à temperatura ambiente durante 72 horas. A taxa de crescimento dos isolados foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm e a taxa de crescimento de cada isolado em diferentes níveis de estresse foi calculada comparando com a quantidade de crescimento dos mesmos isolados com o controle.

Para analisar a tolerância dos isolados ao estresse hídrico, foi testado seu potencial de crescimento em meio com diferentes concentrações de polietilenoglicol (PEG-6000) (50,080g, 78,490g, 100,701g, 119,571g, 136,268g e 151,402g por 1 litro de H<sub>2</sub>O), o que criou diferentes potenciais osmótico dos meios de -0,05, -0,10, -0,15, -0,20, -0,25 e -0,30 MPa respectivamente, considerando a temperatura de 25 ° C, de acordo com Villela, Filho, Sequeira (1999).

Para o teste de tolerância ao NaCl diferentes concentrações foram (0,5, 1, 2, 3 e 5% p/v) acrescentados no meio de cultivo.

## **4.6 Inoculação das sementes do milho em condições de estresse hídrico e salino**

### **4.6.1 Caracterização da variedade do milho utilizada para a inoculação**

Para realização da microbiolização em condição de estresse abiótico foram utilizadas as sementes da variedade BRS Gorutuba, desenvolvida em conjunto com a Embrapa Tabuleiro Costeiros e a Embrapa Milho e Sorgo. Esta variedade apresenta polinização aberta e super precoce (florescimento masculino seis a sete dias antes das variedades precoces), sendo portanto, considerada adaptada ao curto período de chuvas do semiárido nordestino. Como características agrônômicas possui florescimento masculino de 50 dias e feminino de 53 dias, altura média da planta

baixa, em torno de 180 a 2,00 cm, altura média da espiga é baixa de 80 a 100 cm, textura dos grãos dura, cor dos grãos amarela alaranjada, peso médio de 1000 sementes igual a 252g (CARVALHO, GAMA, PACHEGO, 2010).

#### **4.6.2 Determinação do potencial hídrico e salino adequados para as sementes de milho**

Foi realizado um ensaio preliminar para determinar os efeitos das concentrações de NaCl e polietilenoglicol (PEG-6000) sobre a germinação das sementes de milho utilizadas. Em placas de petri foi vertida a solução de ágar-água contendo aditivos indutores de estresse em diferentes concentrações de NaCl (0,5, 1, 2, 3 e 5% p/v) e polietilenoglicol (PEG-6000) (-0,05, -0,10, -0,15, -0,20, -0,25 e -0,30 MPa) adicionados independentemente, foram colocadas 10 sementes previamente desinfestadas, incubadas a temperatura ambiente e mantidas no escuro por 7 dias para avaliação da germinação.

As placas de petri com ágar-água sem aditivos indutores de estresse foram estabelecidas como controle. Foram utilizadas 3 repetições para cada tratamento. Após o período de 7 dias de incubação, de acordo com a quantidade de sementes que germinaram e o comprimento da raiz principal ficou estabelecido que o tratamento na concentração de 1,0% de NaCl e potencial osmótico de -0,20 MPa como parâmetros adequados para posterior teste de inoculação da sementes do miho.

#### **4.6.3 Inoculação das sementes do milho em condições de estresse hídrico e salino**

Foram utilizadas 39 estirpes bacterianas obtidas para avaliar o efeito na germinação das sementes de milho submetidas a estresse abiótico, As mesmas foram crescidas em seus respectivos meios de cultivo BMGM, LGI e NFb. Depois de verificado o crescimento, foi preparado o inóculo, já descrito anteriormente. As sementes foram sanitizadas utilizando álcool 96° GL por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos, seguidos de 10 lavagens sucessivas com água destilada esterilizada.

A inoculação foi feita por microbiolização por meio da imersão por 15 minutos das sementes nos caldos de cultivo ajustados para  $DO_{540}=0,2$ . Além da imersão das

sementes em inóculo preparado com uma bactéria de referência *Azospirillum brasilense* AbV5 (HUNGRIA et al., 2010). As sementes inoculadas foram transferidas para placas de Petri com ágar-água contendo 1,0% de NaCl e 119,57g de PEG 6000 com potencial osmótico de -0,20 MPa em tratamentos independentes, e incubadas a temperatura ambiente, mantidas no escuro por 7 dias.

Sementes imersas em água e acondicionadas em placas de petri vertidas com ágar-água sem aditivos indutores de estresse foram estabelecidas como controle. Sementes imersas em água e acondicionadas em placas de petri vertidas com ágar-água com aditivos indutores de estresse a concentração de 1,0% de NaCl e potencial osmótico de -0,20 MPa foram estabelecidas como testemunha. Foram utilizadas 3 repetições para cada tratamento contendo 10 sementes por repetição. Após o período de incubação foi realizada a contagem da quantidade de sementes que germinaram e medido com uma régua o comprimento da raiz primária. As sementes foram consideradas germinadas quando a raiz obteve pelo menos 2 mm de comprimento.

#### **4.7 Análise estatística**

Os tratamentos foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguidas pelo teste de comparação de médias de Skot-Knot ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa Sisvar 5.0 (Ferreira, 2011). A análise de componente principal (PCA) foi feita utilizando as matrizes de correlação. A análise de agrupamento (clustering) e a PCA para o crescimento das estirpes bacterianas em condições de estresse abiótico foram feitas utilizando o programa PaSt 4.10 (Hammer et al., 2011).

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Isolamento e inoculação das bactérias endofíticas e rizosféricas tolerantes à desidratação**

Foram obtidos 41 estirpes bacterianas (Tabela 1), identificadas numericamente (1-41). Analisando especificamente os compartimentos de tecido vegetal do milho relacionados ao número de estirpes bacterianas, verificou-se que o maior número foi obtido da rizosfera, contabilizando 35 (85%), seguida pelo caule 04 (9,7%) e da raiz 02 (4,9%), não foram obtidas estirpes bacterianas isoladas da folha.

**TABELA 1:** Número de isolados obtidos a partir dos compartimentos de tecido vegetal e rizosfera de três variedades de milho (*Zea mays*) cultivados em Serra Talhada e Araripina (Sertão de Pernambuco) mantidos em sílica gel em diferentes meios de cultivo

Meio de cultura	Genótipo do milho	Localidade	Compartimento	Número de isolados
NFb	BR 5036	Serra Talhada	Rizosfera	5
		Araripina	Rizosfera	3
			Raiz	1
	BR 5037	Serra Talhada	Raiz	1
		Araripina	Rizosfera	3
	BRS 4107	Serra Talhada	Rizosfera	2
				Subtotal
LGI	BR 5036	Serra Talhada	Rizosfera	4
	BRS 4107	Serra Talhada	Rizosfera	13
				Subtotal
BMGM	BR 5036	Serra Talhada	Caule	4
		Araripina	Rizosfera	3
	BR 5037	Serra Talhada	Rizosfera	2
				Subtotal
<b>Total</b>				<b>41</b>

Somente o meio NFb apresentou isolados bacterianos nas 03 variedades do milho, enquanto o meio LGI em 02 variedades (BR 5036 e BRS 4107) e o meio BMGM além da BR 5036 a variedade BR 5037. Os meios NFb e BMGM apresentaram estirpes bacterianas em ambas às localidades Serra Talhada-PE e Araripina-PE, enquanto o LGI somente em Serra Talhada-PE (Tabela 1).

Em relação ao compartimento vegetal foram isoladas estirpes bacterianas da rizosfera e raiz no meio NFb, no meio LGI somente foram obtidas estirpes bacterianas da rizosfera e o meio BMGM foram isoladas estirpes bacterianas oriundas do caule e rizosfera. Contabilizando número total 15, 17, 09 de estirpes bacterianas isoladas nos meios NFb, LGI e BMGM, respectivamente (Tabela 1).

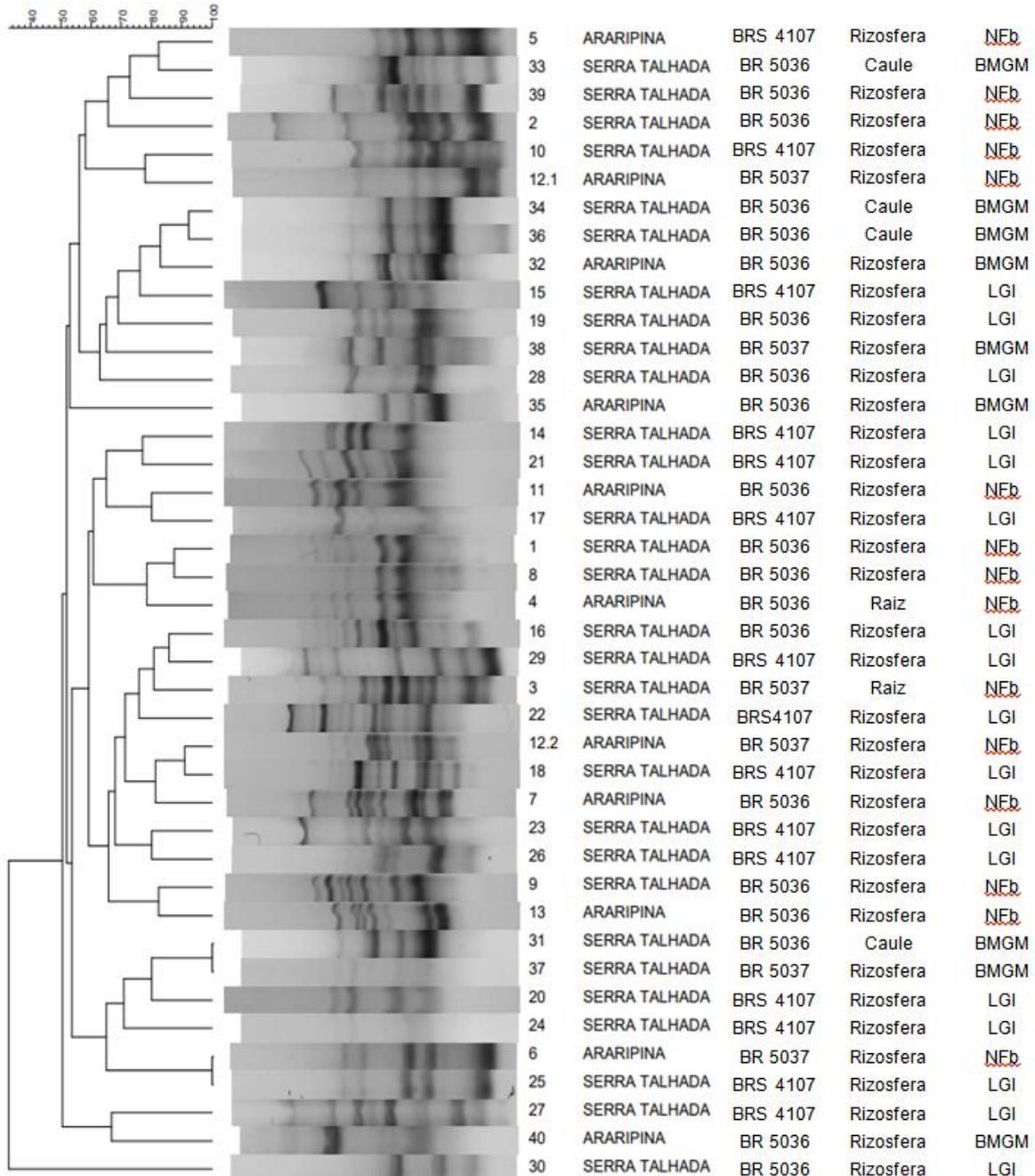
Os genótipos do milho BR 5036 e BR 5037 apresentaram estirpes bacterianas em ambos os municípios, enquanto o genótipo BRS 4107 apresentou somente no município de Serra Talhada-PE. Verificou-se que no genótipo BR 5036 foram obtidos 20 estirpes bacterianas da rizosfera, raiz e caule, nos três tipos de meio e nas duas localidades.

Já a variedade BR 5037 na localidade Serra Talhada-PE apresentou 03 estirpes bacterianas originadas da rizosfera (02) e raiz (01) somados os meios NFb e BMGM, enquanto na localidade de Araripina-PE a mesma variedade apresentou 03 isolados bacterianos da rizosfera, totalizando 06 isolados. Por fim, a variedade BRS 4107 foram obtidas 15 estirpes bacterianas somados os meios NFb e LGI isolados da rizosfera, no município de Serra Talhada-PE.

## **5.2 Caracterização molecular**

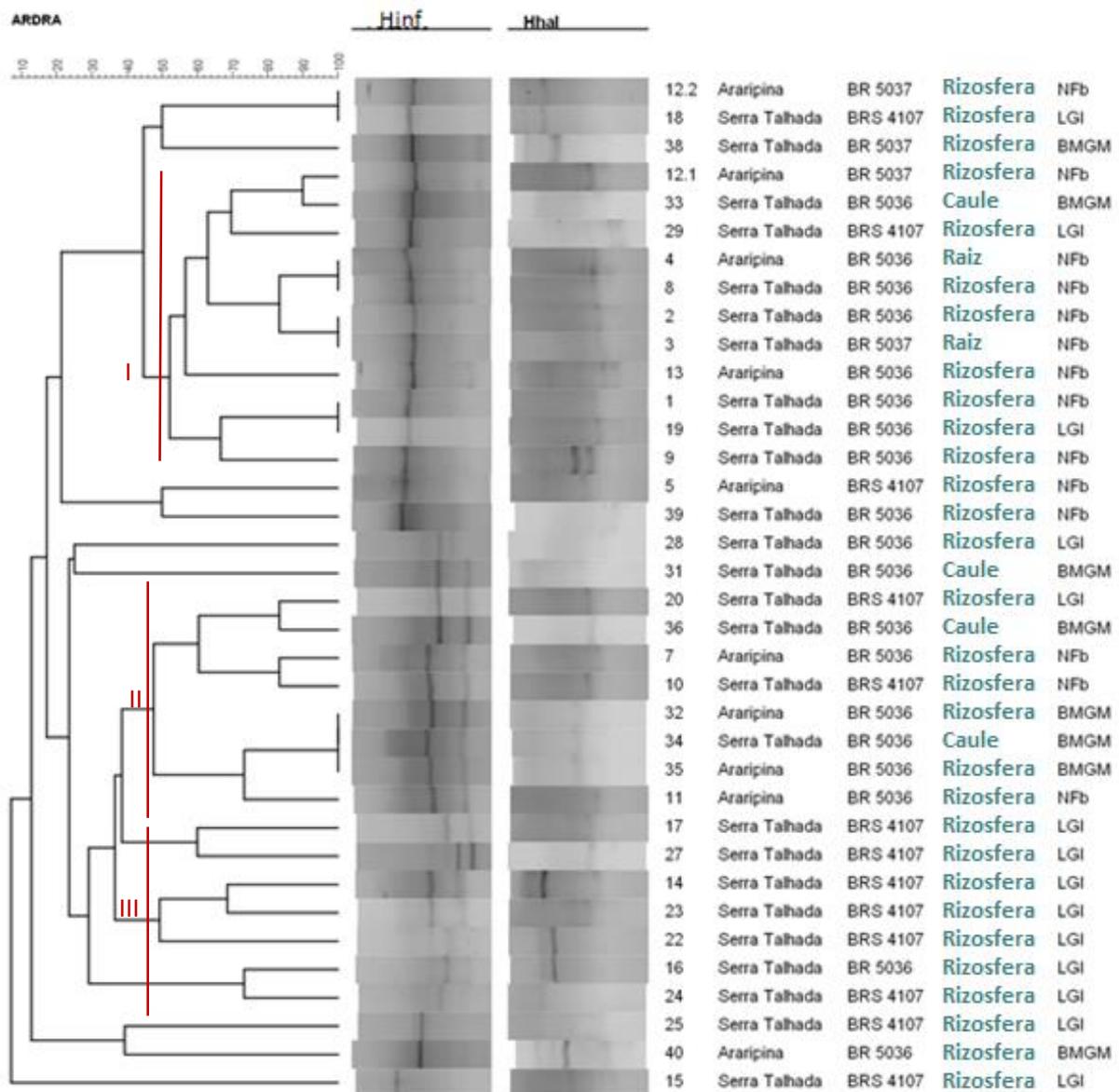
### **5.2.1 Análise das reações de BOX-PCR**

A partir da análise do fingerprint molecular por meio de reações de PCR-BOX, foi possível verificar uma diversidade genética entre as estirpes bacterianas, com exceção das estirpes bacterianas 6 e 25 e 31 e 37 que foram iguais entre si, como observado na Figura 1.



**FIGURA 1:** Dendrograma de similaridade obtido a partir de perfis gerados por meio de reações Box-PCR. Os perfis obtidos foram analisados com o programa BioNumerics 7.6.

### 5.2.2 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)



**FIGURA 2:** Dendrograma de similaridade obtido a partir de perfis gerados por meio de reações ARDRA com enzimas de restrições Hinf e HhaI. Os perfis obtidos foram analisados com o programa BioNumerics 7.6

A partir da análise do dendrograma de similaridade gerado pela análise dos perfis de ARDRA com enzimas de restrições Hinf e HhaI surgiram 3 clusters principais. O primeiro constituído por 11 estirpes bacterianas, representando maior cluster, oriundas das localidades Arapina e Serra Talhada, dos três genótipos do milho (BR 5036, BR 5037 e BRS 4107), sendo o BR 5036 com predominância em relação aos demais genótipos, isoladas do caule, raiz e rizosfera, esta última, com predominância em relação aos demais compartimentos vegetais, e dos três meios de

cultura BMGM, LGI e NFb, sendo o NFb com predominância entre os demais meios de cultura (Figura 2).

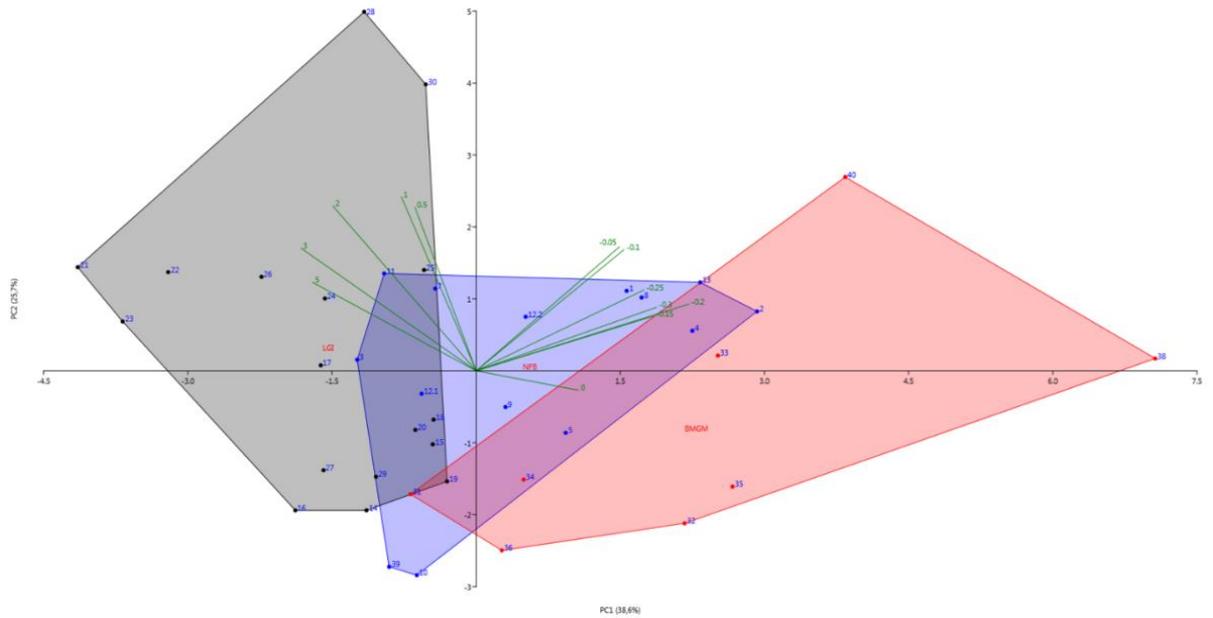
O segundo cluster formado por 8 estirpes bacterianas, 20, 36, 7, 10, 32, 34, 35, 11, oriundas de ambas as localidades (Araripina e Serra Talhada), de dois genótipos do milho (BR 5036 e BRS 4107), com predominância do genótipo BR 5036, isoladas do caule e rizosfera, e dos três meios de cultura, com predominância do meio BMGM. Por último, as estirpes bacterianas 17, 27, 14, 23, 22, 16 e 24 pertencentes ao terceiro cluster, oriundas somente da localidade Serra Talhada, dos genótipos BR 5036 e BRS 4107, com predominância do último, isoladas somente da rizosfera e do meio de cultura LGI (Figura 2).

### **5.3 Caracterização das estirpes bacterianas a tolerância aos estresses abióticos**

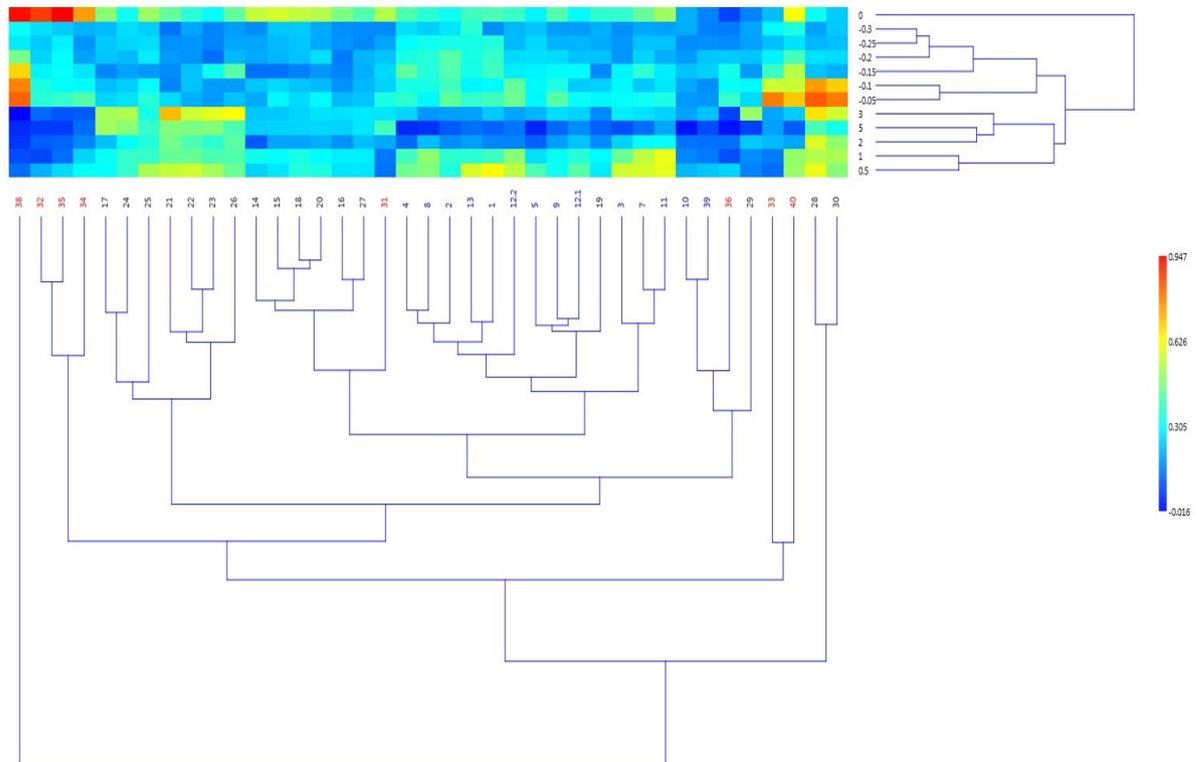
Na PCA, os dois componentes principais representam 68,2% da variância total. As estirpes bacterianas foram separadas conforme os meios utilizados para isolamento correlacionados com os fatores de estresses hídrico e salino (Figura 3). Algumas estirpes bacterianas obtidas em meio LGI foram correlacionadas com as variáveis com diferentes concentrações de NaCl (%). A maioria das estirpes bacterianas obtidas do meio do NFb foi correlacionado com diferentes potenciais osmóticos (MPa) e concentração de NaCl (%).

As estirpes bacterianas oriundas do meio BMGM não foram relacionadas com a variável NaCl (%). As estirpes bacterianas 33, 38 e 40 foram correlacionadas aos diferentes potenciais osmóticos (MPa), portanto, as mesmas apresentam relação positiva com as demais estirpes bacterianas oriundas do meio NFb que constituem o universo amostral relacionado a variável potencial osmótico (MPa).

As estirpes bacterianas 03, 07 e 11 obtidas nos meios NFb, apresentaram correlação positiva em relação as diferentes concentrações de NaCl (%), característica associada ao grupo das estirpes bacterianas cultivadas no meio LGI. Algumas estirpes bacterianas cultivadas no meio LGI não apresentaram correlação com a variável potencial osmótico (MPa) (Figura 3).



**FIGURA 3:** Biplot da Análise de Componentes Principais do crescimento de 39 estirpes bacterianas obtidas a partir de bactérias endofíticas e rizosféricas aplicadas em diferentes concentrações de NaCl (%) e potencial osmótico (MPa). PC1 e PC2 são os principais componentes 1 e 2, respectivamente. Cores/Símbolo: círculo azul - estirpes bacterianas isoladas no meio NFb, círculo preto – estirpes isoladas no meio LGI, círculo vermelho – estirpes isoladas no meio BMGM



**FIGURA 4:** Heatmap do crescimento de 39 estirpes bacterianas obtidas a partir de bactérias endofíticas e rizosféricas aplicadas em diferentes concentrações de NaCl (%) e potencial osmótico (MPa). Cores do número: azul - estirpes bacterianas isoladas no meio NFb, preto – estirpes isoladas no meio LGI, vermelho – estirpes isoladas no meio BMGM

Através do Heatmap pode-se verificar o surgimento de três principais clusters: um constituído pelas estirpes bacterianas obtidas do meio LGI com crescimento bacteriano correlacionado positivamente em relação às variáveis de diferentes concentrações de NaCl (%); um cluster com estirpes bacterianas que apresentaram crescimento moderado correlacionado com as variáveis NaCl (%) e potencial osmótico (MPa); e, por último, um cluster com as estirpes bacterianas com crescimentos correlacionados com os diferentes potenciais osmóticos (MPa) e NaCl (%), oriundas do meio NFb, conforme Figura 4.

No cluster com estirpes bacterianas que apresentaram correlação moderada com as variáveis NaCl (%) e potencial osmótico (MPa), destaca-se a estirpe 31 onde se verificou crescimento a partir das concentrações de NaCl a 2,0% apresentando maior crescimento na concentração 5,0% de NaCl. Enquanto no cluster com as estirpes correlacionados positivamente em relação às variáveis de diferentes concentrações NaCl (%), ressaltam-se as estirpes 21, 22, 23 e 26 onde apresentaram um crescimento gradual nas diferentes concentrações de NaCl% atingindo maior crescimento à 3,0% de NaCl, sendo que as estirpes 21 e 26 apresentaram maior crescimento em relação às demais (Figura 4).

No cluster com as estirpes bacterianas correlacionadas com os diferentes potenciais osmóticos (MPa) e de concentração de NaCl (%) oriundas do meio NFb, destacam-se as estirpes 1, 2, 4, 5, 8, 12.2 e 13 que apresentaram crescimento moderado nas diferentes concentrações de PEG 6000. Neste mesmo grupo, as estirpes 2, 3, 7, 8, 11, e 12.2 apresentaram crescimento elevado na concentração 1,0% de NaCl.

As estirpes bacterianas 28 e 30 apresentaram similaridade entre si e distanciaram-se das demais, pois apresentaram crescimento tanto sob concentração de 3,0% de NaCl quanto sob o potencial osmótico de -0,10 MPa. A estirpe 40 apresentou crescimento na concentração de NaCl de 2,0% e potencial osmótico de -0,20 MPa, comportando-se de forma similar à estirpe bacteriana 33 que apesar de apresentar crescimento moderado em condições salinas apresentou crescimento em condição de estresse hídrico de -0,15 MPa (Figura 4).

Destaca-se a estirpe bacteriana 38 que não apresentou semelhança com nenhum outro cluster e com quaisquer outras estirpes bacterianas, tendo apresentado um crescimento elevado em condição de estresse hídrico em até -0,20 MPa e moderado até -0,30 MPa, apesar de não apresentar crescimento em estresse salino.

Da mesma maneira, porém com níveis de crescimento menor na concentração de PEG 6000 estão as estirpes 32, 35 e 34 que apresentaram crescimento moderado em condições estresse hídrico. A estirpe bacteriana 29 apresentou crescimento na concentração de 3,0% de NaCl.

Podemos perceber uma diferenciação no comportamento das estirpes bacterianas através do agrupamento em relação ao meio de cultura e as variáveis estudadas. O cluster representado pelas estirpes bacterianas que apresentaram crescimentos diante do déficit hídrico foram isoladas do meio NFb, enquanto as estirpes bacterianas que cresceram sob estresse salino foram isoladas do meio LGI.

## **5.4 Avaliação da inoculação nas sementes de milho**

### **5.4.1 Avaliação da germinação em condição de estresse salino**

O efeito da inoculação com cada estirpe bacteriana e referência AbV5 nas sementes do milho submetidas a estresse salino a 1,0% de NaCl estão expressos no Gráfico 1. Observou-se que a maioria das sementes de milho inoculadas germinaram sob condição salina, não apresentando diferença estatística entre si, testemunha e controle. Contudo, em termos numéricos, percebe-se que as estirpes bacterianas 3, 4, 9, 14, 20, 22 e 39 apresentaram maior número de sementes germinadas em relação à testemunha, ao controle e à referência AbV5.

Em relação ao efeito da inoculação no comprimento da raiz, verificou-se o surgimento de dois grupos distintos estatisticamente, um composto pelas estirpes bacterianas 8, 9, 12.1, 12.2, 13, 14, 15, 19, 20, 23, 32, 39 e 40 que induziram um aumento significativo no comprimento da raiz comparadas ao outro grupo composto pelas demais estirpes bacterianas, testemunha e bactéria de referência AbV5 (Gráfico 2).

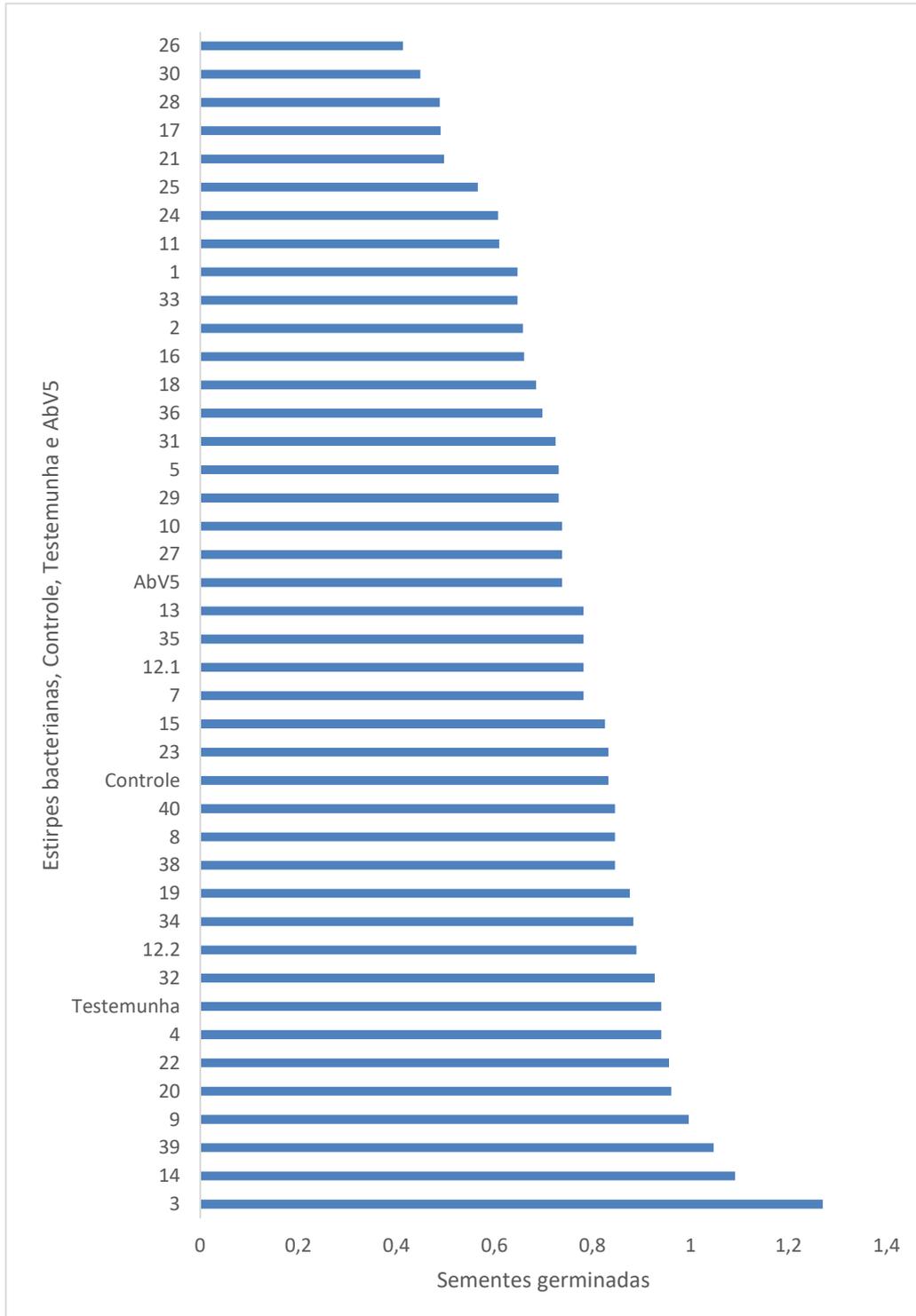
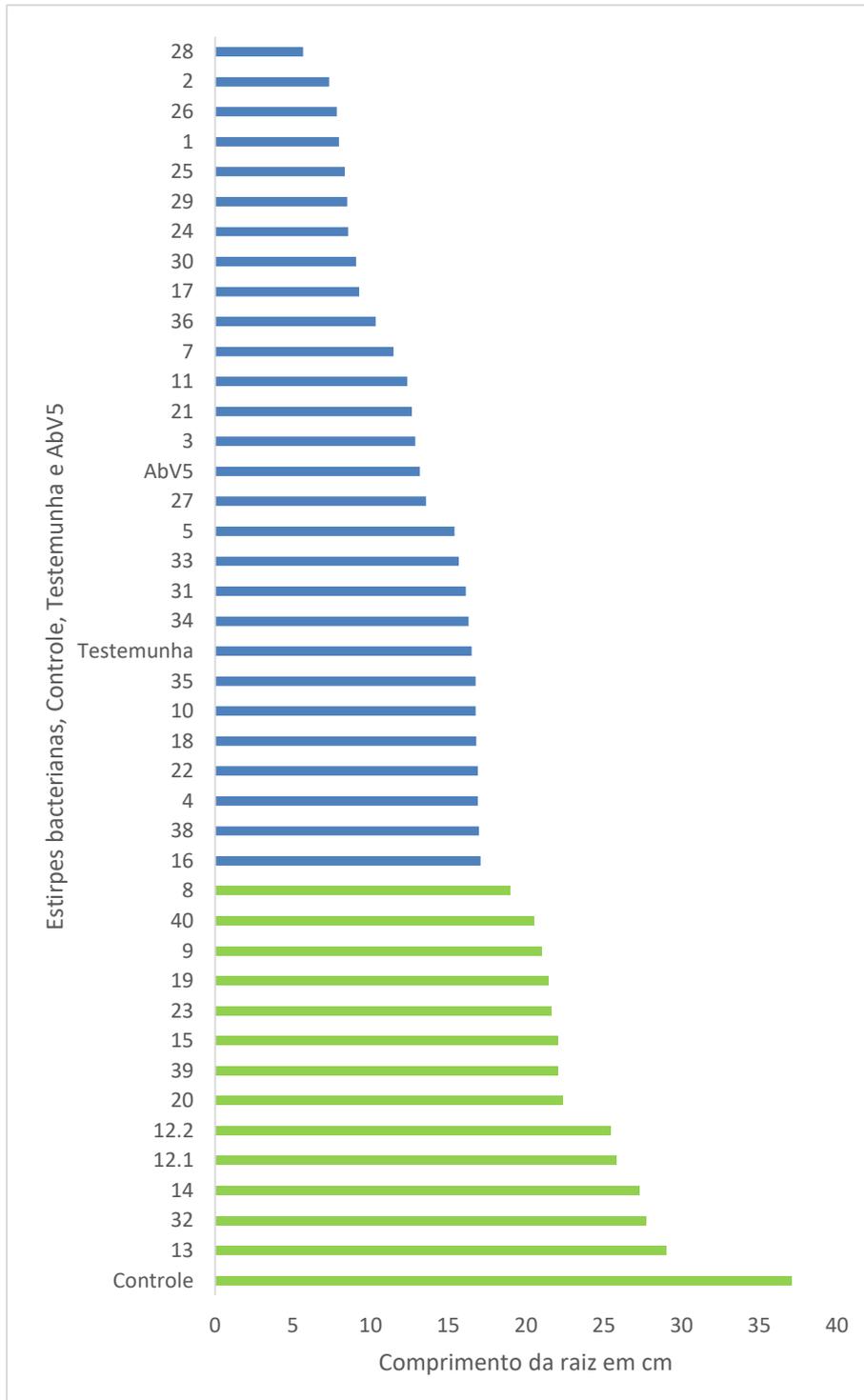


GRÁFICO 1: Efeito da inoculação das estirpes bacterianas e bactéria referência AbV5 na germinação das sementes do milho submetidas a estresse salino na concentração 1,0% de NaCl. Médias com a mesma cor não diferem entre si pelo teste Scott-Knott .



**GRÁFICO 2:** Efeito da inoculação das estirpes bacterianas e bactéria de referência AbV5 no comprimento da raiz do milho submetidas a estresse salino na concentração 1,0% de NaCl. Médias com cores distintas diferem entre si pelo teste Scott-Knott.

Não houve diferença significativa entre as estirpes bacterianas e o controle em condição de estresse salino no comprimento da raiz. Comparando-se os resultados obtidos em ambos os parâmetros observou-se que as estirpes bacterianas 8, 9, 12.2,

14, 19, 20, 32, 39 e 40 apresentaram resultados satisfatórios em condições de estresse salino, conforme Figura 6.



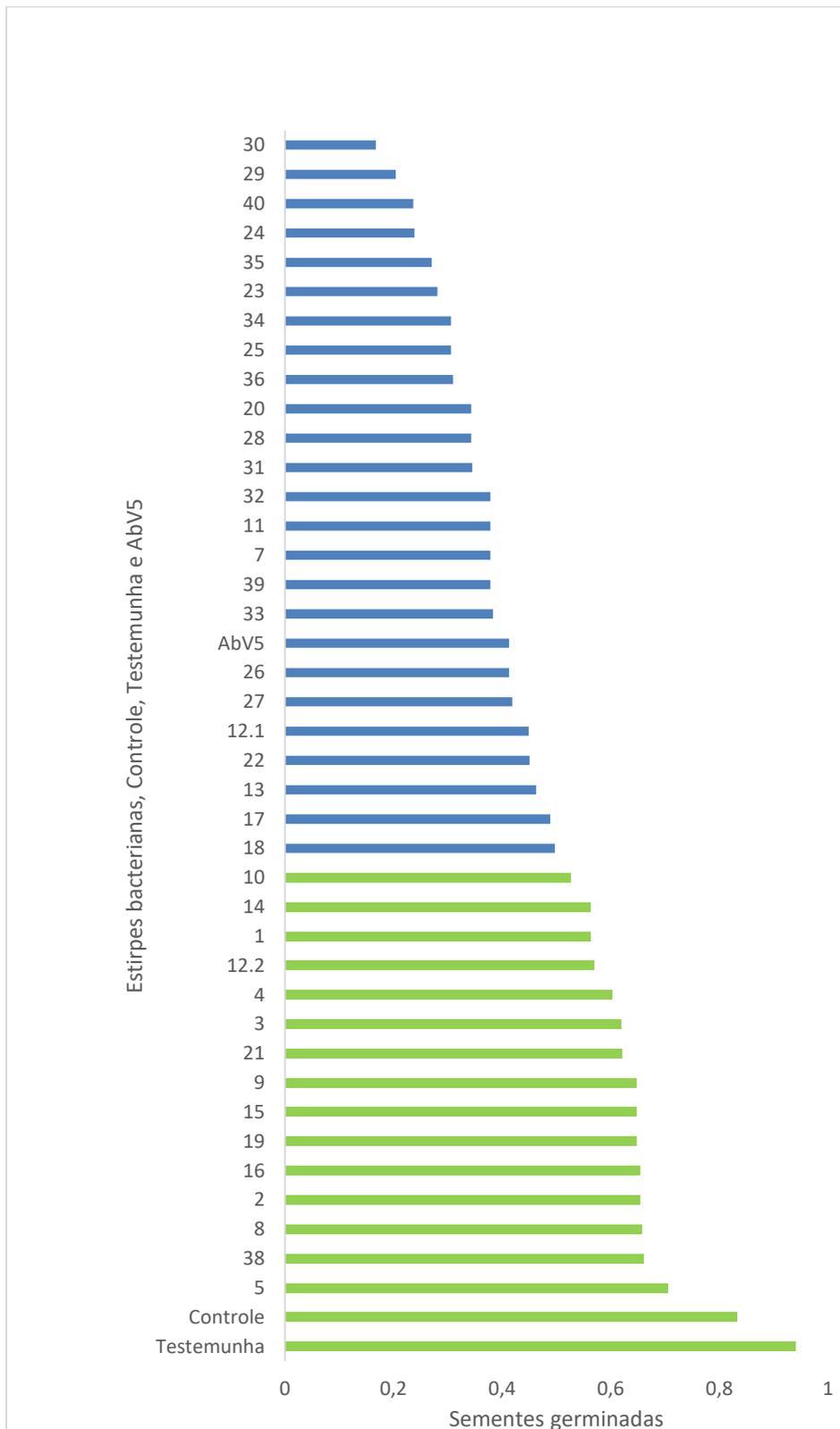
**FIGURA 6:** Desempenho de seis estirpes bacterianas que obtiveram resultados satisfatórios em ambas as análises (germinação e comprimento da raiz) em condição de estresse salino (1,0% de NaCl).

#### 5.4.2 Avaliação da germinação em condição de estresse hídrico

Observou-se menor quantidade de sementes germinadas em resposta a inoculação bacteriana e mantidas em condições de estresse hídrico a -0,20 MPa, apresentando dois grupos distintos estatisticamente, em que as estirpes bacterianas 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12.2, 14, 15, 16, 19, 21 e 38 pertencem ao grupo que apresentaram melhor desempenho significativo no número de sementes germinadas, juntamente com a testemunha e controle em relação com as demais estirpes bacterianas e a referência AbV5 (Gráfico 3).

Em relação ao efeito da inoculação com cada estirpe bacteriana no comprimento da raiz, verificou-se o surgimento de dois grupos estatisticamente diferentes, um composto pelas estirpes bacterianas 3, 5, 8, 9, 10, 12.1, 12.2, 13, 14, 15, 19, 21 e 38 que não diferenciaram da testemunha e controle quanto ao comprimento da raiz, e, outro composto pelas demais estirpes bacterianas e

referência AbV5 que reagiram negativamente sob condição de estresse hídrico (Gráfico 4).



**GRÁFICO 3:** Efeito da inoculação das estirpes bacterianas e bactéria de referência AbV5 na germinação das sementes do milho submetidas a estresse hídrico a pressão osmótica a -0,20 MPa. Médias com cores distintas diferem entre si pelo teste Scott-Knott.

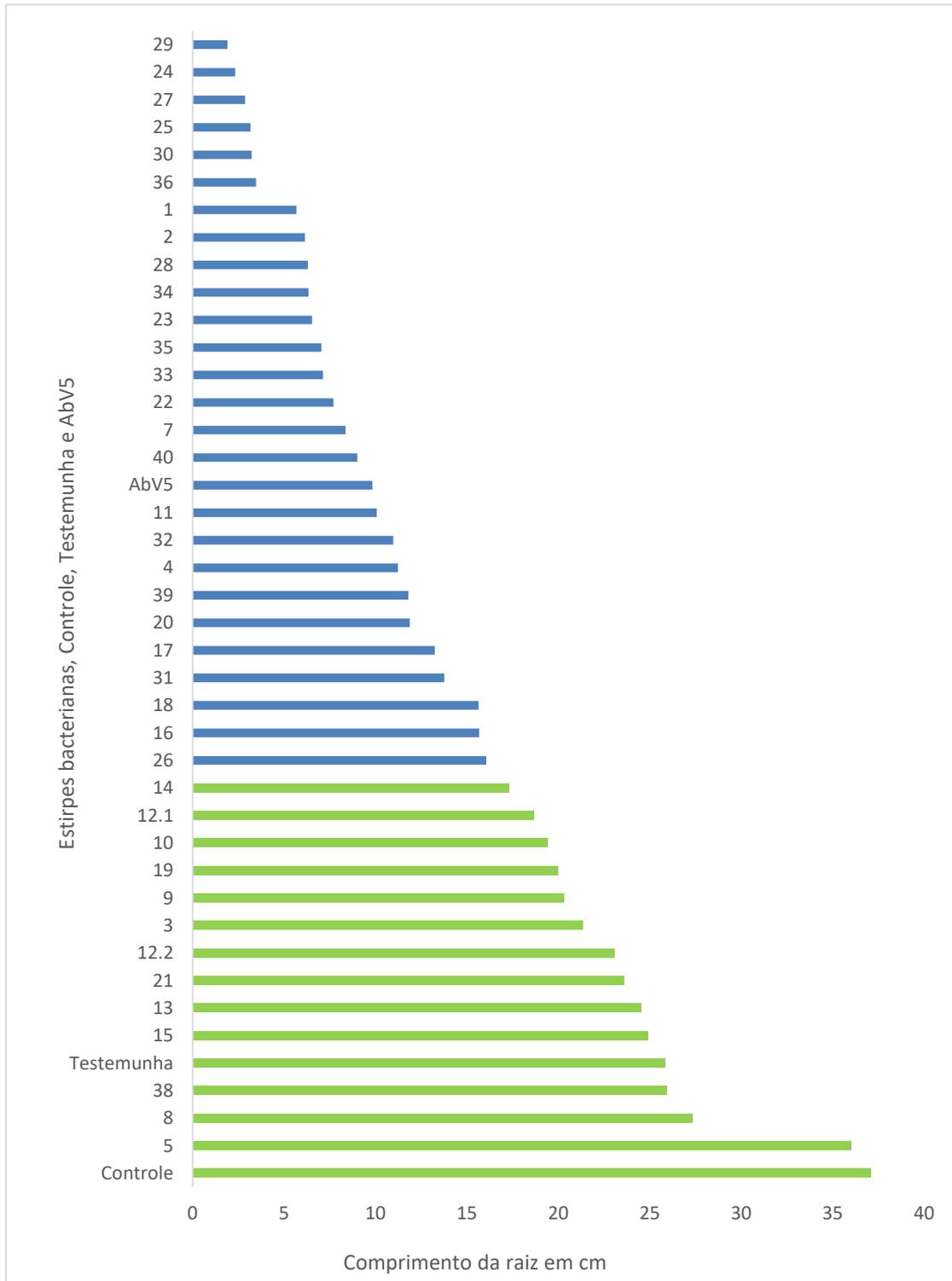


GRÁFICO 4: Efeito da inoculação das estirpes bacterianas e bactéria de referência AbV5 no comprimento da raiz do milho submetidas a estresse hídrico a pressão osmótica  $-0,20$  MPa. Médias com cores distintas diferem entre si pelo teste Scott-Knott.

Comparando os resultados obtidos em ambas as análises em condições de estresse hídrico, destacou-se onze estirpes bacterianas, a seguir: 3, 5, 8, 9, 10, 12.2, 14, 15, 19, 21 e 38 que apresentaram resultados satisfatórios na germinação e

comprimento da raiz, conforme Figura 7, pois apresentaram resultados estatisticamente distintos da referência AbV5. A demonstração do desempenho das demais estirpes bacterianas na germinação e comprimento da raiz em condição de estresse salino e hídrico pode ser observado Anexo I.



**FIGURA 07:** Desempenho das seis estirpes bacterianas que obtiveram resultados satisfatórios em ambas as análises (germinação e comprimento da raiz) em condições de estresse hídrico a pressão osmótica a  $-0,20$  MPa.

## 6. DISCUSSÃO

As plantas estão associadas a uma enorme diversidade de microrganismos (UROZ, COURTY, OGER, 2019), onde bactérias habitam várias camadas do solo e diferentes tecidos das plantas e desempenham papéis vitais ao interagir com seu hospedeiro (PRIYA, ANEESH, HARIKRISHNAN, 2021). A composição da microbiota vegetal é dinamicamente moldada por fatores ambientais, além de fatores do hospedeiro, como espécie, estágio de desenvolvimento e compartimento (RODRIGUEZ et al, 2019).

Com base nos compartimentos do tecido vegetal do milho, observou-se que 35 estirpes foram isoladas da rizosfera (85%) e 06 isoladas do caule e raiz (15%) e nenhuma da folha. Santos e Olivares (2021) relatam que a área de uma folha pode

abrigar em média de  $10^6$ - $10^7$   $\text{cm}^{-2}$  de bactérias e fungos variando de  $10^2$ - $10^8$  UFC  $\text{g}^{-1}$  número comparativamente menor do que da rizosfera. Provavelmente devido à maior suscetibilidade à radiação ultravioleta levando à estratificação do microbioma da filosfera. As raízes sendo um sumidouro de carbono fotossintético e um local de proteção de temperaturas extremas e nível de umidade flutuante, podem ser favorecidas por um habitat adequado para colonização por endófitos, em comparação ao das folhas (MARAG e SUMAN, 2018).

HU e colaboradores (2007) mostram que a folha do milho é sensível à seca e a salinidade, além de apresentar da menor quantidade de microrganismos por área foliar e maior exposição a adventos climáticos. Desta forma, pode-se supor que o menor número de microrganismos existentes no compartimento do tecido foliar não resistiram à condição adicional de dessecação por longo período, explicando-se o não isolamento de estirpes bacterianas nas amostras da folha do milho.

O maior número de microrganismos ao redor das raízes das plantas, pode ser explicado pelos altos níveis de nutrientes, incluindo aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares exsudados das raízes e que são utilizados pelos microrganismos na rizosfera (ETESAMI e GLICK, 2020). As raízes das plantas em geral liberam 17% dos fotossintatos capturados, uma fonte de carbono prontamente disponível na rizosfera, tornando um ambiente favorável para o crescimento dos microrganismos (JIA et al., 2020). Sendo um ambiente rico em carbono, a rizosfera tem 10 a 100 vezes mais microrganismos do que o solo (SANTOS e OLIVARES, 2021).

Em troca pelos nutrientes secretados pela raiz (GOUDA et al, 2018) os microrganismos PGPB beneficiam as plantas ao fornecer outros nutrientes, fitormônios (PRIYA, ANEESH, HARIKRISHNAN, 2021) e no aumento da resistência aos estresses bióticos como fitopatógenos, e não biológicos como calor, alto teor de sal ou seca (ETESAMI e MAHESHWARI, 2018; PRIYA, ANEESH, HARIKRISHNAN, 2021). O milho secreta mucilagem rica em carboidratos através de suas raízes atraindo microrganismos diazotróficos para facilitar a absorção de nitrogênio do ambiente pela planta (VAN DEYNZE et al., 2018).

Segundo Santos e Olivares (2021) microrganismos isolados da rizosfera são excelente colonizadores dos demais compartimentos das plantas, pois são capazes de se mover para outras partes da planta mais facilmente (SANTOS e OLIVARES, 2021). As cepas bacterianas SYSU 3333222 e SYSU 333140 que foram isoladas das raízes de *Borczowwia arabocaspica*, com amostras das raízes mantidas em sílica gel

estéril por três dias mostraram-se eficientes na capacidade promotora de crescimento quando inoculadas em mudas de *Arabidopsis thaliana* sob estresse salino (DONG et al, 2019).

As bactérias endofíticas são derivadas principalmente do solo e da rizosfera. São capazes de colonizar as raízes das plantas em números significativos ( $10^5$ - $10^7$  UFC por grama de raiz fresca), podendo influenciar o crescimento das plantas de maneira positiva em determinados ambientes e condições de solo (BULGARELLI et al., 2013).

Bomfim (2020) e colaborades isolaram 51 estirpes dos diversos compartimentos do tecido vegetal do milho, sendo 10 estirpes bacterianas isoladas da raiz, 9 estirpes bacterianas oriundas da parte aérea, 26 das sementes e 06 estirpes bacterianas isoladas da rizosfera. Contabilizando 19 estirpes bacterianas (37%) constituintes endofíticas (raiz e parte aérea) e 06 de estirpes bacterianas rizosféricas (12%).

Nossos resultados não estão de acordo com a literatura, uma vez que os compartimentos de tecido vegetal do milho mantidos sob desidratação foram isoladas 35 estirpes bacterianas rizosféricas (85%) e 06 estirpes bacterianas endofíticas (15%). Explica-se em parte esta diferença pela metodologia aplicada, pois Bomfim (2020) não submeteu seu experimento a nenhuma condição de estresse. Quando submetidos à condição de estresse, conforme Abedinzadeh, Etesami, Alikhani (2018) foram isoladas 170 estirpes bacterianas da rizosfera e raiz do milho irrigadas com águas residuais industriais e domésticas, obtendo assim resultados proporcionais aos encontrados neste estudo, onde 110 foram isoladas da rizosfera (65%) e 60 foram isoladas da raiz (35%).

Segundo Eke et al (2019) plantas que sobrevivem em áreas propensas à seca modelam sistematicamente seu microbioma para reter colonizadores valiosos. Desta forma, para se obter PGPB, é próprio utilizar amostras de extremos ambientais, uma vez que, associados com plantas que crescem em situações ambientais inibidoras, pode ajudar na aquisição de PGPB tolerantes a vários estresses não biológicos (ETESAMI e GLICK, 2020). Diante do exposto, é possível que o processo de dessecação prévio das amostras em sílica gel pelo período de 18 meses tenha condicionado estresse hídrico e influenciado no isolamento de estirpes bacterianas endofíticas nos respectivos compartimentos vegetais do milho.

Em relação aos meios de culturas utilizados para isolamentos das estirpes bacterianas, o meio de cultura LGI apresentou maior número de estirpes bacterianas isoladas (17) (42%) seguido do meio de cultura NFb (15) (36%) e o menor número o meio de cultura BMGM com 09 estirpes bacterianas isoladas (22%). Apesar da maior quantidade de estirpes bacterianas isoladas do meio cultura LGI nesta pesquisa, Marag e Suman (2018) em seus estudos utilizaram os meios de cultura JNFb e LGI para selecionar bactérias endofíticas diazotróficas das partes do milho (raiz, caule e folha) o meio JNFb contabilizou maior número de bactérias em relação ao meio de cultura LGI.

Nascimento e colaboradores (2021) utilizaram os meios de cultura Dyg's e BMGM para isolamento de bactérias endofíticas da raiz e caule do milho, no qual obtiveram 79 isolados obtidos, onde somente 14 foram oriundos do meio de cultura BMGM. Ao mesmo tempo, relataram que estirpes obtidas do meio de cultura BMGM foram relacionadas ao gene *NifH* amplicação. Neste sentido, as estirpes bacterianas osmotolerantes (32, 33, 34, 35, 38 e 40) e a estirpe bacteriana halofílica 31 isoladas do meio de cultura BMGM são promissoras candidatas a estirpes bacterianas fixadoras de nitrogênio.

Em relação aos genótipos de milho, 20 estirpes bacterianas foram obtidas do genótipo BR 5036 (49%), 15 estirpes bacterianas isoladas da variedade BRS 4107 (36%) e 06 estirpes bacterianas obtidas da variedade BR 5037 (15%). Marag e Suman (2018) isolaram 188 estirpes bacterianas de dois genótipos do milho a variedade Pusa extra Precoce hídrido milho-5 (PEEHM-5) e a variedade Pusa composto-4 (PC-4), onde a segunda variedade apresentou uma maior diversidade com 106 estirpes bacterianas em comparação com hídrido- PEEHM5 com 82 estirpes bacterianas.

Os genótipos do milho BR 5036 e BR 5037 caracterizados pela adaptabilidade produtiva para região a semiárida do nordeste brasileiro foi que obtiveram-se as estirpes bacterianas osmotolerantes. Já as estirpes bacterianas halotolerantes, na sua maioria, foi isolada do genótipo BRS 4107 caracterizado pela adaptabilidade para o estado do Amazonas região norte do Brasil. Segundo Naveed et al (2014) há evidências específicas do genótipo da planta na comunidade microbioma e seus efeitos como PGPB.

Mesmo isoladas do genótipo BRS 4107 as estirpes bacterianas (5, 10, 14, 15 e 21) apresentaram resultados satisfatórios na inoculação de sementes do milho na germinação e no comprimento da raiz sob condição de estresse hídrico. Uma das

explicações prováveis para isso está no fato de que o processo de dessecação prévio das amostras em sílica gel pelo período de 18 meses influenciou no isolamento de estirpes bacterianas osmotolerantes mesmo isoladas do genótipo de milho adaptado as regiões úmidas do Brasil.

A partir da análise dendrograma de similaridade gerado pela análise dos perfis de ARDRA surgiram três agrupamentos principais. Este padrão de agrupamento sugere que o isolamento das estirpes bacterianas foram impulsionados pelo genótipo do milho e a localidade onde foram cultivados. Constatou-se a predominância de 28 estirpes bacterianas correspondente a 68%, isoladas das três variedades de milho (BR 5036, BR5037 e BR 4107) cultivadas no município de Serra Talhada, enquanto 13 estirpes bacterianas correspondente a 32% isoladas de dois variedades de milho (BR 5036 e BR 5037) cultivadas no município de Araripina.

Walters et al (2018) demonstraram que diferentes genótipos do milho impactaram na composição do microbioma da rizosfera dependendo da idade e da localização da planta. Como também, Naveed e colaboradores (2014) relatam que a capacidade de promover o crescimento e estabelecer populações de bactérias endofíticas nas plantas depende do genótipo e do estágio de desenvolvimento da planta.

Quando submetidas ao teste de tolerância ao estresse salino surgiram um número significativo de estirpes bacterianas halotolerantes. Segundo Komaresofla et al (2019) são consideradas bactérias halotolerantes aquelas que têm a capacidade de crescer nas concentrações de 1% a 33% de NaCl. Egamberdieva et al (2017) cita que microrganismos halófilos necessitam de NaCl para seu crescimento e os não halófilos são aqueles que crescem em menos de 1% de NaCl.

Nesta pesquisa, as estirpes bacterianas foram agruparam de acordo com os níveis de tolerância ao NaCl, apresentando agrupamentos de estirpes bacterianas que cresceram nas concentrações de 1% e a 3% de NaCl, classificadas como halotolerantes. Para as estirpes bacterianas que não constituíram os principais agrupamentos, mostraram-se como halotolerantes as estirpes bacterianas 28 e 30 que apresentaram crescimento na concentração de 3% de NaCl e a estirpe bacteriana 40 na concentração de 1% de NaCl.

Destacam-se como halófilas a estirpe bacteriana 31, pois observou-se que não houve crescimento nas concentrações de 0,5 a 1%, apresentando crescimento gradual a partir da concentração 2% atingindo maior crescimento em 5% de NaCl, e

a estirpe bacteriana 29 que apresentou crescimento maior na concentração de 3% de NaCl. A seleção de bactérias Halofílicas/halotolerantes que habitam ecossistemas salgados e áridos, faz-se necessário, pois apresentam potencial para promover o crescimento das plantas em condições de salinidade e seca (VURUKONDA et al, 20016).

A grande quantidade de estirpes halotolerantes isoladas nesta pesquisa, pode-se supor pela própria constituição da comunidade de microbiota do milho, classificado como moderadamente sensível ao sal, que contribuem para resistência da planta sob estresse salino (FAROOQ et al, 2015). Estudos realizado por Pathania, Bhatia, Khatri (2020) com estirpe bacteriana do gênero *Bacillus* sp. MT7 isolada da rizosfera do milho, evidenciaram à tolerância na concentração de 10% de NaCl e quando inoculada nas raízes do tomate submetidas aos estresses abióticos mostrou-se eficientes na atenuação desses efeitos no desenvolvimento do tomateiro. Segundo Egamberdieva et al (2017) as PGPB quando isoladas de ambientes extremos, normalmente mantêm seus atributos de promoção de crescimento, mesmo na presença de alta concentrações de NaCl.

A mitigação do estresse salino pelas PGPB halotolerantes pode envolver uma associação de ações como a sobrevivência da própria bactéria em ambiente hiperosmótico, seus mecanismos de respostas e qualidade do solo (ARORA et al, 2020). Visto que altas concentrações de sais causam toxicidade iônica, choque osmótico e estresse oxidativo, que interrompem os processos metabólicos e impedem o crescimento dos microrganismos (YAN et al., 2015; RATH e ROUSK, 2015; HOU et al., 2021) e causa impactos negativos nos microrganismos do solo, requerendo mudanças a nível molecular, celular e fisiológicos em resposta ao estresse ambiental (ARORA et al, 2020).

Em relação a tolerância ao estresse hídrico, os resultados mostraram um significativo número de estirpes bacterianas resistentes aos diferentes potenciais osmóticos, apesar de terem sido isoladas de uma planta não xerófitica, como o milho. Segundo Kavamura e colaboradores (2013) são considerados microrganismos xerotolerantes aqueles cultivados em meio com redução de disponibilidade de água e/ou encontrados em ambientes onde estão constantemente submetidos ao estresse hídrico, condição esta estabelecida pela desidratação dos compartimentos de tecido vegetal pela sílica gel, somado ao fato de terem sido isoladas de culturas cultivadas em regiões semiárida do nordeste do Brasil.

Pela análise Heatmap, as estirpes bacterianas consideradas osmotolerantes foram agrupadas em um só cluster isoladas principalmente no meio NFb, no qual as estirpes bacterianas 2, 3, 4, 5, 8, 12.1 e 13 apresentaram crescimento sob pressão osmótica a -0,25 MPa a -0,30 MPa. Dentre as estirpes que não formaram cluster principal, destacam-se como osmotolerantes as estirpes bacterianas 40 com crescimento a pressão osmótica de -0,20 MPa, estirpe bacteriana 38 com expressivo crescimento a pressão osmótica de -0,20 MPa e crescimento moderado a pressão osmótica de -0,30 MPa e as estirpes bacterianas 32, 35 e 34 que apresentaram crescimento moderado sob pressão osmótica de -0,30 MPa.

Alguns estudos isolaram bactérias endofíticas e rizosféricas de várias espécies de plantas e de regiões áridas e semiáridas utilizando PEG 6000 para selecionaram estirpes bacterianas osmotolerantes promotoras de crescimento, como girassol (SANDHYA et al, 2009), milho (GARGÍA et al, 2018), leguminosas (CARDOSO et al, 2018) e tomate (EKE et al, 2019; PATHANIA, BHATIA, KHATRI 2020) sob estresse hídrico. Os autores citados constataram que as PGPB podem auxiliar na redução do estresse hídrico através de mecanismos diretos e indiretos, melhorando a estabilidade das membranas celulares e ativando o sistema de defesa antioxidante nas plantas.

A seca é um dos fatores abióticos que mais afeta os microrganismos, além do estresse osmótico, a mobilidade dos nutrientes e o acesso no solo são limitados (SANTOS e OLIVARES, 2021). Dessa forma, a função das PGPB pode ser prejudicadas se as mesmas não puder sobreviver em ambiente sujeito à seca (CARDOSO et al, 2018), deixando de sintetizar solutos compatíveis que atuam como osmólitos e ajudam os organismos a sobreviverem em condições de estresse osmótico extremo (ROJAS-TAPIAS et al, 2012).

A seca e a salinidade são consideradas estresses de origem radicular, pois o metabolismo radicular durante o déficit hídrico e o estresse salino afetam principalmente o processo de fotossíntese (KAUSHAL e WANI, 2016), atingindo as plantas de várias maneiras como redução do crescimento e desenvolvimento, reprodutivo, germinação, vegetativo, atraso no surgimento da espiga, espiguetas por espiga consequentemente redução na produção de grãos (ABBAS et al, 2019). Sob estresse salino o sistema radicular, como o comprimento da raiz, o número da raiz e os pêlos são afetados (DONG et al, 2019).

A microbiolização de sementes de milho é uma técnica utilizada para esse procedimento que influencia na germinação das sementes e no desempenho das

radículas. A colonização das sementes de milho obtida pela microbiolização submetidas ao estresse salino, demonstrou que 13 estirpes bacterianas (32%) mostraram efeito positivo no comprimento da radícula em relação as demais estirpes bacterianas (26) (68%).

Todas as estirpes bacterianas que compõem o grupo que proporcionaram resultados favoráveis na colonização da semente de milho sob condições de estresse salino foram oriundas da rizosfera. Komaresofla et al (2019) nos diz que estirpes bacterianas isolados da rizosfera são mais adaptados a altas concentrações de sais por causa da força iônica neste local devido a maior absorção de água.

Dentre as 13 estirpes bacterianas relacionadas positivamente com o comprimento da radícula, 05 estirpes bacterianas (8, 12.1, 12.2, 23, e 40) foram consideradas halotolerantes no teste *in vitro*, isso explica-se supostamente os benefícios na microbiolização das sementes de milho sob condições de estresse salino pelas estirpes bacterianas halotolerantes. As PGPB halotolerantes colonizadoras de raízes que são fisiologicamente adaptadas ao estresse abiótico podem sobreviver em ambientes hostis e ajudar as plantas a tolerar o estresse salino (EGAMBERDIEVA et al, 2017), usando diferentes mecanismos, podem superar estresse causado por altas concentrações de NaCl (KOMARESOFILA et al, 2019).

A colonização nas sementes de milho obtida pela microbiolização mantidas sob estresse hídrico, demonstrou que 15 estirpes bacterianas (37%) mostraram efeito positivo na germinação das sementes em relação às demais estirpes bacterianas (24) (66%). Da mesma forma, que 13 estirpes bacterianas (32%) mostraram efeito positivo no comprimento da radícula em relação às demais estirpes bacterianas 26 (68%).

Foi observado o maior efeito do estresse hídrico em comparação ao estresse salino na germinação das sementes de milho microbiolizadas. A disponibilidade de água para a semente é influenciada pelo potencial hídrico das zonas do solo imediatamente ao redor da semente, entre outros fatores (VILLELA, FILHO, SEQUEIRA, 1999). Nosso caso, a disponibilidade de água foi comprometida devido ao acondicionamento das sementes de milho em solução água-ágar com PEG 6000 a potencial osmótico de -0,20 MPa.

Um grupo de estirpes bacterianas mostraram-se mais eficiente na colonização das sementes de milho sob estresse hídrico, onde induziram um aumento significativo no comprimento da radícula e no número de sementes germinadas. Dentro desse grupo, encontra-se 07 estirpes bacterianas (2, 3, 5, 8, 12.1, 13 e 38) consideradas

osmotolerantes no teste *in vitro*. A perda de água durante o processo de maturação das sementes parecem favorecer o desenvolvimento de bactérias endofíticas tolerantes a alta pressão osmótica (TRUYENS et al, 2014).

Segundo Vurukonda e colaboradores (2016) alterações na morfologia da raiz na aquisição de tolerância à seca está relacionada com mudanças físicas e químicas induzidas por microrganismos em plantas que resultam em maior tolerância ao estresse hídrico. Um aumento no sistema radicular de uma planta expressados na sua área de superfície expandida, proporciona o aprimoramento na absorção de nutrientes como nitrogênio e fósforo, água, resultando em melhor crescimento e saúde da planta (PATHANIA, BHATIA, KHATRI 2020).

Pesquisadores propuseram diversos mecanismos utilizados pelas PGPB para promoverem o desenvolvimento da raiz na alteração da arquitetura da raiz em condição de estresses hídrico e salino, como tolerância sistemática induzida que envolve mudanças fisiológicas e bioquímicas (NAVEED et al, 2014), modulação dos níveis fitohormonais (EGAMBERDIAVA et al, 2010), exopolissacarídeos bacterianos (VARDHARAJULA et al, 2011), defesa antioxidante (SARAVANAKUMAR et al, 2011), compostos orgânicos voláteis (GUTÍERREZ-LUNA, et al, 2010), genes responsivos à seca (LIU et al, 2020) entre outros que podem melhorar a tolerância ao estresse em plantas.

Enquanto ao efeito inibidor da microbiolização nas sementes de milho, por parte de algumas estirpes bacterianas observado nesta pesquisa, pode-se estar relacionados a vários fatores, como a intensa colonização (EGAMBERDIEVA et al, 2017), o aumento da produção endógena de etileno que afeta negativamente o desenvolvimento da raiz (KAUSHAL e WANI, 2016), o método de inoculação e dosagem (MOUTIA et al, 2009) e sua capacidade de sobrevivência na superfície da semente (GARCÍA et al, 2017), segundo Truyens et al (2014) a intrínseca intervenção da associação planta-microrganismo ocorre na raiz e na semente.

Os resultados do presente estudo da microbiolização das sementes de milho sob condição de estresse abiótico sugerem que um grupo de estirpes bacterianas foram eficientes no aumento da raiz, onde apresentaram diferenças estatísticas em relação à testemunha e à referência AbV5 sob estresse salino. Enquanto, sob estresse hídrico apresentaram diferenças estatísticas em relação à referência AbV5 na germinação e comprimento da radícula. García et al (2017) submeteram as *Azospirillum* Az3, Az8, Az19 e Az36 isoladas da raiz do milho cultivados em diversos

solos e submetidas sob estresses salino e hídrico, no qual a *Azospirillum* Az19 apresentou melhor desempenho comparados à *A. brasilense* Az39 usada com inoculante comercial na Argentina.

Podemos observar que nem todas as estirpes bacterianas consideradas halotolerantes e osmotolerantes nos testes *in vitro* mostraram eficientes na colonização das sementes do milho através da microbiolização mantidas sob estresses abióticos. Mesmo com predisposição a sobrevivência em ambientes estressados, as estirpes bacterianas precisam ter sucesso na colonização de sementes, uma vez que, microrganismos benéficos das sementes atuam no desenvolvimento inicial das plantas, afetando a germinação e a sobrevivência das plântulas (SANTOS e OLIVARES, 2021; TRUYENS et al, 2014). Além, da inoculação por sementes ser um método mais fácil e comumente aplicada por agricultores, em comparação com a inoculação de mudas (PATHANIA, BHATIA, KHATRI 2020).

## 7. CONCLUSÕES

Manter amostras vegetais em condições de desidratação mostrou-se uma técnica promissora no isolamento de estirpes bacterianas osmotolerantes de espécies não xerófitas.

A rizosfera apresentou-se como região mais significativa para isolamento de bactérias resistentes aos estresses hídrico e salino.

A grande maioria das estirpes bacterianas osmotolerantes e halotolerantes foi oriunda dos genótipos do milho BR 5036 e BR5037 e originárias do município de Serra Talhada.

Os meios de culturas LGI e NFb foram correlacionados positivamente com as estirpes bacterianas halotolerantes e as osmotolerantes, respectivamente.

As estirpes bacterianas que apresentaram efeitos significativos na microbiolização das sementes do milho em condição de estresse hídrico e salino foram isoladas na maior parte do meio de cultura NFb.

Nem todas as estirpes bacterianas halotolerantes e osmotolerantes no teste *in vitro* mostraram-se eficientes na microbiolização das sementes de milho sob os estresses hídrico e salino.

Através desta pesquisa inferimos que estirpes bacterianas (3, 5, 8, 9, 12.2, 14, 19, 38 e 40) como promissoras candidatas a bactérias promotoras de crescimento em plantas sob condições de estresse hídrico e salino.

Pesquisas que visam análise de osmolaridade e salinidade são importantes para selecionar bactérias promotoras de crescimento em plantas para ser usadas como inoculante em áreas susceptíveis à seca.

Compreender os efeitos das estirpes bacterianas através da inoculação das sementes em condições de estresses hídrico e salino nos permitirá uso eficaz de técnicas de baixo consumo, sustentáveis e ecologicamente corretas para o melhor gerenciamento de estresses em plantas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, R.; et al. Halotolerant PGPR: A hope for cultivation of saline soils. **Journal of King Saud University–Science**. v. 31, p. 1195–1201, March, 2019.

ABEDINZADEH, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. **Biotechnology Reports**. v. 20, p. 1-12, 2018.

ALLAKHVERDIEV, S. I.; et al. Ionic and Osmotic Effects of NaCl-Induced Inactivation of Photosystems I and II in *Synechococcus* sp.1. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1047–1056, July, 2000.

AMIN, A. B.; et al. Crassulacean Acid Metabolism Abiotic Stress-Responsive Transcription Factors: a Potential Genetic Engineering Approach for Improving Crop Tolerance to Abiotic Stress. **Frontiers in Plant Science**. v. 10, p. 1-8, February, 2019.

ARORA, N. K.; et al. Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. **Journal of Advanced Research**. v. 26, p. 69–82, July, 2020.

ARORA, N. K.; MISHRA, J. Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. **Applied Soil Ecology**. v. 107, p. 405-407, 2016.

BANO, A.; FATIMA, M. Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. **Biol Fertil Soils**. v. 45, p. 405–413, January, 2009.

BARTRAN, A. K.; et al. Exploring links between pH and bacterial community composition in soils from the Craibstone Experimental Farm. **FEMS Microbiol Ecol**. v. 87, p. 403–415, October, 2014.

BOMFIM, C. S. G.; et al. Endophytic bacteria naturally inhabiting commercial maize seeds occupy different niches and are efficient plant growth-promoting agentes. **Symbiosis**. v. 81, p. 255–269, 2020.

BONATELLI, M.L.; et al. Beneficial Plant-Associated Microorganisms From Semiarid Regions and Seasonally Dry Environments: A Review. **Frontiers in Microbiology**. v. 11, p. 1-16, January, 2020.

BUKHAT, S.; et al. Communication of plants with microbial world: Exploring the regulatory networks for PGPR mediated defense signaling. **Microbiological Research**. v. 238, p. 1-20, March, 2020.

BULGARELLI, D.; et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Rev. Plant Biol**. v. 64, p. 807-838, January, 2013.

CARDOSO, P.; et al. Bacteria from nodules of wild legume species: Phylogenetic diversity, plant growth promotion abilities and osmotolerance. **Science of the Total Environment**. v. 645, p. 1094–1102, July, 2018.

CARDOSO, M. J.; et al. Comportamento de cultivares de milho no estado do Piauí: biênio 1995/1996. **Boletim de pesquisa** 17. Teresina: EMBRAPA-CPANN. p.20, 1997.

CARVALHO, H. W. L.; GAMA, E. E. G.; PACHECO, C. A. P. BRS Gorutuba - Variedade de milho superprecoce. **Comunicado Técnico** 104. Aracaju: Embrapa, p. 4, February, 2010.

CARVALHO, H. W. L.; et al. Comportamento de cultivares de milho na região nordeste do Brasil no ano de 1997. **Rev. Cient. Rural**. v. 4, n 1, p 35-46, 1999.

CASTRO, F. C.; ARAÚJO, J. F.; SANTOS, A. M. Susceptibility to soil salinization in the quilombola community of Cupira - Santa Maria da Boa Vista - Pernambuco – Brazil. **Catena**. v. 179, p. 175–183, April, 2019.

COLLIER, R. J.; RENQUIST, B. J.; XIAO, Y. A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. **J. Dairy Sci**. v. 100, p. 10367–10380, August, 2019.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos safra 2020/2021 – Décimo primeiro levantamento**, Brasília, v. 8, n. 11. p. 1-108, August, 2021.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos safra 2020/2021 – Décimo segundo levantamento**, Brasília, v. 8, n. 12. p. 1-97, August, 2021.

CSONKA, L. N. Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Osmotic Stress. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 121-147, March, 1989.

DARYANTO, S.; WANG, L.; JACINTHE, P. A. Drought effects on root and tuber production: A meta-analysis. **Agricultural Water Management**. v. 176, p. 122–131, May, 2016.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE V. O.; BALDANI; V. L. D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. p. 38.  
(Documento Nº 110)

DONG, Z-Y.; et al. Transcriptomic analysis of two endophytes involved in enhancing salt stress ability of *Arabidopsis thaliana*. **Science of the Total Environment**. v. 686, p. 107–117, June, 2019.

DUBEY, A.; et al. Soil microbiome: a key player for conservation of soil health under changing climate. **Biodiversity and Conservation**. v. 28, p. 2405–2429, February, 2019.

EGAMBERDEIVA, D.; et al. Bacteria able to control foot and root rot and to promote growth of cucumber in salinated soils. **Biol Fertil Soils**. v. 47, p. 197-205, December, 2010.

EGAMBERDEIVA, D; et al. Alleviation of salt stress of symbiotic *Galega officinalis* L. (goat's rue) by co-inoculation of *Rhizobium* with root-colonizing *Pseudomonas*. **Plant Soil**. v. 369, p. 453–465, January, 2013.

EGAMBERDIEVA, D.; et al. Impact of soil salinity on the plant-growth – promoting and biological control abilities of root associated bacteria. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 24, p. 1601-1608, July, 2017.

EKE, P.; et al. Endophytic bacteria of desert cactus (*Euphorbia trigonas* Mill) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Microbiological Research**. v. 228, p. 1-15, July, 2019.

EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-IPA. CMS 36/BR 5036: Milho para Chapada do Araripe. **Folders**. Recife, p. 4, 1990.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. E. L.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO J. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 6, p. 2790–2798, June, 2001.

ETESAMI, H.; GLICK, B. R. Halotolerant plant growth–promoting bacteria: Prospects for alleviating salinity stress in plants. **Environmental and Experimental Botany**. v. 178, p. 1-27, May, 2020.

ETESAMI, H; MAHESHWARI, D K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 156, p. 225-246, March, 2018.

FAN, K.; et al. Rhizosphere-associated bacterial network structure and spatial distribution differ significantly from bulk soil in wheat crop fields. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 113, p 275-284, June, 2017.

FAROOQ, M. Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. A review. **Agron. Sustain Dev**. v. 35, p. 461-481, 2015.

FERREIRA D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Cienc e Agrotecnologia**. v. 35, p. 1039–1042, 2011.

FINCHEIRA, P.; et al. Growth promotion of *Lactuca sativa* in response to volatile organic compounds emitted from diverse bacterial species. **Microbiological Research**. v. 193, p. 39–47, September, 2016.

FORTMEIER, R.; SCHUBERT, S. Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): the role of sodium exclusion. **Plant. Cell and Environment**. v. 18, p. 1041-1047, 1995.

GARCÍA, J. E.; et al. *In vitro* PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. **Microbiological Research**. v. 202, p. 21–29, April, 2017.

GOMES, L. S.; FURTADO, A. C. R.; SOUZA, M. C. A Sílica e suas Particularidades. **Rev. Virtual Quim**. v. 10, n. 4, p. 1-22, August, 2018.

GARNICA-VERGARA, A.; et al. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* functioning. **New Phytologist**. v. 209, p. 1496–1512, September, 2015.

GOUDA, S.; et al. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**. v. 206, p. 131-140, August, 2018.

GAO, J. L.; et al. *Caulobacter zeae* sp. nov. and *Caulobacter radices* sp. nov., novel endophytic bacteria isolated from maize root (*Zea mays* L.). **Systematic and Applied Microbiology**. v. 41, p. 604-610, August, 2018.

GLICK. B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**. v. 169, ed 1, p. 30-39, 2014

GUO, J.; et al. Roles of endophytic bacteria in *Suaeda salsa* grown in coastal wetlands: Plant growth characteristics and salt tolerance mechanisms. **Environmental Pollution**. v. 287, p. 1-10, June, 2021.

GUTIÉRREZ-LUNA, F. M.; et al. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. **Symbiosis**. v. 51, p. 75–83, May, 2010.

HAMMER Ø, Harper DAT, Ryan PD et al. PaSt: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaentologia Electron**. v. 4, p. 5–7, 2011.

HOU, L.; et al. Effect of dark septate endophytes on plant performance of *Artemisia ordosica* and associated soil microbial functional group abundance under salt stress. **Applied Soil Ecology**. v. 165, p. 1-13, March, 2021.

HU, Y.; et al. Short-term effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. **Environmental and Experimental Botany**. v.60, p. 268-275, 2007.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por Box-PCR. **Comunicado Técnico 58**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 6 p.

HUNGRIA, M.; SILVA K. **Manual de Curadores de Germoplasma Micro-organismos: Rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Brasília: Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 21 p. (Documentos 333- 332).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Conheça cidades e estados do Brasil**. Brasília: 2022. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/araripina/panorama>>. Acesso em: 20 fev. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Conheça cidades e estados do Brasil**. Brasília: 2022. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/serra-talhada/panorama>>. Acesso em: 20 fev. 2022.

JIA, P.; Inversion of soil pH during the dry and wet seasons in the Yinbei region of Ningxia, China, based on multi-source remote sensing data. **Geoderma Regional**. v. 25, p. 1-9, April, 2021.

KASIM, W. A.; et al. Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth Promoting Bacteria. **J Plant Growth Regul**. v. 32, p. 122–130, April, 2013.

KAUSHAL, M; WANI S. P. Rhizobacterial-plant interactions: Strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. v. 231, p 68-78, September, 2016.

KAVAMURA, V. N.; et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**. v. 168, p. 183–191, December, 2013.

KOMARESOFLA, B. R. Improved growth and salinity tolerance of the halophyte *Salicornia* sp. by co-inoculation with endophytic and rhizosphere bacteria. **Applied Soil Ecology**. v. 138, p. 160–170, February, 2019.

KRISHNAMOORTHY, R.; et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and associated bacteria isolated from salt-affected soil enhances the tolerance of maize to salinity in coastal reclamation soil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 231, p. 233–239, July, 2016.

KUMAR, A.; VERMA, J. P. Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? **Microbiological Research**. v. 207, p. 41–52 , November, 2018.

LIU, W.; SIKORA, E.; PARK, S-W. Plant growth-promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* CR1, upregulates dehydration-responsive genes, RD29A and RD29B, during priming drought tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 156, p. 146-154, August, 2020.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stress. **Academic Press**. 2 ed, p. 365-434, New York, 1980.

LOBO, L. L. B. **Potencial de bactérias endofíticas na promoção de crescimento em plantas de milho**. 2018. 55 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal, Jaboticabal-SP, 2018.

- MAGALHÃES, P. C.; et al. **Fisiologia do Milho**. Sete Lagoas: Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002. 1-22 p. (Circular Técnica 22).
- MARAG, P. S.; SUMAN, A. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). **Microbiological Research**. v. 214, p. 101–113, May, 2018.
- MARQUES, A. P. G. C.; et al. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 42, p. 1229-1235, April, 2010.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; et al. Plant microbiota modified by plant domestication. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 43, p. 1-9, June, 2020.
- MARULANDA, A.; et al. Drought Tolerance and Antioxidant Activities in Lavender Plants Colonized by Native Drought-tolerant or Drought-sensitive *Glomus* Species. **Microbial Ecology**. v. 54, p. 543-552, April, 2007.
- MEDEIROS, B. P. Estresse hídrico simulado por polietileno glicol 6000: um estudo sobre os efeitos em plantas de tomate, *Herbaspirillum seropedicae* e o potencial da inoculação na resistência ao estresse. 2013. 92 f. **Dissertação** (mestrado) - Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro Campos dos Goytacazes – RJ, 2013
- LOBO, L. L. B. **Potencial de bactérias endofíticas na promoção de crescimento em plantas de milho**. 2018. 55 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal, Jaboticabal-SP, 2018.
- MONTÁNEZ, A.; et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**. v. 58, p. 21-28, February, 2012.
- MOREIRA, H.; et al. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria benefit maize growth under increasing soil salinity. **Journal of Environmental Management**. v. 257, p. 1-12, December, 2020.
- MOREIRA, L. C. J.; TEIXEIRA, A. S.; GALVÃO, L. S. Laboratory Salinization of Brazilian Alluvial Soils and the Spectral Effects of Gypsum. **Remote Sens**. v. 6, p. 2647-2663, March, 2014.
- MOUTIA, J-F. Y.; Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant Soil**. v. 337, p. 233–242, August, 2010.
- NASCIMENTO, R. C.; et al. Maize-associated bacteria from the Brazilian semiarid region boost plant growth and grain yield. **Symbiosis**. v. 83, p. 347-359, 2021.

- NAVEED, M.; et al. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD1. **Environmental and Experimental Botany**. v. 9, p. 30–39, September, 2014.
- OVERBEEK, L. S. V.; SAIKKONEN, K. Impact of Bacterial–Fungal Interactions on the Colonization of the Endosphere. **Trends in Plant Science**. v. 21, p. 230-242, n. 3, March, 2016.
- OLIVEIRA, I. J.; et al. Cultivar BRS 4107: Nova variedade de milho para o Amazona. **Comunicado Técnico 150**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, p. 8, December, 2020.
- PATHANIA, P.; BHATIA, R.; KHATRI, M. Cross-competence and affectivity of maize rhizosphere bacteria *Bacillus* sp. MT7 in tomato rhizosphere. **Scientia Horticulturae**. v. 272, p. 1-9, May, 2020.
- PRIYA, P.; ANEESH, B.; HARIKRISHNAN, K. Genomics as a potential tool to unravel the rhizosphere microbiome interactions on plant health. **Journal of Microbiological Methods**. v. 185, p. 1-21, 2021.
- PEDROTTI, A.; et al. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v. 19, n. 2, p. 1308-1324, August, 2015.
- POTTS, M. Desiccation Tolerance of Prokaryotes. **Microbiological Reviews**. v. 58, n. 4, p. 755-805, december, 1994.
- RANI, S.; KUMAR, P.; SUNEJA, P. Biotechnological Interventions for Inducing Abiotic Stress tolerance in Crops. **Plant Gene**. v. 27, p. 1-12, June, 2021.
- RATH, K. M.; ROUSK, J. Salt effects on the soil microbial decomposer community and their role in organic carbon cycling: A review. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 81, p. 108-123, November, 2015.
- RODRIGUEZ, P. A.; et al. Systems Biology of Plant-Microbiome Interactions. **Molecular Plant**. v. 12, p. 804-821, June, 2019.
- ROJAS-TAPIAS, D.; et al. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Applied Soil Ecology**. v. 61, p. 264–272, January, 2012.
- SANDHYA, V.; et al. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. **Biol. Fertil Soils**. v. 46, p. 17-26, September, 2009.
- SANDHYA, V.; et al. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. **Plant Growth Regul.** v. 62, p. 21–30, May, 2010.

SANTANA, S. A.; et al. Inoculation of plant growth-promoting bacteria attenuates the negative effects of drought on *sorghum*. **Archives of Microbiology**. v. 202, p. 1015–1024, January, 2020.

SANTOS, L. F.; OLIVARES, F. L. Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. **Current Plant Biology**. v. 26, p. 1-16, January, 2021.

SARAVANAKUMAR, D.; et al. Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. **Acta Physiol Plant**. v. 33, p. 203-209, June, 2011.

SAVARY, S.; et al. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**. p. 1-52, 2019.

SHENG, M.; et al. Influence of arbuscular mycorrhiza on organic solutes in maize leaves under salt stress. **Mycorrhiza**. v. 21, p. 423–430, December, 2011.

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, p. 123-131, December, 2015.

SUN, T.; et al. Influences of high-level atmospheric gaseous elemental mercury on methylmercury accumulation in maize (*Zea mays* L.). **Environmental Pollution**. v. 265, p. 1-9, May, 2020.

TAFRESHI, S. A. H.; et al. Response of in vitro-regenerated *Myrtus communis* L. shoots to PEG-induced water stress. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 34, p. 1-8, May, 2021.

TOMER, S.; SUYAL, D.C.; GOEL, R. Biofertilizers: A Timely Approach for Sustainable Agriculture. In: CHOUDHARY, D. K.; TUTEJA, A.V. N. **Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture**. Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2016. 384-404.

TRUYENS S.; WEYENS N.; CUYPERS A.; VANGRONSVELD J. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. **Environmental Microbiology Reports**. v. 7, p. 40–50, June, 2014.

UROZ, S.; COURTY, P. E.; OGER, P. Plant Symbionts Are Engineers of the Plant-Associated Microbiome. **Trends in Plant Science**. v. 24, n 10, p. 905-916, October, 2019.

VAISHNAV, A.; et al. Endophytic Bacteria in Plant Salt Stress Tolerance: Current and Future Prospects. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 38, p. 650–668, November, 2019.

VAN DEYNZE, A.; et al. Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota. **PLOS Biology**. v. 16, n 8, p. 1-21, August, 2018.

VARDHARAJULA, S.; et al. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. **Journal of Plant Interactions**. v. 6, n. 1, p. 1-14, March, 2011.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**. v.5., n.1, p. 25-40. 1994.

VERSALOVIC, J. ; LUPSKI J. J. R. Interspersed Repetitive Sequences in Bacterial Genomes. *In*: BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. **Bacterial genomes : physical structure and analysis**. Springer Science+Business Media LLC, 1997. 38-48 p.

VILLELA, F. A.; FILHO, L. D.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesq. agropec. bras.** v. 26, p.1957-1968, November/December. Brasília, 1991.

VURUKONDA, S. S. K. P.; et al. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**. v. 184, p. 13-24, December, 2016.

WALTERS, W. A.; et al. Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. **PNAS**. v. 115, n. 28, p. 7368–7373, July, 2018.

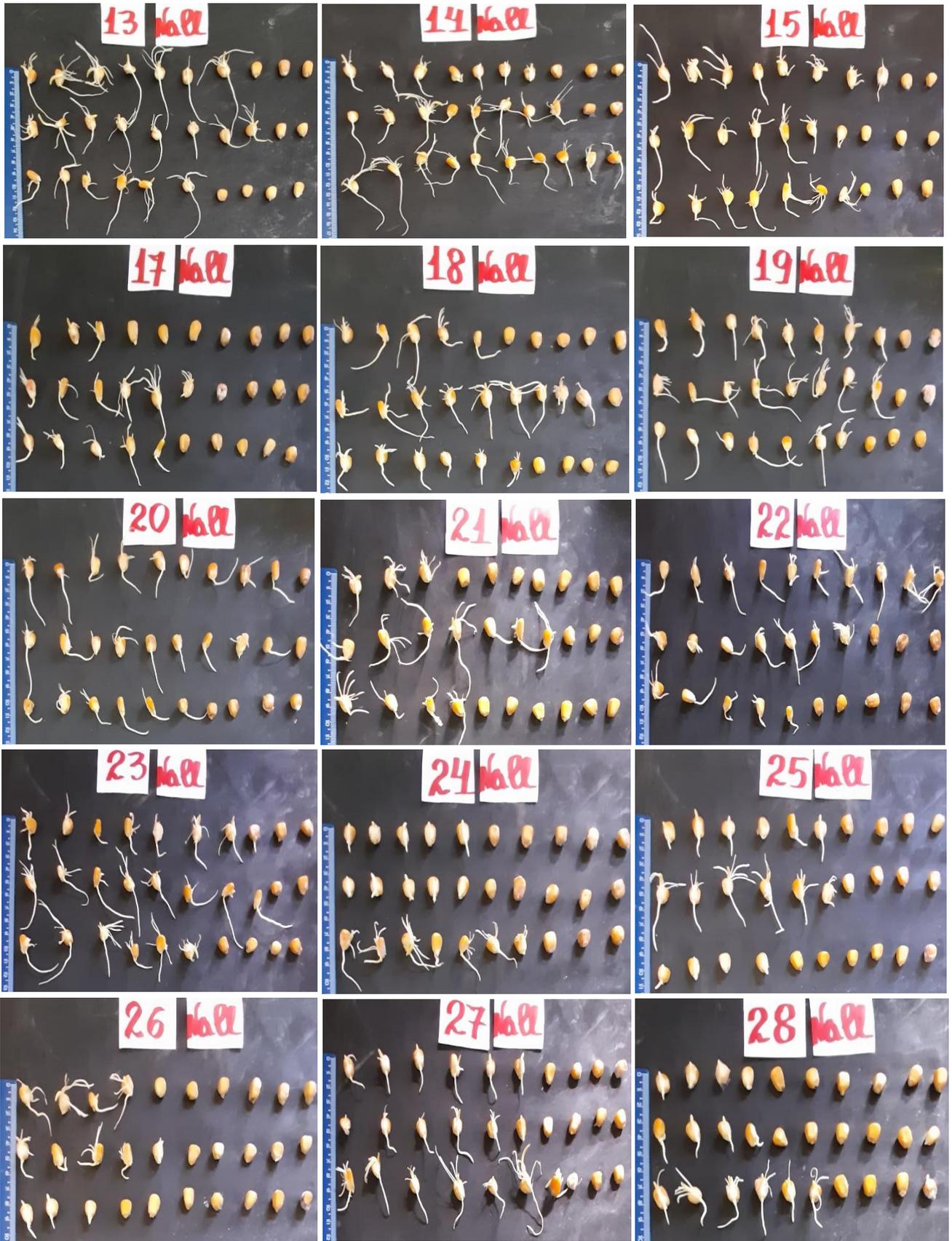
YAN, N.; et al. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. **International Soil and Water Conservation Research**. v. 3, p. 316-323, December, 2015.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n.7, p. 2271-2277, 1991.

ZHANG, L.; FENG, G.; DECLERCK, S. Signal beyond nutrient, fructose, exuded by an arbuscular mycorrhizal fungus triggers phytate mineralization by a phosphate solubilizing bacterium. **The ISME Journal**. v. 12, p. 2339–2351, June, 2018.

### 9. ANEXO







Demonstração do desempenho das estirpes bacterianas na microbiolização das sementes de milho na germinação e comprimento da raiz em condições de estresse salino a concentração 1,0% de NaCl.







Demonstração do desempenho das estirpes bacterianas na microbiolização das sementes de milho na germinação e comprimento da raiz em condições de estresse hídrico a pressão osmótica a -0,2MPa.