

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS ARAPIRACA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

ALAIDE MARIA SILVA SANTOS

**EFEITOS BENÉFICOS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE NÓDULOS
DE LEGUMINOSAS DA CAATINGA NO CRESCIMENTO DO MILHO**

ARAPIRACA

2020

Alaide Maria Silva Santos

Efeitos benéficos de bactérias endofíticas isoladas de nódulos de leguminosas da Caatinga no
crescimento do milho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Flávia de Barros Prado Moura

Coorientador: Dr. Jakson Leite

Arapiraca

2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Biblioteca *Campus* de Arapiraca - BCA

Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Gerlane Costa Silva de Farias CRB4/1802

S237e Santos, Alaide Maria Silva
Efeitos benéficos de bactérias endofíticas isoladas de nódulos de leguminosas da Caatinga no crescimento do milho / Alaide Maria Silva Santos. – Arapiraca, 2020.

73 f.: il.

Orientadora: Flávia de Barros Prado Moura
Coorientador: Jakson Leite

Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Arapiraca, 2020.

Bibliografia: f. 61-69

1. Milho 2. Bactéria endófitas 3. Crescimento (Milho) I. Moura, Flávia de Barros Prado. II. Leite, Jakson. III. Título.

CDU 633.15

ALAIDE MARIA SILVA SANTOS

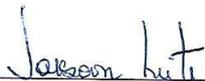
**EFEITOS BENÉFICOS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE
NÓDULOS DE LEGUMINOSAS DA CAATINGA NO CRESCIMENTO DO
MILHO**

Dissertação submetida ao Corpo
Docente do Programa de Pós-
Graduação em Agricultura e
Ambiente da Universidade Federal de
Alagoas e aprovada em 18 de
fevereiro de 2020.

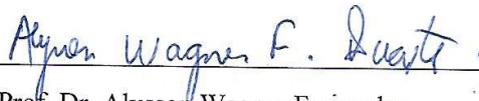


Prof.^a Dr.^a Flávia de Barros Prado Moura
Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Campus Arapiraca

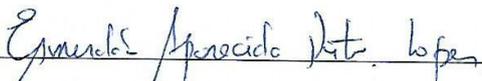
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Jakson Leite
Universidade Federal do Maranhão
Campus Bacabal



Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes
Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Campus Arapiraca



Prof.^a Dr.^a Esmeralda Aparecida Porto Lopes
Universidade Estadual de Alagoas – UNEAL
Campus Arapiraca

*A todos que contribuíram direta e indiretamente para
realização de mais um sonho, vocês foram essenciais.*

DEDICO e OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me fortalecer, por não me desamparar, por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho até aqui, sem dúvidas isso só foi possível com ele ao meu lado;

Aos meus pais (Edson e Rosiete), por me proporcionarem uma educação digna e por me ensinarem que a educação é o melhor caminho, por me darem amor e permanecerem sempre ao meu lado;

Ao meu esposo José Luiz, pela parceria, pelo apoio necessário e por sempre me mostrar que eu sempre posso e sou capaz;

Ao meu irmão João Antônio, pelo incentivo e por sempre me mostrar que estudando a gente consegue chegar a uma carreira digna;

A minha orientadora Flávia Moura, pela orientação e por acompanhar o trabalho durante esses 24 meses;

Ao meu coorientador Jakson Leite, que durante os 24 meses me acompanhou pontualmente, dando todo o auxílio necessário para elaboração do projeto, além de tudo, agradeço por todos os ensinamentos em toda essa jornada e por plantar a semente da curiosidade, da resiliência, da busca por novos conhecimentos e por não me deixar acomodar;

Aos meus amigos Alice, Averlane, Laylton, Josy e Wilisson, pela convivência e por se mostrarem presentes quando necessário;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente pela oportunidade de fazer parte da realização de vários conhecimentos adquiridos;

Aos professores do PPGAA, que através de seus ensinamentos permitiram que eu pudesse hoje está concluindo essa dissertação;

A Roberta, pós-doutoranda do PPGAA, com quem aprendi muito durante essa trajetória, inclusive a ser uma pessoa melhor;

Ao Sivaldo, técnico do laboratório de química dos solos, meu muito obrigado pelo auxílio nas análises de nutrientes e pela pessoa que é, esforçado e muito presente, seus ensinamentos foram essenciais para a conclusão da pesquisa;

Ao professor Vieira, por deixar se fazer uso do laboratório de fisiologia vegetal e de todos os reagentes disponibilizados;

Aos colegas do curso de mestrado, por fazerem esse percurso ser mais alegre e não tão estressante;

A Ana Jéssica e Jéssica Moreira, por disponibilizar a coleção de bactérias e por serem sempre tão amáveis e solícitas;

Ao professor Alysso, por sempre deixar se fazer uso dos equipamentos necessários para o crescimento das bactérias no laboratório de genética;

Ao professor Marcos, pela utilização do moinho de facas e do destilador de nitrogênio;

Ao Aldeído, pelo auxílio nas análises de fósforo;

As bactérias, por permitirem que eu as estudasse e se mantiveram parceiras durante toda a pesquisa;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas pela ajuda financeira, permitindo minha dedicação exclusiva ao mestrado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico também pelo apoio financeiro, permitindo minha total dedicação;

Enfim, agradeço a todas as pessoas que fizeram parte dessa etapa decisiva e de grande conhecimento na minha vida.

RESUMO

Bactérias endofíticas de nódulos de leguminosas têm sido amplamente isoladas em diversos estudos. No entanto, o potencial destas bactérias em promover o crescimento de plantas ainda é pouco explorado. O trabalho objetivou identificar o potencial de promoção de crescimento de plantas em isolados bacterianos provenientes de nódulos de leguminosas da caatinga. Para isso, realizou-se três experimentos com níveis de complexidade diferentes. Os três experimentos realizaram os mesmos processos de crescimento do inóculo a uma concentração de $5,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ e de desinfestação das sementes de milho. Um total de 14 bactérias isoladas de nódulos de leguminosas foram identificadas pelo sequenciamento do gene 16S RNA e testadas. No primeiro experimento as sementes permaneceram 1 hora em imersão do crescimento bacteriano ($5,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹) correspondente a cada tratamento e o controle sem inóculo imerso em meio de cultura, logo após foram colocadas em folhas de papel germitest e inseridas na B.O.D a 25 °C. As variáveis analisadas foram comprimento de raiz e número de raízes laterais com quatro e oito dias. O segundo experimento foi montado em casa de vegetação em DBC, os tratamentos corresponderam a 14 bactérias e dois controles, um sem inoculação e um com adubação nitrogenada (15 mg de N), o substrato utilizado foi a vermiculita e as sementes foram inoculadas com 1 mL do crescimento bacteriano. As variáveis analisadas foram a intensidade verde, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e massa seca total. O terceiro experimento contou com 12 tratamentos, 9 bactérias mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N, três controles (sem inóculo, um com 35 kg ha⁻¹ de N e um com 70 kg ha⁻¹ de N), as sementes foram inoculadas com 1,2 mL do crescimento bacteriano. As variáveis analisadas foram a intensidade verde, altura, massa seca da parte aérea e acúmulo de nutrientes. Com relação ao primeiro experimento, 13 estirpes bacterianas promoveram ($p < 0,05$) maior crescimento radicular quando comparado com o controle, em relação ao número de raízes laterais as bactérias pareceram inibir o aumento. As estirpes representaram os gêneros *Bacillus* (4), *Brevundimonas* (1), *Enterobacter* (1), *Leifsonia* (2), *Pseudomonas* (1), *Paenibacillus* (2) e *Roseomonas* (2). No segundo experimento, a intensidade verde (índice SPAD), massa seca da raiz (MSR), massa da parte aérea seca (MSPA) e massa seca total (MST) foram determinadas aos 30 dias após a emergência. A estirpe *Bacillus* ShS9 promoveu aumento ($p < 0,005$) do índice SPAD e MSR. *Bacillus* sp. ShS3 promoveu ($p < 0,005$) a MSR e MPAS. *Roseomonas* sp. SsP7 induziu maior ($p < 0,005$) MSR e a estirpe *Bacillus* AD47 superaram o controle e promoveu a MSPA. Todas as estirpes promoveram a MST e o comprimento da raiz. No terceiro experimento a estirpe *Paenibacillus* SsS3 promoveu o aumento ($p < 0,005$) da altura da planta e MPAS, superando o controle com 70 kg ha⁻¹ de N. Os isolados *Roseomonas* SsP7, *Pseudomonas* ShP11, *Brevundimonas* ShS2 e *Bacillus* AD47 promoveram aumento ($p < 0,005$) da MPAS, mostrando desempenho semelhante ao tratamento com 70 kg ha⁻¹ de N. Essas mesmas estirpes promoveram o acúmulo de nutrientes minerais em plantas de milho. O melhor desempenho dos isolados do gênero *Bacillus* confirma o que é encontrado em muitos trabalhos, que esse gênero está relacionado diretamente à promoção de crescimento de plantas. Bactérias endofíticas de nódulos de leguminosas arbóreas que não são rizóbios podem promover o crescimento de plantas de milho. Estudos adicionais precisam ser conduzidos para elucidar os mecanismos que estes isolados bacterianos utilizam para a promoção de crescimento das plantas de milho.

Palavras-chave: Inoculação. Milho. Bactérias promotoras do crescimento de plantas.

ABSTRACT

Endophytic bacteria from legume nodules have been widely isolated in several studies. However, the potential of these bacteria to promote plant growth is still little explored. This paper aimed to identify the potential of promoting plant growth in bacterial isolates from nodules of legumes from the caatinga. For this, three experiments were assembled out with different levels of complexity. The three experiments performed the same processes of growing the inoculum at a concentration of 5.2×10^7 UFC mL⁻¹ and disinfecting the maize seeds. A total of 14 bacteria isolated from legume nodules were identified by sequencing the 16S RNA gene and tested. In the first experiment, the seeds remained 1 hour in immersion of the bacterial growth (5.2×10^7 CFU mL⁻¹) corresponding to each treatment and the control without inoculum immersed in culture middle, immediately after they were placed on sheets of germitest paper and inserted. The variables analyzed were root length and number of lateral roots at four and eight days. The second experiment was carried out in a greenhouse in DBC, the treatments corresponded to 14 bacteria and two controls, one without inoculation and one with nitrogen fertilization (15 mg of N), the substrate used was vermiculite and the seeds were inoculated with 1 mL of bacterial growth. The variables analyzed were green intensity, root dry matter, aerial part dry matter and total dry matter. The third experiment had 12 treatments, 9 bacteria plus the addition of 35 kg ha⁻¹ of N, three controls (without inoculum, one with 35 kg ha⁻¹ of N and one with 70 kg ha⁻¹ of N), the seeds were inoculated with 1.2 mL of bacterial growth. The variables analyzed were green intensity, height, dry shoot weight and nutrient accumulation. Regarding the first experiment, 13 bacterial strains promoted ($p < 0.005$) greater root growth when compared to the control, in relation to the number of lateral roots, the bacteria seemed to inhibit the increase. The strains represented the genera *Bacillus* (4), *Brevundimonas* (1), *Enterobacter* (1), *Leifsonia* (2), *Pseudomonas* (1), *Paenibacillus* (2) and *Roseomonas* (2). In the second experiment, the green intensity (SPAD index), dry root mass (MSR), dry shoot weight (MSPA) and total dry mass (MST) were determined at 30 days after emergence. The strain *Bacillus* ShS9 promoted an increase ($p < 0.005$) in the SPAD and MSR index. *Bacillus* ShS3 promoted ($p < 0.005$) MSR and MPAS. *Roseomonas* sp. SsP7 induced an increase in ($p < 0.005$) MSR and the strain *Bacillus* AD47 overcame control and promoted MSPA. All strains promoted MST and root length. In the third experiment, the strain *Paenibacillus* SsS3 promoted an increase ($p < 0.005$) of plant height and MPAS, surpassing the control with 70 kg ha⁻¹ of N. The isolates *Roseomonas* SsP7, *Pseudomonas* ShP11, *Brevundimonas* ShS2 and *Bacillus* AD47 promoted an increase ($p < 0.005$) in MPAS, showing performance similar to the treatment with 70 kg ha⁻¹ of N. These same strains promoted the accumulation of mineral nutrients in maize plants. The better performance of isolates of the genus *Bacillus* confirms what is found in many studies, that this genus is directly related to the promotion of plant growth. Endophytic bacteria from nodules of tree legumes that are not rhizobia can promote the growth of maize plants. Additional studies need to be conducted to elucidate the mechanisms that these bacterial isolates use to promote the growth of corn plants.

Keywords: inoculation. Maize. Plant growth-promoting bacteria.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mecanismos de promoção do crescimento de plantas por rizobactérias 20
- Figura 2 - (A) 14 estirpes de bactérias crescidas ($5,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹). (B) Incubadora shacker (Agitadora) 32
- Figura 3 - (A) Sementes de milho com quatro dias após a germinação. (B) Sementes com oito dias após a germinação e preparadas para a medição das varáveis 32
- Figura 4 - Experimento montado na casa de vegetação da Universidade Federal de Alagoas *campus* Arapiraca 33
- Figura 5 - (A) Sementes de milho com um dia de germinação. (B) Desbaste e segunda inoculação 34
- Figura 6 - (A) Plantas de *Zea mays* L. após a germinação, (B) Sete dias antes da coleta 35
- Figura 7 - Diluição das amostras de K resultantes da solução com HCl 37
- Figura 8 - Amostras de material foliar para análise de P no bloco digestor 38
- Figura 9 - (A) Análise de comprimento das raízes de milho com quatro dias. (B) Análise de comprimento das raízes de milho com oito dias em resposta a bactérias promotoras do crescimento de plantas derivadas de leguminosas da caatinga. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott 42
- Figura 10 - (A) Número de raízes laterais de plântulas de milho com quatro dias. (B) Número de raízes laterais de plântulas de milho com oito dias em resposta a bactérias promotoras do crescimento de plantas derivadas de leguminosas da caatinga. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott 44
- Figura 11 - Aumento da Intensidade verde em resposta a bactérias promotoras de crescimento de plantas em milho utilizando substrato estéril. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. 45

- Figura 12 - Promoção da massa seca da raiz (A) e massa seca da parte aérea (B) por bactérias promotoras de crescimento de plantas em milho utilizando substrato estéril. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott 46
- Figura 13 - Promoção da massa seca total por bactérias promotoras de crescimento de plantas em milho utilizando substrato estéril. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott 47
- Figura 14 - Intensidade verde em resposta a bactérias promotoras de crescimento de plantas em milho com solo mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott 48
- Figura 15 - Altura em resposta a bactérias promotoras de crescimento de plantas em milho com solo mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott 49
- Figura 16 - Aumento da matéria seca da parte aérea em resposta a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott 51
- Figura 17 - A) Acúmulo e B) Eficiência de fósforo em milho em resposta a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott 52
- Figura 18 - Acúmulo de nitrogênio em milho em resposta a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não

	diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott	55
Figura 19 -	Eficiência do uso de nitrogênio em milho em resposta a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha ⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott	56
Figura 20 -	Acúmulo de potássio em plantas de milho em resposta a bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha ⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott	57
Figura 21 -	Eficiência do uso de potássio em milho em resposta a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha ⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Alguns biopesticidas disponíveis comercialmente para controle de doenças em plantas	24
Quando 2 -	Análise do solo utilizado para o cultivo de <i>Zea mays</i> L.	36
Quadro 3 -	Identificação molecular dos isolados com base no gene 16S rRNA	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Bactérias promotoras de crescimento de plantas	16
2.2	Bactérias endofíticas de nódulos de leguminosas	18
2.3	Mecanismos de promoção de crescimentos de plantas por bactérias	19
2.3.1	Mecanismos de ação diretos na promoção do crescimento de plantas por bactérias	20
2.3.1.1	<i>A fixação biológica de nitrogênio</i>	21
2.3.1.2	<i>Solubilização de fosfato</i>	21
2.3.1.3	<i>Síntese de fito-hormônios</i>	22
2.3.1.4	<i>Síntese de sideróforos</i>	23
2.3.2	Mecanismos de ação indiretos na promoção do crescimento de plantas por bactérias	23
2.3.2.1	<i>Controle de patógenos por bactérias promotoras de crescimento de plantas</i>	24
2.3.2.2	<i>Aumento da resistência vegetal a diferentes estresses ambientais</i>	25
2.4	Bactérias promotoras de crescimento na promoção e absorção de nutrientes essenciais para plantas	25
2.5	A cultura do milho (<i>Zea mays</i> L.)	27
3	MATERIAS E MÉTODOS	30
3.1	Origem das bactérias e condições de cultivo	30
3.2	Identificação molecular dos isolados	30
3.3	Experimento I (Teste de germinação e promoção do crescimento radicular de milho)	31
3.4	Experimento II (Promoção do crescimento de milho em substrato estéril)	33
3.5	Experimento III (Promoção do crescimento de milho em solo não estéril)	34
3.5.1	Determinações das concentrações de Potássio (K), Fósforo (P) e Nitrogênio (N) via matéria seca da parte aérea de <i>Zea mays</i> L.	36
3.5.1.1	<i>Determinação das concentrações de K foliar</i>	37
3.5.1.2	<i>Determinação das concentrações de P foliar</i>	38
3.5.1.3	<i>Determinação das concentrações de N foliar</i>	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

4.1	Identificação molecular com base do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos	41
4.2	Experimento I (Teste de germinação e promoção do crescimento radicular de milho)	41
4.3	Experimento II (Promoção do crescimento de milho em substrato estéril)	44
4.4	Experimento III (Promoção do crescimento de milho em solo não estéril)	48
5	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE A - RESUMO SUBMETIDO, ACEITO E APRESENTADO NA 5ª REUNIÃO NORDESTINA DE CIÊNCIA DO SOLO	71
	APÊNDICE B - RESUMO SUBMETIDO, ACEITO E APRESENTADO NO 70º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA EM 25 DE OUTUBRO DE 2019	72
	APÊNDICE C - CAPÍTULO DE LIVRO SUBMETIDO A STRICTO SENSO EDITORA EM 27 DE JANEIRO DE 2020	73
	ANEXO A - SOLUÇÃO DE NORRIS (MODIFICADA) PARA VASOS DE LEONARD	74

1 INTRODUÇÃO

As bactérias representam a comunidade microbiana mais comum dos solos, representando 95%, sendo que dentro dessa comunidade existem diversos tipos de bactérias, como, por exemplo, as que promovem o crescimento de plantas (GLICK, 2012; SPOLAOR *et al.*, 2016). Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) fazem parte desse total de microrganismos presentes no solo e são designadas como um grupo diversificado de microrganismos procarióticos que podem aumentar o crescimento das plantas por diversos mecanismos (IB *et al.*, 2009). Os mecanismos pelos quais essas bactérias promovem o crescimento das plantas são, a produção de fito-hormônios, solubilização de fosfato, mineralização de nutrientes, produção de sideróforos, regulação da biossíntese de etileno, controle biológico de patógenos e aumento da resistência vegetal a diferentes estresse abióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Além das BPCP promoverem o crescimento das plantas através da produção de fito-hormônios, a promoção do crescimento das plantas também pode ocorrer quando a bactéria facilita a aquisição de nutrientes minerais essenciais para o desenvolvimento das plantas (SANTOYO *et al.*, 2016), pois tendem a aumentar a acessibilidade e a concentração de nutrientes, tanto macro quanto micro, fixando ou bloqueando metais, seu suprimento para crescimento e produtividade das plantas (KUMAR, 2016). O nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e ferro (Fe) são nutrientes essenciais que desempenham um papel importante na produção agrícola. Devido às deficiências minerais de alguns nutrientes na maioria dos solos do mundo, por exemplo o N, há uma grande demanda de fertilizantes químicos para suprir essa deficiência (RASHID *et al.*, 2016). As BPCP podem promover mudanças na rizosfera e na arquiteturas das raízes das plantas, melhorando a aquisição e maior absorção dos nutrientes do solo (BREDA; ALVES; REIS, 2016).

Diante disso, é possível afirmar que diversos processos são mediados por esses microrganismos do solo que se associam a raízes de plantas e desempenham papéis importantes na ciclagem de nutrientes. A interação dessas bactérias com diversas plantas de interesse agrícola, por exemplo, tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao potencial biotecnológico evidenciado no aumento da produtividade das culturas, possibilidade de redução dos custos de produção, e a diminuição do uso de adubos nitrogenados, e consequentemente, melhor conservação dos recursos ambientais (MARIA e MOREIRA, 2010).

Dentre as principais BPCP empregadas nos cultivos agrícolas estão os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Agrobacterium* e *Enterobacter* (SILVA *et al.*, 1998). Gêneros de bactérias, como os citados anteriormente, são conhecidos por promoverem o crescimento vegetal, mesmo sendo considerados como organismos de vida livre ou podendo viver na rizosfera (BENIZRI; BAUDOIN; GUCKERT, 2001; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Parte das bactérias que vivem no solo podem colonizar o interior das raízes, e outros tecidos, da planta, sendo assim classificadas como endofíticas (DÖBEREINER; BALDANI; REIS, 1995). As bactérias endofíticas também são habitantes comuns da rizosfera. Portanto, foi sugerido que o microbioma endófito pode ser uma subpopulação das bactérias que habitam a rizosfera (GERMIDA *et al.*, 1998; MARQUEZ-SANTACRUZ *et al.*, 2010).

As BPCP têm sido encontradas em associação com diversas espécies de cereais (arroz, soja, milho) e gramíneas forrageiras. O milho atualmente é a segunda cultura mais importante na agricultura brasileira e tem desempenhado um papel importante em trabalhos com BPCP (GODOY, 2017). Durante anos, diversos trabalhos (SANTOYO *et al.*, 2016; MEYER *et al.*, 2015; PRAYITINO; ROLFE, 2010; ZHAO; XU; LAI, 2018; IBÁÑEZ *et al.*, 2009) relataram a simbiose entre bactérias e plantas, principalmente bactérias do grupo *Rizobium*, que são bactérias do solo capazes de se associarem com leguminosas onde podem residir na raiz estruturas especializadas, os nódulos, onde ocorre a fixação de nitrogênio. No entanto, bactérias encontradas nos nódulos, foram identificadas como sendo de outros gêneros e denominadas de bactérias endofíticas de nódulos, o papel que essas bactérias desempenha em relação a planta hospedeira é pouco conhecido (MEYER *et al.*, 2015).

Algumas bactérias endofíticas de nódulos são membros de gêneros conhecido por abrigar espécies que promovem o crescimento de plantas (IKEDA, 2014). Identificar a capacidade de promoção de crescimento de planta em bactérias endofíticas de nódulos indicaria o potencial papel destas bactérias na interação com leguminosas. Plantas da família Poaceae, como o milho, são sensíveis à inoculação com BPCP (CODEIRO, 2017) sendo, portanto, interessantes para prospectar o potencial de promoção de crescimento de plantas em bactérias endofíticas de nódulos. Recentemente, bactérias isoladas de nódulos de leguminosas de ocorrência na Caatinga alagoana foram classificadas como endofíticas de nódulos, pois não nodularam a leguminosa de origem (GUABIRABA; SOUZA, 2018). No entanto, o caráter promotor de crescimento de plantas não foi avaliado nestes isolados. Com base nisso, o trabalho teve como objetivo, identificar o potencial de promoção de crescimento de plantas de isolados bacterianos provenientes de nódulos de leguminosas da caatinga no *Zea mays* L.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bactérias promotoras de crescimento de plantas

O solo está repleto de formas de vida microscópicas, incluindo bactérias, fungos, actinomicetos, protozoários e algas. Dentre estes diferentes microrganismos, as bactérias são de longe a comunidade mais comum, representando 95%, sendo que dentro dessa comunidade existem diversos tipos de bactérias, como por exemplo bactérias que promovem o crescimento de plantas (GLICK, 2012; SPOLAOR *et al.*, 2016).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) são definidas como um grupo heterogêneo de bactérias de vida livre que podem se associar a rizosfera de plantas e que contribuem para o crescimento e desenvolvimento das plantas, promovendo diretamente o crescimento pela produção de ácido cianídrico, fito-hormônios (auxinas, citocininas, giberilinas), enzimas como a ACC-deaminase, mineralização de nutrientes, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos e aumento da absorção de nutrientes pelas raízes (CONN; NOWAK; LAZAROVITS, 1997) ou indiretamente pelo controle de fitopatógenos que atacam as raízes (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

As BPCP podem ser encontradas em associação na rizosfera de diversas espécies vegetais, como a cana de açúcar, milho, arroz, trigo, leguminosas, e muitas outras espécies importantes no manejo agrícola e florestal (MARIANO *et al.*, 2004; AHMED; KIBRET, 2014); (RASHID *et al.*, 2016). Benefícios que essas bactérias podem causar são evidenciados em trabalhos como o de Pedrinho e colaboradores (2010); Silva e colaboradores (2015) em que a inoculação favorece amplamente a cultura no ganho de biomassa total, tanto da parte aérea, como da raiz, além de ajudar essa cultura no equilíbrio de diversos estresses.

A interação das BPCP com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao potencial biotecnológico evidenciado no aumento da produtividade das culturas, possibilidade de redução dos custos de produção, a diminuição do uso de adubos nitrogenados, e, conseqüentemente, melhor conservação dos recursos ambientais (MARIA; MOREIRA, 2010). Estudos com bactérias promotoras de crescimento de plantas vem ganhando força desde o século passado. Trabalhos como os de Silva *et al.* (1998); Freitas e Pizzinatto (1991); Gomes (2000); Cattelan (1999); Mantovanello e Mello (1994); Peixoto *et al.* (1995); Silveira *et al.* (1995) e Assis *et al.* (1995) mostraram que os tratamentos com os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* promovem o comprimento de raízes de plântulas, além de aumentar a taxa germinativa e o peso seco.

Bactérias endofíticas são organismos que se caracterizam pela associação íntima com a planta hospedeira, podendo ou não promover benefícios a planta. A relação íntima com a planta e a capacidade de promover benefícios ao crescimento do hospedeiro fazem das bactérias alvos de interesse biotecnológico no setor agrícola, justamente por oferecerem a vantagem de estarem completamente compatibilizadas com o hospedeiro; e possibilitar a utilização de sementes ou plântulas já colonizadas por estirpes selecionadas antes das etapas de cultivo comercial pela prática da inoculação (DÖBEREINER; BALDANI; REIS, 1995).

Entre as principais BPCP endofíticas empregadas na agricultura estão os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*, *Agrobacterium* e *Enterobacter* (MARIANO *et al.*, 2004). Os efeitos benéficos promovidos pelas BPCP podem ser observados em plantas propagadas “*in vitro*” e “*in vivo*”, principalmente pelo aumento de área foliar, altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, redução do tempo de aclimatização, maior sobrevivência de mudas, controle de doenças e aumento de produtividade (BALDOTTO *et al.*, 2010).

O ambiente endofítico possui características mais favoráveis à expressão de genes promotores do crescimento vegetal que a rizosfera, como alta disponibilidade energética e baixa competitividade com outras espécies bacterianas (OLIVEIRA; URQUIADA; BALDANI, 2003). Gêneros de bactérias como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, são conhecidos por promoverem o crescimento vegetal, mesmo sendo considerados como organismos de vida livre ou de rizosfera (BENIZRI; BAUDOIN; GUCKERT, 2001; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

Todos esses gêneros, descritos como endófitos bacterianos, também são habitantes comuns da rizosfera. Portanto, foi sugerido que o microbioma endófito pode ser uma subpopulação das bactérias que habitam a rizosfera (GERMIDA *et al.*, 1998; MARQUEZ-SANTACRUZ *et al.*, 2010). O estabelecimento da simbiose associativa entre bactérias e plantas hospedeiras se dá em três passos: bactérias do solo se envolvem na rizosfera, se fixam à superfície radicular e, por fim, tornam a simbiose associativa efetiva (COMBES-MEYNET *et al.*, 2011).

Durante anos, diversos trabalhos relataram a simbiose entre bactérias e plantas, principalmente bactérias do grupo *rhizobium*, que são bactérias do solo capazes de se associarem com leguminosas onde podem residir na raiz ou induzir a formação de nódulos e promover a fixação biológica de nitrogênio para o hospedeiro. No entanto, nos últimos anos diversas bactérias isoladas de nódulos de leguminosas, foram identificadas como não

nodulantes e pertencentes a diversos gêneros e denominadas de bactérias endofíticas de nódulos (MEYER *et al.*, 2015). Muitas destas bactérias são membros de gêneros que apresentam traços promotores do crescimento de plantas, no entanto, as funções destas bactérias nos nódulos ainda são pouco conhecidas.

2.2 Bactérias endofíticas de nódulos de leguminosas

O fato de as bactérias impactarem positivamente na saúde das plantas fez com que estas criassem um microbioma para obter colonizadores bacterianos benéficos, incluindo aqueles que vivem dentro dos tecidos vegetais. Os endófitos bacterianos colonizam onipresentemente os tecidos internos das plantas, sendo encontrados em quase todas as plantas do mundo (SANTOYO *et al.*, 2016). Hallmann *et al.* (1997) propuseram que uma bactéria é considerada endofítica se for isolada de tecido desinfestado de superfície ou extraída de dentro da planta e se não prejudicar visivelmente a planta. No entanto, o autor não explica qual fator genético é responsável pelo estilo de vida endofítico.

Ali *et al.* (2014); Ali, Charles e Glick (2014) ao realizarem dois estudos comparando os genomas completos de nove endófitos do filo proteobacteria (*Bacillus phytofirmans* PsJN, *Burkholderia* spp. JK006, *A. lipoferum* 4B, *E. cloacae* ENHKU01, *K. pneumoniae* 342, *P. putida* W619, *Enterobacter* spp. 638, *Azoarcus* spp. BH72 e *Serratia proteamaculans* 568), identificaram que os genes comuns a todas essas cepas foram considerados potencialmente envolvidos no comportamento endofítico, incluindo genes que codificam proteínas transportadoras, sistemas de secreção e transporte, proteínas de transdução de sinal, regulação transcricional e muitos outros, que fazem a raiz atrair esses microrganismos.

Estimativas sugerem que o planeta contém cerca de 400.000 espécies de plantas catalogadas, a grande maioria das quais contém endófitos. De fato, endófitos microbianos (bactérias e fungos) foram encontrados em todas as espécies de plantas que foram analisadas. De acordo com Partida-Martínez e Heil (2011), uma planta livre de endófitos é uma exceção ao que normalmente é encontrado na natureza. Com base em observações da distribuição da BPCP rizosférica na natureza uma planta sem endófitos seria menos capaz de lidar com patógenos e mais suscetível às condições de estresse ambiental (TIMMUSK *et al.*, 2011).

Muitos dos endofíticos bacterianos estão em uma associação mútua com um grupo de plantas denominadas leguminosas. Prayitno e Rolfe (2010) em seu trabalho sobre a caracterização de bactérias endofíticas diazotróficas isoladas de arroz, mostram que a

utilização da rotação arroz-leguminosa no delta do Nilo proporciona um bom desempenho a planta, principalmente por conta da participação de bactérias dos grupos *Rizobium*, *Sphingomonas*, *Azospirillum* e *Agrobacterium*, provindas das leguminosas, no entanto apenas bactérias do grupo *rhizobium* formaram nódulos.

Muresu *et al.*(2019) revelam a diversidade de microbiomas associados a nódulos em populações selvagens de *Sulla coronaria* e pistas sobre a importância relativa de simbiontes rizóbios e endófitos co-infectantes. Dos 60 nódulos isolados da leguminosa, 25 apresentaram o simbionte oficial *Rhizobium sullae*, dos nódulos restantes não foram obtidas culturas de rizóbio, mas vários gêneros endofíticos diferentes, incluindo *Pseudomonas* sp. (17 nódulos), *Microbacterium* sp. (15 nódulos), *Pantoea agglomerans* (5 nódulos). Segundo os autores, a ocorrência das bactérias não nodulantes podem estar associada à esses resultados à necessidade do hospedeiro de abrigar uma diversidade mais ampla de endófitos para lidar com os desafios mais severos.

Um total de 276 bactérias endofíticas foram isoladas a partir dos nódulos radiculares de soja (*Glycine max* L.) cultivados em 14 locais na província de Henan, China. Dessas, seis bactérias mostraram reações negativas para produção de sideróforos e ácido indolacético. Essas bactérias foram identificadas como pertencentes aos gêneros (*Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum* e *Bacillus*) (ZHAO; XU; LAI, 2018).

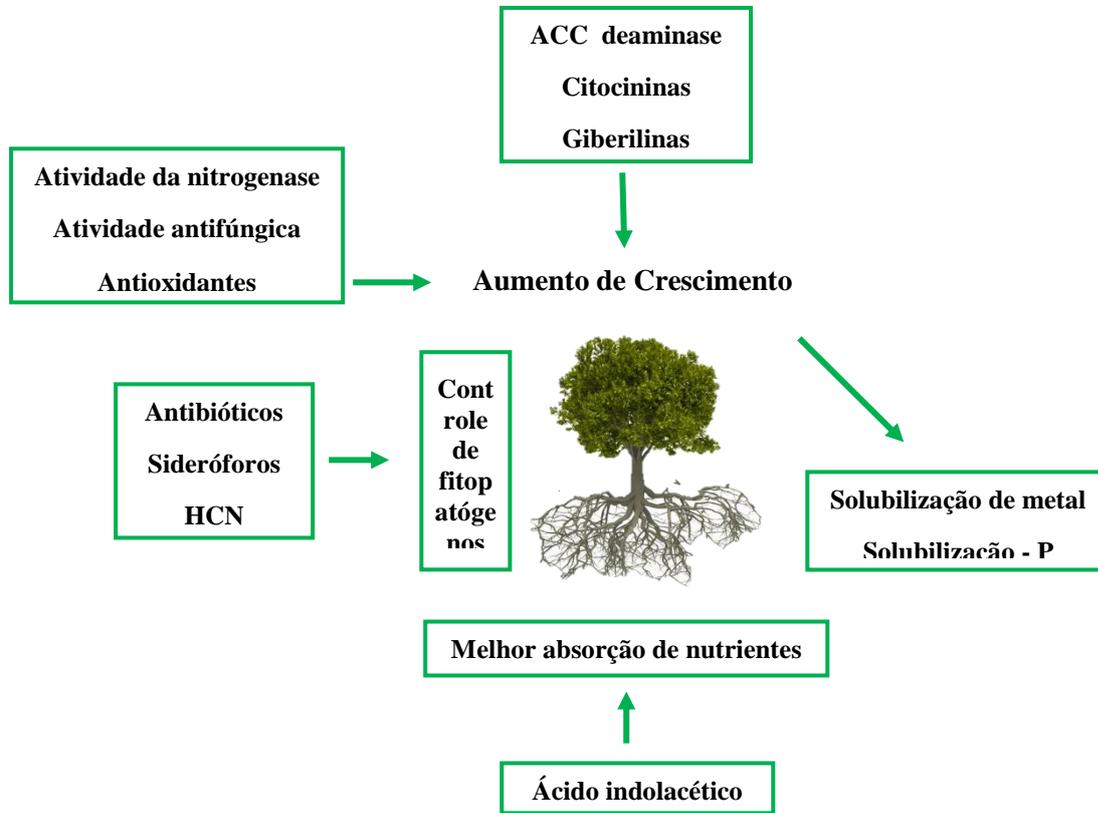
2.3 Mecanismos de promoção de crescimento de plantas por bactérias

O uso de (BPCP) vêm crescendo na agricultura, horticultura, silvicultura e estratégias de limpeza ambiental. Embora possa não haver uma estratégia simples que possa efetivamente promover o crescimento de todas as plantas sob todas as condições, algumas estratégias que são discutidas já mostram grande promessa (GLICK, 2012).

Entender os mecanismos de ação (figura 1) que essas bactérias utilizam nas estratégias para promoção desse crescimento das plantas torna-se fundamental, visto que alguns solos do Brasil carecem de nutrientes em quantidades subótimas e muitas culturas agrícolas necessitam de mecanismos no controle de doenças.

Figura 1 - Mecanismos de promoção do crescimento de plantas por rizobactérias

Promoção do crescimento de plantas por rizobactérias



Fonte: Adaptado de Ahamead e Kibret (2013).

2.3.1 Mecanismos de ação diretos na promoção do crescimento de plantas por bactérias

Os mecanismos executados pelas bactérias que permitem a promoção do crescimento de plantas são caracterizados em: diretos e indiretos. Os mecanismos diretos são os mais estudados, isso porque fornecem naturalmente os nutrientes necessários que auxiliam o desenvolvimento vegetal.

Esses nutrientes variam, mas, os mais comuns são nitrogênio, ferro, fósforo e potássio (GLICK, 2012). Nestes mecanismos estão incluídos a (fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, a produção de fito-hormônios (citocininas, giberilinas, auxinas), produção de sideróforos (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

2.3.1.1 A fixação biológica de nitrogênio

Devido ao crescente uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos, e ao alto custo de fertilizantes nitrogenados, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) que permite o uso, pelas plantas, do N₂ molecular da atmosfera, é o processo mais estudado da biologia do solo. Muitas bactérias associativas são capazes de se fixar as plantas, no entanto ainda é pequeno o número de bactérias que promovem maior absorção de nitrogênio. Para que isso ocorra é necessário que essas bactérias tenham o genes da nitrogenase (*nif*), genes de ativação da proteína férrica e genes reguladores de toda a biossíntese de enzimas relacionadas (DÖBEREINER, 1990).

O complexo enzimático nitrogenase catalisa a reação de redução de N₂ em NH₃ e ocorre somente em organismos procaríotos (Bacteria e Archaea). Em adição, a FBN constitui o principal mecanismo de disponibilização do nitrogênio para os seres vivos, sendo responsável por pelo menos dois terços do aporte anual de nitrogênio na biosfera (FOWLER *et al.*, 2013).

Estimativas da contribuição média da FBN para sistemas agrícolas (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008) apresentam valores de 25 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ para associações não simbióticas (cana-de-açúcar, milho e outros), até 176 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ para associações simbióticas (soja). Apesar da importância da FBN no suprimento de nitrogênio para os seres vivos e da existência de muitas espécies diazotróficas nos solos e em associação com espécies vegetais de interesse agrônômico, os insumos biotecnológicos com base neste processo estão disponíveis somente para algumas culturas e o uso de fertilizantes nitrogenados industriais ainda constitui a principal forma de aporte deste nutriente em sistemas agrícolas (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

2.3.1.2 Solubilização de fosfato

O fósforo (P) é um recurso não renovável e escasso em nosso planeta e as estimativas apresentam o esgotamento de suas reservas em 50-100 anos (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Apesar da relativa abundância de formas orgânica e inorgânicas de P nos solos, sua concentração na forma solúvel é baixa, essa baixa disponibilidade de fósforo solúvel (H₂PO₄) para as plantas. Tal fato é relacionado ao fato de que a maioria do P do solo é encontrada em formas complexadas de baixa solubilidade fixado, insolúveis não assimiladas pelas plantas (AHEMAD; KIBRET, 2014).

A matéria orgânica do solo contribui com 30 a 50%, em média, do total de fósforo solúvel na maioria dos solos, onde o fosfato de inositol (fitato) pode representar até 50% do

P-orgânico. Na forma inorgânica, as maiores reservas de P estão presentes como constituintes de rochas e minerais primários como as apatitas, hidroxiapatitas e oxiapatitas (ZHAO; XU; LAI, 2018).

Porém a mobilização deste nutriente a partir de minerais é um processo lento e a quantidade mobilizada geralmente é insuficiente para suprir as necessidades de um ciclo de cultivo agrícola (SCHNEIDER *et al.*, 2010). Além disso, uma quantidade considerável dos fertilizantes fosfatados aplicados é rapidamente imobilizado nos solos agrícolas, pela sua reação com minerais de ferro, alumínio ou cálcio, formando fosfatos insolúveis e indisponíveis para assimilação pelas plantas. Os microrganismos, bactérias e fungos, têm um papel essencial no ciclo do P na natureza, atuando na mineralização dos fosfatos orgânicos ou na solubilização de fosfatos inorgânicos.

De maneira geral, a solubilização de substratos inorgânicos ocorre pela biossíntese de ácidos orgânicos ou inorgânicos, enquanto o P presente em substratos orgânicos é mineralizado (hidrolisado para a forma inorgânica) pela ação de enzimas hidrolíticas, como as fosfatases (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; RICHARDSON *et al.*, 2011). Considerando que a disponibilidade de P é uma etapa limitante para a nutrição da planta, a habilidade em solubilizar fosfato inorgânico por bactérias associativas representa um grande potencial para a promoção do crescimento vegetal.

2.3.1.3 Síntese de fito-hormônios

A produção de hormônios vegetais é uma resposta interna da planta a diversos fatores abióticos que limitam seu bem estar e um pleno desenvolvimento, sua biossíntese pelos microrganismos do solo e outras moléculas com ação hormonal podem influenciar diretamente o *status* nutricional das plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A síntese, principalmente de auxinas e giberelinas, é provavelmente um dos mecanismos mais importantes utilizados por BPCP para influenciar positivamente o desenvolvimento vegetal (CASSÁN *et al.*, 2014). Outras moléculas produzidas por microrganismos são as citocininas, pesquisas demonstram que diversos gêneros bacterianos conseguem produzir essa substância (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; DROGUE *et al.*, 2012; LOBO, 2018).

Dentre os fito-hormônios citados, a auxina (ácido indol-3-acético ou AIA) é a mais estudada, sendo a capacidade de síntese deste fito-hormônio amplamente distribuída entre

bactérias endofíticas. Acredita-se que cerca de 80% das espécies de bactérias isoladas da rizosfera produzem auxinas (GLICK, 2012).

Segundo Cassán *et al.* (2014) os principais efeitos relacionados com a ação de fitohormônios produzidos por microrganismos sobre o desenvolvimento vegetal consistem de alterações morfológicas no sistema radicular, incluindo aumentos no comprimento e volume radicular, número e comprimento das raízes laterais, massa seca radicular e número e densidade dos pelos radiculares.

2.3.1.4 Síntese de sideróforos

Além de rizobactérias promoverem o crescimento das plantas pela produção de fitohormônios, elas também possuem a capacidade de produzir moléculas orgânicas extracelulares de baixo peso molecular com alta afinidade pelo ferro, que apesar de serem quelantes específicos de íons férricos, também podem se ligar a outros metais, essas moléculas são denominadas sideróforos.

Os sideróforos podem reduzir a disponibilidade desses metais na rizosfera, diminuindo sua toxicidade para as plantas e os próprios microrganismos (BORTOLOTTI, 2014). São classificados em três categorias segundo as quais é doador de oxigênio para a coordenação do Fe^{3+} : a) catecolatos (ou fenolatos), b) hidroxilatos (ou carboxilato) e c) os tipos mistos (SAHA *et al.*, 2013). Grupos de bactérias como as dos gêneros *rhizobium sp.*; *Pesudomonas sp.* também são conhecidas por produzirem essas moléculas e promoverem o aumento e desenvolvimento vegetal (GHOSH; BERA; CHAKRABARTY, 2020).

Apesar do foco nos sideróforos ser uma forma de mecanismo direto na promoção de crescimento de plantas, diversos trabalhos (BEASLEY *et al.*, 2011; FETHERSTON *et al.*, 2010; JIMENEZ *et al.*, 2010;). GRAÇAS *et al.*, 2015) demonstram seus papéis na mediação de patógenos um mecanismo indireto das bactérias promotoras de crescimento de plantas, mostrando assim a dupla importância dessas moléculas.

2.3.2 Mecanismos de ação indiretos na promoção do crescimento de plantas por bactérias

A aplicação de microrganismos no controle de doenças, que é uma forma de controle biológico, é uma abordagem ecológica utilizada há bastante tempo. Os mecanismos indiretos são compostos por (controle biológico de patógenos e aumento da resistência vegetal a diferentes fatores de estresses ambientais) (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

2.3.2.1 Controle de patógenos por bactérias promotoras de crescimento de plantas

As bactérias promotoras de crescimento de plantas além de promoverem o crescimento dos vegetais por meio dos mecanismos anteriormente citados, também evoluíram para trazer a planta associada o máximo de segurança, atuando de forma indireta no controle de patógenos através da degradação da parede celular por ação de enzimas líticas, pela competição por nutrientes e pela indução de resistência sistêmica nas plantas (GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2016). É possível notar no **quadro 1**, que alguns biopesticidas que tem como organismos principais bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*.

Quadro 1 - Alguns biopesticidas disponíveis comercialmente para controle de doenças em plantas

ORGANISMO	PRODUTO	ORGANISMO-ALVO
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Norbac 84-C Agtrol; Galtrol; Diegall	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	Kodiak	<i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp.
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Blue Circle; Intercept	<i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , EG 1053	Dagger	<i>Rhizoctonia</i> spp. e <i>Pythium</i> spp.
<i>P. fluorescens</i> , NC1B 12089	Conquer	Podridão bacteriana de cogumelos comestíveis
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>		<i>Gaeumanomyces graminis</i>

Fonte: Adaptado de Graças *et al.* (2015).

Oliveira de *et al.* (2012) afirmaram que algumas bactérias responsáveis pelo biocontrole produzem enzimas como, quitinases, celulases, β -1,3 glucanases, proteases e lipases que podem lisar uma porção de paredes celulares de muitos patógenos, incluindo fungos. E que as BPCP que sintetizam uma ou mais dessas enzimas foram encontradas possuindo essa atividade de biocontrole contra uma série de fungos patogênicos, incluindo *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*. Essa atividade de degradação da parede celular pode se comparar ao um efeito de um antibiótico em um organismo infectado.

2.3.2.2 Aumento da resistência vegetal a diferentes estresses ambientais

Em experimentos controlados, espera-se que nenhum fator abiótico ou biótico, a não ser os testados, interfira no desenvolvimento e produtividade da espécie estudada. No entanto, no ambiente natural as circunstâncias são outras e a planta sofre interferência de diversos fatores, que podem trazer respostas positivas ou não, as respostas negativas podem virar estresses, quando relacionado ao excesso ou ausência da resposta. As bactérias promotoras de crescimento de plantas podem assegurar as plantas que essa interferência e inibição do crescimento da planta não seja tão significativa através de respostas hormonais (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Essas respostas se constituem da conversação entre planta-bactéria para a produção de hormônios relacionados ao estresse como, ácido jasmônico, ácido abscísico e etileno, essas bactérias por sua vez, possuem a capacidade de identificar sinais emitidos ou percebidos pela planta em condições de estresse, desencadeando respostas de forma conjunta com a planta, resultando em aumento de tolerância por meio dos hormônios citados anteriormente (COELHO *et al.*, 2017).

De acordo com Sarkar *et al.* (2018) as BPCP que promovem uma boa resposta ao estresse e habitam na rizosfera pertencem aos gêneros *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Micobacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*. Estas BPCP são geralmente usadas como inoculantes para a bioestimulação, biocontrole e biofertilização, e, juntamente com outros microrganismos, melhoram o crescimento das plantas sob diferentes condições de estresse ambiental, sendo assim uma fonte barata e de fácil acesso para a mitigação de diferentes estresses bióticos e abióticos.

Numan *et al.* (2018) em seu trabalho sobre bactérias promotoras de crescimento de plantas como estratégia para a tolerância ao estresse salino, ainda discorrem sobre o quanto essas bactérias são importantes para melhoria do solo e desenvolvimento, e produtividade da planta em resposta a esse tipo de estresse, que é tão prejudicial à saúde do solo e da planta, devido à grande dificuldade que a planta tem de extrair a água de um solo salino.

2.4 Bactérias promotoras de crescimento na promoção e absorção de nutrientes essenciais para plantas

Nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e ferro (Fe) são nutrientes essenciais que desempenham um papel importante na produção agrícola em solos degradados e não degradados. A maioria dos solos do mundo é deficiente nos nutrientes mencionados,

necessitando de uma grande demanda de fertilizantes químicos para suprir o requerimento de nutrientes pelas culturas agrícolas (RASHID *et al.*, 2016).

O elemento é essencial para a planta quando está diretamente envolvido no seu metabolismo (como constituintes de moléculas, etc), quando a planta não consegue completar seu ciclo de vida sem ele e quando a função do elemento é específica, ou seja, nem um outro elemento é capaz de substituí-lo naquela função; e são divididos em macronutrientes e micronutrientes, de acordo com a quantidade requerida pelo metabolismo das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas atuam promovendo o aumento a acessibilidade e a concentração de nutrientes, tanto macro quanto micronutrientes, fixando ou bloqueando seu suprimento para crescimento e produtividade das plantas (KUMAR, 2016). A promoção direta do crescimento das plantas ocorre quando uma bactéria facilita a aquisição de nutrientes essenciais (SANTOYO *et al.*, 2016). A absorção dos nutrientes intermediados por esses microrganismos endofíticos é evidenciada desde o início desse século em diferentes regiões do planeta (BREDA; ALVES; REIS, 2016).

Egamberdiyeva e Höflich (2004) ao estudarem o efeito de bactérias promotoras do crescimento de plantas na absorção de nutrientes para o desenvolvimento do algodão e ervilha em uma região semiárida do Uzbequistão, observaram, que após a inoculação com cepas de *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. e *Mycobacterium* sp., os teores de N, P e K aumentaram significativamente na planta.

Outro trabalho de Egamberdiyeva, (2007), agora, sobre o efeito do crescimento de bactérias promotoras no crescimento e absorção de nutrientes do milho em dois solos diferentes, demonstrou que as mesmas cepas bacterianas estimularam a maior absorção de N, P e K nas plantas em solos deficientes desses nutrientes do que em solos ricos, evidenciando a interação positiva entre planta e bactérias para melhoria da absorção dos nutrientes.

Quando se trata do efeito de bactérias promotoras de crescimento de plantas no vegetal, a avaliação sobre os compostos nutricionais provenientes da interação da bactéria-planta também passam por processos de avaliações quantitativas e nutricionais, para se ter ideia do quanto a estirpe bacteriana escolhida beneficiou a espécie em questão. É possível confirmar isso na maioria dos trabalhos atuais relacionados (BREDA; ALVES; REIS, 2016; HARTMANN *et al.*, 2019; LA TORRE-RUIZ *et al.*, 2016; SANTOYO *et al.*, 2016).

As plantas absorvem nitrogênio do solo na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), que são nutrientes essenciais para o crescimento. O nitrato é geralmente a forma predominante de nitrogênio disponível em solos aeróbicos, onde a nitrificação ocorre e é

absorvida pela planta (XU; FAN; MILLER, 2012). Algumas BPCP têm a capacidade de solubilizar o fosfato, resultando em um número aumentado de íons fosfato disponíveis no solo, que podem ser facilmente absorvidos pelas plantas (HERRERA PAREDES; LEBEIS, 2016).

Em relação ao potássio, esse está presente na planta como cátion monovalente (K^+) e executa importante papel na regulação do potencial osmótico das células das plantas. É também requerido para a ativação de muitas enzimas da respiração e da fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013). O potássio é encontrado em solos principalmente em minerais de fontes não renováveis. Alguns *Bacillus* spp. são capazes de dissolver potássio minerais, constituindo um suprimento de (K^+) às plantas. A solubilização do potássio por microrganismos e seus mecanismos foram recentemente revisados (SATTAR *et al.*, 2019).

O ferro é o quarto elemento mais abundante disponível na Terra e existe predominantemente na natureza na forma férrica (Fe^{3+}). É considerado um dos micronutrientes essenciais para a fertilidade do solo e também é necessário para todos os tipos de organismos vivos, para facilitar a absorção de ferro pelas plantas as bactérias produzem moléculas quelantes (os sideróforos). Além disso, as bactérias produzem sideróforos extracelulares que privam organismos patogênicos produzidos sob condição limitada de Fe e formam complexos com outros metais pesados (Zn, Pb, In, Cu, Ga, Cd e Al) (RASHID *et al.*, 2016).

2.5 A cultura do milho (*Zea mays* L.)

O milho (*Zea mays* L.) é classificado como sendo do reino Plantae, divisão Anthophyta, classe Monocotiledonea, ordem Poales, família Poaceae, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* (GODOY, 2017). É considerada uma planta C4, apresentando uma inflorescência masculina, que é o pendão e uma feminina, que é a espiga. A domesticação do milho no México, a partir de uma gramínea selvagem conhecida como teosinto do gênero *Tripsacum*, é um exemplo inquestionável de como grandes mudanças morfológicas podem acontecer em resposta à seleção (KELLOGG, 1997).

O ciclo da maioria das cultivares de milho varia entre 105 e 180 dias, período compreendido entre a semeadura e a colheita. Todas as plantas normais de milho seguem um mesmo padrão geral de desenvolvimento, mas os intervalos de tempo específicos entre os estádios e os números totais de folhas desenvolvidas podem variar entre diferentes híbridos, estações do ano, datas de plantio e locais. Sendo assim, o crescimento de uma planta de milho

é dividido em dois grandes estágios, o vegetativo e o reprodutivo. Durante o estágio vegetativo, ocorre o desenvolvimento da planta e a definição do potencial produtivo teórico. Durante o estágio reprodutivo, ocorre o desenvolvimento da espiga e finalização do ciclo com a maturidade fisiológica da semente (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 1997).

No Brasil, a cultura do milho tem-se caracterizado pela divisão da produção em duas épocas de plantio: plantio de verão ou safra, no final do verão; e safrinha ou segunda safra, no início do inverno (BREDA; ALVES; REIS, 2016). A cultura do milho, além de ter importância no agronegócio, é base de sustentação para a pequena propriedade, constituindo-se, também, num dos principais insumos do complexo agroindustrial (QUADROS *et al.*, 2014).

Em toda extensão territorial brasileira, o milho (*Zea mays* L.) é cultivado, destacando-se das demais culturas e ocupando assim a segunda maior área cultivada do país (CONAB, 2019). Entretanto, praticamente toda a produção de milho brasileira é consumida internamente, diferente da cultura da soja, que concentra sua comercialização em mercados externos (ALVES; REIS; BALDANI, 2007). A maior parte da produção de grãos brasileira é destinada a alimentação animal de suínos, aves e o rebanho bovino.

A cultura do milho apresenta pouca tolerância à falta de água. Cultivado em diversos sistemas produtivos, o milho é plantado principalmente nas regiões do Centro-Oeste, Sudeste e Sul. No Nordeste do Brasil os rendimentos da cultura são muito baixos, cultivado por pequenos agricultores que utilizam pouco ou nenhum recurso tecnológico. Entretanto, apesar dos baixos rendimentos, o milho é um cereal tradicional e apresenta aspectos culturais e históricos na região (ROBERTO; FRANCISCO; SANTOS, 2017). O Estado de Alagoas só representa (0,30%) da produção da cultura do milho no Nordeste Brasileiro (CONAB, 2015).

A geração de tecnologias pelos órgãos de fomento deve levar em consideração não apenas a otimização do processo produtivo em sistemas com elevada aplicação de tecnologia, mas também favorecer alternativa de cultivo sob baixa tecnologia, evidenciando principalmente o fato de o milho ser uma cultura que gera empregos no setor agrícola e ter grande importância pela utilização na indústria, alimentação humana e de animais (PEDRINHO, 2009).

Para suprir a baixa produtividade do milho e trazer facilidade de economia para o produtor diversos trabalhos têm sido desenvolvidos ao longo de décadas analisando o potencial de resposta do milho a diversas estirpes bacterianas. De acordo com (OLIVEIRA *et al.*, 2012), a inoculação com diversas estirpes de bactérias favorece a produtividade do milho, aumentando a massa da planta e o melhor desenvolvimento dos grãos. É notório também o

quanto foi significativo a resposta de estirpes bacterianas a essa espécie em muitas outras pesquisas decorridas anteriormente.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Origem das bactérias e condições de cultivo

As bactérias foram provenientes do isolamento feito anteriormente à partir de uma coleção de nódulos de leguminosas do gênero *Stylosanthes* (SOUZA, 2018) e de *Chloroleucon dumosum* (GUABIRABA, 2018) utilizadas como planta-isca para a captura de rizóbios de amostras de solo coletadas em quatro áreas de Caatinga (Delmiro D1 e D2, Pão-de-açúcar e Santana do Ipanema. Nesse estudo foram utilizados 14 isolados bacterianos que não mostraram capacidade para nodular as leguminosas de origem, indicando que estas bactérias não são rizóbios e fazem parte de uma comunidade endofítica do nódulo, a saber: AD47, AD3, AP93, AT8 e AT20 isolados de nódulos de *Chloroleucon dumosum*; ShP6, ShP9, ShP11, ShP12, ShS2, ShS3; e ShS9 isolados de *Stylosanthes hamata* e SsP7 e SsS3 isolados de nódulos de *Stylosanthes scabra*. As bactérias foram, inicialmente, recuperadas do estoque sendo cultivadas em meio de cultura YMA (VINCENT, 1970) a 28 °C até o surgimento de colônias puras para a realização dos experimentos de inoculação.

3.2 Identificação molecular dos isolados

A identificação molecular dos isolados foi feito com base no sequenciamento do gene 16S rRNA. Para isso, o DNA genômico dos 14 isolados foi extraído utilizando a metodologia de Doyle e Doyle (1991) e utilizado para as reações de amplificação por cadeia da polimerase (PCR) do gene 16S rRNA. A amplificação do 16S rRNA foi feita utilizando os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') em volume de 50 µL contendo 2 µL de amostra do DNA genômico (~10 ng), 0,20 µM de cada primer, 1× PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 1,75 mM de MgCl₂, 0,250 mM de cada dNTP e 2U de Taq DNA polymerase. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; finalizando com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Uma alíquota de 2 µL do produto da PCR foi aplicada em gel de agarose 1% e migrado por eletroforese. Os géis foram corados com brometo de etídeo, e foi visualizado em transluminador com luz ultravioleta para checagem da amplificação. Os produtos da PCR foram utilizados para o sequenciamento usando BigDye® de acordo com as instruções do manual e o sequenciamento feito em sequenciador capilar ABI 3730 (Applied Biosystems,

USA). A qualidade das sequências obtidas foi verificada utilizando o programa Sequence Scanner v.10 (Biosystems, USA) e quando necessários, erros foram corrigidos. As sequências foram submetidas a identificação genética, a nível de gênero, por comparação com as sequências depositadas no GenBank usando o algoritmo BLASTN, Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>. Acesso em: 20 ago. 2019 (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

3.3 Experimento I (Teste de germinação e promoção do crescimento radicular de milho)

Com o intuito de saber os efeitos que essas bactérias poderiam causar no desenvolvimento de espécies vegetais, foram feitos três experimentos, como forma de filtrar essas bactérias na função em que elas mais promovem o desenvolvimento das plantas e ter as melhores estirpes para a aplicação em campo. O experimento foi conduzido no laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Alagoas *Campus* Arapiraca. Foram utilizados 14 isolados bacterianos (AD3, AD47, AP93, AT8, AT20, ShP6, ShP9, ShP11, ShP12, ShS2, ShS3, ShS9, SsP7 e SsS3) de nódulos de leguminosas da caatinga do estado de Alagoas. As sementes de milho utilizadas foram da variedade Jabotão (crioulo). As sementes foram previamente testadas quanto ao potencial germinativo para averiguar a viabilidade de acordo com a RAS, (2009). As sementes foram desinfestadas por imersão em álcool 70% por 1 minuto, depois em hipoclorito de sódio por 3 minutos e, posteriormente, lavadas seis vezes sucessivamente com água destilada estéril. A inoculação foi feita por imersão, em que 32 sementes ficaram submersas por 1 hora em 10 mL em suspensão de bactérias com concentração de $5,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ do respectivo tratamento.

As sementes do controle foram imersas em meio YM por 1 hora. O inóculo bacteriano foi obtido após o crescimento de colônias puras de cada bactéria em meio de cultivo YM (VINCENT, 1970) por 24 horas a 150 rpm, quando atingiu a concentração de $5,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹. Cada tratamento contou com quatro repetições, sendo cada repetição composta por oito sementes. As oitos sementes foram colocadas em cima de duas folhas de papéis germitest umedecidas com água destilada e autoclavada (1 atm, 120 °C, 30 min) e então coberta com outra folha de papel, enroladas e colocadas em BOD na temperatura de 25 °C para a germinação, como vistos na figura 2, A e B.

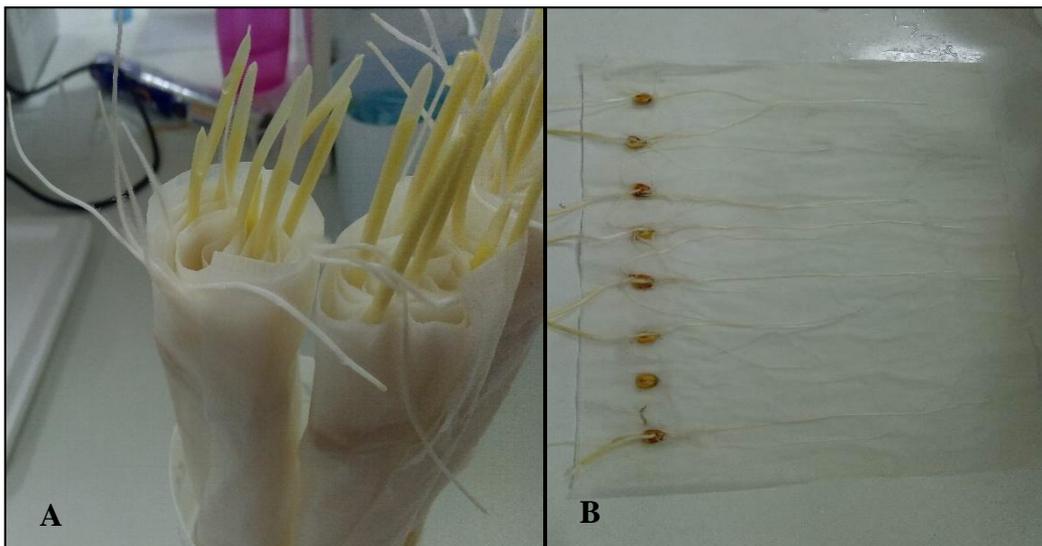
Figura 2 - (A) 14 estirpes de bactérias crescidas ($5,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹). (B) Incubadora shacker (Agitadora).



Fonte: A autora (2019).

As coletas de dados foram feitas aos quatro e oito dias após a germinação das sementes de milho. As variáveis medidas foram: germinação (%), comprimento da raiz principal (cm) e o número de raízes laterais. Foi feita a média de cada repetição por tratamento e verificada a distribuição normal dos dados aplicando o teste de Shapiro-Wilk e posteriormente aplicada a análise de variância (ANOVA) através do teste F com agrupamento das médias utilizando o teste de Scott-Knott com significância de 5%. O programa Sisvar v 5.0 (FERREIRA, 2011) foi utilizado para a produção das análises estatísticas.

Figura 3 - (A) Sementes de milho com quatro dias após a germinação. (B) Sementes com oito dias após a germinação e preparadas para a medição das variáveis.



Fonte: A autora (2019).

3.4 Experimento II (Promoção do crescimento de milho em substrato estéril)

As etapas do experimento II foram conduzidas no laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Alagoas *Campus* Arapiraca e na casa de vegetação da universidade anteriormente citada (figura 5). Foram utilizados os mesmos passos do primeiro experimento em relação ao crescimento dos inóculos utilizados e os processos de desinfestação das sementes. Após as bactérias terem crescido foi montado o experimento, com intuito de avaliar a contribuição que a bactéria poderia estabelecer no crescimento da planta, a montagem de todo o experimento se deu de forma gnotobiótica, promovendo um ambiente estéril. O substrato para estabelecimento da planta utilizado, foi a vermiculita, que previamente foi esterilizada. O experimento se deu em blocos casualizados, no total foram utilizados 16 tratamentos, os 14 isolados bacterianos, mais um controle positivo com nitrogênio (15 mg de N) e um negativo sem nitrogênio, apenas o potencial da semente, cada tratamento contou com 10 repetições.

Figura 4 - Experimento montado na casa de vegetação da Universidade Federal de Alagoas campus Arapiraca.



Fonte: A autora (2019).

A inoculação das bactérias se deu nos vasos de 500 mL e foi colocado 1 mL de crescimento bacteriano ($5,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹) nas sementes. Com cinco dias após a montagem do experimento aconteceram as germinações de todas as sementes, depois de sete dias da emergência foi feito o desbaste e uma reinoculação nas plântulas com a mesma quantidade de suspensão bacteriana anterior (figura 5, A e B). Os vasos foram irrigados 3 vezes por semana com 250 mL de água destilada e esterilizada, uma vez por semana os vasos eram irrigados também com solução nutritiva de Norris (VINCET, 1970) isenta de nitrogênio (**ANEXO A**).

Figura 5 - (A) Sementes de milho com um dia de germinação. (B) Desbaste e segunda inoculação.



Fonte: A autora (2019).

As variáveis analisadas após 30 dias da emergência das sementes de milho foram: Intensidade verde (SPAD), número de folhas, volume da raiz (ml), altura da planta (cm), matéria seca da raiz (g), matéria seca da parte aérea (g) e massa seca total (g). Foi feita a média de cada repetição por tratamento e verificada a distribuição normal dos dados aplicando o teste de Shapiro-Wilk e posteriormente aplicada a análise de variância (ANOVA) através do teste F com agrupamento das médias utilizando o teste de Scott-Knott com significância de 5%. O programa Sisvar v 5.0 (FERREIRA, 2011) foi utilizado para a produção das análises estatísticas.

3.5 Experimento III (Promoção do crescimento de milho em solo não estéril)

As etapas do crescimento das estirpes se deram da mesma forma dos dois experimentos anteriores (figura 2). A etapas da realização desse experimento também ocorreram no laboratório de fisiologia vegetal e na casa de vegetação da Universidade Federal de Alagoas *Campus* Arapiraca.

Para esse experimento, tomamos como base os dois experimentos anteriores e filtramos as estirpes que promoveram maiores respostas em relação ao milho, tendo como foco um possível experimento mais perto o possível das condições encontradas em campo. No total foram utilizados 9 isolados bacterianos (ShP11, SsS3, ShS2, ShS3, SsP7, ShS9, AT20, AD3 e AD47) mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de nitrogênio e três controles (apenas o potencial da semente, um controle nitrogenado com 35 kg ha⁻¹ e um controle nitrogenado com 70 kg ha⁻¹), totalizando 12 tratamentos, cada tratamento contou com sete repetições.

O experimento foi organizado em blocos ao acaso. As sementes foram desinfestadas e cinco sementes foram semeadas em vasos (4,5 L) preenchidos com amostra de um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico. O solo foi coletado numa área em que já havia sido plantado milho da Universidade Federal de Alagoas *Campus Arapiraca*, após ser homogeneizado, 500 g da amostra foram encaminhados para análise dos atributos químicos na empresa Central Analítica (Quadro 2).

Todos os vasos foram adubados com 60 kg ha⁻¹ de superfostato simples (P₂O₅) e 40 kg ha⁻¹ de cloreto de potássio (K₂O). Foi utilizado 1,2 mL de crescimento bacteriano (5,2 x 10⁷ UFC mL⁻¹) do respectivo tratamento nas sementes inseridas nos vasos. Após 5 dias ocorreram as germinações, com 10 dias após a germinação foi feito o desbaste e com 20 dias após a germinação as plantas foram inoculadas novamente e controle com 70 kg ha⁻¹ de N recebeu uma nova dose. Os vasos foram irrigados três vezes por semana com 500 mL de água.

Figura 6 - (A) Plantas de *Zea mays* L. após a germinação com inoculação de BPCP, (B) Sete dias antes da coleta e avaliação das plantas.



Fonte: A autora (2019).

Quadro 2 - Análise do solo utilizado para o cultivo de *Zea mays* L.

Atributo do solo	Valor
pH (H ₂ O)	6,9
Matéria orgânica – M.O. (%)	1,67
P (mg Kg ⁻¹)	36,0
K (cmol _c dm ⁻³)	65,0
Na (cmol _c dm ⁻³)	16,0
Ca (cmol _c dm ⁻³)	2,1
Mg (cmol _c dm ⁻³)	1,4
Al (cmol _c dm ⁻³)	0,0
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	4,4
Soma de bases – SB (cmol _c dm ⁻³)	3,74
Saturação de bases – V (%)	45,9

Fonte: Central Analítica (2019).

As coletas de dados se deram com 40 dias após a germinação. As variáveis medidas foram: Intensidade verde (SPAD), altura da planta (cm), número de folhas, diâmetro do caule (mm), matéria seca da raiz (g) e matéria seca da parte aérea (g). Foi feita a média de cada repetição por tratamento e verificada a distribuição normal dos dados aplicando o teste de Shapiro-Wilk e posteriormente aplicada a análise de variância (ANOVA) através do teste de comparação de Scott-Knott com significância de 5% usando o Software Sisvar (FERREIRA, 2011). 5.0. Os gráficos foram feitos através do pacote MS excel 2013.

3.5.1 Determinações das concentrações de Potássio (K), Fósforo (P) e Nitrogênio (N) via matéria seca da parte aérea de *Zea mays* L.

As amostras da parte aérea das plantas de milho foram secadas em estufa com ventilação a 65°C por setes dias até atingir um peso constante, em seguida foram trituradas em um moinho de facas (Nova Orgânica, Modelo: 048), guardadas e etiquetadas para análises químicas posteriores.

3.5.1.1 Determinação das concentrações de K foliar

A determinação da concentração de K foliar foram realizadas através de Fotometria de chama de emissão (MALAVOLTA *et al.*, 1997). Previamente foram pesadas em balança analítica 0,500 g do material foliar e a digestão se deu por via seca, onde as amostras foram colocadas na mufla elétrica para incineração, a uma temperatura de 500 a 550 °C, por duas a quatro horas, até a obtenção de uma cinza branca.

Figura 7 - Diluição das amostras de K resultantes da solução com HCl.



Fonte: A autora (2019).

A cinza resultante desse processo foi dissolvida em 25 mL de HCl a 1M, depois disso a solução dissolvida foi filtrada e retirado 1 mL da solução que foi adicionada à 30 mL de água destilada, ficando na razão 1:31, depois de homogeneizada, como estourou o limite máximo de quantificação, foi feita uma nova diluição, então removeu-se 10 mL da solução de 20 mL da água destilada, ficando em uma razão 1:93. Após a amostra ser agitada e homogeneizada novamente, foi feita a leitura no Fotômetro de chama.

Para a calibração do Fotômetro de chama foram utilizadas as soluções padrão de potássio 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg L⁻¹. Todos os dados obtidos foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel 2010 para o cálculo de obtenção da concentração de K, que teve como fórmula:

$$K \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Leitura}_K - n)}{m} \times d$$

Em que: m é o coeficiente angular da reta e n o coeficiente linear da equação da reta $y = mx + n$.

3.5.1.2 Determinação das concentrações de P foliar

A determinação das concentrações de fósforo foliar foram realizadas através da técnica de Espectrofotometria com amarelo de vanadato, nesta, o ânion fosfato (PO_4^{3-}) reage com molibdato (MoO_4^{2-}) e vanadato (VO_4^{3-}), em meio ácido, formando um complexo de coloração amarela que absorve a luz na região de 420 nm (EMBRAPA, 2000). O equipamento utilizado foi um Espectrofotômetro UV-Visível da marca Global.

A digestão foi realizada da seguinte forma: foi adicionado ao tubo de digestão cerca de 0,100 g de material foliar triturado e colocado 2 mL de ácido nítrico e 500 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), deixado em pré-digestão por uma noite em temperatura ambiente, em seguida as amostras foram colocadas no bloco digestor e ligado o aquecimento gradual até atingir 120 °C, onde permaneceu até que elas ficassem incolor, caso fosse necessário colocaria mais 500 μL de H_2O_2 nas amostras isoladas que necessitasse para acelerar o processo e continuava o processo até ficar incolor. Para as análises, foram utilizados 200 μL da amostra digerida, 1,8 mL de água e 400 μL da mistura dos reagentes, composta pelas soluções de molibdato de amônio (50 g/L) e metavanadato de amônio na proporção (2,5 g/L) de 1/1 (v/v) (EMBRAPA, 2000).

Figura 8 - Amostras de material foliar para análise de P no bloco digestor.



Fonte: A autora (2019).

Foi utilizada uma curva de calibração obtida com o fosfato de potássio monobásico como padrão. Foram preparadas soluções nas concentrações de 2,5, 5,0, 10, 20, 25 mg/L, as quais tiveram suas absorções medidas a 420 nm.

3.5.1.3 Determinação das concentrações de N foliar

A determinação das concentrações de N foliar foi realizada através da digestão sulfúrica seguida do método semi-micro Kjeldahl. Técnica que baseia-se na oxidação da matéria orgânica, transformando o nitrogênio orgânico em mineral (sulfato de amônio), através da ação do H_2SO_4 e catalisadores a quente (CARMO *et al.*, 2000).

Essa técnica apresenta três etapas cruciais: 1) Digestão da amostra a base de sais catalisadores ($Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$; Na_2SO_4 ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e H_2SO_4). Os sais: sulfato de selênio, e sulfato de cobre em presença de ácido sulfúrico são agentes catalisadores e tem como finalidade elevar o ponto de ebulição do ácido; já o sulfato de sódio irá oxidar a matéria orgânica, transformando o nitrogênio para a forma de sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$). 2) Destilação de NH_3 , onde adiciona-se hidróxido de sódio (NaOH) 50% (m\|V) e aquece-se para a liberação de NH_3 em solução de ácido bórico (H_3BO_3), formando borato de amônio, que constitui forma quantificável do nitrogênio e 3) Quantificação do borato de amônio por titulação com uma solução padronizada de ácido clorídrico (HCl), obtendo-se assim, o teor de nitrogênio presente na amostra (MALAVOLTA *et al.*, 1997).

Foi adicionado cerca de 0,100 g de material foliar triturado e 5 mL de ácido sulfúrico mais catalisadores no tubo de digestão, colocados no bloco digestor e aquecido lentamente até atingir a temperatura de 400 °C. Foi mantida a temperatura até a solução ficar translúcida (MALAVOLTA *et al.*, 1997).

Quando os tubos atingiram uma temperatura abaixo de 100 °C foram adicionados 10 mL de água destilada para homogeneizar a solução. Em erlenmeyer de 125 mL, foram adicionados 10 mL de solução de H_3BO_3 (4%) e juntamente com três gotas de uma solução mista de vermelho de metila e verde de bromocresol. O erlenmeyer foi então adaptado ao conjunto de destilador de N para receber toda a amônia destilada. Cada tubo digestor com a mostra digerida foi levado ao conjunto de destilação e foram adicionados 25 mL de NaOH (50%).

O volume total do destilado foi de 20 mL, mantendo esse valor constante entre as amostras. Ao atingir o volume proposto pela metodologia, o erlenmeyer foi retirado para ser

titulado com HCl até a mudança de cor do indicador verde esmeralda. A solução utilizada do HCl foi de 0,01 M (MALAVOLTA *et al.*, 1997).

Foram colocados em cada bloco um tubo em branco (sem amostra), passando por todos os processos (digestão, destilação e titulação) com o objetivo de eliminar a interferência e contaminação dos reagentes e dos parâmetros de digestão, destilação e titulação.

A quantificação de N se deu através da fórmula:

$$N_{total}\% = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times M \times f \times 100 \times 14}{1000 \times massa_{amostra}}$$

Em que:

$N_{total}\%$ = percentual de Nitrogênio com base na amostra;

$V_{amostra}$ = volume da solução de ácido clorídrico utilizado na titulação (mL);

V_{branco} = volume de ácido clorídrico utilizado na titulação do branco (mL);

M = molaridade 0,01 mol L⁻¹;

f = fator de correção da concentração;

14 = peso molecular do Nitrogênio.

Para a análise estatística de todas as determinações das concentração de N, P e K foi feita a média de cada repetição por tratamento e verificada a distribuição normal dos dados aplicando o teste de Shapiro-Wilk e posteriormente aplicada a análise de variância (ANOVA) através do teste F com agrupamento das médias utilizando o teste de Scott-Knott com significância de 5%. O programa Sisvar v 5.0 (FERREIRA, 2011) foi utilizado para a produção das análises estatísticas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação molecular com base do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos

As análises das sequências do gene 16S rRNA revelaram que os 14 isolados pertencem a sete diferentes gêneros, a saber: *Bacillus* (4 isolados), *Brevudimonas* (1), *Enterobacter* (1), *Leifsonia* (2), *Paenibacillus* (3), *Pseudomonas* (1) e *Roseomonas* (2) (Quadro 3). Os cinco isolados obtidos dos nódulos de *Chloroleucon dumosum* corresponderam a quatro gêneros (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Leifsonia* e *Paenibacillus*), enquanto os nove isolados obtidos de nódulos das espécies de *Stylosanthes* spp. representaram cinco gêneros (*Bacillus*, *Brevudimonas*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Roseomonas*). Todos os gêneros identificados na fração da coleção de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas da caatinga são conhecidos por abrigarem espécies com capacidade de promover o crescimento de plantas. Alguns dos gêneros identificados nesse estudo já foram encontrados como parte da comunidade microbiana de nódulos de feijão-caupi (LEITE *et al.*, 2017).

Quadro 3 - Identificação molecular dos isolados endofíticos de leguminosas da caatinga com base no gene 16S rRNA.

Isolado	Origem		Número de base da sequência	Gênero correspondente no GenBank
	Planta	Local		
AD3	<i>Chloroleucon dumosum</i>	Delmiro Gouveia	920	<i>Enterobacter</i> sp.
AP93	<i>Chloroleucon dumosum</i>	Pão de Açúcar	939	<i>Paenibacillus</i> sp.
AT8	<i>Chloroleucon dumosum</i>	Girau do Ponciano	308	<i>Leifsonia</i> sp.
ShP6	<i>Stylosanthes hamata</i>	Pão de Açúcar	854	<i>Bacillus</i> sp.
ShP9	<i>Stylosanthes hamata</i>	Pão de Açúcar	911	<i>Roseomonas</i> sp.
ShP11	<i>Stylosanthes hamata</i>	Pão de Açúcar	968	<i>Pseudomonas</i> sp.
ShP12	<i>Stylosanthes hamata</i>	Pão de Açúcar	949	<i>Paenibacillus</i> sp.
ShS2	<i>Stylosanthes hamata</i>	Santana do Ipanema	884	<i>Brevundimonas</i> sp.
ShS9	<i>Stylosanthes hamata</i>	Santana do Ipanema	851	<i>Bacillus</i> sp.
SsP7	<i>Stylosanthes scabra</i>	Pão de Açúcar	301	<i>Roseomonas</i> sp.
SsS3	<i>Stylosanthes scabra</i>	Santana do Ipanema	931	<i>Paenibacillus</i> sp.

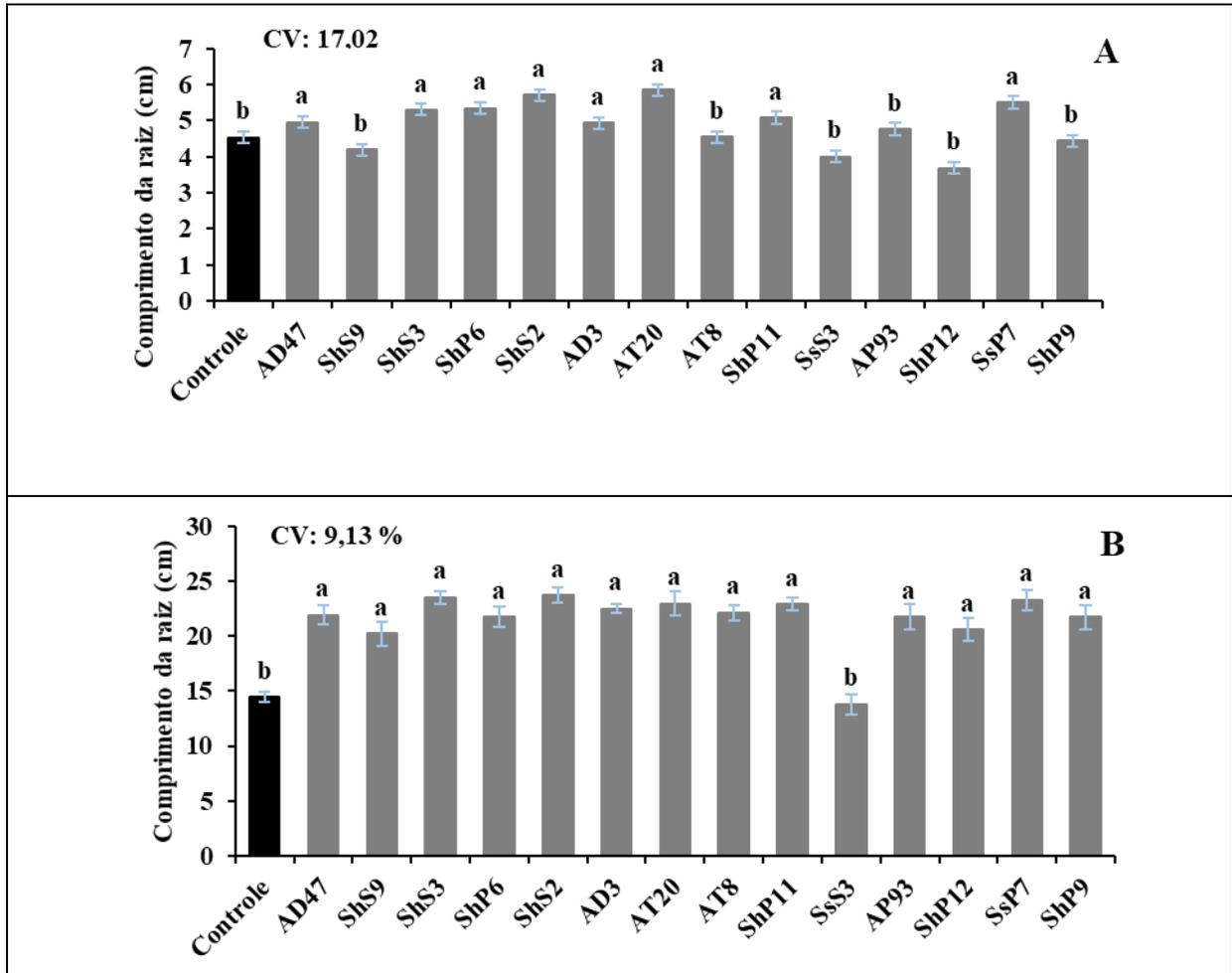
Fonte: A autora (2019).

4.2 Experimento I (Teste de germinação e promoção do crescimento radicular de milho)

Após quatro dias de germinação das sementes de milho, o efeito da inoculação de 14 estirpes bacterianas foi avaliado, e oito bactérias de seis gêneros diferentes promoveram ($p < 0,05$) o crescimento radicular da raiz principal das plântulas de milho em relação ao controle sem inóculo (Figura 9 A), essas bactérias pertencem aos gêneros *Bacillus* (AD47,

ShS3 e ShP6), *Brevundimonas* (ShS2), *Enterobacter* (AD3), *Leifsonia* (AT20), *Pseudomonas* (ShP11) e *Roseomonas* (SsP7).

Figura 9 - (A) Análise de comprimento das raízes de milho com quatro dias. (B) Análise de comprimento das raízes de milho com oito dias em resposta a bactérias promotoras do crescimento de plantas derivadas de leguminosas da caatinga. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Fonte: A autora (2019).

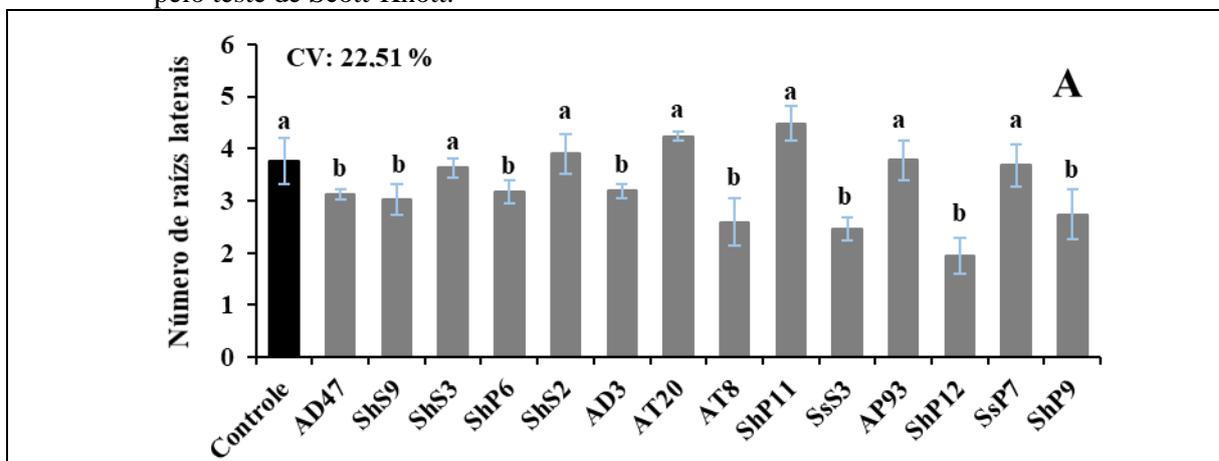
Aos oito dias após a germinação das plantas, houve um aumento no número de bactérias que apresentaram o fenótipo de promoção do crescimento de planta, em que 13 bactérias promoveram ($p < 0,05$) o crescimento da raiz principal das plântulas de milho (Figura 9 B). Estas bactérias representam os sete gêneros identificados neste estudo (item 4.1), a saber: AD47, ShS3, ShS9 e ShP6 do gênero *Bacillus*, ShS2 do gênero *Brevundimonas*, AD3 pertencente ao gênero *Enterobacter*, AT20 e AT8 do gênero *Leifsonia*, ShP11 *Pseudomonas*, SsP7 e ShP9 identificadas como do gênero *Roseomonas* e, por fim ShP12, AP93 e SsS3 do gênero *Paenibacillus*.

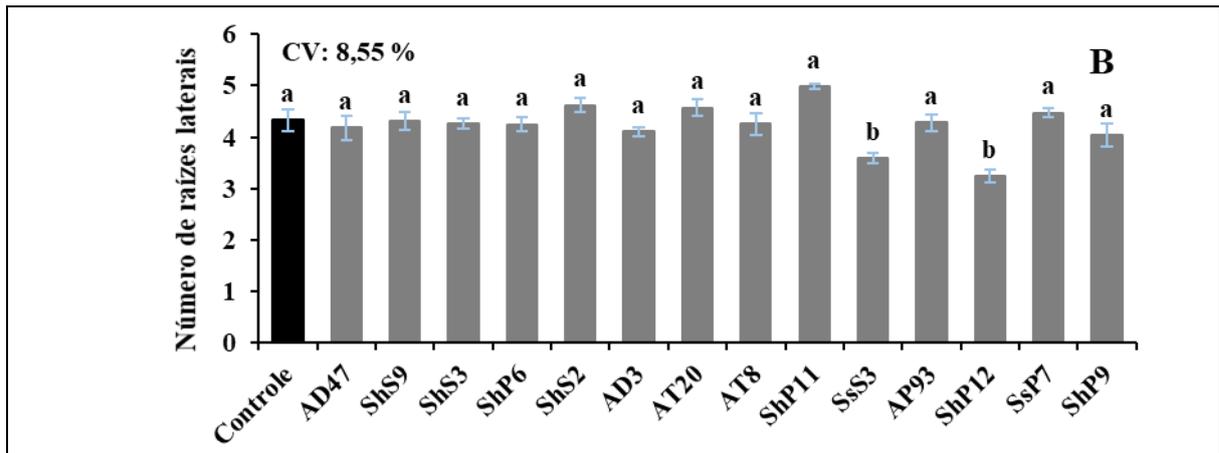
Esses resultados podem ser explicados pelo fato de as bactérias induzirem a produção de fito-hormônios como citocininas e auxinas, que afetam a proliferação de brotações ou aumentam a captação de água e nutrientes, modificando o sistema radicular, levando à superprodução de raízes e pelos radiculares (NUMAN *et al.*, 2018).

Segundo Sarkar *et al.*, (2018), várias linhagens como *Enterobacter*, *Bacillus*, *Roseomonas* e *Pseudomonas*, e outras bactérias endofíticas promovem o crescimento das plantas pela atividade da ACC desaminase, HCN, sideróforo, produção de AIA e solubilização de fosfato. O sistema radicular é ativado pelo AIA, o alongamento radicular é derivado do meristema apical e o desenvolvimento lateral da raiz aumenta o acesso da planta a nutrientes.

Os resultados apresentados na figura 10; A e B mostra que as estirpes bacterianas desempenharam papéis na diferenciação do número de raízes laterais. Quando comparado ao grupo controle, é visível que com quatro dias de avaliação das plântulas de milho, as sementes que receberam os tratamento com oito estirpes bacterianas (AD47, ShS9, ShP6, AD3, AT8, SsS3, ShP12 e ShP9), inibiram o aumento do número de raízes laterais. Entretanto, na segunda avaliação com oito dias, o número de estirpes que inibiram o aumento do número de raízes laterais foi reduzido para dois (SsS3 e ShP12), respectivamente dos gêneros *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp. As 11 estirpes não inibiram o número de raízes laterais; também não promoveram o aumento em relação ao controle.

Figura 10 - (A) Número de raízes laterais de plântulas de milho com quatro dias após inoculação. (B) Número de raízes laterais de plântulas de milho com oito dias em resposta a bactérias promotoras do crescimento de plantas derivadas de leguminosas da caatinga. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.





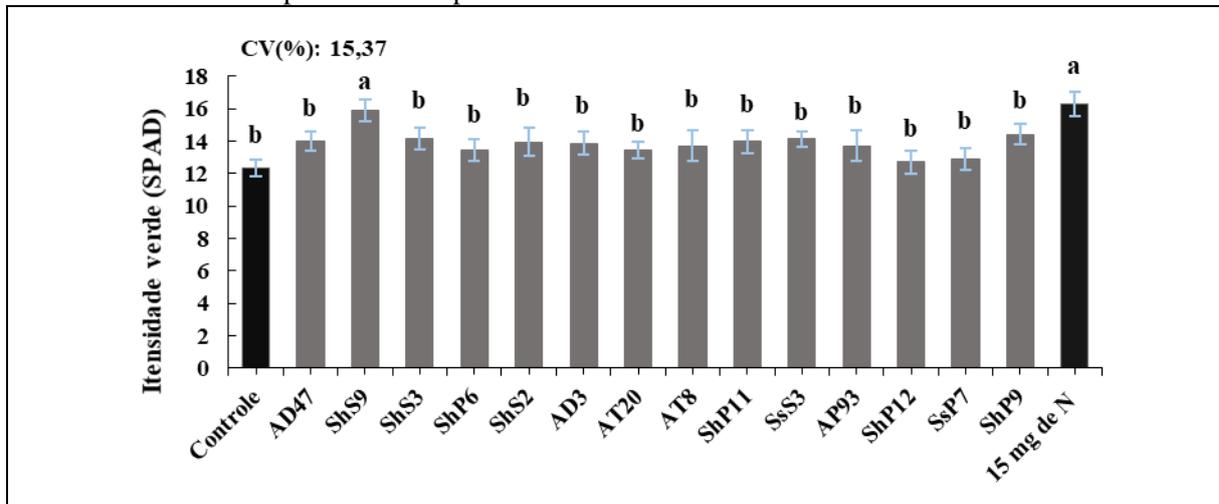
Fonte: A autora (2019).

A ACC-deaminase é uma enzima considerada chave para a produção vegetal, sendo responsável pela clivagem do aminoácido precursor do etileno na planta, ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano), reduzindo os níveis de ACC nas plantas. Bactérias excretam auxinas, induzindo o crescimento e proliferação de raízes secundárias e pelos radiculares. Contudo, quando os vegetais apresentam elevação nos níveis de auxinas, também se eleva a atividade da enzima ACC-sintase, transformando S-adenosil-L-metionina (SAM) à ACC. O ACC é precursor direto do etileno, o que acarreta o estresse, inibição do crescimento, aumento da respiração (GUIMARÃES *et al.*, 2018). Isso talvez possa explicar o fato de as raízes laterais terem sido inibidas pelas bactérias, no entanto não explica o fato disso não ter atingido o comprimento das raízes principais. A germinação não sofreu influência das estirpes bacterianas quando comparado ao controle. Isso pode ter acontecido pelo fato de as sementes estarem totalmente viáveis e todas germinarem ao mesmo tempo, como é visto nas Regras de análise de sementes (RAS) (SILVA, 2008).

4.3 Experimento II (Promoção do crescimento de milho em substrato estéril)

A intensidade verde (índice SPAD), massa seca da raiz (MSR), massa da parte aérea seca (MSPA) e massa seca total (MST) foram determinadas aos 30 dias após a emergência das sementes de milho. A figura 11 apresenta os resultados da intensidade verde, e, é possível ver que a estirpe ShS9 do gênero *Bacillus* promoveu o aumento ($p < 0,05$) do índice SPAD, mostrando desempenho semelhante ao tratamento que recebeu adubação com nitrogênio mineral.

Figura 11 - Aumento da intensidade verde em resposta a bactérias promotoras de crescimento de plantas em milho. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Fonte: A autora (2019).

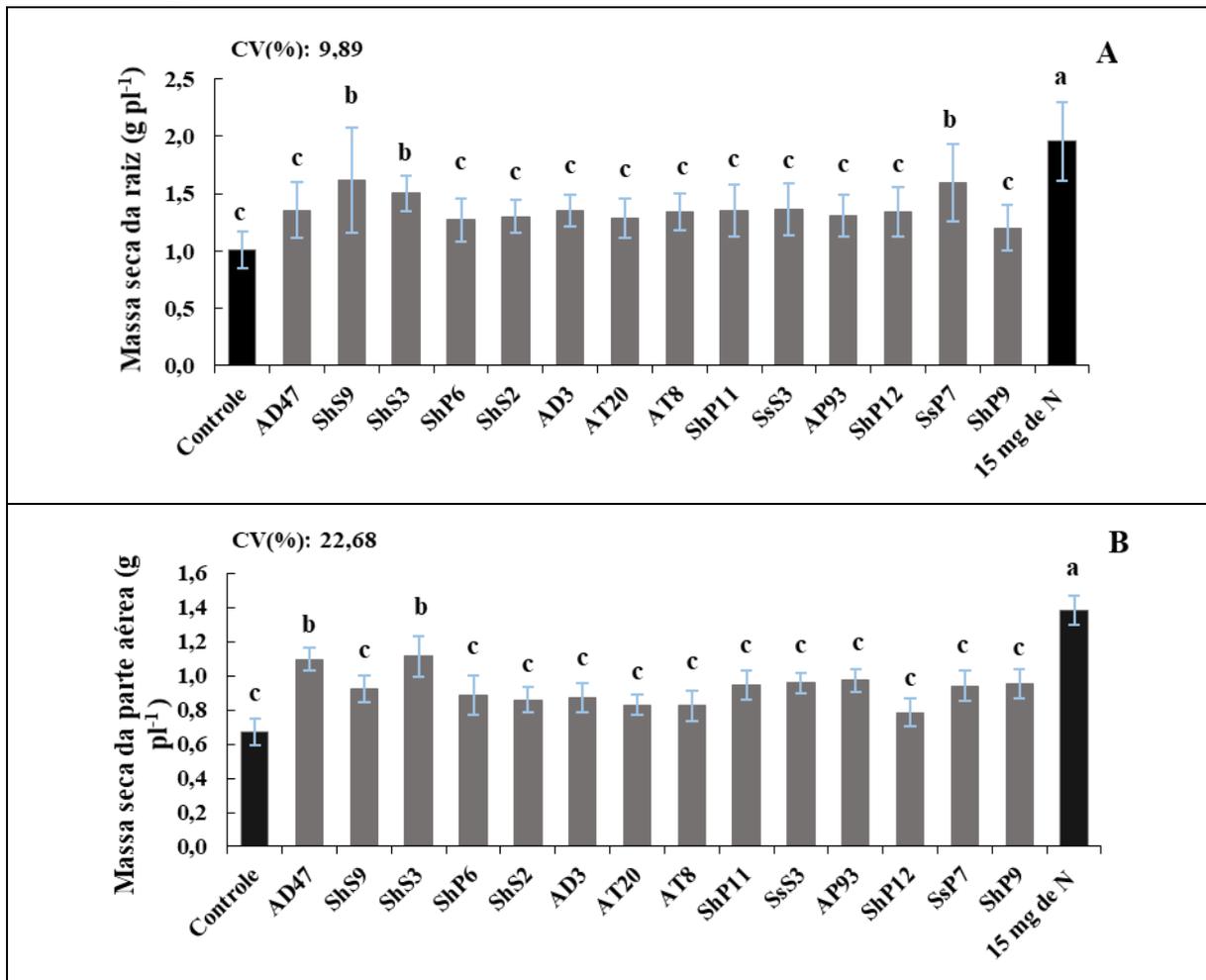
Atualmente, tem sido proposta a análise do teor de verde das folhas para avaliar o estado de nitrogênio da planta, devido à alta correlação que existe entre a intensidade do verde e o teor de clorofila com a concentração de nitrogênio na folha (MARENCO e LOPES, 2007). Essa correlação parte do princípio de que o nitrogênio é o elemento que compõe a estrutura dos cloroplastos.

Pagnani *et al.* (2018) trabalhando com inóculos rizobacterianos em *Cannabis sativa*, encontraram que os inóculos promoviam o aumento da intensidade verde com a mesma significância ao tratamento com apenas nitrogênio, fato esse encontrado nos resultados da figura 11, em que a bactéria ShS9 tem a mesma significância do tratamento com 15 mg de nitrogênio. Com relação a apenas uma bactéria do gênero *Bacillus* ter mostrado uma resposta positiva quando comparado ao controle com nitrogênio no aumento da intensidade verde, parece comum a maior resposta desse gênero ao aumento de determinadas variáveis na planta. A capacidade de bactérias do gênero *Bacillus* em promover o aumento da intensidade de verde parece um evento comum. Ângulo-Castro *et al.* (2018) e Karlidag *et al.* (2011) também identificaram estirpes de *Bacillus* que promoveram o aumento da intensidade de verde por aumentar a capacidade fotossintética no fotossistema II da planta.

Quanto à massa seca da raiz, as estirpes ShS9 e ShS3, de *Bacillus* e SsP7, do gênero *Roseomonas* promoveram ($p < 0,05$) o aumento do peso da raiz das plantas de milho quando comparado ao controle sem inóculo e sem N, porém essas estirpes não superaram o controle nitrogenado. A massa seca da parte aérea foi promovida por duas estirpes de *Bacillus* (AD47 e ShS3) quando comparado ao controle sem inóculo e sem N (figura 12) letras A e B. Esses

resultados apontam para a existência de especificidades da interação entre as estirpes estudadas e os tecidos da planta, em que algumas estirpes tem melhor efeito no crescimento de raiz, enquanto outras no tecido na parte aérea. Isso indica, talvez, a necessidade de inoculações conjuntas para a promoção do crescimento da planta baixo e acima do nível do solo.

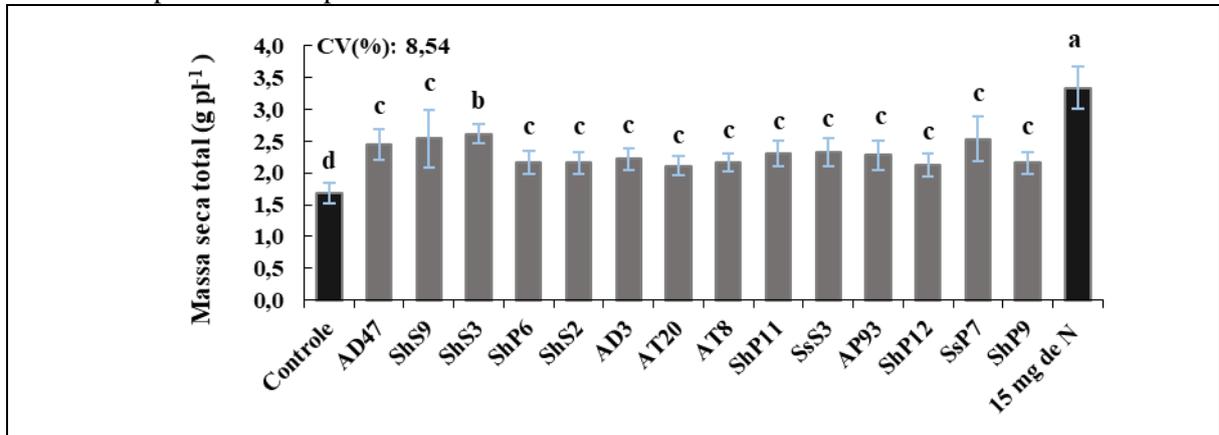
Figura 12 - Promoção da massa seca da raiz (A) e massa seca da parte aérea (B) por inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas em milho. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Fonte: A autora (2019).

Todas as estirpes bacterianas promoveram o aumento ($p < 0,05$) da massa seca total, indicando que a análise total da produção de biomassa foi um parâmetro mais sensível para a identificação do fenótipo de promoção de crescimento de planta nas bactérias. No entanto, os resultados apresentados na figura 13, mostraram existir quatro grupos estatísticos, onde é possível notar que a estirpe *Bacillus* ShS3 promoveu o maior aumento da biomassa total quando se compara as outras estirpes e, ao controle sem inóculo e sem N, apesar dessa estirpe não ter superado o controle nitrogenado.

Figura 13 - Promoção da massa seca total por bactérias promotoras de crescimento de plantas em milho. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Fonte: A autora (2019).

Na literatura já publicada, o gênero *Bacillus* sp. sempre está vinculado à produção de AIA, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio, atributos essenciais na facilitação da promoção da massa seca da raiz, da massa seca da parte aérea e da massa seca total (GIASSI; KIRITANI; KUPPER, 2016).

Em um estudo de Araujo e Guerreiro (2010) sobre o efeito de *Bacillus* na inoculação de sementes de milho. Descobriram que os isolados tiveram um efeito significativo nas variáveis número de folhas e biomassa seca total, sendo que, a maioria dos isolados que promoveram o crescimento do milho não estava entre os principais produtores de AIA *in vitro*. A capacidade dos microrganismos de produzir altas taxas de AIA *in vitro* não é um pré-requisito para o crescimento da planta. O efeito benéfico depende da concentração empregada. Em baixas concentrações, essa substância pode estimular o crescimento radicular, mas em concentrações mais altas, pode ter um efeito inibitório no crescimento das plantas. No entanto, a capacidade do microrganismo de produzir altas taxas de AIA *in vitro* não garante que esse microrganismo também seja um bom agente promotor de crescimento (DOBBELAERE *et al.*, 2002).

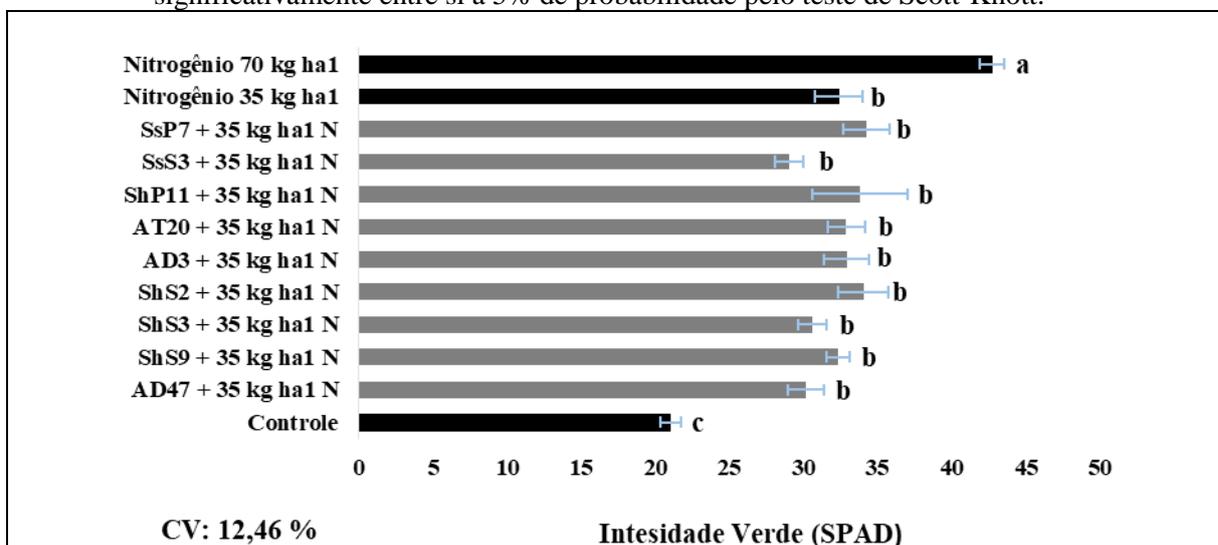
Segundo Pérez-Montañó *et al.* (2014) a fitoestimulação, produção de fitohormônios como AIA, GAs, citocininas e certos Compostos Orgânicos Voláteis (COV) alteram a morfogênese radicular, a proliferação, e melhoram a captação de minerais e a exsudação radicular, que promovem o crescimento das plantas, aumentando a biomassa da planta. Canuto *et al.* (2003) trabalhando com espécies diazotróficas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar utilizando substrato estéril, afirmam que a resposta a inoculação é bastante

variável e parece ser dependente de vários fatores incluindo o genótipo da planta e o ambiente. Essa dependência de fatores pode explicar o porquê de muitas estirpes não promoverem o aumento da massa seca da planta. Por fim, as variáveis número de folhas, volume da raiz (mL) e altura da planta (cm) não sofreram influência das estirpes bacterianas e portanto, não houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

4.4 Experimento III (Promoção do crescimento de milho em solo não estéril)

As variáveis de crescimento intensidade verde (Índice SPAD), altura (cm), diâmetro do caule (mm), número de folhas (pl^{-1}) massa da parte aérea seca (MSPA) e as variáveis fisiológicas acúmulo (g/MSPA) e eficiência (g/g) de N, P e K foram determinadas após 40 dias da emergência das sementes de milho. Todas as 9 estirpes (SsP7, SsS3, ShP11, AT20, AD3, ShS2, ShS3, ShS9 e AD47) avaliadas tiveram um desempenho positivo no aumento ($p < 0,05$) de alguma variável, quando correlacionada ao controle sem adição de nitrogênio. No entanto quando analisado em relação aos tratamentos que receberam somente adubação mineral com N as respostas foram variadas. As plantas de milho inoculadas com as estirpes SsP7, SsS3, ShP11, AT20, AD3, ShS2, ShS3, ShS9 e AD47 mais a adição 35 kg há^{-1} de N apresentaram o mesmo desempenho ($p < 0,05$) na intensidade de verde que o controle com 35 kg há^{-1} de N, essas estirpes são representadas por seis gêneros diferentes (*Bacillus*, *Brevundimonas*, *Enterobacter*, *Leifsonia*, *Pseudomonas* e *Roseomonas*, sendo que as médias entre os tratamentos variaram de 20,0 a 42,0 aproximadamente (figura 14).

Figura 14 - Intensidade verde em resposta a bactérias promotoras de crescimento de plantas em milho mais a adição de 35 kg há^{-1} de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

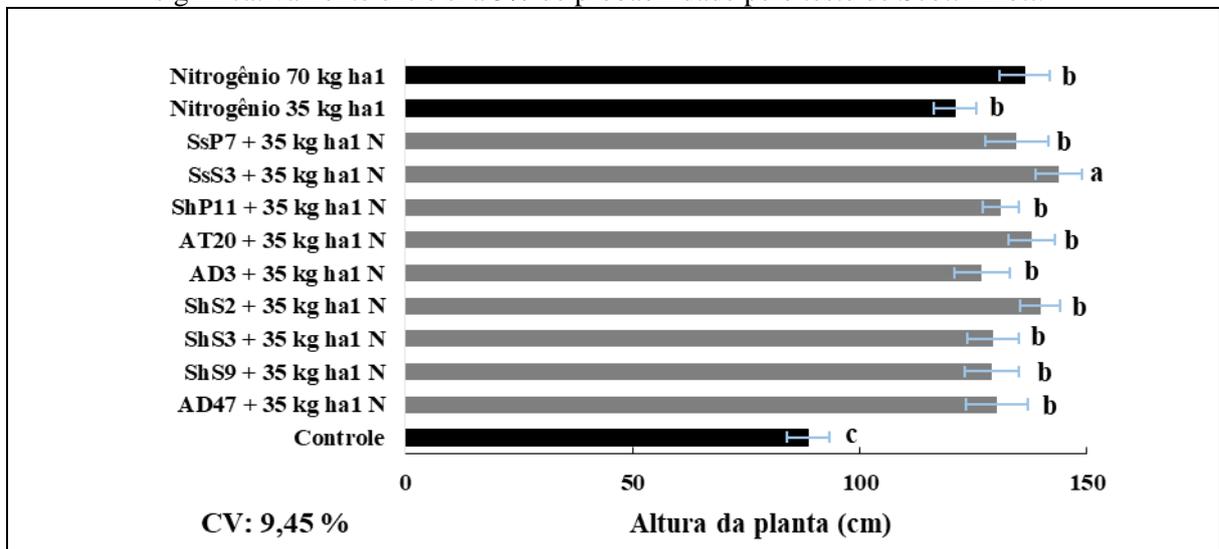


Fonte: A autora (2019).

O uso de inoculantes na cultura do milho tem sido cada vez mais valorizado, em vista dos benefícios que pode trazer à cultura. Quadros *et al.* (2014) trabalhando com três híbridos de milho inoculado, encontrou respostas significativas e diferentes entre os genótipos de milho com relação ao SPAD. O trabalho de Quadros *et al.* (2014) mostra que as médias do SPAD em plantas inoculadas são superiores e significativas do que as das plantas com o tratamento controle. Discorrem que durante o estágio V_3 e V_7 a leitura do SPAD aumentou linearmente e explicam esse fato pela comum disponibilidade de N no solo. Esse fato pode ser utilizado para entender o porquê de todas as plantas com as bactérias terem respondido positivamente ao aumento do SPAD, visto que, essas estirpes tem a adição de metade do nitrogênio disponível na forma de fertilizante junto a sua inoculação e comprova a parceria que existe entre disponibilidade N e o índice SPAD.

As plantas de milho mostraram resposta positiva ($p < 0,05$) à inoculação com a estirpe SsS3 para a variável altura quando comparadas as plantas que receberam metade da dose de N (70 Kg ha^{-1}) recomendada para adubação de milho (figura 15).

Figura 15 - Altura em resposta a bactérias promotoras de crescimento de plantas em milho mais a adição de 35 kg ha^{-1} de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Fonte: A autora (2019).

O efeito de rizobactérias, dentre as quais podemos destacar as do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus* sp. sobre o desenvolvimento de plantas são amplos, incluindo os efeitos benéficos na emergência e promoção de crescimento das plantas (ARAÚJO e GUERREIRO, 2010). Lima *et al.* (2011) em seu estudo sobre o sinergismo dos gênero *Bacillus*,

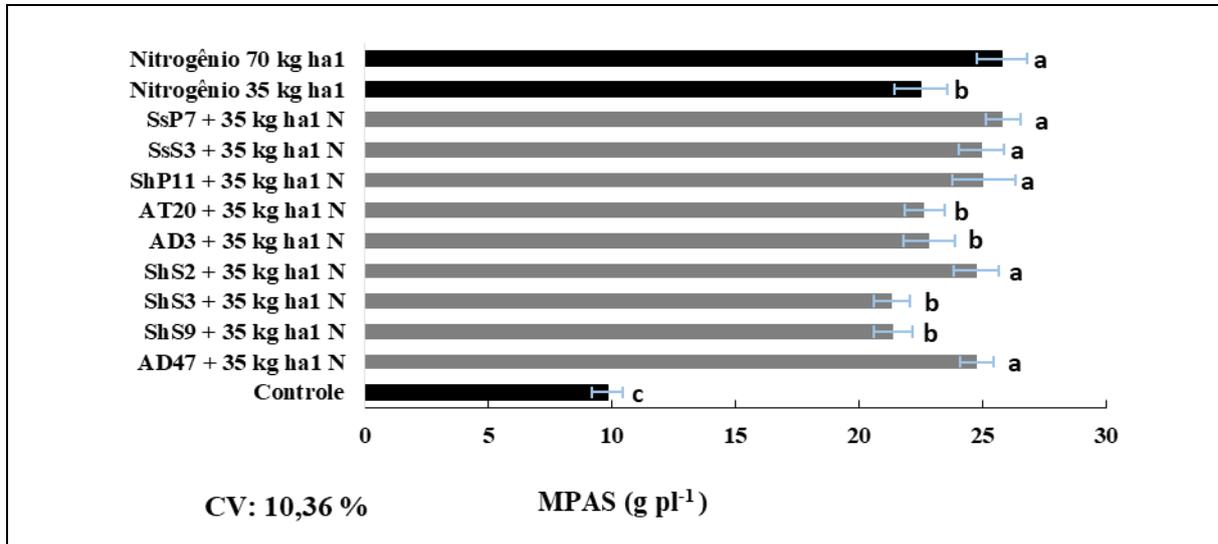
Paenibacillus, *Brevibacillus*, na simbiose *Bradyrhizobium*-Caupi, os autores caracterizaram as estirpes quanto à produção de ácido indol-acético e solubilização de fosfato.

Um trabalho recente de Kumari e Thakur (2018) em que foi feita uma análise bioquímica e proteômica de uma estirpe do gênero *Paenibacillus*, mostrou que está cepa apresentava caracteres para fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo, produção de amônia e de sideróforos. Esse caracter para a fixação de nitrogênio pode estar presente em outras estirpes do gênero, o que pode demonstrar o porquê da estirpe que utilizamos no trabalho ter demonstrado um desempenho maior na altura da planta de milho, já que a estirpe pertence ao gênero em questão.

O gênero *Paenibacillus* contém muitas espécies que são conhecidas por promoverem o crescimento de plantas, incluindo milho, abóbora, arroz, capim e muitos outros. Conseguem isso através de várias estratégias, produzindo ácido indol-3-acético (AIA) e outros fitohormônios como auxinas, solubilizando inacessíveis fontes de fósforo na forma que pode ser absorvida por raízes de plantas, e algumas espécies também podem fixar nitrogênio da atmosfera (GRADY *et al.*, 2016).

As estirpes bacterianas SsP7, SsS3, ShP11, ShS2 e AD47 mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N, figura 16 promoveram (p<0,005) o aumento da massa seca da parte aérea (MPAS) após 40 dias da emergência das plantas de milho, mostrando um desempenho semelhante ao controle nitrogenado com 70 kg ha⁻¹ de N. Essas estirpes pertencem respectivamente aos gêneros *Roseomonas*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, e *Bacillus*. Esses resultados corroboram com dados de muitos trabalhos (ARAUJO; GUERREIRO, 2010; DÖBEREINER; BALDANI; REIS, 1995; GLICK, 2012; GRADY *et al.*, 2016; NUMAN *et al.*, 2018; SANTOYO *et al.*, 2016) encontrados na literatura que trazem essas variedades de gêneros como sendo de bactérias que promovem o crescimento de plantas através de diferentes mecanismos, que vão desde a produção de hormônios que alteram positivamente o metabolismo da planta, fazendo com que a planta aumente sua biomassa, até bactérias que fazem com que as plantas consigam resistir a diferentes tipos de estresses ambientais, como por exemplo, resistência à patógenos e etc.

Figura 16 - Aumento da matéria seca da parte aérea em resposta à inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



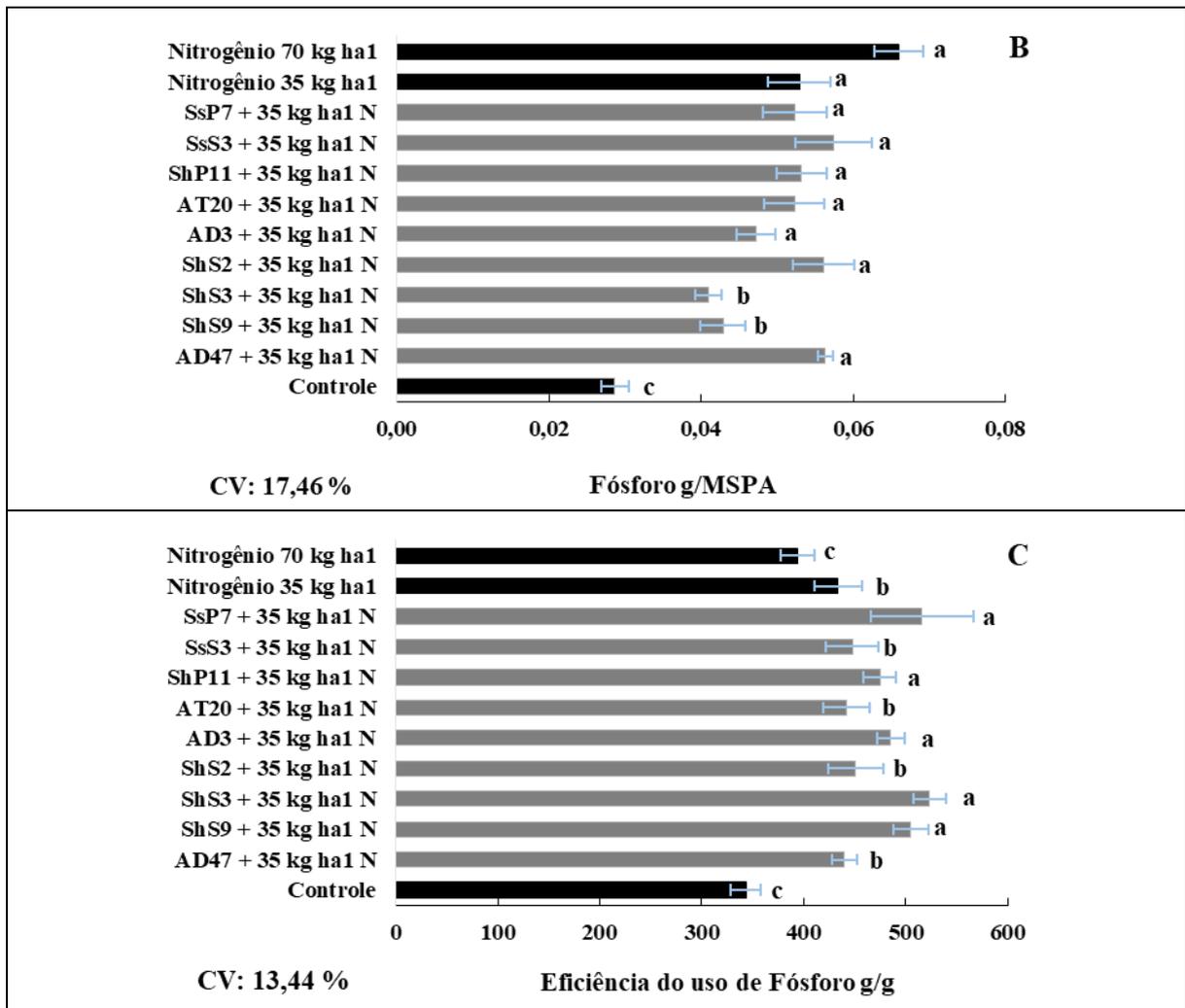
Fonte: A autora (2019).

Dois trabalhos, um de Silva *et al.* (2015) utilizando a adubação de cobertura e outro de Breda, Alves e Reis (2016) com a inoculação e presença de doses de nitrogênio, com o objetivo de avaliar se a inoculação em sementes de milho substitui a adubação nitrogenada, demonstraram que inoculação e a adubação em cobertura proporcionaram maiores rendimentos de grãos e altura de plantas e, a inoculação aumenta o vigor, a altura da planta e da inserção da espiga e o rendimento de grãos da cultura, sem interação entre estes dois fatores. Afirmam ainda que a inoculação favorece o acúmulo de P nos grãos, mas tem efeito positivo sobre a produtividade somente em combinação com doses de N mineral, o que indica que seu efeito é mais destacado na promoção do crescimento do milho do que na fixação biológica de N. Apesar desses trabalhos utilizarem inoculantes diferentes, a cultura em questão é o milho, o que pode explicar alguns fatores encontrados nesse trabalho.

Com relação a análise de nutrientes, com base no acúmulo e eficiência de N, P e K. Sete estirpes bacterianas (SsP7, SsS3, ShP11, AT20, AD3, ShS2 e AD47) mostraram o mesmo desempenho que os controles nitrogenados com 35 kg ha⁻¹ de N e 70 kg ha⁻¹ de N, aumentando ($p < 0,005$) o acúmulo de P g/MPAS de plantas de milho. Cinco estirpes bacterianas SsP7, ShP11, AD3, ShS3 e ShS9 promoveram ($p < 0,005$) maior eficiência da utilização do P nas plantas de milho, superando todos os controles, em comparação ao controle com 35 kg ha⁻¹ N quatro estirpes SsS3, AT20, ShS2 e AD47 mostraram o mesmo

desempenho. O controle sem inóculo e o controle nitrogenado com 70 kg ha^{-1} de N apresentaram o mesmo desempenho (Figura 17).

Figura 17 - A) Acúmulo e B) Eficiência de fósforo em milho em reposta a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha^{-1} de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Fonte: A autora (2019).

Diversos grupos de microrganismos presentes no solo ou na rizosfera são capazes, por mecanismos diversos, de extrair ou solubilizar fósforo P de frações insolúveis no solo e de fosfatos inorgânicos naturais poucos solúveis (GUIMARÃES *et al.*, 2018). O aporte de bactérias promotoras de crescimento de plantas no sistema solo-planta é capaz de incrementar a solubilização de fosfato, liberando mais compostos fosfatados aos vegetais, evidenciado em interações de entre BPCP e cana-de-açúcar (LIRA-CADETE *et al.*, 2012) e milho (PEDRINHO *et al.*, 2010).

Ahemad e Kibret (2014) em seu trabalho sobre mecanismos e aplicações de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, demonstram que os gêneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* etc, são solubilizadores de fosfato, alguns desses gêneros também são comuns aos que estão presentes no trabalho. Esses autores ainda afirmam que as plantas absorvem menos quantidades de fertilizantes fosfáticos aplicados e o restante é rapidamente convertido em complexos insolúveis no solo.

A solubilização do fósforo inorgânico ocorre como consequência da ação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular que são sintetizados por várias bactérias do solo (ZAIDI *et al.*, 2009). Por outro lado, a mineralização do fósforo orgânico ocorre através da síntese de uma variedade de fosfatases diferentes, catalisando a hidrólise de ésteres fosfóricos (GLICK, 2012).

Arif *et al.* (2017) utilizando uma estirpe rizobacteriana mobilizadora de fósforo *Bacillus cereus* GS6 na melhoria e eficiência simbiótica da soja em um aridisol emendada com adubo enriquecido com fósforo, obteve que a utilização do *Bacillus* mais a adição de composto enriquecido com fosfato (PEC), resultou em um acúmulo significativamente maior de nitrogênio, fósforo e potássio. Esses resultados podem ser comparados com os dados obtidos nessa pesquisa, já que o *Bacillus* AD47 promoveu acúmulo de fósforo semelhante aos controles nitrogenados.

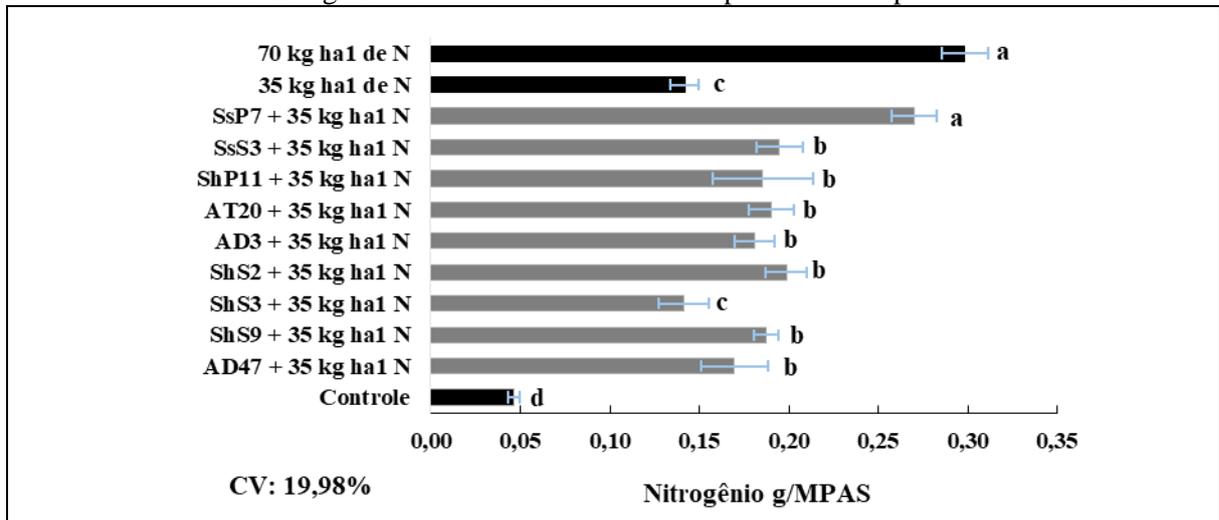
Os resultados presentes na figura 17, mostram que três bactérias SsP7, SsS3 e AD3 mostraram o mesmo desempenho tanto no acúmulo de fósforo como na eficiência deste. Essas bactérias são respectivamente dos gêneros *Roseomonas*, *Paenibacillus* e *Enterobacter*. O fato de essas bactérias tanto acumularem o fósforo como utilizarem de forma eficiente é bastante interessante. Esses resultados vão ao encontro aos dados evidenciados no trabalho de Tchuisseu Tchakounté *et al.* (2018) em que esses gêneros foram os mais representativos na solubilização de fosfato. Esses autores também destacaram outro gênero que solubiliza fosfato frequentemente e que está presente nos dados com um bom desempenho no acúmulo de fósforo, que é o gênero *Bacillus*, além desse gênero solubilizar bem o fósforo, ele também se destacou no trabalho desses autores como bom produtor de sidéforos, resistência a salinidade e fixação de nitrogênio. Essas observações apoiam o fato de que gêneros relacionados geralmente possuem características ecológicas e capacidades funcionais semelhantes (MORRISSEY *et al.*, 2016).

Dawwam *et al.* (2013) em seu estudo sobre o efeito benéfico do crescimento de plantas promovido por bactérias isoladas das raízes da planta da batata doce, demonstraram que bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, solubilizam o fosfato inorgânico podendo ser detectado no aumento do teor de fósforo no sistema de brotamento e estimulando o crescimento da batata, fornecendo um passo adiante na agricultura sustentável.

Em relação as análises de acúmulo e eficiência de N. A estirpe bacteriana SsP7 do gênero *Roseomonas* obteve o mesmo desempenho que o controle com 70 kg ha⁻¹ de N, promovendo o aumento (p<0,005) do acúmulo de nitrogênio na planta de milho. As estirpes SsS3, ShP11, AT20, AD3, ShS2, ShS9 e AD47 apresentaram desempenho (p<0,005) superior quando comparado ao controle com 35 kg ha⁻¹ de N no aumento do acúmulo de nitrogênio. E a estirpe ShS3 apresentou o mesmo desempenho que o controle com 35 kg ha⁻¹ de N, figura 18. O nitrogênio é um nutriente essencial, e embora sua concentração na atmosfera seja de aproximadamente 80%, as plantas não possuem a capacidade de absorvê-lo nessa forma química, caracterizando-o como um fator limitante para as culturas agrícolas, principalmente culturas de milho e soja (CERQUEIRA *et al.*, 2016). O fato dessas estirpes terem mostrado uma resposta positiva no aumento do acúmulo de N é um forte indicativo para fixação biológica de nitrogênio (FBN). Tais características e resultados encontrados para estas estirpes sugerem um indicativo do seu potencial uso como inoculante para culturas como o milho.

Um estudo de campo realizado por Dawwam *et al.* (2013) para determinar os efeitos de diferentes linhagens locais de BPCP e fertilizantes nitrogenados com três níveis (0, 33 e 100 kg ha⁻¹ de N) no crescimento e no rendimento da batata-doce, mostrou que plantas inoculadas com o BPCP juntamente com 1/3 da taxa normal (33 kg N ha⁻¹) proporcionou o maior peso seco das raízes de armazenamento em comparação com as plantas de controle não inoculadas, a inoculação também aumentou as concentrações de N, P e K. Os resultados desse trabalho se assemelham com os encontrados aqui, visto que a inoculação com metade da proporção de N foi igual ao controle com a dose de N total para essa variável.

Figura 18 - Acúmulo de nitrogênio em milho em reposta a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



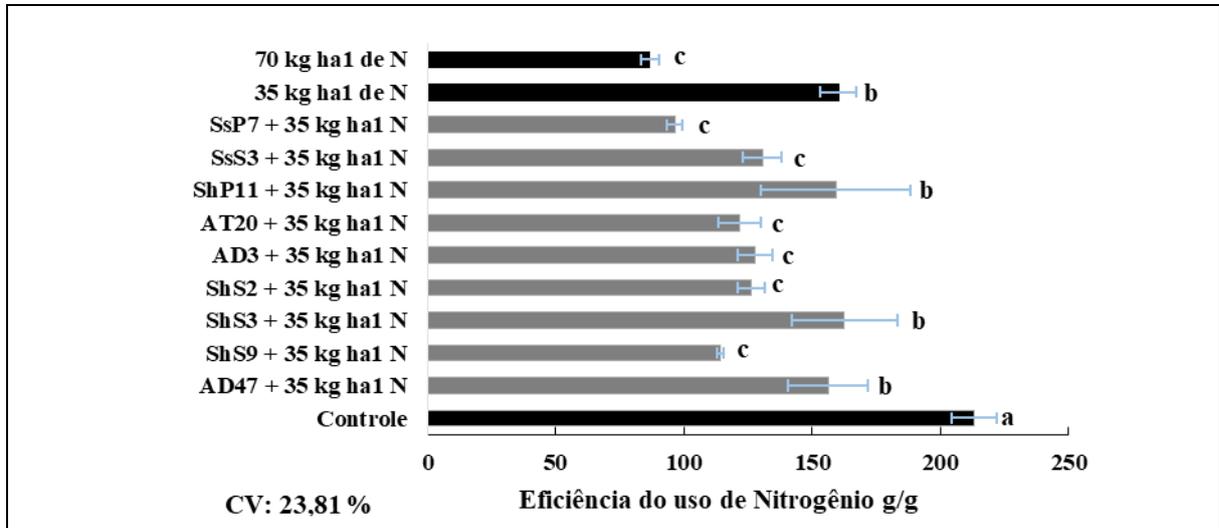
Fonte: A autora (2019).

Esses resultados vão ao acordo com os trabalhos de Hartmann *et al.* (2019); Tchuisseu Tchakounté *et al.* (2018) onde estirpes bacterianas de diversos gêneros, inclusive *Roseomonas*, promovem o aumento de nitrogênio nas plantas de milho.

A capacidade de fixar nitrogênio atmosférico é generalizada entre muitos gêneros bacterianos, como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Enterobacter* e *Erwinia*, isolados da rizosfera de milho (MONTAÑEZ *et al.*, 2012; ZAHID *et al.*, 2015). Ao mediar a aquisição de nitrogênio do ar e entregá-lo à planta, essas bactérias podem ser usadas como biofertilizantes para melhorar a produtividade das culturas e reduzir a aplicação de fertilizantes sintéticos com nitrogênio (RIBEIRO; CARDOSO, 2012).

Os resultados encontrados na figura 19, que trazem as análises da eficiência do uso do nitrogênio na planta em resposta a inoculação das bactérias mais a metade da dose de nitrogênio total, parecem indicar que o efeito das bactérias é mais destacado na promoção do crescimento do que na fixação biológica de nitrogênio, pois, é possível notar que os tratamentos que possuem combinações entre inoculantes e doses de nitrogênio não usaram esse nitrogênio de forma eficiente ou usaram o nitrogênio presente para satisfazer necessidades de seu próprio metabolismo e da planta, já que este é necessário no metabolismo da planta para realizar várias reações, além de ser constituinte de numerosos compostos orgânicos como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e compostos do metabolismo vegetal secundário, como alcaloides.

Figura 19 - Eficiência do uso de nitrogênio em milho em reposta a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

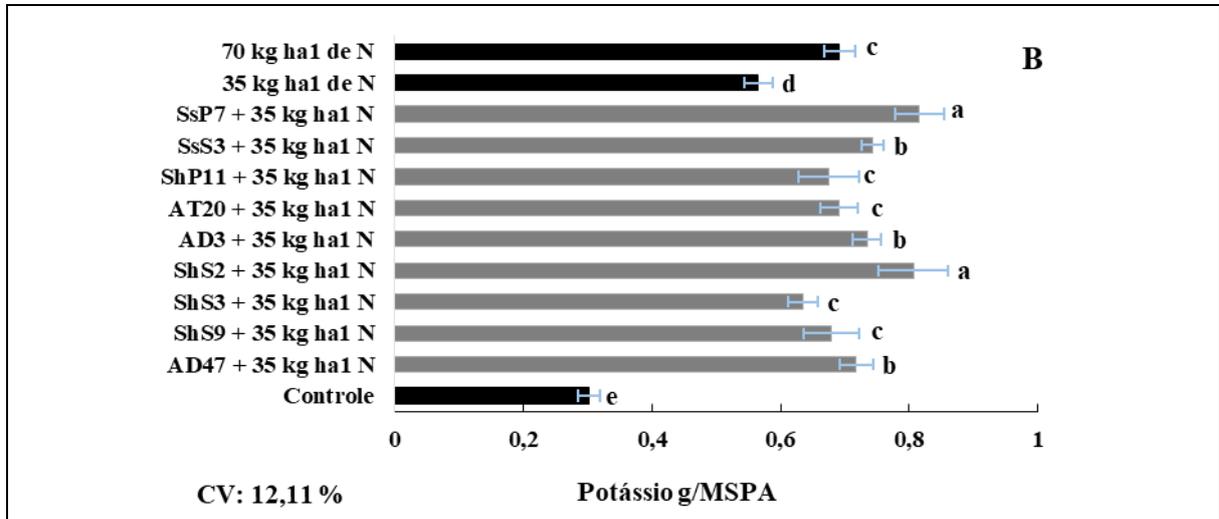


Fonte: A autora (2019).

Fageria e Baligar, (2005), afirmam que a natureza dinâmica do N e sua propensão à perda nos sistemas solo-planta criam um ambiente único e desafiador para seu gerenciamento eficiente. O fato de o controle sem inóculo e sem N, ter usado o nitrogênio de forma mais eficiente é um exemplo disso. Como esse tratamento não recebeu nitrogênio a mais do que o que já tinha presente no solo, as plantas tiveram que usar a pequena dose de nitrogênio presente de maneira mais eficiente.

Através das análises de acúmulo e eficiência de potássio foi possível notar nos resultados presentes da figura 20, que cinco estirpes bacterianas (SsP7, ShS2, SsS3, AD3 e AD47), dos gêneros *Roseomonas*, *Brevundimonas*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Bacillus* apresentaram desempenho superiores aos controles nitrogenados e sem nitrogênio e inóculo, promovendo assim o acúmulo de potássio em plantas de milho. No entanto as estirpes SsP7 e ShS2 obtiveram médias maiores e foram inseridas em outro grupo estatístico. As estirpes (ShP11, AT20, ShS3 e ShS9) apresentaram o mesmo desempenho que o controle com 35 kg ha⁻¹ de N.

Figura 20 - Acúmulo de potássio em plantas de milho em reposta a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Fonte: A autora (2019).

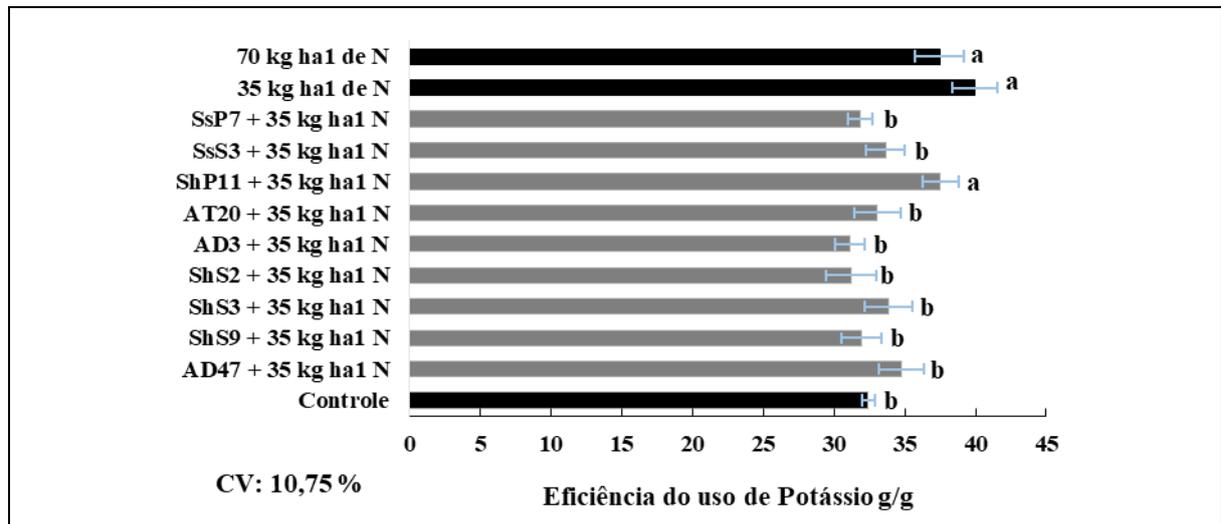
Ferreira, Soares e Soares (2019) relatam que alguns *Bacillus* spp. são capazes de dissolver rolamentos de potássio minerais, constituindo um suprimento de K⁺ às plantas. Isso pode explicar o porquê de estirpes do gênero *Bacillus* terem apresentado respostas positivas em relação ao acúmulo de potássio. Diversos são os trabalhos (Ali, Charles e Glick, 2014; Ferreira, Soares e Soares, 2019; Nautiyal *et al.*, 2013; Numan *et al.*, 2018; Rashid *et al.*, 2016; Sattar *et al.*, 2019) encontrados na literatura sobre o aumento de macronutrientes nas plantas, como o potássio, mediado por bactérias promotoras do crescimento de plantas.

Sattar *et al.* (2019) afirmam que o elemento potássio desempenha um papel vital em vários processos fisiológicos e metabólicos na planta, incluindo fotossíntese, taxa de assimilação, acúmulo de açúcares, eficiência do uso da água, regulação de estômatos, crescimento e desenvolvimento gerais das plantas. Esses autores também discorrem muito desses gêneros, que também são comuns a esse trabalho e obtiveram destaque, como mobilizadores de potássio. Essas bactérias que solubilizam potássio usam como principais mecanismos a acidólise, a quelção, reações de troca, complexólise e produção de ácido orgânico (MEENA; MAURYA; VERMA, 2014).

O trabalho de Kavamura (2012) traz os gêneros *Enterobacter*, *Roseomonas* e *Bacillus* de bactérias provenientes de cactáceas como os mais representativos na promoção e acúmulo de macronutrientes, principalmente N, P e K, esses gêneros também foram os mais representativos no acúmulo de potássio em milho.

A estirpe ShP11, demonstrou um desempenho semelhante aos controles com 35 kg ha⁻¹ de N e 70 kg ha⁻¹ de N no uso eficiente de potássio, todas as outras estirpes apresentaram um desempenho semelhante ao controle sem nitrogênio no uso eficiente de potássio, como é notado na **figura 21**. A eficiência do uso de K⁺ por diferentes microrganismos varia com a natureza dos minerais constituídos de potássio e as condições aeróbias (UROZ *et al.*, 2009).

Figura 21 - Eficiência do uso de potássio em milho em reposta a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Fonte: A autora (2019).

5 CONCLUSÕES

Endófitos bacterianos de leguminosas da caatinga podem ser promissores na promoção do crescimento do milho.

Populações espontâneas de leguminosas podem hospedar bactérias com diferentes identidades e funções, revelando uma alta diversidade da comunidade bacteriana ligada às culturas de milho.

Uma formulação, contendo as estirpes (ShS9, ShS3, SsP7, ShS2, ShP11 e AT20) que tiveram melhor desempenho em diversas variáveis de crescimento nos três experimentos pode ser recomendada para realização de ensaios de campo visando a confirmação dos resultados obtidos em casa de vegetação.

Os resultados do experimento III, mostraram que essas estirpes bacterianas estão inclinadas a terem uma propensão na facilitação do acúmulo de nutrientes em plantas de milho.

Caracterizações adicionais dos respectivos papéis desses endófitos associados a nódulos de leguminosas da caatinga permitirá obter melhores insights para explorar o potencial de promover o crescimento das plantas nas condições adversas que prevalecem em climas cada vez mais áridos e semiáridos.

Tais estudos são de particular importância em um cenário climático em mudança, onde a produção sustentável de plantas deve necessariamente ser obtida sob práticas ambientalmente sustentáveis, visando a conservação da biodiversidade dos recursos do solo.

REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, [on-line], v. 26, n. 1, p. 1–20, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364713000293>. Acesso em: 07 jul. 2019.
- ALI, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. **Plant Physiology and Biochemistry**, [on-line], v. 80, p. 160–167, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769617>. Acesso em: 07 jul. 2019.
- ALI, S. *et al.* A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in Burkholderia spp. **Journal of Theoretical Biology**, Ontario, v. 343, p. 193–198, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24513137>. Acesso em: 08 jul. 2019.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, [on-line], v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694>. Acesso em: 02 set. 2019.
- ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho**. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <https://tede.ufrrj.br/jspui/handle/tede/267>. Acesso em: 11 nov. 2019.
- ANGULO-CASTRO, A. *et al.* Growth and photochemical efficiency of photosystem II in seedlings of two varieties of *Capsicum annuum* L. inoculated with rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. **Revista Argentina de Microbiologia**, [on-line], v. 50, n. 2, p. 178–188, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054549>. Acesso em: 08 jul. 2019.
- ARAUJO, F. F. de; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores 837 de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciencia e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 837–844, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542010000400007&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 09 out. 2019.
- BALDOTTO, L. E. B. *et al.* Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 349–360, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832010000200008. Acesso em: 09 out. 2019.
- BEASLEY, F. C.; MAROLDA, C. L.; CHEUNG, J.; BUAC, S.; HEINRICHS, D. E. *Staphylococcus aureus* transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by staphyloferrin A, staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence. **Infection and Immunity**, Londres, v. 79, n. 6, p.

2345–2355, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402762>. Acesso em: 09 set. 2019.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, Viçosa, v. 11, n. 5, p. 557–574, 2001. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583150120076120>. Acesso em: 10 dez. 2019.

BORTOLOTTI, V. L. **Produção de sideróforos e hormônio de crescimento vegetal do tipo ácido indolacético por bactérias diazotróficas provenientes de nódulos de Mimosa spp. em solos ultramáficos**. 2014. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Gestão Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2014. Disponível em: http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4622/1/MD_COGEA_2014_1_02.pdf. Acesso em: 10 dez. 2019.

BREDA, F. A. da F.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 1, p. 45–52, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/294580653_Produtividade_de_milho_na_presenca_de_doses_de_N_e_de_inoculacao_de_Herbaspirillum_seropedicae. Acesso em: 23 out. 2019.

CANUTO, E. D. L.; SALLES, J. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; PERIN, L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, [on-line], v. 37, n. 3, p. 67–72, 2003. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/237740434_respostas_de_plantas_micropropagadas_de_cana-de-acucar_a_inoculacao_de_bacterias_diazotroficas_endofiticas. Acesso em: 11 dez. 2019.

CASSÁN, F. *et al.* Producción de fitohormonas por Azospirillum sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. (ed.). **Azospirillum sp.**: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86. Disponível em: https://www.academia.edu/30121628/PRODUCCION_DE_FITOHORMONAS_POR_AZOSPIRILLUM_SP_ASPECTOS_FISIOLOGICOS_Y_TECNOLOGICOS_Y_TECNOLOGICO_DE_LA_PROMOCION_DEL_CRECIMIENTO_VEGETAL. Acesso em: 19 set. 2019.

CARMO, C.A.F.S. *et al.* Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2000. 41 p. (Circular técnica, 6).

CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36 p. (Documentos, 139). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/461542/1/doc139.pdf>. Acesso em: 12 de out. 2019.

CERQUEIRA, W. F.; MORAIS, J. S. DE; MIRANDA, J. S.; MACÊDO, E. D. DE; SANTOS, A. F. DE J. S. Rizobactérias do semiárido na promoção de crescimento de plantas de milho (*Zea mays* L.). **Cadernos Macumbira**, São Geraldo, v. 1, n. 2, p. 26–33, 2016. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/315552493_RIZOBACTERIAS_DO_SEMIARIDO_NA_PROMOCAO_DE_CRESCIMENTO_DE_PLANTAS_DE_MILHO_Zea_mays_L. Acesso em: 11 nov. 2019.

COELHO, A. E. *et al.* Seed inoculation with *Azospirillum brasilense* in corn plants submitted to water limitation. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 16, n. 2, p. 186–192, 2017. Disponível em: <http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/14004>. Acesso em: 11 nov. 2019.

COMBES-MEYNET, E.; POTHIER, J. F.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; PRIGENT-COMBARET, C. The pseudomonas secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of azospirillum genes involved in plant-growth promotion. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [on-line], v. 24, n. 2, p. 271–284, 2011. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/47659586_The_Pseudomonas_Secondary_Metabolite_24-Diacetylphloroglucinol_Is_a_Signal_Inducing_Rhizoplane_Expression_of_Azospirillum_Genes_Involved_in_Plant-Growth_Promotion. Acesso em: 12 out. 2019.

CONN, K. L.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant growth-promoting rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ontario, v. 43, n. 9, p. 801–808, 1997. Disponível em: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m97-117?journalCode=cjm#.XhUMOUdKjIU>. Acesso em: 22 dez. 2019.

DAWWAM, G. E.; ELBELTAGY, A.; EMARA, H. M.; ABBAS, I. H.; HASSAN, M. M. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. **Annals of Agricultural Sciences**, Cairo, v. 58, n. 2, p. 195–201, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0570178313000298>. Acesso em: 22 dez. 2019.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, [on-line], v. 36, n. 4, p. 284–297, 2002. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-002-0534-9>. Acesso em: 22 dez. 2019.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. Endophytic Occurrence of Diazotrophic Bacteria in Non-Leguminous Crops. **Azospirillum VI and Related Microorganisms**, Assam, n. 1993, p. 3–14, 1995. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-79906-8_1. Acesso em: 22 dez. 2019.

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, Rio de Janeiro, n.8, p. 9, 1990. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40141990000100011. Acesso em: 23 dez. 2019.

DROGUE, B.; DORÉ, H.; BORLAND, S.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; PRIGENT-COMBARET, C. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants?. **Research Microbiology**, [on-line], 163: 500–510, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22989671>. Acesso em: 24 nov. 2019.

EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, Tashkent, v. 36, n. 2–3, p. 184–189, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139307000455>. Acesso em: 20 dez. 2019.

EGAMBERDIYEVA, D.; HÖFLICH, G. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. **Journal of Arid Environments**, [on-line], v. 56, n. 2, p. 293–301, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0140196303000508>. Acesso em: 24 dez. 2019.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing Nitrogen Use Efficiency in Crop Plants. **Advances in Agronomy**, [on-line], v. 88, n. 05, p. 97–185, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211305880046>. Acesso em: 22 nov. 2019.

FERREIRA, C. M. H.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. **Science of the Total Environment**, [on-line], v. 682, p. 779–799, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719317541>. Acesso em: 22 nov. 2019.

FETHERSTON, J. D. *et al.* The Yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague. **Infection and Immunity**, [on-line], v. 78, n. 5, p. 2045–2052, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20160020>. Acesso em: 23 out. 2019.

FOWLER, D. *et al.* The global nitrogen cycle in the Twentyfirst century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [on-line], v. 368, n. 1621, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23713126>. Acesso em: 24 dez. 2019.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Leopoldo, v. 82, n. 0, p. 1–9, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1808-16572015000100403&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 19 ago. 2019.

GERMIDA, J. J. *et al.* Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, [on-line], v. 26, n. 1, p. 43–50, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168649698000208>. Acesso em: 18 nov. 2019.

GIASSI, V.; KIRITANI, C.; KUPPER, K. C. Bacteria as growth-promoting agents for citrus

rootstocks. **Microbiological Research**, São Carlos, v. 190, p. 46–54, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27393998>. Acesso em: 23 out. 2019.

GUABIRABA, A. J. G. **Simbiose entre *Chloroleucon dumosum* (Benth) G.P. Lewis e rizóbios de solos da caatinga**. 2018. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) - Universidade Federal de Alagoas, *Campus Arapiraca*, Arapiraca, 2018.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, [on-line], v. 2012, p. 1–15, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/258925236_Plant_Growth-Promoting_Bacteria_Mechanisms_and_Applications. Acesso em: 11 nov. 2019.

GOMES, N. S. B. **Seleção de Antagonistas para o controle de *Cylindrocladium Spathulatum*, agente causal da pinta-preta em erva-mate**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/25122>. Acesso em: 09 set. 2019.

GRAÇAS, J. P. *et al.* **Microrganismos estimulantes na agricultura**. São Paulo: Esalq, 2015. (Sério Produtor rural, 59). Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/286925078_Microrganismos_estimulantes_na_agricultura. Acesso em: 05 set. 2019.

GRADY, E. N. *et al.* Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: A review. **Microbial Cell Factories**, [on-line], v. 15, n. 1, p. 1–18, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27905924>. Acesso em: 04 dez. 2019.

GUIMARÃES, V. F. *et al.* Bactérias promotoras de crescimento vegetal: da FBN à regulação hormonal, possibilitando novas aplicações. *In: ZAMBOM, M. A. et al. (org.). Ciências*

agrárias: ética do cuidado, legislação e tecnologia na agropecuária. 1. ed. Marechal Cândido Rândôn: UNIOESTE, 2018. p. 192-212. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/323943035_Bacterias_Promotoras_de_Crescimento_Vegetal_da_FBN_a_regulacao_hormonal_possibilitando_novas_aplicacoes. Acesso em: 24 nov. 2019.

HALLMANN, J. *et al.* Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, [on-line], v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997. Disponível em: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/m97-131#.XhUSYkdKjIU>. Acesso em: 11 out. 2019.

HARTMANN, A. *et al.* Assessment of the structural and functional diversities of plant microbiota: Achievements and challenges: a review. **Journal of Advanced Research**, [on-line], v. 19, p. 3–13, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123219300852>. Acesso em: 04 dez. 2019.

HERRERA PAREDES, S.; LEBEIS, S. L. Giving back to the community: microbial mechanisms of plant–soil interactions. **Functional Ecology**, Tennessee, v. 30, n. 7, p. 1043–1052, 2016. Disponível em: <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2435.12684>. Acesso em: 03 jan. 2020.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, [on-line], v. 311, n. 1–2, p. 1–18, 2008.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/226974357_Global_Inputs_of_Biological_Nitrogen_Fixation_in_Agricultural_Systems. Acesso em: 03 jan. 2020.

IBAÑEZ, F. *et al.* Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, [on-line], n.1, v. 32, , p. 49-55, 2020. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/23569586_Endophytic_occupation_of_peanut_root_nodules_by_opportunistic_Gammaproteobacteria. Acesso em: 03 de jan. 2020.

IKEDA, A. C. **Bioprospecção e identificação de bactérias isoladas de raízes de milho (*Zea mays* L.) para promoção de crescimento vegetal e controle biológico**. 2014. 95 f. Tese (Doutorado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/338233746_Bioprospeccao_e_identificacao_de_bacterias_isoladas_de_raizes_de_milho_Zea_mays_L_para_promocao_de_crescimento_vegetal_e_controle_biologico?enrichId=rgreq-a6e569003119517a7c852d9699fc109e-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzMzODIzMzc0NjUzBUzo4NDE4MTAwMDM5MDI0NjVAMTU3NzcxNDU1MzY3NA%3D%3D&el=1_x_3&_esc=publicationCoverPdf. Acesso em: 07 fev. 2020.

JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant and Soil**, Rio de Janeiro, v. 356, n. 1–2, p. 1–3, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-012-1317-1>. Acesso em: 21 nov. 2019.

JIMENEZ, P. N. *et al.* Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. **Microbiology**, [on-line], v. 156, n. 1, p. 49–59, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19778968>. Acesso em 21 nov. 2019.

KARLIDAG, H. *et al.* Effects of plant growth promoting bacteria on yield, growth, leaf water content, membrane permeability, and ionic composition of strawberry under saline conditions.

Journal of Plant Nutrition, [on-line], v. 34, n. 1, p. 34–45, 2011. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/233122517_Effects_of_plant_growth_promoting_bacteria_on_yield_growth_leaf_water_content_membrane_permeability_and_ionic_composition_of_strawberry_under_saline_conditions. Acesso em: 21 nov. 2019.

KAVAMURA, V. N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico**. 2012. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-25102012-095956/pt-br.php>. Acesso em: 27 dez. 2019.

KUMARI, M.; THAKUR, I. S. Biochemical and proteomic characterization of *Paenibacillus* sp. ISTP10 for its role in plant growth promotion and in rhizostabilization of cadmium.

Bioresource Technology Reports, [on-line], v. 3, p. 59–66, 2018. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2589014X1830046X>. Acesso em: 27

dez. 2019.

LA TORRE-RUIZ, N. DE; RUIZ-VALDIVIEZO, V. M.; RINCÓN-MOLINA, C. I.; RODRÍGUEZ-MENDIOLA, M.; ARIAS-CASTRO, C.; GUTIÉRREZ-MICELI, F. A.; PALOMEQUE-DOMINGUEZ, H.; RINCÓN-ROSALES, R. Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. **Brazilian Journal of Microbiology**, Tuxtla Gutiérrez, v. 47, n. 3, p. 587–596, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822016000300587. Acesso em: 26 dez. 2019.

LAZAROVITS, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **HortScience**, [on-line], v. 32, n. 2, p. 188–192, 1997. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285896679_Rhizobacteria_for_Improvement_of_Plant_Growth_and_Establishment. Acesso em: 26 dez. 2019.

LEITE, J. *et al.* Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. **Frontiers in Plant Science**, [on-line], v. 7, p. 2064, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.02064/full>. Acesso em: 10 fev. 2020.

LIMA, A. S. T. de *et al.* Sinergismo *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [on-line], v. 35, n. 3, p. 713–721, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832011000300006. Acesso em: 14 set. 2019.

LUGTENBER, G. B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review Microbiology**, [on-line], v. 32, p. 541–556, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/229138683_Plant-Growth-Promoting_Rhizobacteria. Acesso em: 27 nov. 2019.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319 p.

MARIA, F.; MOREIRA, D. S. Diazotrophic associative bacteria : diversity , ecology and potential applications Bactérias diazotróficas associativas : diversidade , ecologia e potencial de aplicações. 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/279467287_Diazotrophic_associative_bacteria_Diversity_ecology_and_potential_applications. Acesso em: 15 set. 2019.

MARQUEZ-SANTACRUZ, H. A. *et al.* Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. **Genetics and Molecular Research**, [on-line], v. 9, n. 4, p. 2372–2380, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/49683034_Diversity_of_bacterial_endophytes_in_roots_of_Mexican_husk_tomato_plants. Acesso em 26 dez. 2019.

MEENA, V. S.; MAURYA, B. R.; VERMA, J. P. Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? **Microbiological Research**, [on-line], v. 169, n. 5–6, p. 337–347, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501313001432>. Acesso em: 04 jan. 2020.

MEYER, S. E. de *et al.* A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). **Soil Biology and Biochemistry**, Bélgica, v. 83, p. 1–11, 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071715000127>. Acesso em: 20 set. 2019.

MURESU, R. *et al.* Nodule-associated microbiome diversity in wild populations of *Sulla coronaria* reveals clues on the relative importance of culturable rhizobial symbionts and co-infecting endophytes. **Microbiological Research**, Sassari, v. 221, n. January, p. 10–14, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501318314381>.

Acesso em: 20 set. 2020.

NAUTIYAL, C. S.; SRIVASTAVA, S.; CHAUHAN, P. S.; SEEM, K.; MISHRA, A.; SOPORY, S. K. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, [on-line], v. 66, p. 1–9, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/235775344_Plant_growth-promoting_bacteria_Bacillus_amyloliquefaciens_NBRISN13_modulates_gene_expression_profile_of_leaf_and_rhizosphere_community_in_rice_during_salt_stress. Acesso em: 10 out. 2019.

NUMAN, M. *et al.* Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. **Microbiological Research**, Islamabad, v. 209, p. 21–32, 2018a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501317312806>. Acesso em: 10 out. 2019.

OLIVEIRA, A. L. M. de *et al.* Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, [on-line], v. 3, n. 1, p. 56, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/281377292_Aplicacoes_da_biodiversidade_bacteria_na_do_solo_para_a_sustentabilidade_da_agricultura. Acesso em: 12 dez. 2019.

OLIVEIRA, M. A. de *et al.* Desempenho agrônômico do milho sob adubação mineral e inoculação das sementes com rizobactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [on-line], v. 16, n. 10, p. 1040–1046, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v16n10/a02.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2019.

PAGNANI, G. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in *Cannabis sativa* ‘Finola’ cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics. **Industrial Crops and Products**, [on-line], v. 123, n. october, p. 75–83, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669018305430>. Acesso em: 03 out. 2019.

PARTIDA-MARTÍNEZ, L. P.; HEIL, M. The microbe-free plant: Fact or artifact? **Frontiers in Plant Science**, [on-line], v. 2, n. DEC, p. 1–16, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22639622>. Acesso em: 14 dez. 2019.

PEDRINHO, E. Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays*). **Aleph**, [on-line], 2009. Disponível em:

https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/103918/pedrinho_ean_dr_jabo.pdf. Acesso em: 03 ago. 2019.

PÉREZ-MONTAÑO, F.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R. A.; CERRO, P. DEL; ESPUNY, M. R.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; OLLERO, F. J.; CUBO, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, [on-line], v. 169, n. 5–6, p. 325–336, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131300164X>. Acesso em: 06 dez. 2019.

PRAYITNO, J. O. K. O.; ROLFE, B. Characterization of Endophytic diazotroph bacteria isolated from rice. **HAYATI Journal of Biosciences**, [on-line], v. 17, n. 2, p. 73–78, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1978301916302145>. Acesso em: 24 set. 2019.

QUADROS, P. D. *et al.* Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, [on-line], v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2014000200008. Acesso em: 24 ago. 2019.

RASHID, M. I.; MUJAWAR, L. H.; SHAHZAD, T.; ALMEELBI, T.; ISMAIL, I. M. I.; OVES, M. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. **Microbiological Research**, [on-line], v. 183, p. 26–41, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26805616>. Acesso em: 22 out. 2019.

RICHARDSON, A. E. *et al.* Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. **Plant and Soil**, [on-line], v. 349, n. 1–2, p. 121–156, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-011-0950-4>. Acesso em: 04 nov. 2019.

RITCHIE, S.; HANWAY, J.; BENSON, G. How a corn plant develops.; Spec. Publ. 48. **Iowa Agricultural and Home Economics Experiment Station Publications**, Aioa, v. 48, 1997. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/9b58/851e0cd351d2edaa61e5ebce890095f6ffd6.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2019.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, [on-line], v. 17, n. 4–5, p. 319–339, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975099000142>. Acesso em: 22 dez. 2019.

SAHA, R. *et al.* Microbial siderophores: A mini review. **Journal of Basic Microbiology**, [on-line], v. 53, n. 4, p. 303–317, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/228066850_Microbial_siderophores_A_mini_review. Acesso em: 06 dez. 2019.

SANTOYO, G. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, [on-line], v. 183, p. 92–99, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131530029X>. Acesso em: 10 jan.

2020.

SARKAR, A. *et al.* A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. **Research in Microbiology**, [on-line], v. 169, n. 1, p. 20–32, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250817301481>. Acesso em: 02 jan. 2020.

SATTAR, A. *et al.* Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. **Applied Soil Ecology**, [on-line], v. 133, n. September, p. 146–159, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139318308096>. Acesso em: 02 jan. 2020.

SCHNEIDER, K. D. *et al.* Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. **Journal of Applied Microbiology**, [on-line], v. 108, n. 1, p. 366–374, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19709342>. Acesso em: 23 dez. 2019.

SILVA, A. G. *et al.* Inoculação de sementes de milho safrinha com *Azospirillum* e aplicação de nitrogênio em cobertura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Rio Verde, v. 14, n. 3, p. 358–370, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/306372442_Inoculacao_de_Sementes_de_Milho_Safrinha_com_Azospirillum_e_Aplicacao_de_Nitrogenio_em_Cobertura. Acesso em: 11 nov. 2019.

SOUZA, J. M. S. **Caracterização fenotípica de rizóbios da caatinga que nodulam *Stylosanthes* spp.** 2018. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente)- Universidade Federal de Alagoas, *Campus* Arapiraca, Arapiraca, 2018.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, [on-line], v. 24, n. 4, p. 487–506, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978548>. Acesso em: 13 out. 2019.

TCHUISSEU - TCHAKOUNTÉ, G. V. *et al.* Community structure and plant growth-promoting potential of cultivable bacteria isolated from Cameroon soil. **Microbiological Research**, Großbeeren, v. 214, n. may, p. 47–59, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501318301034>. Acesso em: 10 de out. 2019.

TIMMUSK, S.; PAALME, V.; PAVLICEK, T.; BERGQUIST, J.; VANGALA, A.; DANILAS, T.; NEVO, E. Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates. **PLoS ONE**, [on-line], v. 6, n. 3, p. 1–7, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017968>. Acesso em: 10 de out. 2019.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. p. 164. (International Biological Programme Handbook, 15).

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A. J. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, [on-line], v. 63, n. 1, p. 153–182, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224450>. Acesso em: 11 out. 2019.

ZHAO, L. F.; XU, Y. J.; LAI, X. H. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. **Brazilian Journal of Microbiology**, [on-line], v. 49, n. 2, p. 269–278, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822018000200269. Acesso em: 19 nov. 2019.

**APÊNDICE A - RESUMO SUBMETIDO, ACEITO E APRESENTADO NA 5ª
REUNIÃO NORDESTINA DE CIÊNCIA DO SOLO**

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE NÓDULOS PROMOVEM O CRESCIMENTO DO
MILHO (*Zea mays* L.)**

Alaide Maria Silva Santos¹, Flávia de Barros Prado Moura², José Wilisson Ferreira dos Santos³, Jakson Leite⁴

⁽¹⁾Mestranda em Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Alagoas, *Campus Arapiraca*, Arapiraca-AL, alaidemaria46@gmail.com; ⁽²⁾ Professora, Universidade Federal de Alagoas, *Campus A. C. Simões*, Maceió-AL; ⁽³⁾ Graduando em Agronomia, Universidade Federal de Alagoas, *Campus Arapiraca*, Arapiraca-AL; ⁽⁴⁾Bolsista PDCR, Universidade Federal de Alagoas, *Campus Arapiraca*, Arapiraca-AL

Bactérias endofíticas de nódulos de leguminosas têm sido amplamente isoladas em diversos estudos. No entanto, o potencial destas bactérias em promover o crescimento de plantas ainda é pouco explorado. O objetivo desse trabalho foi verificar se bactérias que não são rizóbios isoladas de nódulos de leguminosas promovem o crescimento de plantas. Para isso, 14 bactérias isoladas de nódulos de leguminosas arbóreas foram identificadas pelo sequenciamento do gene 16S RNA e testadas quanto à capacidade de promover o crescimento de plantas de milho. O experimento aconteceu em casa de vegetação em blocos ao acaso com dez repetições e 16 tratamentos: 14 bactérias e dois controles sem inoculação, um com adubação nitrogenada (15 mg de N) e outro sem. As sementes foram desinfestadas, semeadas em substrato estéril (vermiculita) e inoculadas com 1 mL do crescimento bacteriano (10^6 células) do respectivo tratamento. As plantas foram irrigadas com solução nutritiva de Norris. A intensidade verde (índice SPAD), massa seca da raiz (MSR), massa da parte aérea seca (MSPA) e massa seca total (MST) foram determinadas aos 30 dias após a emergência. Os isolados representaram os gêneros *Bacillus* (4), *Brevundimonas* (1), *Enterobacter* (1), *Leifsonia* (2), *Pseudomonas* (1), *Paenibacillus* (2) e *Roseomonas* (2). O isolado *Bacillus* sp. ShS9 promoveu aumento ($p < 0,05$) do índice SPAD e MSR. *Bacillus* sp. ShS3 promoveu ($p < 0,05$) a MSR e MPAS. *Roseomonas* sp. SsP7 induziu maior ($p < 0,05$) MSR e o isolado *Bacillus* sp. AD47 superaram o controle e promoveu a MSPA. Todos os isolados promoveram a MST. O melhor desempenho dos isolados do gênero *Bacillus* confirma o que é encontrado em muitos trabalhos, que esse gênero está relacionado diretamente à promoção de crescimento de plantas. Bactérias endofíticas de nódulos de leguminosas arbóreas que não são rizóbios podem promover o crescimento de plantas de milho. Estudos adicionais precisam ser conduzidos para elucidar os mecanismos que estes isolados bacterianos utilizam para a promoção de crescimento das plantas de milho.

Palavras-chave: Rizosfera; Bactérias associativas; Ecossistema solo.

Agradecimentos: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

**APÊNDICE B - RESUMO SUBMETIDO, ACEITO E APRESENTADO NO 70º
CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA EM 25 DE OUTUBRO DE 2019**

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS NA PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO DE MILHO**

Santos, Alaide Maria Silva⁽¹⁾; Moura, Flávia de Barros Prado⁽²⁾; Joseliane Fernandes Miguel dos Santos⁽¹⁾; Leite, Jakson⁽³⁾. (1) Mestranda em Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Alagoas, *campus* Arapiraca; (2) Professora, Universidade Federal de Alagoas, *campus* A. C. Simões, Maceió-AL; (3) Bolsista PDCR, Universidade Federal de Alagoas, *campus* Arapiraca-AL.; alaidemaria46@gmail.com

Em agroecossistemas, a produtividade de plantas da família Poaceae pode ser promovida quando em consórcio com plantas da família Leguminosae (Fabaceae); sendo o enriquecimento microbiano, promovido pelas leguminosas nas raízes, um dos motivos do aumento dessa produtividade. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito de bactérias endofíticas de leguminosas na promoção do crescimento de poáceas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de bactérias endofíticas de nódulos de leguminosas no crescimento de plantas de milho, uma poácea comum em agroecossistemas. Nove bactérias isoladas de nódulos de leguminosas arbóreas da Caatinga foram testadas quanto à capacidade de promover o crescimento de plantas de milho em casa de vegetação. O experimento foi organizado em blocos ao acaso com sete repetições e 12 tratamentos: 9 bactérias mais a adição de 35 kg ha⁻¹ de N e três controles sem inoculação, um com 35 kg ha⁻¹ de N, um com 70 kg ha⁻¹ de N e outro sem adubação com N. As sementes foram desinfestadas, e cinco sementes foram semeadas em potes (4,5 L) preenchidos com amostra de um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico. As sementes foram inoculadas com 1,2 mL do crescimento bacteriano (5,2 x 10⁷ UFC mL⁻¹) do respectivo tratamento. O efeito dos tratamentos foi verificado na altura, a intensidade verde (índice SPAD), massa seca da raiz (MSR), massa da parte aérea seca (MPAS), diâmetro do caule e no número de folhas foram determinados aos 40 dias após a emergência das plantas. O isolado *Paenibacillus* sp. SsS3 promoveu o aumento (p<0,05) da altura da planta e MPAS, superando o controle com 70 kg ha⁻¹ de N. Os isolados *Roseomonas* sp. SsP7, *Pseudomonas* sp. ShP11, *Brevundiomonas* sp. ShS2 e *Bacillus* sp. AD47 promoveram aumento (p<0,05) da MPAS, mostrando desempenho semelhante ao tratamento com 70 kg ha⁻¹ de N. Os isolados não promoveram respostas significativas no que concerne as demais variáveis. Esses gêneros que obtiveram melhor desempenho incluem espécies de isolados de plantas que variam de promotores de crescimento a fixação de nitrogênio, o fato do isolado SsS3 ter superado o nitrogênio em sua dose total, indica que este pode promover o crescimento do milho por aumentar o uso eficiente de N quando aplicada a metade da dose requerida. Bactérias endofíticas de nódulos de leguminosas arbóreas podem promover o crescimento de grupos de plantas de milho, uma poácea comum em agroecossistemas.

Agradecimentos: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Palavras-chave: Leguminosas, Bactérias endofíticas, Rizosfera.

APÊNDICE C - CAPÍTULO DE LIVRO SUBMETIDO A STRICTO SENSO
EDITORA EM 27 DE JANEIRO DE 2020

RESPOSTA DE GENÓTIPOS DE MILHO A INTERAÇÃO COM BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

Alaide Maria Silva Santos¹, Joseliane Fernandes Miguel dos Santos¹, José Wilisson
Ferreira dos Santos², Roberta Samara Nunes de Lima², Flávia de Barros Prado Moura³,
Jakson Leite²

1. Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Alagoas, *Campus Arapiraca*, Alagoas, Brasil.
2. Universidade Federal de Alagoas, *Campus Arapiraca*, Arapiraca, Alagoas, Brasil.
3. Universidade Federal de Alagoas, *Campus A. C. Simões*, Arapiraca, Alagoas, Brasil.

Resumo: Bactérias endofíticas de nódulos de leguminosas podem promover o crescimento de plantas, mas ainda são poucos os relatos que confirmam esse fenômeno. O objetivo desse estudo foi avaliar as respostas de dois genótipos de milho à interação com bactérias endofíticas de nódulos de leguminosas. Bactérias (14) de sete diferentes gêneros foram inoculadas, individualmente, em sementes de dois genótipos de milho (crioula e híbrido). Aos quatro e oito dias após a inoculação foi avaliado a germinação, brotações laterais e comprimento da radícula. A resposta positiva à inoculação no genótipo crioulo foi identificada já aos quatro dias após a inoculação com oito isolados promovendo o crescimento radicular (AD47, ShS3, ShP6, ShS2, AD3, AT20, ShP11 e SsP7). Aos oito dias após a germinação, 13 isolados mostraram interação positiva com o genótipo crioulo promovendo o crescimento da radícula. No genótipo híbrido, a resposta à inoculação ocorreu um pouco mais tarde, aos oito dias após a inoculação. Somente dois isolados (ShP6 e AD3) promoveram o crescimento radicular do genótipo híbrido. O isolado ShP6, pertencente ao gênero *Bacillus*, dobrou o crescimento radicular no genótipo híbrido, representando um recurso microbiano promissor para testes em campo com este genótipo. Bactérias endofíticas de nódulos promovem o crescimento radicular do milho e esta resposta é dependente do genótipo da planta e da bactéria.

Palavras-chave: *Zea mays* L. Inoculação. Bactérias promotoras do crescimento de plantas.

ANEXO A - SOLUÇÃO DE NORRIS (MODIFICADA) PARA VASOS DE LEONARD

Quadro A- Solução e Norris (modificada) para Vasos de Leonard.

Reagente	Quantidade	Preparo da solução estoque
K_2HPO_4	1mL	Solução 1 M (87,1g em 0,5L de água destilada esterilizada)
KCL	1mL	Solução 1 M (37,26g em 0,5L de água destilada esterilizada)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1mL	Solução 1 M (123,23g em 0,5L de água destilada esterilizada)
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,344g	
Solução de micronutrientes para a solução de Norris	0,5mL	H_3BO_3 ...1,43g; $MnSO_4 \cdot H_2O$...2,03g; $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$...0,22 g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$...0.08 g; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$...0.01 g Completar o volume para 1L com água destilada esterilizada
Solução de Fe para a solução de Norris	0,5mL	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$...5g; Ácido cítrico...5g; Completar o volume para 1L com água destilada esterilizada
Água destilada esterilizada	Completar o volume de 1/2L	
Obs 1 - Para volumes de solução maiores que 1 L multiplicar o volume da solução pelo volume ou massa do reagente listado acima		
Obs 1 - Para o preparo da solução estoque usar vidraria e água esterilizadas		

Fonte: Norris (1964).