



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E  
DA NATUREZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR BACTÉRIAS EM ASSOCIAÇÃO COM  
GENÓTIPOS DE MILHO-PIPOCA**

**Maxenal Edouard**

Foz do Iguaçu

2024

**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR BACTÉRIAS EM ASSOCIAÇÃO COM  
GENÓTIPOS DE MILHO-PIPOCA**

**Maxenal Edouard**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Henrique Kamphorst

Foz do Iguaçu

2024

Maxenal Edouard

## **SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR BACTÉRIAS EM ASSOCIAÇÃO COM GENÓTIPOS DE MILHO-PIPOCA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano De Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: **Prof. Dr. SAMUEL HENRIQUE KAMPHORST**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA (UNILA)

---

**BRUNA ROHEN SIMÃO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO (UENF)

---

**Prof. Dra. NATHALIA CORREA CHAGAS DE SOUZA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA (UNILA)

---

**Prof. Dr. VALTER JARIO DE LIMA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO VALE DO ACARAÚ (UVA)

Foz de Iguaçu, 15 de outubro de 2024

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela inteligência, pela saúde, e por todas as bênçãos que Ele tem me concedido desde o meu nascimento.

Aos meus pais, expresso minha profunda gratidão pelo encorajamento inabalável, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem no meu potencial. Vocês são minha base e meu porto seguro em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), manifesto minha gratidão pela oportunidade única de realizar um curso superior e fazer parte de uma comunidade acadêmica que valoriza a integração e o crescimento mútuo. Essa oportunidade foi essencial para a minha formação e desenvolvimento pessoal.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Samuel Henrique Kamphorst, ofereço meus sinceros agradecimentos por sua orientação iluminada, sua paciência e incentivo contínuo. Sua dedicação e apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho e, mais do que isso, para o meu crescimento como estudante. A sua orientação e confiança no meu trabalho desde o início até a conclusão foram incomensuráveis e cruciais para o sucesso deste projeto.

À Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), agradeço pela generosa oportunidade de realizar o experimento que possibilitou este trabalho. Ao Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da UENF e a todo o pessoal envolvido, registro meu agradecimento pelo suporte técnico e pelos valiosos recursos disponibilizados.

Aos professores da banca examinadora, agradeço por aceitarem participar deste processo, pela dedicação em analisar este trabalho e por suas contribuições valiosas que certamente o aprimorarão.

Por fim, aos meus colegas e amigos, agradeço por todo o apoio, pelas palavras de incentivo e pelos momentos compartilhados ao longo dessa jornada acadêmica. O companheirismo de vocês tornou essa caminhada muito mais leve e gratificante.

A todos, meu muito obrigado!

## RESUMO

A insuficiência de fósforo (P) é um desafio significativo no cultivo de milho-pipoca, pois esse nutriente é essencial para o crescimento das plantas. O esgotamento de P pode prejudicar a produção agrícola. Nesse cenário, microrganismos benéficos que solubilizam P se destacam como uma estratégia biotecnológica promissora. Nesse contexto, objetivou-se investigar a interação entre bactérias solubilizadoras de fosfato com diferentes genótipos (híbridos) de milho-pipoca (*Zea mays* L. Everta), avaliando os impactos dessa associação nas características fisiológicas e morfológicas das plantas. O estudo foi conduzido na Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) com as bactérias *Azospirillum brasilense* (T1) e *Leclercia adecarboxylata* (T2), inoculadas em genótipos de milho-pipoca, juntamente com o controle (C), ou seja, plantas não inoculadas. O solo utilizado no experimento recebeu aporte nutritivo, via solução de Hoagland, com baixo nível de P. As plantas foram cultivadas até o estágio V4, onde, nessa ocasião, avaliou-se as seguintes características fisiológicas, taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática (gs), taxa de transpiração (E), clorofila (Chl), flavonoides (Flav), antocianinas (Anth) e Índice de balanço de nitrogênio (NBI); e morfológicas, isto é, altura da planta (AP), diâmetro de colmo (DC) e massa seca foliar (MSF). A análise de variância revelou diferenças significativas no T1 para Chl, Flav, Anth, NBI e A; no T2 para gs, E, A, Chl, Flav, Anth e NBI; e no C para A, gs, Flav, Anth e NBI. Em relação às características morfológicas, houve diferenças significativas para AP no T1; AP e MSF no T2; e DC no (C). Os resultados mostraram que *A. brasilense* foi mais eficiente na promoção do crescimento das plantas em comparação com *L. adecarboxylata*, com aumentos significativos na variáveis Chl (5%), A (63%) e gs (97%). Além disso, *A. brasilense* promoveu maior AP, DC e MSF, com incrementos de 29%, 35%, e 89%, respectivamente. Esses resultados indicam uma interação positiva entre as bactérias solubilizadoras de fosfato e os genótipos de milho-pipoca, o que contribui para um melhor desenvolvimento das plantas em condições de baixo P disponível. Além de aumentar a disponibilidade de P para as plantas, essas bactérias podem reduzir a necessidade de fertilizantes químicos, promovendo uma agricultura sustentável e eficiente no manejo de recursos não renováveis como o P.

**Palavras-chave:** fósforo, solubilização de fosfato, *Azospirillum brasilense*, milho-pipoca, biotecnologia agrícola.

## ABSTRACT

Phosphorus (P) insufficiency is a significant challenge in popcorn maize cultivation, as this nutrient is essential for plant growth. P depletion can hinder agricultural production. In this scenario, beneficial P-solubilizing microorganisms stand out as a promising biotechnological strategy. This study aimed to investigate the interaction between phosphate-solubilizing bacteria and different popcorn maize (*Zea mays* L. Everta) genotypes (hybrids), evaluating the impacts of this association on the plants' physiological and morphological characteristics. The study was conducted at the Darcy Ribeiro Northern Fluminense State University (UENF) using the bacteria *Azospirillum brasilense* (T1) and *Leclercia adecarboxylata* (T2), inoculated on popcorn maize genotypes, along with a control (C), in other words non-inoculated plants. The soil used in the experiment received nutrient supplementation through Hoagland's solution with a low P level. The plants were cultivated until the V4 growth stage, at which time the following physiological characteristics were evaluated: CO<sub>2</sub> assimilation rate (A), stomatal conductance (gs), transpiration rate (E), chlorophyll (Chl), flavonoids (Flav), anthocyanins (Anth), and nitrogen balance index (NBI); and morphological characteristics, namely, plant height (PH), stem diameter (SD), and leaf dry mass (LDM). Variance analysis revealed significant differences in T1 for Chl, Flav, Anth, NBI, and A; in T2 for gs, E, A, Chl, Flav, Anth, and NBI; and in C for A, gs, Flav, Anth, and NBI. Regarding morphological characteristics, significant differences were observed for PH in T1; PH and LDM in T2; and SD in C. Results showed that *A. brasilense* was more efficient in promoting plant growth compared to *L. adecarboxylata*, with significant increases in Chl (5%), A (63%), and gs (97%). Additionally, *A. brasilense* promoted greater PH, SD, and LDM, with increases of 29%, 35%, and 89%, respectively. These results indicate a positive interaction between phosphate-solubilizing bacteria and popcorn maize genotypes, which contributes to improved plant development under low available P conditions. Besides increasing P availability for plants, these bacteria can reduce the need for chemical fertilizers, promoting sustainable agriculture and efficient management of non-renewable resources such as P.

**Keywords:** phosphorus, phosphate solubilization, *Azospirillum brasilense*, popcorn maize, agricultural biotechnology.

## RESUMEN

La insuficiencia de fósforo (P) es un desafío significativo en el cultivo de maíz para palomitas, ya que este nutriente es esencial para el crecimiento de las plantas. El agotamiento de P puede afectar la producción agrícola. En este contexto, los microorganismos beneficiosos que solubilizan P se destacan como una estrategia biotecnológica prometedora. Así, el objetivo fue investigar la interacción entre bacterias solubilizadoras de fosfato y diferentes genotipos (híbridos) de maíz para palomitas (*Zea mays* L. Everta), evaluando los impactos de esta asociación en las características fisiológicas y morfológicas de las plantas. El estudio se realizó en la Universidad Estadual del Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) con las bacterias *Azospirillum brasilense* (T1) y *Leclercia adecarboxylata* (T2), inoculadas en genotipos de maíz para palomitas, junto con un control (C), es decir, plantas no inoculadas. El suelo utilizado en el experimento recibió un aporte de nutrientes a través de la solución de Hoagland, con un bajo nivel de P. Las plantas fueron cultivadas hasta la etapa V4, en la cual se evaluaron las siguientes características fisiológicas: tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (A), conductancia estomática (gs), tasa de transpiración (E), clorofila (Chl), flavonoides (Flav), antocianinas (Anth) e índice de balance de nitrógeno (NBI); y características morfológicas, tales como altura de la planta (AP), diámetro del tallo (DT) y masa seca foliar (MSF). El análisis de varianza reveló diferencias significativas en T1 para Chl, Flav, Anth, NBI y A; en T2 para gs, E, A, Chl, Flav, Anth y NBI; y en C para A, gs, Flav, Anth y NBI. En cuanto a las características morfológicas, se observaron diferencias significativas en AP en T1; AP y MSF en T2; y DT en C. Los resultados mostraron que *A. brasilense* fue más eficiente en la promoción del crecimiento de las plantas en comparación con *L. adecarboxylata*, con aumentos significativos en las variables Chl (5%), A (63%) y gs (97%). Además, *A. brasilense* promovió mayor AP, DT y MSF, con incrementos de 29%, 35% y 89%, respectivamente. Estos resultados indican una interacción positiva entre las bacterias solubilizadoras de fosfato y los genotipos de maíz para palomitas, lo que contribuye a un mejor desarrollo de las plantas en condiciones de baja disponibilidad de P. Además de aumentar la disponibilidad de P para las plantas, estas bacterias pueden reducir la necesidad de fertilizantes químicos, promoviendo una agricultura sostenible y un manejo eficiente de los recursos no renovables como el P.

**Palabras clave:** fósforo, solubilización de fosfato, *Azospirillum brasilense*, maíz para palomitas, biotecnología agrícola.

## LISTA DE TABELA

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Esquema dos cruzamentos em dialelo.....   | 20 |
| Tabela 2 – Resumo das análises de variância individuais e conjunta, das médias e dos coeficientes de variação experimental (%) de características fisiológicas híbridos de milho-pipoca avaliados após a inoculação de <i>A. brasiliense</i> e <i>L. adecarboxilata</i> e sob condições controle (sem inoculação). ..... | 28 |
| Tabela 3 – Resumo das análises de variância individuais e conjunta, das médias e dos coeficientes de variação experimental (%) de características morfológicas híbridos de milho-pipoca avaliados após a inoculação de <i>A. brasiliense</i> e <i>L. adecarboxilata</i> e sob condições controle (sem inoculação). ..... | 31 |



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Efeito do pH na disponibilidade de P no solo para as plantas.....   | 15 |
| Figura 2 – Mecanismos de aquisição e utilização de fósforo (P) em plantas. ....  | 16 |
| Figura 3 – Comparação do incremento (%) nas características fisiológicas entre os<br>Tratamentos 1 e 2 em relação com controle. .... | 25 |
| Figura 4 – Comparação do aumento (%) nas características morfológicas entre os<br>Tratamentos 1 e 2 em relação com controle. ....    | 29 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 11 |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 13 |
| 2.1. A PRODUÇÃO DE MILHO PIPOCA .....  | 13 |
| 2.2. FÓSFORO NO <i>CONTINUUM</i> SOLO-PLANTA .....   | 14 |
| 2.3. MECANISMOS DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO.....   | 15 |
| 2.4. PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS POR MICROORGANISMOS<br>SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS ..... | 17 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | 18 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL.....   | 18 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 18 |
| <b>4. MATERIAL E METODOS</b> .....   | 19 |
| 4.1. OBTENÇÃO DOS HÍBRIDOS.....  | 19 |
| 4.2. INOCULAÇÃO DA BACTÉRIA <i>Azospirillum brasilense</i> E <i>Leclercia adecarboxylata</i> .   | 20 |
| 4.2.1. Seleção em meio sólido .....  | 20 |
| 4.2.2. Seleção em meio líquido .....   | 21 |
| 4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....                                      | 22 |
| 4.4. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS.....   | 22 |
| 4.4.1 Pigmentos foliares.....  | 22 |
| 4.4.2 Trocas gasosas.....  | 23 |
| 4.5. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS .....  | 23 |
| 4.5.1 Altura das plantas .....   | 23 |
| 4.5.2. Diâmetro do colmo .....   | 24 |
| 4.5.3 Massa seca foliar .....  | 24 |
| 4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....  | 24 |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 25 |
| 5.1. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS .....  | 25 |
| 5.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS .....  | 29 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....  | 32 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 33 |

## 1. INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um nutriente essencial para a agricultura, desempenhando papéis cruciais em processos como fotossíntese, armazenamento de energia e síntese de ácidos nucleicos nas plantas (Khan *et al.*, 2023). Cerca de 30% das terras aráveis são deficientes em fósforo, o que compromete o desenvolvimento das culturas (Joan; José Manuel; Xavier, 2017). São aplicadas grandes quantidades de P no solo, mas devido a sua baixa solubilidade e pouca mobilidade na solução do solo (Ouyang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020). Em solos alcalinos, o Pi é fixado por compostos de cálcio, enquanto em solos ácidos, são compostos de ferro e alumínio que o tornam indisponível para a absorção das raízes. Em contrapartida, o mineral que não é adsorvido pelo solo sequer entra em contato com as raízes das plantas, é lixiviado para lagos e rios, gerando graves impactos ambientais (Mpanga *et al.*, 2019). Levando os agricultores a depender de fertilizantes fosfatados, cuja aplicação excessiva pode resultar em problemas ambientais, como a eutrofização (Edixhoven; Gupta; Savenije, 2014).

Com o aumento da população e a intensificação da agricultura, a demanda por alimentos superou a disponibilidade de fósforo no solo (Cordell; White, 2011). A rocha fosfática, uma das principais fontes de P, enfrenta desafios devido ao esgotamento das reservas naturais e à concentração geográfica dessas reservas (Scholz; Wellmer, 2013). Estima-se que, até o final do século, as reservas de fosfato de alta qualidade estarão esgotadas, o que elevará os custos de produção e afetará negativamente os agricultores em regiões em desenvolvimento (Colombo *et al.*, 2024)

A reciclagem de fósforo e a recuperação desse nutriente a partir de resíduos orgânicos surgem como estratégias alternativas para lidar com a escassez de nutrientes (Pantano *et al.*, 2016). O desenvolvimento de plantas geneticamente melhoradas para a utilização eficiente do fósforo e a adoção de práticas agrícolas sustentáveis são essenciais para garantir a produção agrícola futura e minimizar as consequências econômicas e ambientais associadas à dependência do fosfato natural (Sharpley *et al.*, 2015). A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) destaca-se nas pesquisas sobre o melhoramento do milho-pipoca, especialmente em nutrição mineral e eficiência no uso de P (Silva *et al.*, 2020).

Estudos realizados na UENF identificaram variabilidade genética em genótipos de milho-pipoca, demonstrando diferentes níveis de eficiência e responsividade ao uso de fósforo (Silva *et al.*, 2020). Esta instituição vem atuando em outra vertente para promover a sustentabilidade agrícola no que se refere ao uso do P, isto é, por meio

da associação de plantas com Bactérias Solubilizadoras de Fósforo (BSF). Tal estratégia é fundamental para aumentar a absorção de P em solos de baixa disponibilidade de P, uma vez que essas bactérias conseguem converter fosfatos insolúveis em formas solúveis para a planta (Rodríguez; Fraga, 1999). Os microrganismos associados às plantas também contribuem para a resistência a estresses abióticos e à adaptação à salinidade, além de melhorar a fixação biológica de nitrogênio e a resistência a patógenos(Kumar *et al.*, 2020)

Apesar do potencial das BSF em outras culturas, sua aplicação no milho-pipoca é pouco explorada, refletindo uma lacuna importante no desenvolvimento de inoculantes específicos para esta cultura(Pereira *et al.*, 2020). A pesquisa sobre a interação entre BSF e genótipos de milho-pipoca é essencial para melhorar a eficiência do uso do P e aumentar a produtividade desta cultura, que ganha relevância econômica em várias regiões(Simão *et al.* 2021). Este trabalho teve como objetivo investigar a interação entre a bactéria *Azospirillum brasilense* e *Leclercia. adecarboxylata* com diferentes genótipos de milho-pipoca (*Zea Mays* L. Everta), avaliando os impactos dessa associação nas características fisiológicas e morfológicas das plantas. Esse trabalho foi desenvolvido também para reforçar a importância o uso de práticas agrícolas sustentáveis, mediada por estratégias biotecnológicas, para enfrentar os desafios da escassez de recursos não renováveis, contribuindo para uma agricultura mais sustentável e produtiva.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A PRODUÇÃO DE MILHO PIPOCA

Atualmente, a produção de milho-pipoca (*Zea Mays L.*) no Brasil continua modesta quando justaposta à produção de milho comum. Em 2023, estimou-se que aproximadamente 247 mil toneladas de pipoca foram produzidas, constituindo uma parcela menor do milho total cultivado no país (Globo Rural, 2024). Embora a região Centro-Oeste tenha sido o foco principal dessa produção, outras áreas, incluindo Paraná e São Paulo, também fizeram investimentos neste setor. A demanda por pipoca está aumentando, impulsionada pelo aumento do consumo interno e das exportações, principalmente para os Estados Unidos e Europa, ambos mercados globais significativos para o milho-pipoca (LSPA, 2020).

No Brasil, cultivam-se poucas variedades de milho-pipoca, destacando-se híbridos como BRS Angela, BRS Jade, IAC 125 e IAC-112, que são apreciados por suas características de crescimento (Paula *et al.*, 2009). No entanto, o principal desafio para o futuro da produção de milho-pipoca no país é desenvolver variedades que se adaptem melhor às condições climáticas locais, especialmente nas regiões semiáridas Caranhato *et al.*, 2022.

Nos últimos anos, o consumo de milho-pipoca vem se expandindo no Brasil e no mundo. Estima-se que, globalmente, a demanda por pipoca movimente cerca de 2 bilhões de dólares por ano (FAO, 2022). No Brasil, o mercado de milho-pipoca ainda é dependente de importações, principalmente devido ao uso de híbridos desenvolvidos no exterior, que apresentam maior produtividade e resistência a pragas (LSPA, 2016). Entretanto, o cenário vem mudando com investimentos em programas de melhoramento genético no país.

Uma pesquisa realizada na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) tem focado no melhoramento genético de variedades de milho que utilizam o fósforo (P) de forma mais eficiente. Este elemento é essencial para o crescimento das plantas, mas sua disponibilidade em solos é limitada devido à baixa solubilidade. A UENF tem desenvolvido genótipos de milho com maior eficiência na absorção de fósforo, permitindo que as plantas alcancem maiores rendimentos mesmo em condições de solo pobres em nutrientes (Silva *et al.*, 2020).

Diante disso, o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes a estresses abióticos e eficientes no uso de nutrientes é crucial para a produção de milho-pipoca no Brasil. Assim, a pesquisa contínua e a adaptação do milho-pipoca às condições nacionais são essenciais para fortalecer a produção interna e promover uma

agricultura sustentável, com ênfase no manejo eficiente de fósforo no continuum solo-planta, garantindo maior resiliência em cenários de escassez de recursos naturais (Pavinato *et al.*, 2020).

## 2.2. FÓSFORO NO CONTINUUM SOLO-PLANTA

O fósforo é essencial para o crescimento saudável das plantas e para alta produtividade agrícola, desempenhando papel crucial na síntese de compostos vitais, como DNA, RNA e fosfolípidios das membranas celulares (Marschner, 2011). Entretanto, a deficiência global de fósforo no solo é um desafio crítico, com estudos indicando que cerca de 30% dos solos aráveis em todo o mundo são deficientes em P (MacDonald *et al.*, 2011). No Brasil, aproximadamente 90% das análises de solo mostram baixos níveis de fósforo disponível, exigindo altas quantidades desse nutriente, o que resulta em custos significativos para os agricultores, limitando a produção agrícola e afetando a segurança alimentar (Pavinato *et al.*, 2020).

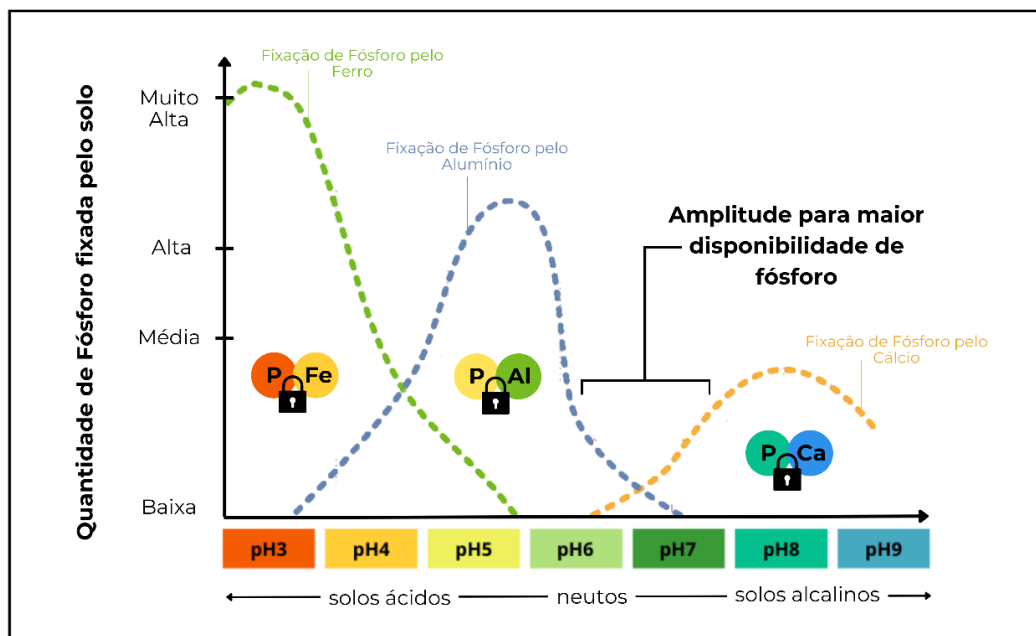
O fósforo no solo ocorre na forma de compostos inorgânicos e orgânicos que não estão disponíveis prontamente para as plantas, sendo que a maioria dos solos contém uma quantidade relativamente baixa de P total, com apenas uma pequena fração disponível para as plantas. O ciclo do fósforo inicia-se com o intemperismo das rochas fosfatadas, liberando íons fosfato que são absorvidos pelas plantas e reintegrados ao solo por meio de resíduos orgânicos, podendo ser lixiviados ou fixados, o que impacta sua disponibilidade (Joan; José Manuel; Xavier, 2017)

Com predominância de formas não diretamente absorvíveis pelas plantas. A fração disponível é composta principalmente por íons ortofosfatos, presentes em pequenas quantidades. A maioria das formas orgânicas de fósforo, como inositol P e fosfonatos, oriundas de resíduos vegetais e esterco animal, não são imediatamente absorvíveis (Ducouso-Détrez *et al.*, 2022). Em contraste, formas inorgânicas, como apatitas e estregita, são prontamente disponíveis para absorção, mas sua solubilidade é influenciada pelo pH do solo e outros fatores ambientais (Elhaissofi *et al.*, 2022).

Apesar da aplicação de fertilizantes, o fósforo continua pouco acessível para as plantas devido à sua baixa solubilidade e mobilidade no solo. Sua interação com cátions como cálcio e alumínio forma minerais insolúveis, limitando a absorção. Em solos alcalinos, o P inorgânico é fixado por compostos de cálcio, enquanto em solos ácidos, são compostos de ferro e alumínio que o tornam indisponível para a absorção das raízes.

O pH do solo também influencia a disponibilidade de fósforo, sendo valores entre 6 e 7 ideais para a absorção máxima, conforme exposto na Figura 1. Solos ácidos podem gerar estresses abióticos, como a toxicidade de alumínio, afetando a disponibilidade do fósforo (Shen *et al.*, 2011).

Figura 1 – Efeito do pH na disponibilidade de P no solo para as plantas.



Fonte: Adaptado de HYLAND *et al.*, 2005 e Simão, 2024.

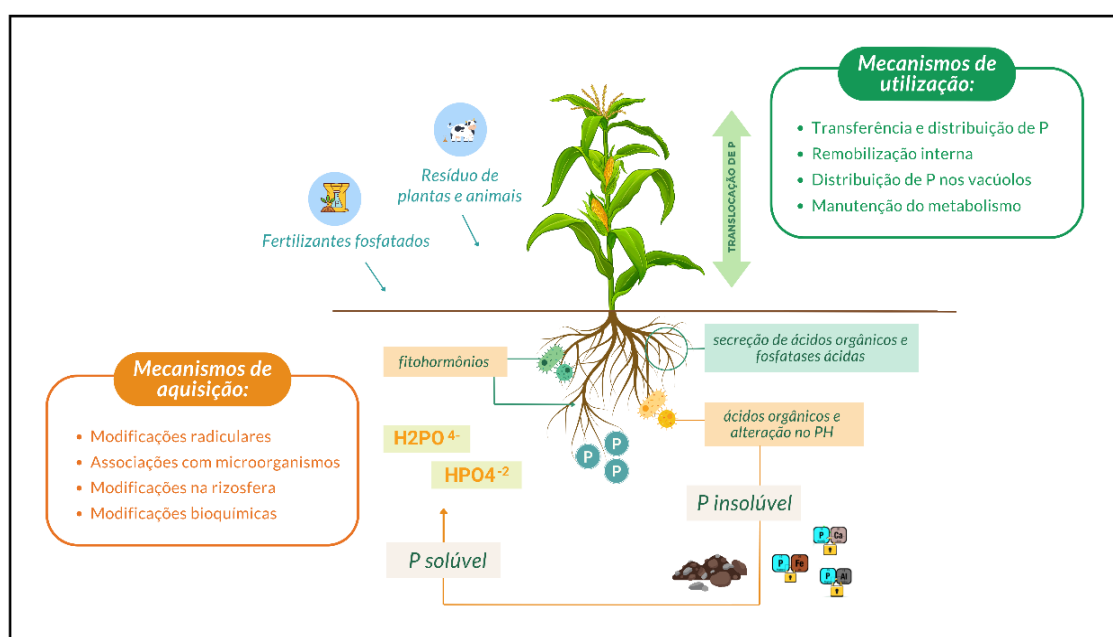
A dinâmica das formas inorgânicas de fósforo no solo, influenciada pela acidez e atividades biológicas da rizosfera, afeta diretamente a disponibilidade desse nutriente. Isso destaca a importância da interação entre componentes do solo, plantas e microrganismos para otimizar a disponibilidade de fósforo (Shen *et al.*, 2011; Elhaisoufi *et al.*, 2022).

### 2.3. MECANISMOS DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

A escassez de íons ortofosfatos desafia as plantas, levando à evolução de estratégias adaptativas, como alterações morfológicas nas raízes, que ajudam a liberar fosfato inorgânico de fontes orgânicas no solo (Khan *et al.*, 2023). Além disso, a aquisição de fósforo envolve o recrutamento de microrganismos do solo, onde a planta desempenha um papel central, ajustando a composição dos exsudatos radiculares para selecionar microrganismos benéficos durante períodos de estresse (Pantigoso *et al.*, 2023).

A atividade dos microrganismos no solo é essencial para disponibilizar fósforo às plantas, promovendo seu crescimento por meio de processos como solubilização, quelação e mineralização do fósforo (Cruz *et al.*, 2024). Na interação entre os microrganismos e o solo na rizosfera, processos metabólicos vitais, como a liberação de ácidos orgânicos, produção de sideróforos e enzimas fosfatases, ocorrem, afetando a disponibilidade de nutrientes, destacando a liberação de ácidos orgânicos como um dos mais cruciais (Mahmud *et al.*, 2021). Os mecanismos de aquisição de P em plantas pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Mecanismos de aquisição e utilização de fósforo (P) em plantas.



Fonte: Adaptado de Fritsche-Neto e Borém (2022) e Simão, 2024.

Derivados do metabolismo microbiano, os ácidos orgânicos são influenciados por fatores ambientais e pela composição do solo. Espécies bacterianas como *A. brasilense* e *L. adecarboxylata* têm sido identificadas como capazes de sintetizar diversos ácidos orgânicos, incluindo o ácido glucônico, que desempenha um papel crucial na solubilização de fósforo (Magalhães *et al.*, 2024).

Os microrganismos rizosféricos, através da produção de sideróforos, são fundamentais na liberação do fosfato ligado ao ferro. A eficácia dos ácidos orgânicos nesse processo é consideravelmente superior à dos ácidos inorgânicos, conforme evidenciado por Mahmud *et al.*, (2021). Compreender os processos intrincados de solubilização de fosfato é essencial para desvendar a complexa interação entre



plantas e microrganismos no solo, sendo crucial para a nutrição das plantas e a saúde do solo Marschner, (2011).

Ao entender esses mecanismos, é possível melhorar a eficiência do uso de fósforo na agricultura, promovendo um crescimento vegetal mais sustentável e saudável. A interação entre as plantas e microrganismos não só contribui para a nutrição, mas também para a saúde do ecossistema do solo como um todo.

#### 2.4. PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS POR MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS

A utilização de microrganismos solubilizadores de fósforo tem despertado interesse global como uma estratégia biotecnológica promissora para otimizar a solubilização e disponibilização do fosfato na agricultura (Elhaisoufi *et al.*, 2022). Esses microrganismos facilitam a disponibilidade de fósforo ao complexar o nutriente com cálcio, ferro e alumínio no solo. Além disso, eles produzem compostos que inibem fungos e bactérias fitopatogênicas, induzindo resistência sistêmica em plantas contra patógenos (Silva *et al.*, 2020).

A sinergia entre microrganismos solubilizadores e fosfatos de rocha emerge como uma estratégia sustentável, promovendo ganhos econômicos e de produtividade, além de contribuir para a preservação ambiental (Khan; Zaidi; Wani, 2022). A descoberta da BSF fornece uma nova maneira de resolver o problema da deficiência efetiva de fósforo nos solos; a BSF desempenha um papel fundamental no ciclo do fósforo do solo, mineralizando o fósforo orgânico por meio da secreção de ácido e hidrolisando minerais de fósforo inorgânico por meio da atividade enzimática, solubilizando assim o fósforo insolúvel e aumentando a quantidade de fósforo disponível nos solos (Pan; Cai, 2023).

A seleção de cepas capazes de solubilizar fosfatos é, muitas vezes, realizada em meio sólido com fontes insolúveis de fosfato, embora vários estudos questionem a eficácia desse método (Salcedo *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2016). Dessa forma, para testar a capacidade de solubilizar fosfato das bactérias *Azospirillum brasilense* e *Leclercia adecarboxylata* em condição mais parecidas com a de campo, previamente identificadas por Roehm (2024), motivou-se o desenvolvimento desse trabalho.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a interação entre as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Leclercia adecarboxylata* solubilizadoras de P com diferentes genótipos (híbridos) de milho-pipoca (*Zea mays* L. Everta), avaliando os impactos dessa associação nas características fisiológicas e morfológicas das plantas.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Leclercia adecarboxylata* sobre os pigmentos foliares de diferentes genótipos de milho-pipoca, medindo os teores de clorofila, flavonoides e antocianinas nas folhas das plantas.

Mensurar as trocas gasosas em plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Leclercia adecarboxylata*, considerando parâmetros como taxa fotossintética líquida, condutância estomática e taxa de transpiração em diferentes genótipos de milho-pipoca.

Analisar as características morfológicas de plantas de milho-pipoca sob inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Leclercia adecarboxylata*, avaliando a altura de plantas, o diâmetro do colmo e a massa seca foliar em diferentes genótipos de milho pipoca.

#### 4. MATERIAL E METODOS

As etapas “4.1. INOCULAÇÃO DA BACTÉRIA *Azospirillum brasilense* e *Leclercia adecarboxylata*”, “4.2. OBTENÇÃO DOS HÍBRIDOS” e “4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL” foram realizadas durante o estágio, em associação com o projeto da Bruna Simões Roehm, Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas, orientada pelo Prof. Dr. Antônio Teixeira do Amaral Junior, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). As etapas que foram executadas para o presente Trabalho de Conclusão de Curso são aquelas descritas nos itens “4.4. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS”, 4.5. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, “4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS”, que ocorreram durante a estadia na UENF.

##### 4.1. OBTENÇÃO DOS HÍBRIDOS

Os híbridos *Zea mays* L. Everta foram derivados de cruzamentos em um dialelo completo, sem recíproco. Foram semeadas três sementes em vasos de 35L contendo substrato (terra) e N-P-K na seguinte proporção: 30 kg ha<sup>-1</sup> de N (na forma de ureia), 60 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (superfosfato triplo) e 60 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (cloreto de potássio). O desbaste foi realizado aos 20 e aos 30 dias após a semeadura, mantendo-se duas plantas por vaso. Posteriormente, a adubação de cobertura (50 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia) foi realizada aos 30 e aos 40 dias após a semeadura. A irrigação foi fornecida em abundância por meio de sistema automatizado com gotejadores.

Por ocasião do florescimento, foram feitas polinizações manuais aos pares, conforme descrito na Tabela 1. Para tanto, as espigas das plantas femininas foram cobertas antes do surgimento do estilo-estigmas com sacos plásticos transparentes. Essas espigas protegidas foram polinizadas com pólen coletado ao cobrir os pendões com sacos de papel, aproximadamente 24h, antes desse processo. O pólen perde sua viabilidade em 8h e manter o pendão coberto por 24h garante que qualquer pólen viável presente no saco de papel fosse proveniente do próprio pendão coberto. Foram realizados dez cruzamentos para obtenção de cada híbrido, com o intuito de obter quantidades suficientes de sementes para a etapa de avaliação dos genótipos.

Tabela 1 - Esquema dos cruzamentos em dialelo.

| <b>Linhagens</b> | <b>P2</b> | <b>P7</b> | <b>L75</b> | <b>L80</b> |
|------------------|-----------|-----------|------------|------------|
| <b>P2</b>        |           | P2 × P7   | P2 × L75   | P2 × L80   |
| <b>P7</b>        |           |           | P7 × L75   | P7 × L80   |
| <b>L75</b>       |           |           |            | L75 × L80  |
| <b>L80</b>       |           |           |            |            |

Fonte: Simão, 2024.

#### 4.2. INOCULAÇÃO DA BACTÉRIA *Azospirillum brasilense* E *Leclercia adecarboxylata*

Utilizou-se as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Leclercia adecarboxylata* devido ao seu potencial de promover o crescimento vegetal, principalmente em culturas como o milho (Simão, 2024). Os isolados bacterianos *Azospirillum brasilense* e *Leclercia adecarboxylata* (G70) foram derivados da coleção de bactérias promotoras do crescimento do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, localizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Cada isolado bacteriano foi plaqueado com o auxílio de alça bacteriológica de platina, em placas de Petri contendo meio sólido DYGS (Rodrigues Neto, 1986), sendo incubado por 72h a 30 °C em estufa. Para obtenção do pré-inóculo, foi retirada uma colônia bacteriana da placa de Petri com o auxílio da alça bacteriológica, sendo disposta em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio líquido DYGS. A bactéria foi crescida a 30 °C em 180 rpm durante 24h em agitador orbital. O inóculo foi preparado a partir de 150 µL do pré-inóculo, pipetado em Erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido DIGYS e incubado novamente em agitador orbital a 180 rpm durante 24h a 30°C. Posteriormente, a leitura de densidade óptica (DO) foi realizada a 600nm, em espectrofotômetro, objetivando-se uma concentração de  $1,8 \times 10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC.mL<sup>-1</sup>).

##### 4.2.1. Seleção em meio sólido

A avaliação em meio NBRIP sólido contendo fosfato de cálcio (5 g L<sup>-1</sup>) foi realizada até o 15º dia após a inoculação com um repique no centro de uma placa de Petri, contendo duas repetições. Mensurou-se o diâmetro do halo da colônia a cada cinco dias, e no 15º dia foi calculado o índice de solubilização (IS) por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (Berraqueiro *et al.*, 1976).

#### 4.2.2. Seleção em meio líquido

Para a avaliação da eficiência de solubilização de termofosfato natural, foi utilizado o meio líquido MS para solubilização descrito por Nahas *et al.* (1994) (Barroso e Nahas, 2005). Foram colocados 40 mL de meio de cultivo distribuídos em Erlenmeyer de 125 mL contendo 2,0 g.L<sup>-1</sup> de termofosfato natural como única fonte de P. Posteriormente, o meio foi autoclavado por 15 min a 121°C, o pH foi ajustado para 7,5 com 110 µL hidróxido de sódio (NaOH) a 1 M estéril. Em seguida, alíquotas de 200 µL de cada suspensão de células foram inoculadas em triplicata nesse meio de cultura e incubadas durante 10 dias, sob agitação constante de 130 rpm, à temperatura de 28 °C ± 2. Em seguida, as culturas foram transferidas para tubos do tipo Falcon, e centrifugadas por 10 min a 8.000 rpm e o sobrenadante foi filtrado em um papel de filtro Whatman nº 42. Para a determinação do fósforo solubilizado foi aplicado o método colorimétrico de Murphy e Riley (1962) em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 880 nm, subtraindo-se o P solúvel contido nas amostras que foram incubadas pelo valor de P contido na amostra controle (meio de cultura com termofosfato sem inoculação) e uma curva padrão de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) para quantificação do P em mg.L<sup>-1</sup>. O pH foi determinado no restante do filtrado de todas as amostras, incluindo os controles. A partir dos dez isolados, foi selecionada a bactéria com maior índice de solubilização.

No tratamento 1 (T1), realizou-se a inoculação da bactéria *Azospirillum brasilense*. O procedimento envolveu a preparação inicial do inóculo em dois formatos:

1. Inóculo sólido: 1 grama de turfa, previamente inoculada com *A. brasilense*, foi aplicado diretamente abaixo das sementes durante o processo de semeadura.
2. Inóculo líquido: além do inóculo sólido, aplicou-se 1 ml do inóculo bacteriano em meio líquido sobre as sementes no momento do plantio, visando maximizar o contato inicial entre o microrganismo e as plantas.

Mesmo procedimento para o tratamento 2, (T2). Porém, com a outra espécie bacteriana, *Leclecia Adecarboxylata*.

1. Inóculo sólido: 1 grama de turfa, previamente inoculada com *Leclecia Adecarboxylata*, foi aplicado diretamente abaixo das sementes durante o processo de semeadura.
2. Inóculo líquido: além do inóculo sólido, aplicou-se 1 ml do inóculo bacteriano em meio líquido sobre as sementes no momento do plantio, visando maximizar o contato inicial entre o microrganismo e as plantas.

### 4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi arranjado em blocos completos casualizados. Foram utilizados cinco híbridos, duas cepas, isto é, *Azospirillum brasilense* (T1), *Leclercia adecarboxylata* (T2), e duas condições (inoculação com T1 ou T2 e controle não inoculados (C)), com quatro repetições, totalizando 120 unidades experimentais (uma planta por parcela). Utilizou-se cinco híbridos, pois um dos híbridos não germinou.

A partir do terceiro dia após a emergência das plantas foi aplicada a solução nutritiva conforme descrito por Hoagland e Arnon (1950), com modificação no fornecimento de P, na forma de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , com uma baixa concentração de  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ , diluído em  $\frac{1}{4}$  da força. O volume de solução nutritiva foi ajustado de acordo com o crescimento da planta e fornecido a cada dois dias, até atingir o estágio vegetativo V4 (quatro folhas totalmente expandidas), aproximadamente 20 dias após a semeadura, ocasião em que se iniciaram as avaliações experimentais.

### 4.4. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

#### 4.4.1 Pigmentos foliares

Os teores de clorofila foliar (chl), flavonoides (flav), antocianinas (anth) e o índice balance de nitrogênio (NBI) foram obtidos utilizando um medidor portátil Dualex® (FORCE-A, Orsay, França). As quantificações foram realizadas no terço médio da última folha desenvolvida de cada planta, um dia antes da colheita do experimento, 20 dias após a semeadura.



#### 4.4.2 Trocas gasosas

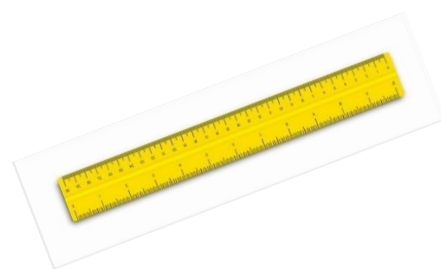
As trocas gasosas foram mensuradas com o auxílio de um analisador de gás infravermelho (IRGA), modelo LI-6400 (LI-COR, Lincoln, NE, USA), equipado com uma fonte de luz 6400-40 LCF (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Essa avaliação foi realizada um dia antes da colheita entre 10h30min e 14h30min, devido a estabilidade fisiológica da planta. Para evitar o estresse nas plantas durante o procedimento de medição, o que poderia influenciar negativamente os parâmetros fotossintéticos e a saúde das plantas. A escolha do horário deve-se ao fato de que, nesse período, a luz solar é mais intensa, proporcionando condições mais obtidas para a medição de trocas gasosas. Isso permite uma avaliação mais precisa dos parâmetros fotossintéticos em um momento de alta atividade (Taiz e Zeiger, 2017). As condições ambientais da câmara foliar consistiram de uma densidade de fluxo de fótons fotossintetizantes de  $1.500\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , na concentração de  $400\text{ mmol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ , com umidade relativa do ar entre 55 e 60% e temperatura de  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . A taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs) e taxa de transpiração (E) foram avaliadas na última folha desenvolvida de cada planta.



#### 4.5. CARACTERÍSTICAS

##### MORFOLÓGICAS 4.5.1 Altura das plantas

A altura das plantas foi medida usando uma régua de 30 cm, quantificada desde a base até a última folha desenvolvida (cm). Tal característica foi mensurada em estádio V4.



#### 4.5.2. Diâmetro do colmo

Com o auxílio de um paquímetro digital ajustado para a unidade de medida em milímetros (mm), logo abaixo da bainha da última folha desenvolvida na plântula, mensurou-se o diâmetro do colmo das plântulas.



#### 4.5.3 Massa seca foliar

As partes aéreas das plantas, compostas por folhas e colmos, colhidos em estádio V4, foram separadas umas da outra. Após, acondicionou-se em sacos de papel e armazenados em estufa a 70 °C, por 72h para determinação da massa seca foliar (g), usando uma balança analítica.



#### 4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Realizou-se a análise de variância individual de acordo com o seguinte modelo:  $Y_{ij} = \mu + g_i + b_j + \varepsilon_{ij}$ , em que  $Y_{ij}$ : valor observado do i-ésimo genótipo no j-ésimo bloco;  $\mu$ : constante geral;  $g_i$ : efeito fixo atribuído ao i-ésimo genótipo;  $b_j$ : efeito aleatório do bloco j; e  $\varepsilon_{ij}$ : erro aleatório associado à observação  $Y_{ij}$ .

Posteriormente, foi realizada a análise de variância conjunta com base no seguinte modelo estatístico:  $Y_{ijk} = \mu + G_i + B/A_{jk} + A_j + GA_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ , em que  $Y_{ijk}$ : observação do i-ésimo genótipo na j-ésima disponibilidade de P no k-ésimo bloco;  $\mu$ : é a média geral;  $G_i$ : efeito fixo do i-ésimo genótipo;  $B/A_{jk}$ : efeito aleatório do k-ésimo bloco dentro da condição j de P;  $A_j$ : efeito fixo da j-ésima condição de P;  $GA_{ij}$ : efeito fixo da interação entre o i-ésimo genótipo com a j-ésima condição de P; e  $\varepsilon_{ijk}$ : erro aleatório experimental médio associado à observação  $Y_{ijk}$ .



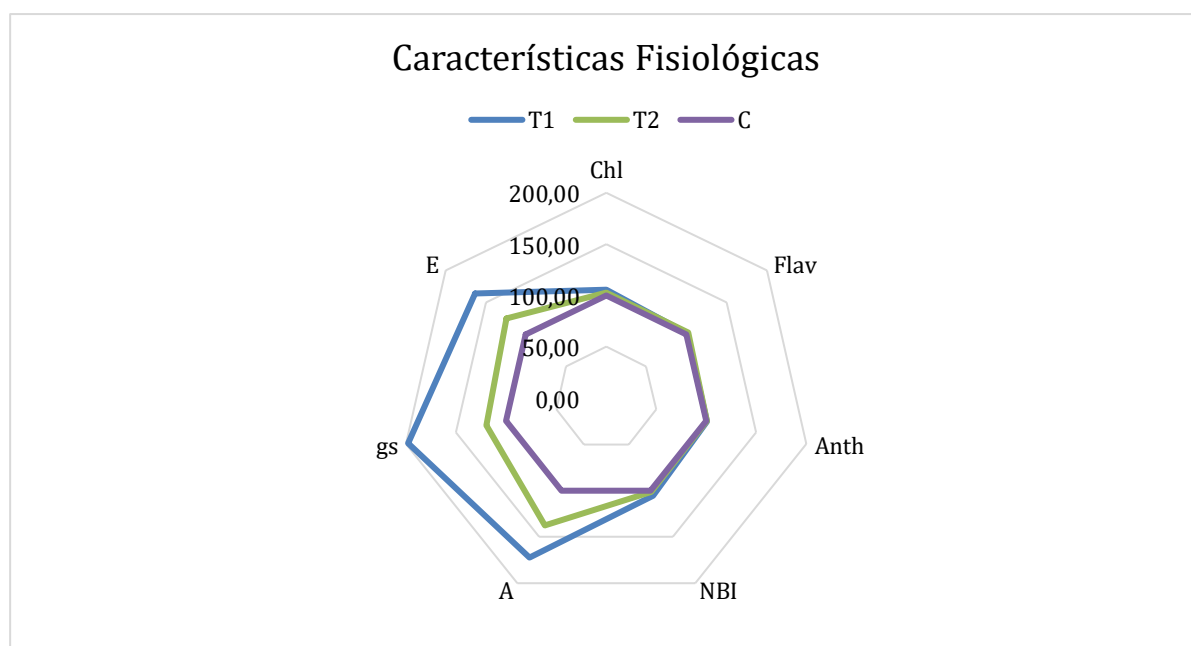
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

As características que tiveram diferenças significativas foram Chl, Flav, Anth, NBI e A para o Tratamento 1 (T1); gs, E, A, Chl, Flav, Anth e NBI para o tratamento 2; e A, gs, Flav, Anth, e NBI para o Controle (Tabela 2). Os coeficientes de variação (CV) variaram entre 5,90% (Anth – T1) a 26,47% (gs – C).

O tratamento (T1) com *A. brasilense* resultou em um aumento de 5,64% na clorofila (Chl) em relação ao controle, enquanto *L. adecarboxylata* provocou um aumento menor, de 2,80%. Essa maior quantidade de clorofila no T1 está associada à capacidade da bactéria aplicada a promover a absorção de nutrientes na síntese de clorofila e moléculas importantes para o metabolismo vegetal. Este aumento reflete uma maior eficiência na captação de luz e, conseqüentemente, na fotossíntese das plantas tratadas com *A. brasilense* (Hungria *et al.*, 2010; Bashan *et al.*, 2010). A bactéria *L. adecarboxylata*, embora também promova um aumento na clorofila, possui menor efeito em comparação ao tratamento com *A. brasilense*, possivelmente devido às diferenças nas interações fisiológicas dessas bactérias com a planta como observou na figura 3.

Figura 3 – Comparação do incremento (%) nas características fisiológicas entre os Tratamentos 1 (T1) e 2 (T2) em relação ao controle (C).



Chl.: clorofila; Flav.: flavonoide; Anth.: antocianina; NBI: Índice base de nitrogênio A.: fotossíntese; gs.: condutância estomática; e E: transpiração.

Tanto no T1, quanto no T2, ambas as bactérias induziram um pequeno aumento no conteúdo de flavonoides (Flav), com T1 apresentando 1,07% e T2 com 2,15%. Segundo (Ghitti *et al.*, 2022), o aumento de flavonoides está relacionado a defesa antioxidante das plantas, protegendo-as contra condições adversas, que no presente caso representado pelo baixo nível de P. Esse incremento indica que as plantas tratadas com ambas as bactérias tiveram uma resposta adaptativa.

Para as antocianinas (Anth), não foram observadas diferenças importantes entre os tratamentos. Tanto o T1, quanto o T2, apresentaram variações mínimas em relação ao controle, com 0,76% e 0,67%, respectivamente. As antocianinas são pigmentos relacionados à resposta ao estresse ambiental, como luz intensa ou condições de seca. A baixa variação sugere que as bactérias *A. brasilense* e *L. adecarboxylata* não interferiram significativamente na produção de antocianinas.

No NBI também não foi observada diferença importante em ambos os tratamentos em relação ao controle.

A taxa de fotossíntese (A) aumentou significativamente no tratamento com *A. brasilense*, com uma elevação de 72,28% em relação ao controle, enquanto em T2 o aumento foi de 37,51%. A inoculação por *A. brasilense* proporcionou um aumento na taxa fotossintética (A), o que pode ter resultado em maior altura. Esse resultado pode confirmar os benefícios trazidos por *A. brasilense* e sugerir o uso desses inoculantes para otimizar o crescimento da cultura do milho-pipoca.

A condutância estomática (gs) apresentou um aumento de 97,82% em T1, o que indica uma maior abertura dos estômatos e, conseqüentemente, uma maior absorção de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese. Esse aumento é atribuído à ação de *A. brasilense* em promover a atividade estomática, facilitando a troca gasosa. Em T2, o aumento na condutância foi menor, com 19,64%, mas ainda acima do controle. Esses dados mostram que *A. brasilense* tem um efeito mais expressivo na regulação dos estômatos, enquanto *L. adecarboxylata* também melhora a condutância, mas de forma menos intensa.

Em T1, a transpiração (E) foi maior, com um aumento de 63,22% em relação ao controle, enquanto T2 apresentou um aumento de 24,57%. O aumento da transpiração está relacionado à maior abertura dos estômatos e à maior atividade fotossintética.

O tratamento com o T2 também promoveu um aumento na transpiração, embora presente, foi menor em comparação ao aumento registrado no tratamento T1.

Na análise conjunta, as características fisiológicas que tiveram diferenças estatísticas foram E, Chl e Anth para a fonte de variação G; A, gs e E para a fonte de variação I e gs para a fonte de variação G\*I (Tabela 2). Os resultados indicam que as interações entre diferentes genótipos (G) e ambiente (I) desempenham um papel importante na variação fisiológica observada. Todavia, deve-se mencionar que as respostas das plantas à inoculação podem variar dependendo do genótipo e das condições ambientais (por exemplo, disponibilidade de nutrientes no solo). Segundo Lopes; Dias-Filho E Gurgel (2021) a eficiência da inoculação pode ser afetada por fatores ambientais como temperatura e umidade, que influenciam a atividade microbiana no solo.

Tabela 2 – Resumo das análises de variância individuais e conjunta, das médias e dos coeficientes de variação experimental (%) de características fisiológicas híbridos de milho-pipoca avaliados após a inoculação de *A. brasiliense* e *L. adecarboxilata* e sob condições controle (sem inoculação).

| FV /<br>Caract. | <i>A. brasiliense</i> |         |         |       |        | <i>L. adecarboxilata</i> |         |         |       |        | Controle |        |         |       |        | Conjunta |    |     |
|-----------------|-----------------------|---------|---------|-------|--------|--------------------------|---------|---------|-------|--------|----------|--------|---------|-------|--------|----------|----|-----|
|                 | QMG                   | QMR     | Teste F | Média | CV (%) | QMG                      | QMR     | Teste F | Média | CV (%) | QMG      | QMR    | Teste F | Média | CV (%) | G        | I  | G*I |
| <b>Chl</b>      | 1,58                  | 2,07    | 1,00 ** | 22,41 | 6,43   | 7,99                     | 5,01    | 0,24 ** | 21,81 | 10,27  | 13,33    | 2,18   | 0,01 ns | 21,22 | 6,96   | **       | ns | ns  |
| <b>Flav</b>     | 0,02                  | 0,01    | 0,12 ** | 1,27  | 7,01   | 0,01                     | 0,02    | 1,00 ** | 1,28  | 10,46  | 0,004    | 0,002  | 0,18 ** | 1,26  | 3,47   | ns       | ns | ns  |
| <b>Anth</b>     | 0,00004               | 0,00018 | 1,00 ** | 0,22  | 5,90   | 0,0002                   | 0,0003  | 0,04 *  | 0,22  | 4,27   | 0,00007  | 0,0002 | 0,02 *  | 0,22  | 3,18   | *        | ns | ns  |
| <b>NBI</b>      | 2,21                  | 4,30    | 1,00 ** | 17,92 | 11,57  | 5,50                     | 7,09    | 1,00 ** | 17,24 | 15,44  | 12,20    | 2,54   | 0,02 *  | 17,04 | 9,35   | ns       | ns | ns  |
| <b>A</b>        | 0,25                  | 13,32   | 1,00 ** | 25,48 | 14,33  | 14,36                    | 9,39    | 0,26 ns | 20,34 | 15,07  | 5,84     | 11,09  | 1,00 ** | 14,79 | 22,51  | ns       | ** | ns  |
| <b>gs</b>       | 0,007                 | 0,003   | 0,09 ns | 0,27  | 19,13  | 0,0007                   | 0,00058 | 0,34 ** | 0,16  | 14,58  | 0,0031   | 0,0013 | 0,11 ** | 0,14  | 26,47  | ns       | ** | *   |
| <b>E</b>        | 0,93                  | 0,35    | 0,09 ns | 4,47  | 13,31  | 0,15                     | 0,16    | 1,00 ** | 3,41  | 11,80  | 1,16     | 0,38   | 0,06 *  | 2,74  | 22,47  | *        | ** | ns  |

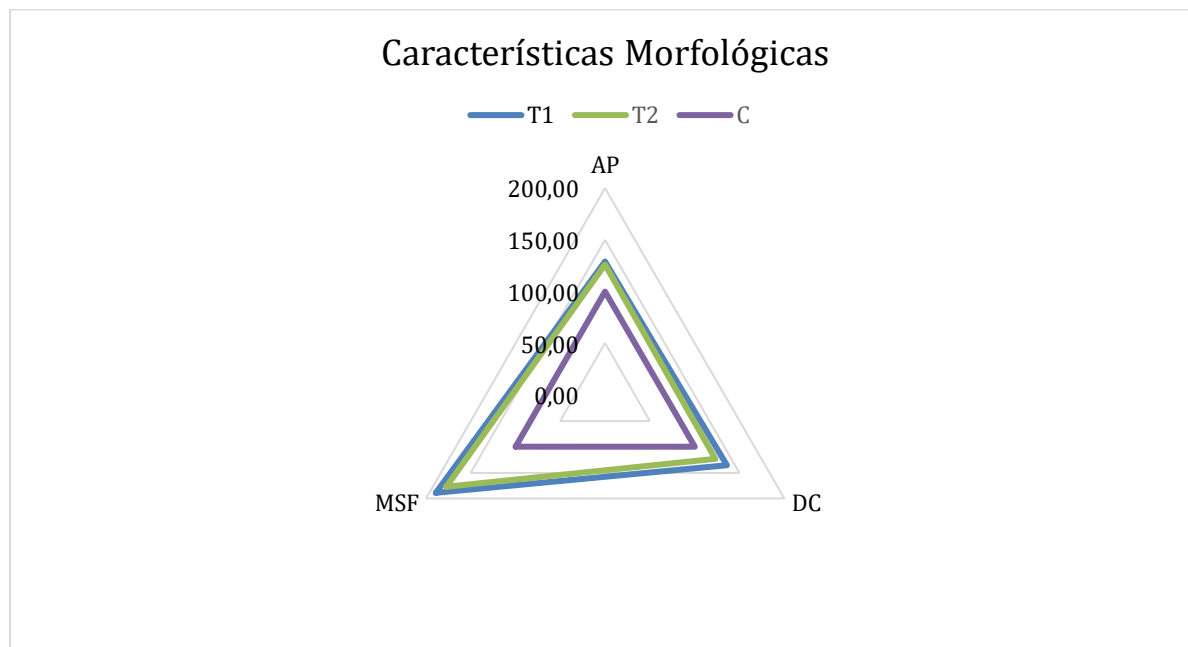
FV.: fonte de variação; Caract.: características; QMG.: quadrado médio de genótipo; QMR.: quadrado médio do resíduo; CV (%): coeficiente de variação experimental; Chl.: clorofila; Flav.: flavonoide; Anth.: antocianina; NBI: Índice Base de Nitrogênio; A.: fotossíntese ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); gs.: condutância estomática ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); e E: transpiração ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

## 5.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

As características morfológicas que tiveram diferenças significativas foram AP para o Tratamento 1 (T1), AP e MSF para o Tratamento 2 (T2), e DC para o controle (C) (Tabela 3). Os coeficientes de variação (CV) variaram entre 7,37 % (AP – T1) a 30,95 % (MSF – C).

Baseado na Análise de Variância (ANOVA), o T1 resultou em um aumento significativo de 29,01% na AP em relação ao controle, enquanto as plantas inoculadas com o T2 apresentaram um aumento de 26,06%. Esse aumento pode ser explicado pela capacidade de *A. brasilense* em promover o crescimento das plantas, devido à sua habilidade de fixar P e melhorar a absorção de nutrientes (Hungria *et al.*, 2010)). Embora o T2 também tenha causado um aumento na altura das plantas, ele foi menor em comparação ao T1, sugerindo que o T2 também tem um efeito positivo, mas menos intenso do que o T1.

Figura 4 – Comparação do aumento (%) nas características morfológicas entre os Tratamentos 1 e 2 em relação com controle.



AP.: altura de planta; DC.: diâmetro de colmo e MSF.: massa seca foliar.

No DC, o T1 promoveu um aumento de 35,85% em relação ao controle, indicando um fortalecimento significativo da estrutura da planta. Esse aumento está atribuído à maior disponibilidade de nutrientes e à produção de hormônios que estimulam o desenvolvimento de tecidos de suporte, como o colmo (Bashan *et al.*,

2010). Em T2, o aumento foi de 22,93% em comparação ao controle, o que mostra que *L. adecarboxylata* também melhora a estrutura da planta, mas com menor impacto.

A MSF foi a variável que apresentou a maior variação entre os tratamentos. O T1 mostrou em um aumento de 89,05% em relação ao controle, enquanto o T2 promoveu um aumento de 77,39%. O aumento na massa seca foliar reflete a maior eficiência fotossintética proporcionada por ambos os tratamentos, que melhoram a captação de luz e a assimilação de carbono pelas plantas (Hungria *et al.*, 2010). A maior produção de biomassa está diretamente ligada ao aumento na fotossíntese e na eficiência de uso da água e nutrientes. No entanto, o tratamento com *A. brasilense* se mostrou mais eficiente nesse aspecto.

Na análise conjunta, as características morfológicas que tiveram diferenças estatísticas foram AP e DC para a fonte de variação G; AP, DC e MSF para a fonte de variação I, e DC para a fonte de variação G\*I (Tabela 3). Os resultados também indicam que as interações entre diferentes genótipos (G) e ambiente (I) desempenham um papel importante na variação morfológica observada. O fato de DC ter apresentado diferenças significativas para as G, I e G\*I sugere que as respostas das plantas à inoculação podem variar dependendo do genótipo e das condições ambientais. Segundo Lopes; Dias-Filho e Gurgel (2021), a eficiência da inoculação pode ser afetada por fatores ambientais como temperatura e umidade, que influenciam a atividade microbiana no solo.

Tabela 3 – Resumo das análises de variância individuais e conjunta, das médias e dos coeficientes de variação experimental (%) de características morfológicas híbridos de milho-pipoca avaliados após a inoculação de *Azospirillum. brasiliense* e *Leclercia. adecarboxylata* e sob condições controle (sem inoculação).

| FV /<br>Caract. | <i>A. brasiliense</i> |      |            |       |           |  | <i>L. adecarboxilata</i> |      |            |       |           | Controle |      |            |       |           | Conjunta |    |    |     |
|-----------------|-----------------------|------|------------|-------|-----------|--|--------------------------|------|------------|-------|-----------|----------|------|------------|-------|-----------|----------|----|----|-----|
|                 | QMG                   | QMR  | Teste<br>F | Média | CV<br>(%) |  | QMG                      | QMR  | Teste<br>F | Média | CV<br>(%) | QMG      | QMR  | Teste<br>F | Média | CV<br>(%) |          | G  | I  | G*I |
| <b>AP</b>       | 5,70                  | 0,99 | 0,01 *     | 13,54 | 7,37      |  | 7,71                     | 2,22 | 0,04 *     | 13,23 | 11,26     | 2,66     | 1,55 | 0,21 ns    | 10,50 | 11,87     |          | ** | ** | ns  |
| <b>DC</b>       | 5,26                  | 1,91 | 0,08 ns    | 7,32  | 18,87     |  | 0,89                     | 1,10 | 0,72 ns    | 6,62  | 12,84     | 1,56     | 0,41 | 0,03 *     | 5,39  | 11,95     |          | *  | ** | *   |
| <b>MSF</b>      | 0,04                  | 0,02 | 0,22 ns    | 0,80  | 18,84     |  | 0,06                     | 0,01 | 0,03 *     | 0,75  | 16,16     | 0,02     | 0,02 | 0,38 ns    | 0,42  | 30,95     |          | ns | ** | ns  |

FV.: fonte de variação; Caract.: características; QMG.: quadrado médio de genótipo; QMR.: quadrado médio do resíduo; CV (%): coeficiente de variação experimental; AP.: altura de planta(cm); DC.: diâmetro de colmo(mm) e MSF.: massa seca foliar(g).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Leclercia adecarboxylata* têm efeitos positivos sobre o desenvolvimento fisiológico e morfológico dos diferentes genótipos de milho-pipoca testados. A inoculação com *A. brasilense* foi mais eficiente em promover o aumento da clorofila, taxa fotossintética e condutância estomática em comparação ao controle e ao tratamento com *Leclercia. adecarboxylata*. Esse efeito se reflete em um crescimento mais robusto das plantas, evidenciado por maior altura, diâmetro de colmo e massa seca foliar, especialmente nas plantas inoculadas com *Azospirillum. brasilense*.

A capacidade dessas bactérias de melhorar a absorção de fósforo demonstra seu papel importante na promoção do crescimento das plantas, contribuindo para o posterior aumento da produtividade agrícola. O fósforo, um nutriente essencial e não renovável, desempenha um papel crucial na produção agrícola. Entretanto, sua disponibilidade natural é limitada, o que ressalta a necessidade de práticas agrícolas sustentáveis para otimizar seu uso. Nesse contexto, as bactérias solubilizadoras de fosfato oferecem uma estratégia biotecnológica promissora, aumentando a disponibilidade de fósforo para as plantas e reduzindo a dependência de fertilizantes fosfatados químicos.

A biotecnologia tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento e aplicação dos bioinsumos, proporcionando ferramentas para enfrentar os desafios da produção de alimentos com sustentabilidade. O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal, especialmente *Azospirillum. brasilense*, na produção de milho-pipoca, reforça a importância de soluções biotecnológicas que promovem a sustentabilidade agrícola ao mesmo tempo em que reduzem o impacto ambiental. Portanto, os resultados deste estudo destacam a relevância das estratégias biotecnológicas, como o uso de bactérias solubilizadoras de fosfato, na busca por uma agricultura mais sustentável e produtiva, em um cenário de escassez de recursos não renováveis como o fósforo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barroso, C. B.; Nahas, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Applied Soil Ecology*, v. 29, n. 1, p. 73-83, 2005.
- Bashan, Y.; De-Bashan, L. E. Chapter Two - How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A critical assessment. In: SPARKS, D. L. (ed.). *Advances in Agronomy*. Academic Press, v. 108, p. 77-136, 2010.
- Berraqueiro, F.; Barrera, J.; Nuñez De Caceres, R.; Olmos, J. Solubilization of phosphates by soil bacteria. *Revista Española de Microbiología*, v. 31, p. 31-42, 1976.
- Bigolin, Tiago e Edson Talamini. 2024. "Impactos de cenários de mudanças climáticas no sistema de dupla cultura de milho e soja no Brasil" *Climate* 12, no. 3: 42. <https://doi.org/10.3390/cli12030042>
- Bruna Rohem Simão et al. Eficiência no uso do fósforo em milho-pipoca: estudo sobre efeitos gênicos. in: anais do xiii congresso fluminense de iniciação científica e tecnológica / vi congresso fluminense de pós-graduação, 2021, Campos dos Goytacazes. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2021. Disponível em: <<https://proceedings.science/confict-conpg/confict-conpg-2021/trabalhos/eficiencia-no-uso-do-fosforo-em-milho-pipoca-estudo-sobre-efeitos-genicos?lang=pt-br>> Acesso em: 08 Out 2024.
- Caranhato, A. L. H., Trindade, R. W. R., Uhdre, R. S., Pinto, R. J. B., Scapim, C. A., & Paterniani, M. E. A. G. Z. (2022).
- Cheng, Y.; Narayanan, M.; Shi, X.; Chen, X.; Li, Z.; Ma, Y. Phosphate-solubilizing bacteria: their agroecological function and optimistic application for enhancing agro-productivity. *Science of The Total Environment*, v. 901, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166468>
- Colombo, F.; Pesenti, M.; Nocito, F. et al. An integrated and multi-stakeholder approach for sustainable phosphorus management in agriculture. *Agronomy*, v. 14, n. 4, p. 780, 2024. Available at: <https://doi.org/10.3390/agronomy14040780>.

Cordell, D.; White, S. A. (2011). *Peak phosphorus: clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus security*. *Sustainability*, v. 3, n. 9, p. 2000-2016.

Cruz, D. R. C.; Ferreira, I. V. L.; Monteiro, N. O. Da C.; Nascente, A. S.; Oliveira, R. B.; Santos, S. G. F. Dos; Rosa, C. O.; Vieira, I. C. De O. Microorganismos multifuncionais na agricultura: uma revisão sistemática sobre bactérias solubilizadoras de fósforo. *Contribuciones a las ciencias sociales, [S. l.]*, v. 17, n. 3, p. e5854, 2024. DOI: 10.55905/revconv.17n.3-358. Disponível em: <https://ojs.revistacontribuciones.com/ojs/index.php/clcs/article/view/5854>. Acesso em: 8 out. 2024.

Edixhoven, J. D., Gupta, J., & Savenije, H. H. G. Recent revisions of phosphate rock reserves and resources: a critique. *Earth System Dynamics*, 5(2), 491-507, 2014.

Elhaissofi, Wissal; Ghoulam, Cherki; Barakat, Abdellatif; Zeroual, Youssef; Bargaz, Adnane. Phosphate bacterial solubilization: a key rhizosphere driving force enabling higher P use efficiency and crop productivity. *Journal of Advanced Research*, v. 38, 2022.

FAO. *The State of Food Security and Nutrition in the World 2022*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022.

Gerhardt, I. F. et al. Avaliação de genótipos de milho pipoca quanto à eficiência no uso de fósforo. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 16, n. 1, p. 72-83, 2017.

Ghitti E, Rolli E, Crotti E, Borin S. Flavonoids Are Intra- and Inter-Kingdom Modulator Signals. *Microorganisms*. 2022 Dec 15;10(12):2479. doi: 10.3390/microorganisms10122479. PMID: 36557733; PMCID: PMC9781135.

Hart, M. R.; Quin, B. F.; Nguyen, M. L. (2004). Phosphorus runoff from agricultural land and direct fertilizer effects: a review. *Journal of Environmental Quality*, v. 33, n. 6, p. 1954-1972. DOI: 10.2134/jeq2004.1954.

Hungria, M., Campo, RJ, Souza, EM *et al*. Inoculação com linhagens selecionadas de *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* melhora produtividades de milho e trigo no Brasil. *Plant Soil* 331, 413–425 (2010). <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>

Khan F, Siddique AB, Shabala S, Zhou M, Zhao C. Phosphorus Plays Key Roles in Regulating Plants' Physiological Responses to Abiotic Stresses. *Plants (Basel)*. 2023 Aug 3;12(15):2861. doi: 10.3390/plants12152861. PMID: 37571014; PMCID: PMC10421280.

Khan, Fahad; Siddique, Abu Bakar; Shabala, Sergey; Zhou, Meixue; Zhao, Chenchen. Phosphorus Plays Key Roles in Regulating Plants' Physiological Responses to Abiotic Stresses. *Plants*, v. 12, n. 15, p. 2861, 2023.

Khan, M. S.; Zaidi, A.; Wani, P. A. Papel dos microrganismos solubilizadores de fosfato na agricultura sustentável: uma revisão. *Agronomia para o Desenvolvimento Sustentável*, v. 27, n. 1, mar. 2007. DOI: 10.1051/agro:2006011.

Kumar, Akhilesh; Singh, Saurabh; Gaurav, Anand Kumar; Srivastava, Sudhakar; VERMA, Jay Prakash. Plant Growth-Promoting Bacteria: Biological Tools for the Mitigation of Salinity Stress in Plants. *Institute of Environment and Sustainable Development*, Banaras Hindu University, Varanasi, India.

Lopes, M. J. S.; Dias-Filho, M. B.; Gurgel, E. S. C. Micróbios promotores de crescimento de plantas bem-sucedidos: métodos de inoculação e fatores abióticos. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 5, p. 606454, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606454>.

Macdonald, G. K.; Bennett, E. M.; Potter, P. A.; Ramankutty, N. Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 7, p. 3086-3091, 2011.

Marschner, Horst. Mineral nutrition of higher plants. 3. ed. Page 11. London: Academic Press, 2012.

Murphy, J.; Riley, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, v. 27, p. 31-36, 1962.

Nahas, E.; Fornasieri, D. J.; Assis, L. C. Resposta à inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. *Scientia Agricola*, v. 51, n. 1, p. 75-82, 1994.

Pan L, Cai B. Phosphate-Solubilizing Bacteria: Advances in Their Physiology, Molecular Mechanisms and Microbial Community Effects. *Microorganisms*. 2023 Dec 1;11(12):2904. doi: 10.3390/microorganisms11122904. PMID: 38138048; PMCID: PMC10745930.

Pan, L.; Cai, B. Bactérias solubilizadoras de fosfato: avanços em sua fisiologia, mecanismos moleculares e efeitos na comunidade microbiana. *Microorganisms*, v. 11, n. 12, p. 2904, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122904>.

Pantano, G.; Grosseli, G. M.; Mozeto, A. A.; Fadini, P. S. Sustentabilidade no uso do fósforo: uma questão de segurança hídrica e alimentar. *Química Nova*, v. 39, n. 6, p. 732-740, 2016. DOI: 10.5935/0100-4042.20160086. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160086>.

Pantigoso HA, Manter DK, Fonte SJ, Vivanco JM. Root exudate-derived compounds stimulate the phosphorus solubilizing ability of bacteria. *Sci Rep*. 2023 Mar 10;13(1):4050. doi: 10.1038/s41598-023-30915-2. PMID: 36899103; PMCID: PMC10006420.

Paula, T. O. M. De; Gonçalves, L. S. A.; Amaral Júnior, A. T.; Oliveira, É. C.; Silva, V. Q. R. Da; Scapim, C. A.; Lopes, A. D. Magnitude of the genetic base of commercial popcorn and recommendations in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 3, p. 9085-9098, 2015.

Pavinato, P.S., Cherubin, M.R., Soltangheisi, A. *et al.* Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. *Sci Rep* 10, 15615 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72302-1>

Pereira, Nathália Cristina Marchiori; Galindo, Fernando Shintate; Gazola, Raíssa Pereira Dinalli; Dupas, Elisângela; Rosa, Poliana Aparecida Leonel; Mortinho, Emariane Cetim; Teixeira Filho, Marcelo Carvalho Minhoto. Rendimento do milho e eficiência no uso de fósforo: Resposta às taxas de fósforo associadas a bactérias promotoras do crescimento vegetal.

Rodríguez, H.; Fraga, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

Romanyà, Joan; Blanco-Moreno, Jose Manuel; Sans, Francesc Xavier. Phosphorus mobilization in low-P arable soils may involve soil organic C depletion. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 113, p. 250-259, 2017.

Salakinkop, SR, Talekar, SC, Patil, CR *et al.* Intensificação sustentável do sistema milho-grão-de-bico resiliente ao clima em trópicos semiáridos por meio da avaliação da produtividade dos fatores. *Sci Rep* 14, 3958 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53573-4>

Salcedo, L.D.P., Prieto, C., Correa, M.F., 2014. Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the Eastern Cordillera of the Colombian Andes. *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), 734-742. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5940>.

Scholz, R. W.; Wellmer, F.-W. (2013). Approaching a dynamic view on the availability of mineral resources: What we may learn from the case of phosphorus? *Global Environmental Change*, v. 23, n. 1, p. 11-27.

Sharpley, A. N.; Bergstrom, L.; Aronsson, H. et al. Agricultura futura com perdas minimizadas de fósforo para as águas: necessidades e direção da pesquisa. *AMBIO*, v. 44, Suppl. 2, p. 163-179, 2015. DOI: 10.1007/s13280-014-0612-x.

Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W, Zhang F. Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiol.* 2011 Jul;156(3):997-1005. doi: 10.1104/pp.111.175232. Epub 2011 May 12. PMID: 21571668; PMCID: PMC3135930.

Silva Filho, G. N.; Vidor, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, n. 1, p. 115-123, 2000.

Simão. B. R.; Eficiência No Uso Do Fósforo Em Milho-Pipoca: Desvendando Efeitos Gênicos. Trabalho de Conclusão de Curso. Campos dos Goytacazes, 2022.

Taiz, L.; Zeiger, E. Fisiologia vegetal. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

Tian, J.; Ge, F.; Zhang, D.; Deng, S.; Liu, X. Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology*, v. 10, n. 2, p. 158, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology10020158>.

Zhu, Y.; Xing, Y.; Shi, W. The role of phosphate-solubilizing microbial interactions in phosphorus activation and utilization in plant–soil systems: a review. *Plants*, v. 13, n. 19, p. 2686, 2024.