

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**CRESCIMENTO, ECOFISIOLOGIA E NUTRIÇÃO DE PLANTAS
DE MILHO (*Zea Mays* L.) INOCULADAS COM *Acaulospora*
colombiana E *Serendipita indica* SOB ESTRESSE HÍDRICO**

DANIEL PESSANHA RIBEIRO

VILA VELHA - ES
NOVEMBRO 2021

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**CRESCIMENTO, ECOFISIOLOGIA E NUTRIÇÃO DE PLANTAS
DE MILHO (*Zea Mays* L.) INOCULADAS COM *Acaulospora*
colombiana E *Serendipita indica* SOB ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

DANIEL PESSANHA RIBEIRO

VILA VELHA - ES
NOVEMBRO 2021

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

R484c Ribeiro, Daniel Pessanha.
Crescimento, ecofisiologia e nutrição de plantas de milho (*Zea Mays L.*) inoculadas com *acaulospora colombiana* e *serendipita indica* sob estresse hídrico / Daniel Pessanha Ribeiro – 2021.
66 f. : il.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.
Dissertação (mestrado em Biotecnologia Vegetal) -
Universidade Vila Velha, 2021.
Inclui bibliografias.

1. Biotecnologia Vegetal. 2. Agricultura sustentável.
3. Simbiose. I. Ramos, Alessandro Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 660.60

DANIEL PESSANHA RIBEIRO

**CRESCIMENTO, ECOFISIOLOGIA E NUTRIÇÃO DE PLANTAS
DE MILHO (*Zea Mays* L.) INOCULADAS COM *Acaulospora*
colombiana E *Serendipita indica* SOB ESTRESSE HÍDRICO**

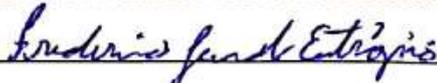
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do
grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 30 de novembro de 2021,

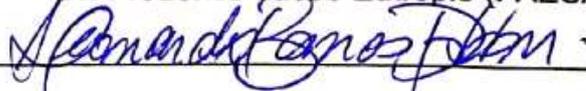
Banca Examinadora:



Dra. Amanda Azevedo Bertolazi (UVV)



Dr. Frederico Jacob Eutrópio (FAESA)



Dr. Leonardo Barros Dobbss (UFVJM)



Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos (UVV)

Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu pai, Carlos Renato Ribeiro, por sempre ter me dado suporte para buscar os meus objetivos e realizar meus sonhos. Tenho total consciência do quanto ele trabalha e se esforça para prover a nossa família uma ótima qualidade de vida. É graças a ele e minha mãe, Silvia Cristina Tavares Pessanha Ribeiro, que eu nunca passei dificuldade na minha vida, pois até hoje eles continuam me ajudando. Digo isso não só em relação às coisas materiais ou questões financeiras, mas principalmente pela educação, honestidade, amor, carinho, responsabilidade, compaixão e empatia que eles me ensinaram e ainda me ensinam. Meu maior sonho e conquista é poder dar a eles a satisfação e o orgulho de ser um homem autossuficiente, realizado e feliz. Outra pessoa que gostaria de agradecer é o meu irmão, Lucas Pessanha Ribeiro, ele sempre me apoiou em tudo, sabendo os momentos certos para me criticar e elogiar.

Também devo agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos. Ele é simplesmente incrível, um camaleão, capaz de se adaptar a qualquer ambiente e ao mesmo tempo, altamente cativante, contagiando a todos ao seu redor. Sua compreensão foi essencial para que eu pudesse completar essa jornada, pois sempre soube respeitar o meu tempo, sem cobranças, me permitindo trabalhar com total liberdade e de forma independente. Com ele aprendi que a ciência e a pesquisa são esculpidas no dia a dia, e que ser multidisciplinar é um aspecto que deve ser constantemente trabalhado.

Os meus agradecimentos para toda a equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia – LMAB/UVV, em especial à Amanda Bertolazi, a qual possui um caráter único. Detentora de uma voz doce e com um jeito carinhoso, sabendo escolher as pessoas certas para ter ao seu lado. Além disso, é uma pesquisadora maravilhosa, empreendedora e visionária. Agora, dedico essa parte exclusivamente ao meu co-orientador e amigo, Sávio Bastos de Souza. Esse jovem apareceu em minha vida com um colete salva vidas em mãos, pois além de me ajudar em todo o trabalho que realizei, também me ajudou e ajuda com suas opiniões. Além de pesquisador, ele sabe fazer uma ótima cerveja e cozinha como ninguém.

Por fim e não menos importante, gostaria de agradecer a FAPES – Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo. Os recursos e o fomento oriundos dessa instituição foram de extrema importância para mim, permitindo que eu pudesse realizar esse trabalho acadêmico e científico. As bolsas do Edital PROCAP foram mais do que necessárias para o meu sustento, permitindo que eu pudesse me dedicar exclusivamente para o mestrado em Biotecnologia Vegetal.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
2 HIPÓTESES.....	10
3 OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo geral	11
3.2 Objetivos específicos	11
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
4.1 Milho	11
4.2 Biotecnologia	13
4.3 Estresse hídrico e seus efeitos sobre a fisiologia e nutrição das plantas	15
4.4 Microrganismos Promotores do Crescimento Vegetal (MPCV)	18
4.4.1 Fungos Micorrízicos	18
4.4.2 <i>Serendipita indica</i>	20
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1 Seleção da espécie vegetal e dos fungos	21
5.2 Determinação da taxa de colonização micorrízica	21
5.3 Condições de crescimento, inoculação e avaliações realizadas	22
5.4 Taxa fotossintética líquida, transpiração, condutância estomática e eficiência no uso da água intrínseca	23
5.5 Determinação dos índices de reflectância	24
5.6 Acumulação de macro e micronutrientes	25
5.7 Análise estatística	25
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6.1 Taxa da colonização micorrízica	26
6.2 Condições de crescimento, inoculação e parâmetros analisados ...	29

6.3 Taxa fotossintética líquida, transpiração, condutância estomática e eficiência intrínseca do uso da água.....	32
6.4 Determinação dos índices de reflectância.....	36
6.5 Acumulação de macro e micronutrientes.....	43
7 CONCLUSÃO.....	49
8 REFERÊNCIAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (A)** Taxas de colonização micorrízica nas raízes das plantas de milho inoculadas, nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação.....27
- Figura 2.** Micrografia representativa da colonização fúngica nas raízes de milho não inoculadas, inoculadas com o fungo *Serendipita indica* **(B)**, inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Acaulospora colombiana* **(C)** e co-inoculado (*S. indica* + *Acaulospora colombiana*) no tratamento irrigado.....28
- Figura 3.** Micrografia representativa da colonização fúngica nas raízes de milho não inoculadas, inoculadas com o fungo *Serendipita indica*, inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Acaulospora colombiana* e co-inoculado (*S. indica* + *Acaulospora colombiana*) no tratamento estresse.....29
- Figura 4.** Micrografia representativa da colonização fúngica nas raízes de milho não inoculadas, inoculadas com o fungo *Serendipita indica*, inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Acaulospora colombiana* e co-inoculado (*S. indica* + *Acaulospora colombiana*) no tratamento re-irrigado.....29
- Figura 5.** Imagens das plantas de milho, nas diferentes condições hídricas, **(A) Irrigado, (B) Estresse e (C) Re-irrigado**, após 90 dias de inoculação. Alguns exemplares das diferentes condições de inoculação: não-inoculado, *A. colombiana*, *S. indica* e co-inoculado (*A. colombiana* + *S. indica*).....30
- Figura 6.** Aspectos morfológicos das plantas de milho, após 90 dias de inoculação, sob diferentes condições de inoculação e de hidratação: **(A)** Altura, **(B)** Peso seco parte aérea, **(C)** Largura da folha, **(D)** Volume da raiz e **(E)** Peso seco da raiz.....31
- Figura 7. (A)** Taxa de assimilação fotossintética (*A*), **(B)** Taxa de condutância estomática (*gs*), **(C)** Taxa de transpiração (*E*) e **(D)** Eficiência no uso da água intrínseca (*iWUE*) de folhas de plantas de milho não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana*, *S. indica* e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação.....33

Figura 8. Níveis de carotenoides (CR1), calculados a partir dos espectros de reflectância mensurados pelo espectrômetro, em folhas de plantas de milho não-inoculadas, inoculadas com <i>A. colombiana</i> , <i>S. indica</i> e co-inoculadas (<i>A. colombiana</i> + <i>S. indica</i>) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação.....	37
Figura 9. Níveis de índice de verde – Greenness index (G), calculados a partir dos espectros de reflectância mensurados pelo espectrômetro, em folhas de plantas de milho não-inoculadas, inoculadas com <i>A. colombiana</i> , <i>S. indica</i> e co-inoculadas (<i>A. colombiana</i> + <i>S. indica</i>) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação.....	39
Figura 10. Níveis de água – Water Band Index (WBI), calculados a partir dos espectros de reflectância mensurados pelo espectrômetro, em folhas de plantas de milho não-inoculadas, inoculadas com <i>A. colombiana</i> , <i>S. indica</i> e co-inoculadas (<i>A. colombiana</i> + <i>S. indica</i>) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação.....	42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Teor de macronutrientes** [Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Enxofre (S)] **nas raízes das plantas de milho** não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana* ou *S. indica*, e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey.....43
- Tabela 2. Teor de micronutrientes** [Ferro (Fe), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Manganês (Mn) e Boro (B)] **nas raízes de plantas de milho** não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana* ou *S. indica*, e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey.....43
- Tabela 3. Teor de macronutrientes** [Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Enxofre (S)] **nas partes aéreas das plantas de milho** não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana* ou *S. indica*, e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey.....44
- Tabela 4. Teor de micronutrientes** [Ferro (Fe), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Manganês (Mn) e Boro (B)] **nas raízes de plantas de milho** não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana* ou *S. indica*, e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey.....44

RESUMO

RIBEIRO, DANIEL PESSANHA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, novembro de 2021. **Crescimento, Ecofisiologia e Nutrição de Plantas de Milho (*Zea mays* L.) Inoculadas com *Acaulospora colombiana* e *Serendipita indica* sob Estresse Hídrico.** Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

O milho (*Zea mays* L.) é um grão extensivamente produzido em todo o mundo e o Brasil é um dos maiores produtores. Dada a importância desse vegetal para a alimentação humana, produção de rações e biocombustíveis, atualmente são exploradas soluções biotecnológicas capazes de mitigar os efeitos do déficit hídrico na produção de milho. Dentre elas, a utilização de bioinoculantes, tais como os fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV), esses microrganismos possibilitam melhores condições para o crescimento e desenvolvimento vegetal, a partir de uma ampla gama de benefícios, tais como melhora na absorção de nutrientes e aumento da tolerância à estresses. Portanto, esse estudo tem como objetivo investigar o papel da inoculação do fungo micorrízico arbuscular - *Acaulospora colombiana* e do fungo endófitico - *Serendipita indica*, tanto nas formas isoladas quanto co-inoculadas, no crescimento, ecofisiologia e nutrição de plantas de milho sob diferentes condições de hídricas. Os resultados demonstraram que as taxas de colonização micorrízica foram superiores a 50%. Quanto aos parâmetros de crescimento (altura, largura da folha, volume de raiz e, peso seco de parte aérea e raiz), as plantas inoculadas e co-inoculadas, sob irrigação, apresentaram alturas superiores aos tratamentos não inoculados ($p < 0,0001$). As taxas de assimilação fotossintética (A), condutância estomática (gs), transpiração (E), eficiência no uso da água intrínseca (iWUE), foram reduzidas significativamente nos tratamentos condicionados ao estresse hídrico, embora a inoculação tanto isolada quando na forma de co-inoculado influenciou de forma positiva todos os parâmetros ecofisiológicos, assim como para os índices de reflectância (CRI1, G e WBI) e acumulação de micro e macronutrientes. Portanto, constatou-se que a inoculação isolada de *A. colombiana* e *S. indica* beneficiaram as plantas de milho sob condições de estresse e, de uma maneira geral, os tratamentos co-inoculados apresentaram resultados semelhantes as condições de inoculação isoladas. Sendo assim, embora não tenha ocorrido sinergia entre os fungos utilizados, fica evidente que o FMA e o *S. indica* não foram antagônicos, ou seja, não houve competição nutricional e as espécies não se prejudicaram nos processos de colonização das raízes. Embora os efeitos esperados da dupla inoculação dos fungos utilizados neste trabalho não tenham sido como esperados, é possível inferir que as espécies utilizadas são capazes de conviver, sem haver competição interespecífica ou prejuízos para a planta.

Palavras-chave: Agricultura sustentável, Seca, Sinergismo, Simbiose, Co-Inoculação.

ABSTRACT

RIBEIRO, DANIEL PESSANHA, M.Sc, University of Vila Velha – ES, november 2021. **Growth, Ecophysiology and Nutrition of Corn Plants (*Zea mays* L.) Inoculated with *Acaulospora colombiana* and *Serendipita indica* under Water Stress.** Advisor: Alessandro Coutinho Ramos.

Corn (*Zea mays* L.) is a grain extensively produced all over the world and Brazil is one of the largest producers. Given the importance of this vegetable for human consumption, production of animal feed and biofuels, biotechnological solutions capable of mitigating the effects of water deficit in corn production are currently being explored. Among them, the use of bioinoculants, such as plant growth promoting fungi (FPCV), these microorganisms provide better conditions for plant growth and development, from a wide range of benefits, such as improved nutrient absorption and increased of stress tolerance. Therefore, this study aims to investigate the role of the inoculation of the arbuscular mycorrhizal fungus - *Acaulospora colombiana* and the endophytic fungus - *Serendipita indica*, both in isolated and co-inoculated forms, in the growth, ecophysiology and nutrition of maize plants under different conditions of water. The results showed that mycorrhizal colonization rates were greater than 50%. Regarding the growth parameters (height, leaf width, root volume and dry weight of shoot and root), the inoculated and co-inoculated plants, under irrigation, showed higher heights than the non-inoculated treatments ($p < 0.0001$). Photosynthetic assimilation rates (A), stomatal conductance (gs), transpiration (E), intrinsic water use efficiency (iWUE), were significantly reduced in treatments conditioned to water stress, although inoculation both isolated and in the form of co -inoculated positively influenced all ecophysiological parameters, as well as reflectance indices (CRI1, G and WBI) and accumulation of micro and macronutrients. Therefore, it was found that the isolated inoculation of *A. colombiana* and *S. indica* benefited the corn plants under stress conditions and, in general, the co-inoculated treatments presented similar results to the isolated inoculation conditions. Therefore, although there was no synergy between the fungi used, it is evident that AMF and *S. indica* were not antagonistic, that is, there was no nutritional competition and the species were not harmed in the root colonization processes. Although the expected effects of the double inoculation of the fungi used in this work were not as expected, it is possible to infer that the species used are able to coexist, without interspecific competition or damage to the plant.

Keywords: Sustainable agriculture, Drought, Synergism, Symbiosis, Co-Inoculation.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L. - Poaceae) é um grão extensivamente produzido em todo o mundo, tendo grande importância cultural (QUIZANI et al., 2016), social (VINCENT, 2012; MELCHIOR e SULIS, 2020) e econômica (MARTINS et al., 2019; AN et al., 2021). O Brasil é considerado o terceiro maior produtor mundial de milho (FAO, 2020), no entanto, apesar do grande volume produzido, devido às crescentes demandas, tanto para alimentação humana quanto para produção de rações e biocombustíveis, busca-se aumentar a produção deste grão continuamente (AN et al., 2021).

A produção de milho brasileira é modulada principalmente pelas condições climáticas e (LOPES, 2016; VIAN et al., 2016; ANDREA et al., 2018; NUCCIO et al., 2018; CUNHA et al., 2019). Andrea et al. (2018), a fim de avaliar a variabilidade induzida pelo clima no cultivo de milho em diferentes regiões brasileiras e, tomando como referência as principais safras, concluíram que a água e a temperatura possuem papéis determinantes nesse processo. Enquanto isso, Lopes (2016) e Vian et al. (2016) avaliaram o cultivo de milho, nas regiões nordeste e sul, respectivamente, e enfatizaram a influência da pluviosidade e da irrigação na produção desse grão. Cunha et al. (2019) correlacionaram a ocorrência de doenças foliares na cultura do milho com a época de semeadura e as condições climáticas, enfatizando a necessidade de prover as melhores condições ambientais, como temperatura e umidade adequadas do solo, para garantir maior produtividade desses grãos.

A agricultura moderna, com o objetivo de mitigar os efeitos do déficit hídrico para a produção do milho, tem aumentado o uso de técnicas de irrigação, cujo recurso hídrico é obtido principalmente de lençóis freáticos e rios (SINGH, 2014). Apesar de acarretar em um aumento das concentrações de sais nos solos (SINGH, 2016; SINGH, 2018), provocando outros tipos de estresses, além de provocar danos ao meio ambiente (UMANATH et al., 2016). Logo, técnicas ecologicamente amigáveis para mitigar o déficit hídrico durante a produção do milho se fazem necessárias.

Nesse cenário, uma alternativa para diminuir os efeitos negativos do estresse hídrico no cultivo de milho é a inoculação destas plantas com

microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV), dos quais, pode-se destacar os fungos promotores do crescimento vegetal (MISHRA et al., 2017). Esses microrganismos possibilitam melhores condições para o crescimento e desenvolvimento vegetal, a partir de uma ampla gama de benefícios, tais como melhora na absorção de nutrientes e aumento da tolerância aos estresses (BAKHSHANDEH et al., 2019).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), que são caracterizados por serem simbioses obrigatórios, ou seja, são dependentes de uma planta hospedeira para suprir suas necessidades de carbono (MACLEAN et al., 2017). Os FMA proveem nitrogênio e fósforo (WALDER et al., 2012; VAN DER HEIJDEN et al., 2015), facilitam a captação de potássio e sulfato (WANG et al., 2017) e também fornecem alguns micronutrientes, como zinco e cobre, para a planta hospedeira (FEDDERMANN et al., 2010; JACOTT et al., 2017). Além desses fatores, os FMAs possuem a capacidade de beneficiar algumas espécies vegetais sob condições de estresses abióticos, tais como o salino, o de temperatura (BASU et al., 2018) e o hídrico (BASU et al., 2018; BEGUM et al., 2019). Sendo que este último é mitigado nas plantas inoculadas com estes microrganismos em decorrência de um aumento na captação de água pelas raízes (AUGÉ, 2001; QUIROGA et al., 2018).

O fungo endófito *Serendipita indica* (VARMA et al., 2012; DIAS et al., 2020) destaca-se principalmente por ser um simbionte facultativo e pela capacidade de ser cultivado em meio de cultura axênico, podendo ser produzido em meios sintéticos (KUMAR et al., 2011). O *S. indica* possui comportamento semelhante ao dos FMAs, sendo capaz de colonizar uma ampla gama de espécies vegetais (KUMAR et al., 2011 e GILL et al., 2016), favorecendo o crescimento e desenvolvimento vegetal em condições de estresse abiótico (estresse hídrico, salino e de temperatura) (VARMA et al., 2012; GHORBANI et al., 2019) e bióticos (DEL BARRIO-DUQUE et al., 2019). Além disso, esse fungo também é responsável por potencializar a absorção de nutrientes, tais como nitrogênio e fósforo, pelos vegetais (VARMA et al., 2012).

Esses fatores resultam em estímulos positivos para o desenvolvimento vegetal, influenciando no ganho de biomassa, na floração, na produção de sementes e em um maior conteúdo de clorofila nas folhas, melhorando sua

eficiência fotossintética (STREET et al., 2012). Por esses motivos, o *S. indica* tem sido apontado como uma potencial ferramenta para aplicações agronômicas e biotecnológicas (OELMÜLLER et al., 2009).

Assim, pelo fato de existir uma variedade de espécies de microrganismos que beneficiam o desenvolvimento e crescimento vegetal, atualmente, as pesquisas estão sendo direcionadas para investigar o papel da co-inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal. Dentre alguns trabalhos publicados recentemente, alguns exploraram a co-inoculação entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (WANG et al., 2011; ANLI et al., 2020 e BEGUM et al., 2021). Enquanto outros, mais específicos, investigaram a influência da co-inoculação entre FMAs e membros do grupo Serendipitaceae (fungos endofíticos de raiz), e seus potenciais efeitos sinérgicos para o crescimento e nutrição vegetal (HALLASGO et al., 2020). Já Heidarianpour et al. (2020) trabalharam com FMA e *Serendipita indica*, a fim de compreender essa co-inoculação e seus efeitos em plantas de tomate submetidas a estresse salino.

Portanto, levando em consideração esse atual cenário, foi estabelecido para este trabalho, o estudo da co-inoculação entre um FMA e o *S. indica*, com o intuito de avaliar um possível sinergismo entre estes microrganismos, no que se refere a potencialização dos benefícios à cultura de milho.

2 HIPÓTESES

A associação entre os fungos promotores do crescimento vegetal, *Acaulospora colombiana* e *Serendipita indica*, terão efeitos sinérgicos nas plantas, no que tange a maior resistência ao estresse hídrico. Esses efeitos seriam decorrentes da otimização dos parâmetros das plantas quando inoculadas pelos FPCV.

A re-irrigação das mudas promoverá uma recuperação parcial do estado hídrico das plantas, nas quais, espera-se que nas plantas inoculadas essa recuperação seja mais acentuada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da inoculação dos fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV), *Acaulospora colombiana* e *Serendipita indica*, sobre o crescimento, ecofisiologia e nutrição de plantas de milho, expostas ao estresse hídrico.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência micorrízica na atenuação dos efeitos negativos decorrentes do estresse hídrico, ao comparar os tratamentos inoculados e co-inoculados aos controles;

- Determinar a influência dos FPCV no volume e peso seco\peso fresco de raiz e na altura, peso seco\peso fresco e área foliar da parte aérea, em diferentes condições hídricas;

- Avaliar a eficiência fotossintética, das plantas de milho, inoculadas e não-inoculadas, com os FPCV, em diferentes condições hídricas;

- Obter o teor de nutrientes na parte aérea e nas raízes das plantas de milho, inoculadas e não-inoculadas, com os FPCV, em diferentes condições hídricas.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Milho

O milho (*Zea mays* L.) é um vegetal membro da família das gramíneas (Poaceae) e, desde os tempos antigos, tem sido cultivado para alimentação de subsistência, principalmente entre os povos da América Central e do Sul (VINCENT, 2012). A taxonomia do gênero *Zea* foi minuciosamente documentada por Doebley (2003), demonstrando as bases moleculares presentes e o relaciona com seu ancestral, o teosinte. Dentro do contexto nacional, o milho possui grande relevância cultural e social, pois está presente desde o início do descobrimento do Brasil, sendo que algumas tribos indígenas, os tupis-guaranis,

utilizavam esse grão em seus rituais, enquanto os povos africanos e afro-brasileiros o prestigiavam em cultos religiosos (MELCHIOR e SULIS, 2020).

Além disso, o milho é encontrado na culinária brasileira em forma de farinha (fubá) e é matéria prima para diversos pratos típicos da festa junina, tais como, a pamonha, o curau, a canjica, o bolo de fubá e; as pipocas salgada e/ou doce (QUIZANI et al., 2016). O milho está presente até na legislação brasileira, a Lei nº 13.101/2015, determina o dia 24 de maio como o Dia Nacional do Milho, cujo dia foi estabelecido para estimular e orientar a cultura do milho em todo o território nacional (BRASIL, 2015).

Enquanto isso, na esfera econômica, o Brasil é classificado como o 3º maior produtor de milho no mundo, com uma produção média de 77,31 milhões de toneladas, ficando abaixo dos Estados Unidos e da China. Dados da FAO demonstraram que no Brasil no ano de 2011 foram produzidos aproximadamente 55,66 milhões de toneladas, o que corresponde a aproximadamente 13,22 milhões de hectares, ao passo que em 2019 a produção foi de 101,138 milhões de toneladas – 17,52 milhões de hectares (FAO, 2020). Esses parâmetros evidenciam que, tanto a produção nacional quanto a área cultivada crescem vigorosamente ao longo dos anos, sendo que, essa elevada produtividade favorece a balança comercial, ampliando a exportação e destacando a importância do milho para economia brasileira.

O aumento na produtividade de milho é consequência de uma demanda que cresce exponencialmente, ou seja, é reflexo de uma população mundial cada vez maior. Um relatório publicado pelas Nações Unidas prevê que a população mundial em 2050 deve se aproximar de 9,7 bilhões (ONU, 2019). Portanto, para atender as demandas crescentes por alimentos, rações, fibras e biocombustíveis da população mundial, as culturas de milho devem continuar aumentando sua produtividade (AN et al., 2021). No entanto, apesar do milho ser uma cultura versátil, seu desenvolvimento e produtividade são influenciados diretamente pelas condições ambientais (MARTINS et al., 2019).

Dentro desse contexto, deve-se destacar o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), no qual este órgão das Nações Unidas avalia as alterações climáticas no mundo. O IPCC realiza projeções mundiais que evidenciam o aumento na concentração de CO₂ atmosférico e nas

temperaturas médias, resultando assim, no que se denomina aquecimento global (IPCC, 2021). O estresse causado pelo aumento das temperaturas condiciona ao aumento da evapotranspiração e, em consequência disso, as relações hídricas das plantas são severamente afetadas (SATTAR et al., 2020). Portanto, o aumento da produção dos cultivos e as estratégias para contornar os problemas hídricos são grandes desafios para a sociedade mundial, no qual existem alternativas viáveis, como o investimento em programas de pesquisa e desenvolvimento, principalmente na área de biotecnologia vegetal.

4.2 Biotecnologia

Em resposta às tendências mundiais, a Organização das Nações Unidas (ONU) apresentou a Agenda 2030, a qual são propostos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. O Brasil, sendo um dos integrantes da ONU, adotou esses objetivos, dos quais destacam-se aqueles intitulados como Fome Zero e Agricultura Sustentável (2º objetivo) e Vida Terrestre (15º objetivo). Esses objetivos trazem consigo alguns princípios que norteiam os estudos da biotecnologia vegetal. Logo, a biotecnologia vegetal ganha um papel relevante como uma ferramenta para ampliar a produtividade de alimentos e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres (ONU, 2019).

Enquanto isso, no âmbito estadual, o Instituto de Desenvolvimento Educacional e Industrial do Espírito Santo (IDEIES), uma das entidades que compõem a Federação das Indústrias do Espírito Santo (FINDES), apresentou um projeto denominado de Indústria 2035. Uma das principais características desse projeto é a representatividade de diversos setores, tais como o produtivo, o acadêmico e o público. Além disso, esse projeto aponta a Biotecnologia como um dos Setores Portadores de Futuro para o estado, demonstrando como essa área possui papel importante para o desenvolvimento e crescimento econômico capixaba. Portanto, o cenário atual é favorável para o desenvolvimento de pesquisas que objetivam encontrar soluções biotecnológicas para a agroindústria (GOLDNER, 2019).

Nesse sentido, dentre essas soluções biotecnológicas, podemos destacar os biofertilizantes, os quais são uma alternativa sustentável para aumentar a fertilidade do solo. A melhor definição para o termo biofertilizante é descrita por Vessey (2003), denominando como: "uma substância que contém

microrganismos vivos que, quando aplicados a sementes, superfícies de plantas ou solo, colonizam a rizosfera ou o interior da planta e promove o seu crescimento, aumentando a oferta ou disponibilidade de nutrientes primários para a planta hospedeira".

Herrmann e Lesueur (2013) demonstraram os desafios para a formulação de biofertilizantes e destacaram as características necessárias para se atingir o sucesso na inoculação. Dentre as quais, se faz necessário um ambiente favorável ao crescimento dos microrganismos, com composição, pH e teor de água controlados; afim de impedir o declínio populacional durante o armazenamento, transporte e posterior a introdução no solo. Somado a isso, os biofertilizantes devem ser de fácil manuseio, ser ecologicamente correto, confeccionados com um material acessível e de baixo custo. Assim, os biofertilizantes possuem relevância econômica para a agroindústria, pois são considerados como substitutos ecologicamente corretos para os agroquímicos convencionais, que ao longo dos anos encarecem o custo na produção de culturas, em resposta à maior demanda do mercado.

Ao longo dos últimos vinte anos, diversos estudos foram realizados com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), sendo estes relatados por apresentarem inúmeros benefícios para a qualidade do solo, crescimento e desenvolvimento vegetal. Atualmente, os FMAs são considerados como uma alternativa suplementar para os vegetais, pois a bioinoculação desses microrganismos reduzem significativamente (até 50%) a aplicação de agroquímicos, principalmente aqueles à base de fósforo (BEGUM et al., 2019). Além disso, os FMAs possuem papel importante na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, atuando como biofertilizantes, pois aprimoram a absorção de nutrientes em ambientes estressantes (BEGUM et al., 2019).

Somado à isso, alguns microrganismos do solo possuem a capacidade de reduzir os efeitos negativos ao desenvolvimento vegetal, quando estes estão sob condições de estresse. Chandra et al. (2021) abordaram sobre estudos realizados com rizobactérias, demonstrando os múltiplos benefícios que esses microrganismos propiciam para o desenvolvimento e crescimento vegetal, além

de alterarem as respostas físico-químicas da planta e contribuirão no processo adaptativo aos estresses abióticos, por exemplo, a seca.

Nesse cenário, Augé (2001) salienta em sua revisão, a influência dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no balanço hídrico das plantas hospedeiras quando estão em abundância de água e em condição de seca. Por fim, é importante frisar que essas relações mutualísticas entre a microbiota do solo e as plantas é uma forma sustentável de aumentar o crescimento vegetal e resultar em um ganho na produtividade em condições de seca (CHANDRA et al., 2021).

4.3 Estresse hídrico e seus efeitos sobre a fisiologia e nutrição das plantas

A disponibilidade hídrica se mostra como um fator limitante para o desenvolvimento e produtividade das culturas. Sobre o processo de estresse hídrico, Taiz e Zeiger (2017) discorrem detalhadamente sobre os vegetais e as suas relações hídricas, esclarecendo que, naturalmente, o fluxo de água através de membranas é um processo passivo. Isso quer dizer que, o direcionamento das moléculas de água para regiões de baixo potencial hídrico ou de baixa energia livre é governado por forças físicas que direcionam o fluxo de água do solo para as raízes da planta. Além do mais, a pressão de turgor positiva ($\Psi_p > 0$) possui papel importante no crescimento das células vegetais, pois elas necessitam dessa pressão de turgor para estender suas paredes celulares. Assim, fica evidente que a perda de turgor sob déficits hídricos resulta na diminuição do crescimento e expansão celular (TAIZ e ZEIGER, 2017).

No início do estresse hídrico ocorre uma acumulação de solutos no citoplasma e no vacúolo das células vegetais, isso permite a manutenção da pressão de turgor, mesmo sob baixos potenciais hídricos. No entanto, quando a escassez de água se mantém, a pressão de turgor dentro das células desses tecidos começa a diminuir. Assim, a planta começa a apresentar sintomas de deficiência hídrica, na forma de murcha e estado de senescência (MATHUR e ROY, 2021). Além disso, se o estresse permanecer por muito tempo, a célula vegetal continua perdendo água, isso torna suas paredes mecanicamente deformadas, podendo ser danificada (TAIZ e ZEIGER, 2017).

Portanto, a disponibilidade de água é um fator que coordena diversas características fisiológicas tais como o ponto de murcha, a condutividade hidráulica da raiz e do caule (MATHUR e ROY, 2021). Essa relação da disponibilidade de água com a fisiologia das plantas também leva à redução da área foliar, desfolhamento e senescência aceleradas (VIMAL et al., 2017). Ullah et al. (2017) destacaram algumas estratégias realizadas pelas plantas com intuito de mitigar os danos causados pela seca, tais como: desenvolvimento da raiz, fechamento estomático, acúmulo de ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (JA).

Naturalmente, os vegetais perdem água para atmosfera devido a transpiração de forma constante e contínua. Esse processo de transpiração vegetal ocorre através dos estômatos, os quais são capazes de modular a entrada de gás carbônico e saída de água. O mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos decorre de processos fisiológicos e moleculares que controlam a transpiração vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2017). Dentro desse contexto, destaca-se o ABA, cuja molécula é capaz de modular uma cascata de eventos através do aumento dos seus níveis endógenos na planta (SHARMA e ZHENG, 2019), atuando diretamente no fechamento das células guarda e reduzindo a atividade dos canais internos de K^+ (MATHUR e ROY, 2021), até mesmo como um possível regulador de aquaporina (QUIROGA et al., 2018).

O estresse hídrico afeta as propriedades bioquímicas e moleculares das plantas, resultando em crescimento atrofiado e baixo rendimento, em consequência da redução na captação de luz devido ao baixo conteúdo de pigmentos fotossintéticos nas folhas (CHANDRA et al., 2021). Sattar et al. (2020) ressaltaram que a seca, associada ao estresse térmico, diminuem de forma significativa a eficiência fotossintética, a condutância estomática, a área foliar e a eficiência do uso de água em milho (*Zea mays* L.).

Somado à isso, o estresse hídrico afeta a atividade das enzimas fotossintéticas, tal como a rubisco, e também enzimas antioxidantes, resultando em acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MATHUR e ROY, 2021). Esse acúmulo de ROS afeta o aparato fotossintético das plantas, ocasionando

na redução da taxa fotossintética, taxa de transpiração, eficiência fotoquímica do PSII e transporte de elétrons ao longo da membrana (SHARMA e ZHENG, 2019).

Desta forma, sob condições de estresse hídrico, as plantas alteram o fluxo de íons através da membrana plasmática e do tonoplasto. Essas alterações envolvem as atividades de enzimas vegetais que hidrolisam ATP (adenosina trifosfato) e PPi (pirofosfato), essas são, respectivamente, a V-ATPase (H⁺-adenosina trifosfatase) e a V-PPase (H⁺-pirofosfatase). O papel dessas bombas de prótons é aumentar a concentração de prótons (H⁺) nos vacúolos, estabelecendo um gradiente eletroquímico através do tonoplasto e, conseqüentemente, um aumento na pressão osmótica dentro dos vacúolos. Esse processo está ligado a uma redução no potencial hídrico na célula, o que em conseqüência favorece a captação de água do solo, reduzindo o estresse hídrico (VIGANI et al., 2018).

Além da baixa pluviosidade, o estresse hídrico também pode ser provocado por outros fatores, tal como a salinidade (CHANDRA et al., 2021). O excesso de sal diminui o potencial da água e, conseqüentemente, prejudica a captação de água do solo pelas raízes das plantas. A manutenção desse equilíbrio osmótico é, em parte, realizada pelas aquaporinas (GHORBANI et al., 2019). Aquaporinas são proteínas integrais de membrana que auxiliam no transporte passivo de moléculas de água através das membranas plasmáticas, facilitando o fluxo hídrico para dentro das células vegetais (TAIZ e ZEIGER, 2017). Essas proteínas possuem duas principais subfamílias de aquaporinas, as PIPs (proteínas intrínsecas da membrana plasmática) e as TIPs (proteínas intrínsecas do tonoplasto), as quais, estão presentes, respectivamente, na membrana plasmática e tonoplasto das células vegetais (GHORBANI et al., 2019).

Além dos efeitos fisiológicos e bioquímicos citados, é necessário ressaltar que a restrição hídrica prejudica a absorção de nutrientes pela planta. Begum et al. (2019) demonstram em seus estudos com milho, que as plantas submetidas à condições hídricas distintas, apresentam diferenças significativas nos conteúdos de N, P e K. Sendo que, quanto maior o período de estresse hídrico, menores foram os conteúdos desses nutrientes nas partes aéreas das plantas.

Portanto, que a melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos (condutância estomática, crescimento vegetal, volume de raiz e ganho de biomassa) e bioquímicos (conteúdo de ABA e clorofila, níveis de enzimas do estresse oxidativo e atividade das aquaporinas) que condicionam as plantas durante o estresse hídrico, levaria a uma agricultura mais produtiva (QUIROGA et al., 2018). Uma forma sustentável de mitigar os efeitos negativos do estresse hídrico para as plantas é a partir da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), pois esses são capazes de favorecer o desenvolvimento das plantas hospedeiras sob condições de estresse (BEGUM et al., 2019). Isso ocorre devido a um complexo processo de comunicação entre a planta e o fungo, resultando no aumento da taxa fotossintética da planta e outras características relacionadas às trocas gasosas, além de aumentar a absorção de água (BEGUM et al., 2019).

4.4 Microrganismos Promotores do Crescimento Vegetal (MPCV)

Os MPCV podem ser categorizados em duas classes, *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR) e *plant growth promoting fungi* (PGPF), no qual esses microrganismos são assim definidos por possuírem a capacidade de otimizar o crescimento e desenvolvimento vegetal (MISHRA et al., 2017). Os benefícios que a inoculação desses microrganismos pode promover para as plantas hospedeiras são muito abrangentes, partindo desde a melhora na absorção de nutrientes, até a um processo de resistência sistemática, favorecendo a tolerância aos diversos tipos de estresses (BAKHSHANDEH et al., 2019).

4.4.1 Fungos Micorrízicos

Dentre os microrganismos promotores do crescimento vegetal, existem os fungos micorrízicos, os quais são caracterizados por realizar associações simbióticas com as raízes das plantas. A simbiose micorrízica é um mutualismo entre fungos do solo e plantas, durante o qual, produtos fotossintéticos são trocados por nutrientes minerais derivados do solo (CAMERON et al., 2013), desempenhando assim, um papel importante nos ecossistemas terrestres,

através do fornecimento de nutrientes essenciais e necessários para o desenvolvimento vegetal e produção primária.

Existem diferentes tipos de simbioses micorrízicas e, 80% das espécies vegetais ao redor do mundo formam alguma associação, sendo a mais comum entre a maioria das plantas, a micorriza arbuscular (SANDERS, 2011). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são simbiontes obrigatórios, necessitando da planta hospedeira para suprimento de carboidratos e ácidos graxos, importantes para o metabolismo, crescimento e esporulação fúngica (MACLEAN et al., 2017) que em troca, podem fornecer até 90% de nitrogênio e fósforo demandados pela planta hospedeira (WALDER et al., 2012 e VAN DER HEIJDEN et al., 2015) e Walder et al. (2012). Além disso, esses fungos facilitam a captação de potássio e sulfato, mediada por transportadores (WANG et al., 2017), e micronutrientes, como zinco e cobre (FEDDERMANN et al., 2010; JACOTT et al., 2017). Essas associações influenciam no ecossistema, atuando com um papel importante na ciclagem de nutrientes, tais como carbono (AVERILL et al., 2014), nitrogênio (VERESOGLOU et al., 2012; HODGE e STORER, 2015) e fósforo (FEDDERMANN et al., 2010).

Ao longo dos anos, pesquisas vêm sendo realizadas, a fim de compreender os benefícios dessa associação micorrízica para a produção vegetal e uma agricultura sustentável. Basu et al. (2018) demonstraram que plantas inoculadas com esses fungos se adaptam melhor às alterações das condições ambientais, sendo tolerantes aos estresses, tais como seca, salinidade e temperatura.

Enquanto, Augé (2001) e Quiroga et al. (2018) demonstraram que os FMA atuam diretamente na regulação dos processos de abertura e fechamento estomáticos, influenciando diretamente nas relações hídricas do vegetal e, de certa forma, modulando a absorção de água pelo organismo. Por este motivo, plantas inoculadas com estes fungos apresentam maiores atividades fotossintéticas, mesmo em plantas expostas ao estresse hídrico, principalmente devido ao aumento na eficiência do uso de água nas mesmas (PORCEL et al., 2015). Logo, o emprego de FMA em cultivos de plantas de interesse agrícola em regiões que apresentem baixa pluviosidade, podem despontar como boas ferramentas biotecnológicas, reduzindo, em parte, a necessidade excessiva de

irrigação, diminuindo tanto o impacto sobre as plantas quanto para o ecossistema.

4.4.2 *Serendipita indica*

O fungo *Serendipita indica* é pertencente ao filo Basidiomycota, e é um exemplo de fungo endofítico caracterizado por residir inteiramente dentro dos tecidos vegetais (raízes, caules e/ou folhas) (RODRIGUEZ et al., 2009; VARMA et al., 2012; DIAS et al., 2020). A colonização da raiz por esse simbiote se inicia com germinação intercelular de clamidósporos e formação de hifas extracelulares, ao mesmo tempo, também ocorre penetração das células rizodérmicas e corticais. Embora o *S. indica* colonize as células radiculares vivas, por sua penetração direta, o mesmo não invade os tecidos vasculares do hospedeiro (GILL et al., 2016).

Esse fungo é capaz de colonizar raízes de diversas espécies vegetais, desde musgos até plantas vasculares. Somado a isso, possui como peculiaridade a capacidade de mimetizar o comportamento de alguns fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (GILL et al., 2016), de tal forma que, favorece o crescimento e desenvolvimento vegetal em condições de estresse abiótico (GHORBANI et al., 2019) e biótico, como exemplo os fitopatógenos *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* (DEL BARRIO-DUQUE et al., 2019). Além disso, *S. indica* também influencia diretamente na absorção de nutrientes e condiciona os vegetais a se desenvolverem em situações de estresse hídrico, salino e de temperatura (VARMA et al., 2012). Outros benefícios desta simbiose são: aumento do ganho de biomassa durante o crescimento, aumento da floração, produção de sementes e maior conteúdo de clorofila, influenciando na eficiência fotossintética (STREET et al., 2012).

Por este motivo, as pesquisas com o fungo *S. indica* têm avançado de forma significativa nos últimos anos. Recentemente, foram avaliados os fenótipos que esse fungo pode manifestar em cultura *in vitro*, como consequência da concentração de glicose no meio. Como resultado, foram observadas diferenças macromorfológicas e fisiológicas, ressaltando que ele pode apresentar um estilo de vida saprofítico e um estilo de vida biotrófico. Por fim, foi especulado que o fator que determina a plasticidade fenotípica e

fisiológica de *S. indica* é a proporção C para N e o estágio de vida do fungo (DIAS et al., 2020).

Recentemente, foram investigados os efeitos da interação de *S. indica* no metabolismo de carboidratos da planta modelo *A. thaliana*. Os resultados desse trabalho revelaram que o fungo altera o metabolismo do açúcar em plantas colonizadas, a partir da modulação na expressão de invertases (INVs) e sacarose sintases (SUSs) no hospedeiro, alterando os reservatórios de açúcar e os mecanismos de defesa da planta (OPITZ et al., 2021)

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Seleção da espécie vegetal e dos fungos

A seleção da espécie vegetal e dos fungos foram estabelecidos com embasamento nos levantamentos bibliográficos, levando em consideração o histórico de utilização da espécie vegetal e a eficiência dos microrganismos (fungos) na promoção do crescimento, biomassa vegetal e capacidade em fornecer tolerância ao estresse hídrico para as plantas hospedeiras.

5.2 Determinação da taxa de colonização micorrízica

A colonização micorrízica de *A. colombiana* e *S. indica* nos diferentes tratamentos foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Phillips e Hayman (1970) com modificações, 60 dias após a inoculação. As amostras de raízes foram limpas e levadas à aquecimento em banho maria dentro de tubos Falcon preenchidos com solução de KOH 10% por 60 minutos. Assim que as raízes estavam clarificadas, foram lavadas com água corrente e colocadas em outros tubos Falcon com azul de tripano a 0,02%, por 20 minutos, para coloração. Posteriormente, o excesso de corante foi removido em lactofenol a 50% por 1–2 h antes da observação. Assim, vinte e um segmentos de cada tratamento, medindo aproximadamente 1 centímetro de comprimento, foram escolhidos aleatoriamente, colocadas em lâminas e levadas para visualização em microscópio óptico.

A distribuição de clamidósporos, esporos (*S. indica*) e arbúsculos (FMA) dentro dos córtex das raízes foram estabelecidos como parâmetros positivos de colonização. O percentual de colonização foi determinado utilizando a seguinte fórmula: colonização de raiz (%) = [(número de segmentos colonizados / número total de segmentos analisados) x 100] (BERTOLAZI et al., 2019 e BEGUM et al, 2019).

5.3 Condições de crescimento, inoculação e avaliações realizadas

As sementes de milho (*Zea mays* L.) foram inicialmente desinfestadas em álcool 70% por 3 minutos e posteriormente em hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, lavadas em água destilada, transferidas para sementeiras contendo areia estéril e colocadas em bandejas (5L). Para a esterilização da areia e da terra vegetal foram feitas duas autoclavagens de uma hora, com intervalo de 24 horas entre uma e outra. Após o plantio, as sementes foram levadas para a câmara de crescimento (16/8h claro/escuro; 350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ao nível de superfície da folha durante o período de luz), onde estiveram mantidas por 15 dias.

Após 15 dias, as plantas foram transplantadas para vasos de cultura (1,5L), contendo substrato composto por uma mistura de areia e terra vegetal (2:1) esterilizado, e foram inoculadas ou não, com o fungo micorrízico (*Acaulospora colombiana*) e o fungo endofítico (*Serendipita indica*). O delineamento amostral estabelecido para o experimento foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (4x3) em parcelas subdivididas, sendo determinado dois fatores – condições de inoculação e irrigação.

O substrato, contendo esporos e hifas do fungo micorrízico arbuscular (*Acaulospora colombiana*) foi fornecido pelo Dr. Sidney Luiz Stürmer ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB – UVV), sendo oriundo da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG), localizada na Universidade Regional de Blumenau (FURB). Com 15 dias de experimento, foi realizada a inoculação dos tratamentos com o fungo micorrízico a partir da adição de 25 mL desse substrato, para cada vaso, em contato direto com as raízes das plantas.

A manutenção da cultura de *S. indica* foi realizada em meio sólido, com remoção de um disco de ágar (1,0 cm diâmetro) da borda de colônias fúngicas crescidas em meio Kaefer Modificado (KM) (SHERAMETI et al., 2008 e KUMAR et al., 2011) e inoculadas em placas de Petri contendo o meio sintético KM em pH 6,5. Aos 15 dias de crescimento constatou-se a produção de clamidósporos em placas. Após 15 dias de plantio colocou-se o fungo para crescer, através da germinação dos esporos, a inoculação dos tratamentos ocorreu a partir da inserção de 4 discos de ágar, contendo clamidósporos do *S. indica*, em contato direto com as raízes das plantas.

As plantas foram regadas, duas vezes por semana, com 100 mL de solução de Clark modificada ($\frac{1}{4}$ e $\frac{2}{4}$ força), de forma intercalada, respectivamente. A solução teve seu pH ajustado entre 5,5-5,6 (CLARK, 1975) e mantidas em casa de vegetação (30% interceptação da radiação fotossinteticamente ativa, RFA), foram regadas diariamente pela manhã com água deionizada, até a capacidade de campo dos vasos de 1,5L. O estresse hídrico foi imposto com 75 dias após a inoculação, enquanto a re-irrigação foi realizada quando a fotossíntese das plantas controle estivesse zerada, este parâmetro foi mensurado utilizando um Portable Photosynthesis System – Infrared Gas Analyser (IRGA) modelo Li-6400 (LI-COR, Lincoln, NB, USA), com o experimento em andamento.

O experimento ocorreu em um total de 90 dias, este tempo foi estabelecido em relação a simbiose, entre o fungo micorrízico e a planta, ocorrer em sua plenitude, ou seja, o tempo necessário para que a inoculação seja considerada completa. Logo, aos 90 dias após a inoculação foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento da parte aérea, peso seco da raiz e da parte aérea, taxa de colonização micorrízica, taxa fotossintética líquida, transpiração, condutância estomática, eficiência no uso da água intrínseca, determinação dos índices de reflectância e conteúdo de macro e micronutrientes.

5.4 Taxa fotossintética líquida, transpiração, condutância estomática e eficiência no uso da água intrínseca

O efeito da inoculação de *A. colombiana* e/ou *S. indica* na eficiência fotossintética das plantas de milho foi realizada no dia do desmonte do

experimento. A taxa fotossintética líquida - A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), transpiração - E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), condutância estomática - G_s ($\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), e eficiência no uso da água intrínseca - $iWUE$ (A/G_s) foram aferidas nas folhas jovens completamente desenvolvidas (segunda ou terceira folha) de todas as plantas, correspondentes a cada tratamento, em um período diurno, utilizando um Portable Photosynthesis System – Infrared Gas Analyser (IRGA) modelo Li-6400 (LI-COR, Lincoln, NB, USA) com uma câmara de folha de 6 cm^2 . A temperatura do ar dentro da câmara foi padronizada para $25 \text{ }^\circ\text{C}$, e a concentração de CO_2 foi mantida em 390 ppm (níveis ambientais de CO_2) utilizando de um sistema de injeção de CO_2 (LI-COR, Lincoln, NB, USA). A intensidade do fluxo de fótons fotossintéticos foi de $850 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por uma fonte de luz LED vermelha / azul (6400-02B).

5.5 Determinação dos índices de reflectância

O espectro de reflectância de folha foi determinado usando o CI-710/720 Miniature Leaf Spectrometer (CID-Bioscience, Camas, Washington, USA). Os espectros de reflectância (ρ) mensurados foram realizados a partir de 400 nm até 1000 nm para comprimento de onda, e vários índices foram obtidos pelas médias do software acoplado ao sistema, abaixo são apresentados alguns destes índices. As estimativas de reflectância foram realizadas nas mesmas folhas utilizadas para trocas gasosas e fluorescência, ao final do experimento. Os cálculos dos índices foram realizados da seguinte forma:

1. CRI1 (Carotenoid Reflectance Index 1) é obtido a partir de $1/\rho_{510} - 1/\rho_{550}$. O CRI1 representa a função dos carotenoides no processo de absorção da luz em plantas, bem como na proteção dos efeitos danosos do excesso de luz. O enfraquecimento da vegetação contém concentrações maiores de carotenoides, então este índice é uma medida para mensurar o estresse nos vegetais. Esse índice utiliza da reflectância mensurada no espectro visível para tirar vantagem das assinaturas de absorção de pigmentos relacionados ao estresse.

2. G (Greenness Index) = ρ_{554} / ρ_{677} .

3. WBI (Water Band Index) = $p900 / p970$, possibilita a detecção de estresse hídrico.

O desmonte do experimento foi realizado após as análises, sendo 90 dias após a semeadura, as plantas foram separadas em raízes e partes aéreas.

5.6 Acumulação de macro e micronutrientes

As amostras da parte aérea e da raiz das plantas dos respectivos tratamentos foram lavadas em água corrente e água deionizada, e em seguida, secas em estufa de circulação forçada de ar a 60-70°C, por um período de 72 h, e pesadas. Após secagem as amostras foram moídas e o material resultante foi acondicionado em recipientes de plástico hermético visando um melhor acondicionamento do mesmo, para as posteriores análises químicas.

Para a determinação dos teores de N, o material vegetal foi submetido à digestão sulfúrica, no qual o nitrogênio será determinado pelo método de Nessler (JACKSON, 1965) como descrito no Handbook of Soil and Plant Analysis (KALRA, 1997).

Os outros nutrientes P, K, Ca, Mg, S, Zn, Fe, Cu, Mn e B foram quantificados por ICP-OES, após digestão com HNO₃ concentrado e H₂O₂ em sistema de digestão aberta. Condições do ICP: gás plasma 8,0 L.min⁻¹, taxa de fluxo de gás auxiliar 0,70 L.min⁻¹ e taxa de fluxo de gás carreador 0,55 L.min⁻¹ (PETERS, 2005).

5.7 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por two-way ANOVA. Quando verificado que houve diferença significativa entre os tratamentos, os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7.0, com um nível de significância de 5 % para testar as hipóteses.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Taxa da colonização micorrízica

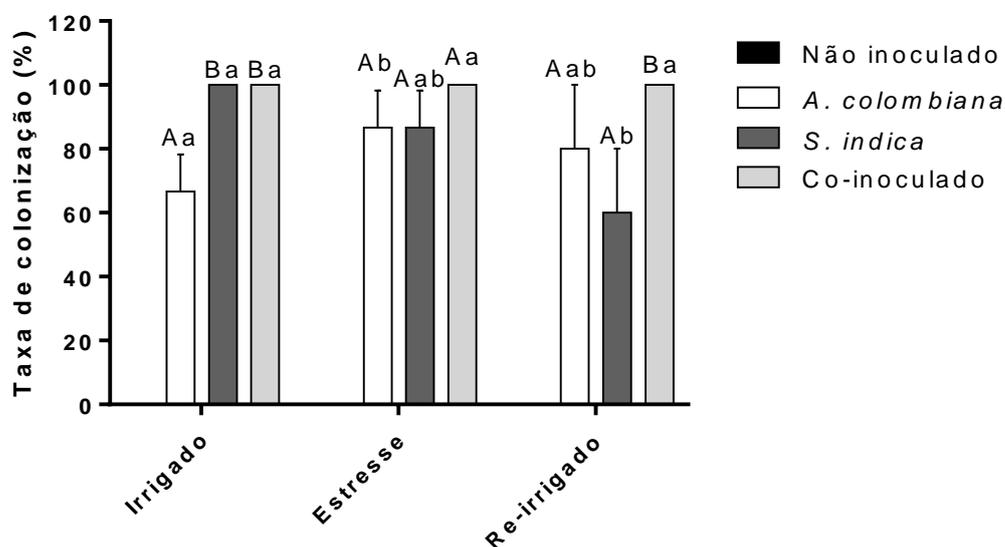


Figura 1. Taxas de colonização micorrízica nas raízes das plantas de milho inoculadas, nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. As letras maiúsculas e minúsculas distintas destacam que há diferenças significativas pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n=5$), em relação a condição hídrica e a condição de inoculação, respectivamente.

A microscopia dos fragmentos de raiz das plantas de milho inoculadas demonstrou que a taxa de colonização micorrízica para ambos os fungos, em todas as condições hídricas, foram maiores que 50% (Figura 1). De acordo com a Figura 1, é possível notar que para os tratamentos irrigados, o fungo *S. indica* possui maiores taxas de colonização em comparação aos tratamentos inoculados com o FMA, *A. colombiana*, sendo essa diferença significativa, pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n=5$). Já para os tratamentos sob estresse, as taxas de inoculação entre os inóculos não apresentam diferenças significativas. Enquanto nos tratamentos re-irrigados a taxa de colonização do *A. colombiana* não difere estatisticamente em relação as outras condições hídricas, no entanto, para os tratamentos inoculados com *S. indica* é possível observar que o estresse hídrico afeta a taxa de colonização e, mesmo após as plantas serem re-irrigadas, os efeitos do estresse influenciam no processo de colonização das raízes pelo fungo endofítico.

Os resultados apresentados na Figura 1 estão de acordo com os resultados obtidos por Hosseini et al. (2017), pois estes autores observaram que a taxa de colonização do *S. indica* tem influência significativa com diferentes potenciais osmóticos (ANOVA - $p < 0,01$), de tal forma que o aumento do estresse hídrico (redução dos potenciais osmóticos) proporciona diminuição significativa no percentual de colonização do *S. indica* em raízes de trigo.

Ren et al. (2019) avaliaram a taxa de colonização micorrízica de um FMA - *Funneliformis mosseae* - em raízes das plantas de milho, sob duas condições hídricas, irrigado e sob estresse hídrico. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos no que se refere a taxa de colonização. Sendo assim, o mesmo foi observado neste trabalho, logo que em condições de estresse a taxa de colonização seja aparentemente menor, não difere estatisticamente da taxa de colonização no tratamento irrigado, pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n=5$).

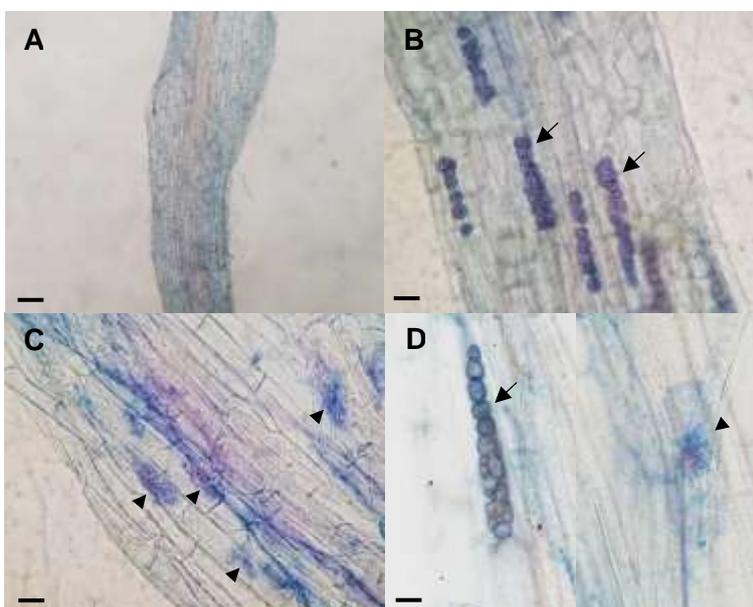


Figura 2. Micrografia representativa da colonização fúngica nas raízes de milho não inoculadas (A), inoculadas com o fungo *Serendipita indica* (B), inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Acaulospora colombiana* (C) e co-inoculado (*S. indica* + *Acaulospora colombiana*) (D) no tratamento irrigado. Raízes colonizadas com a presença de esporos de *S. indica* (setas pretas) e arbúsculos do FMA (ponta da seta). As barras representam 40 μ M (A) e 20 μ M (B, C e D).

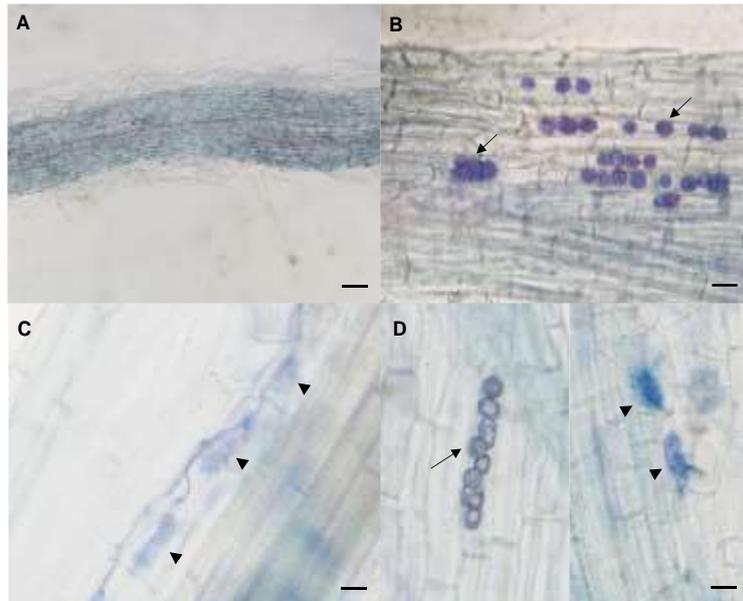


Figura 3. Micrografia representativa da colonização fúngica nas raízes de milho não inoculadas (A), inoculadas com o fungo *Serendipita indica* (B), inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Acaulospora colombiana* (C) e co-inoculado (*S. indica* + *Acaulospora colombiana*) (D) no tratamento estresse. Raízes colonizadas com a presença de esporos do *S. indica* (setas pretas), arbúsculos do FMA (ponta da seta) e esporos germinados com hifas do FMA (setas pretas pontilhadas). As barras representam 40 μ M (A) e 20 μ M (B, C e D).

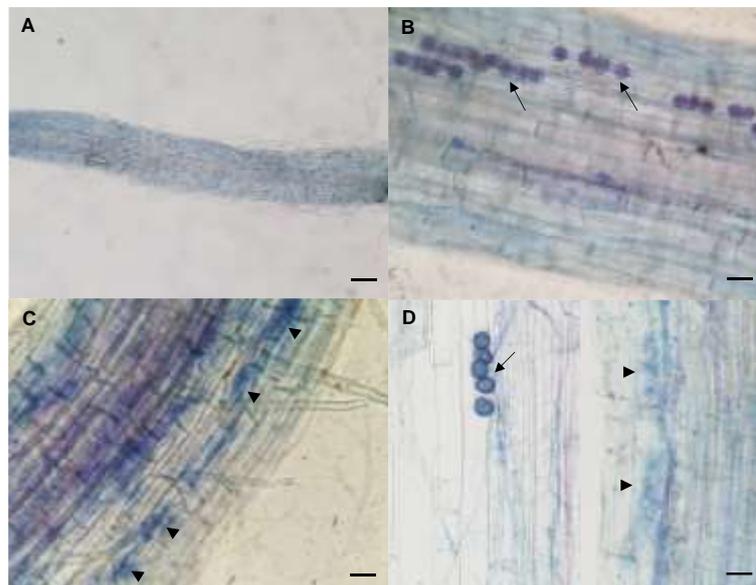


Figura 4. Micrografia representativa da colonização fúngica nas raízes de milho não inoculadas (A), inoculadas com o fungo *Serendipita indica* (B), inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Acaulospora colombiana* (C) e co-inoculado (*S. indica* + *Acaulospora colombiana*) (D) no tratamento re-irrigado. Raízes colonizadas com a presença de esporos do *S. indica* (setas pretas), arbúsculos do FMA (ponta da seta) e hifas do FMA (setas pretas pontilhadas). As barras representam 40 μ M (A) e 20 μ M (B, C e D).

6.2 Condições de crescimento, inoculação e parâmetros analisados

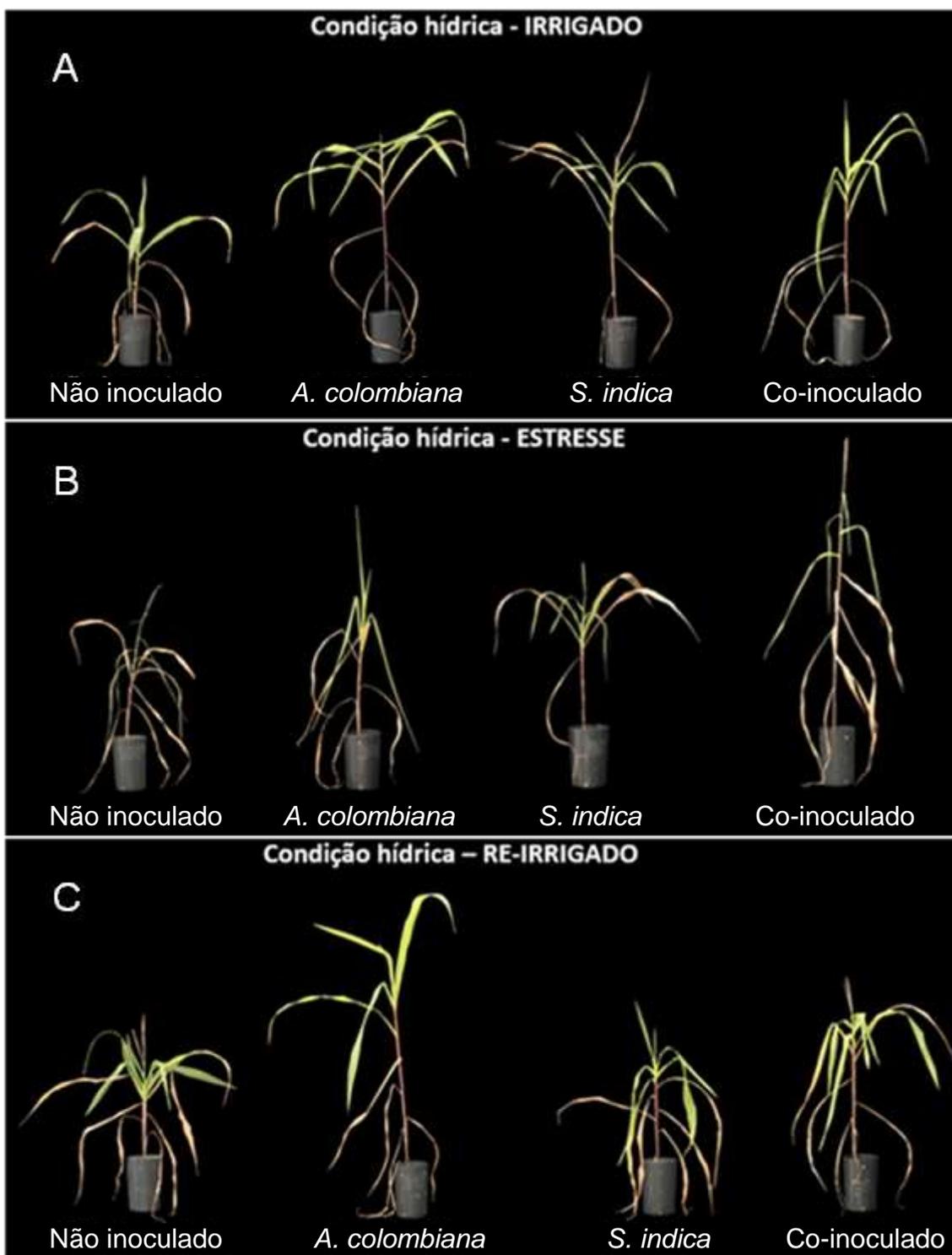


Figura 5. Imagens das plantas de milho, nas diferentes condições hídricas, **(A) Irrigado**, **(B) Estresse** e **(C) Re-irrigado**, após 90 dias de inoculação. Alguns exemplares das diferentes condições de inoculação: não-inoculado, *A. colombiana*, *S. indica* e co-inoculado (*A. colombiana* + *S. indica*).

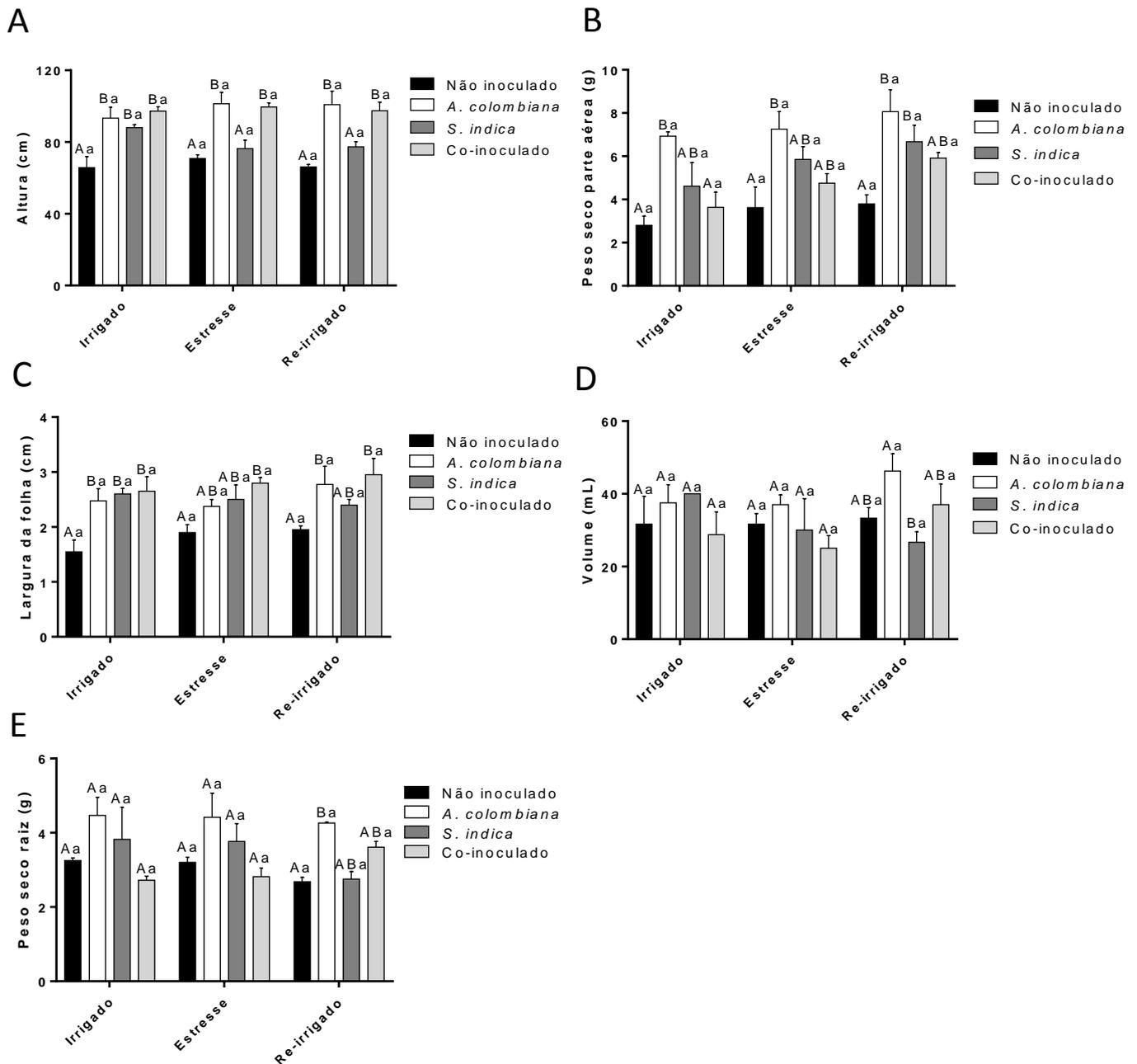


Figura 6. Aspectos morfológicos das plantas de milho, após 90 dias de inoculação, sob diferentes condições de inoculação e de hidratação: **(A) Altura, (B) Peso seco parte aérea, (C) Largura da folha, (D) Volume da raiz, (E) Peso seco da raiz.** Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. Para cada condição de inoculação, barras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$). Entre tratamentos de condições de inoculação distintas, barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$).

Plantas em condições hídricas ótimas, ou seja, irrigadas, apresentaram para os tratamentos inoculados com o fungo *A. colombiana* e co-inoculados, valores de altura significativamente maiores se comparados as plantas dos tratamentos não inoculados ($p < 0,0001$, Figura 6-A). De maneira semelhante,

plantas inoculadas com o fungo *S. indica*, sob irrigação, apresentaram valores de altura significativamente maiores em relação as plantas não inoculadas ($p=0,0002$, Figura 6-A).

Com relação ao peso seco da parte aérea, plantas inoculadas com o fungo *A. colombiana* apresentaram valores significativamente maiores se comparados com tratamento não inoculado ($p=0,0026$, Figura 6-B). Não foi possível observar diferenças significativas entre as plantas inoculadas com o fungo *S. indica* e o tratamento co-inoculado ($p=0,8943$), embora ambos apresentaram valores de peso seco da parte aérea superior ao do tratamento não inoculado, respectivamente $p=0,3776$ e $p=0,9791$ (Figura 6-B). Dentre os tratamentos, não foi possível observar diferenças significativas em relação ao estado de hidratação das plantas, sendo que o período de exposição ao estresse hídrico não influenciou nos parâmetros morfológicos avaliados (Figura 6).

Os resultados obtidos nesse experimento estão de acordo com Sánchez-blanco et al. (2004), os quais enfatizam que as plantas inoculadas com FMA apresentam maior ganho de biomassa. Diversos estudos já demonstraram que plantas de milho quando inoculadas com FMAs apresentam maior crescimento, principalmente devido ao maior aporte de nutrientes e água (ZABIR et al., 1998; ARIHARA e KARASAWA, 2000; TIAN et al., 2013, HUSSAIN et al., 2021).

No entanto, apesar de existirem evidências de que a co-inoculação de plantas de milho com FMAs e outros microrganismos promotores do crescimento vegetal possa ser benéfico ao crescimento de plantas de milho (MOREIRA et al., 2020; MUSYOKA e NJERU, 2020), não foi possível observar este efeito nos resultados obtidos neste estudo, tendo o tratamento co-inoculado (inoculado com o fungo *A. colombiana* e *S. indica*), em geral, resultados inferiores ao apenas inoculado com o FMA (Figura 6). Segundo Hussain et al. (2021), a eficácia de um inóculo pode variar devido a sua especificidade, exsudatos radiculares e forma de inoculação. Logo, baseado nos resultados encontrados, pode-se inferir que as plantas de milho apresentam maior eficácia se inoculadas apenas por FMAs.

Nos parâmetros volume e peso seco radicular, não foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos inoculados com o fungo *A.*

colombiana, *S. indica* e co-inoculado (Figura 6-D e E). No entanto foi possível observar que em ambos os parâmetros estes tratamentos apresentaram valores significativamente maiores que as plantas controle (Figura 6-D e E). Estes resultados corroboram com os encontrados em diversos trabalhos, que já demonstraram que plantas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal, dentre os muitos benefícios, modulam o crescimento radicular (PARNISKE, 2008; GUTJAHR e PARNISKE, 2013; BASU et al., 2018; REN et al., 2019; KHAN et al., 2020).

Os MPCV podem secretar e, até mesmo, estimular a produção do fitormônio auxinas nas plantas inoculadas. Este fitormônio está diretamente relacionado ao crescimento tanto da parte aérea quanto da raiz, logo plantas inoculadas por estes microrganismos podem apresentar tanto maior crescimento da parte aérea quanto radicular.

6.3 Taxa fotossintética líquida, transpiração, condutância estomática e eficiência intrínseca do uso da água

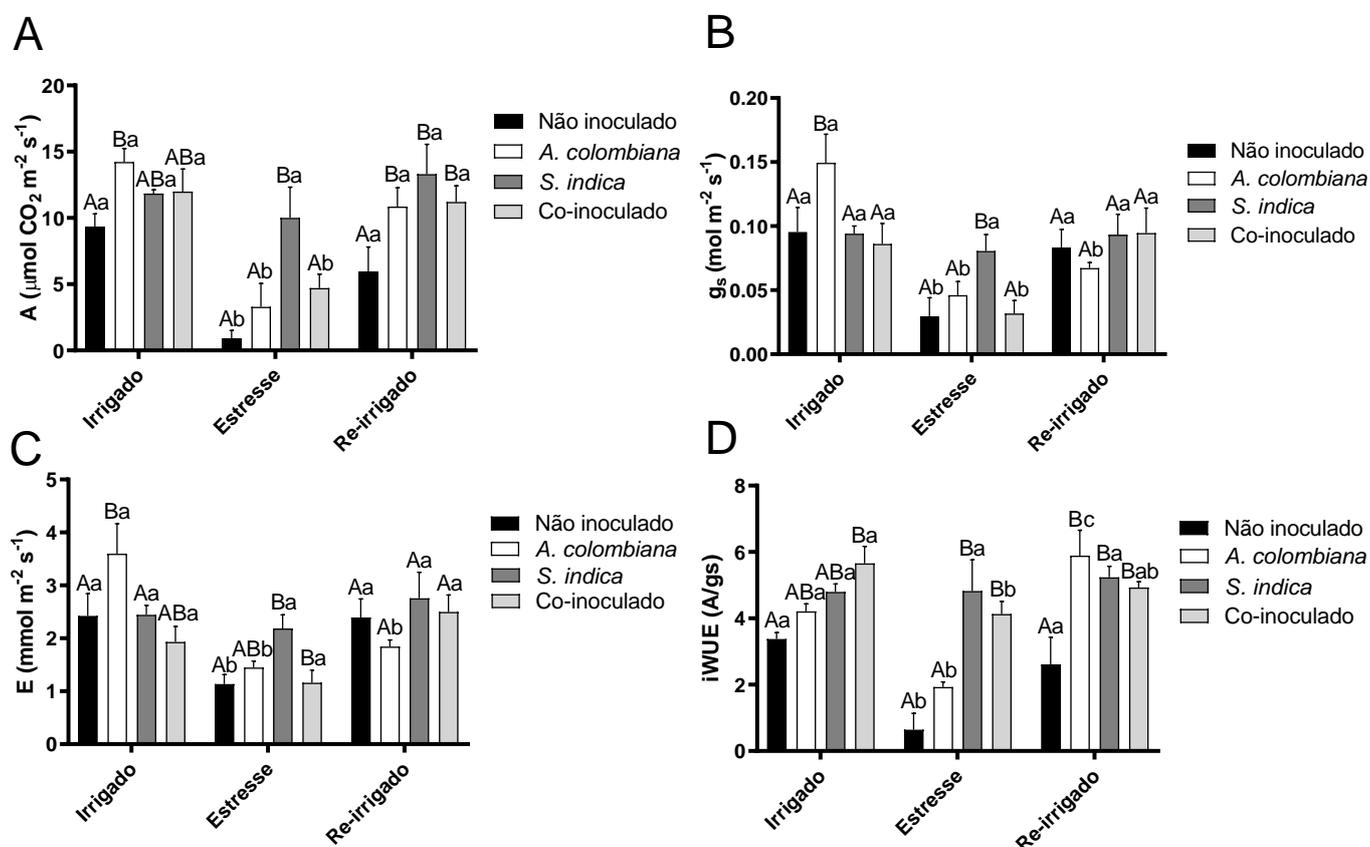


Figura 7. (A) Taxa de assimilação fotossintética (*A*), (B) Taxa de condutância estomática (*gs*), (C) Taxa de transpiração (*E*) e (D) Eficiência no uso da água intrínseca (*iWUE*) de folhas de plantas de milho não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana*, *S. indica* e co-inoculadas (A.

colombiana + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. Para cada condição de inoculação, barras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$). Entre tratamentos de condições de inoculação distintas, barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$).

As Figura 7-A e B evidenciam que as plantas submetidas ao estresse apresentaram menores taxas de assimilação fotossintética e de condutância estomática. Embora nos tratamentos inoculados com *S. indica* essa diferença não tenha sido significativa entre os tratamentos irrigados e estresse ($p=0,9308$, $p=0,9898$). No entanto, sob estresse, essas taxas foram superiores para os tratamentos inoculados com *S. indica*, em relação aos tratamentos não inoculados (A $p<0,0001$ e Gs $p=0,0095$).

Em relação aos tratamentos inoculados com *A. colombiana*, houve diferença significativa em comparação ao tratamento não inoculado, sob condições hídricas ótimas (tratamento irrigado), tanto para as taxas de assimilação fotossintéticas ($p=0,0200$) quanto para as taxas de condutância estomática ($p=0,0058$) e taxas de transpiração ($p=0,0049$). Conforme apresentado nas Figuras 7-A e B, sob condições de estresse, todas as plantas inoculadas pelo *S. indica* apresentaram valores maiores para as taxas de A e Gs. Hussin et al. (2017) observou resultados semelhantes, destacando que os tratamentos inoculados com *S. indica* diferem estatisticamente dos tratamentos não inoculados.

A Figura 7-D apresenta a eficiência no uso da água intrínseca (iWUE), sendo este parâmetro calculado a partir da relação entre a taxa de assimilação fotossintética (A) e a taxa de condutância fotossintética (gs), de tal forma que valores médios menores destas taxas induzem a valores menores para iWUE. Portanto, as taxas de A e Gs inferiores para os tratamentos não inoculados resultam em valores médios inferiores para iWUE, sendo possível observar diferenças significativas em relação aos tratamentos inoculados. As plantas inoculadas com *S. indica* e co-inoculadas submetidas ao estresse, apresentaram valores superiores de iWUE em relação as plantas não inoculadas, respectivamente $p<0,0001$ e $p<0,0001$. Todavia, os tratamentos inoculados com *A. colombiana* não houve diferença em relação aos tratamentos não inoculados ($p=0,1418$).

Os resultados apresentados na Figura 7 se assemelham aos dados apresentados por Sattar et al. (2020), os quais evidenciam que o estresse hídrico reduz de forma significativa a eficiência fotossintética, a condutância estomática e a eficiência no uso da água em plantas de milho (*Zea mays* L.). A influência da seca na ecofisiologia das plantas também é retratada por Sharma e Zheng (2019), esses autores mostraram que a seca afeta os níveis de CO₂ intracelular, o que favorece a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS danificam o aparato fotossintético e conseqüentemente, reduzem a taxa fotossintética, a condutância estomática e a taxa de transpiração das plantas.

As plantas inoculadas com *A. colombiana*, quando submetidas ao estresse, apesar de não haver diferenças significativas, apresentaram taxas relativamente maiores em comparação aos tratamentos não inoculados. Esse comportamento é relatado na literatura, na qual enfatiza que a inoculação de FMA melhora os parâmetros ecofisiológicos das plantas, tal como a taxa de assimilação fotossintética e a condutância estomática (AUGÉ, 2001). Trabalhos realizados com plantas de *Helianthemum almeriense* (MORTE et al., 2000) e *Rosmarinus officinalis* (SÁNCHEZ-BLANCO et al., 2004) submetidas estresse hídrico, expõem que as plantas estressadas inoculadas com FMA apresentaram maiores taxas fotossintéticas em relação as plantas estressadas não inoculadas.

Enquanto isso, Humphreys et al. (2010) observaram comportamento semelhantes em plantas hepáticas inoculadas com FMA, dos quais destacaram que a inoculação melhora significativamente a taxa de assimilação de carbono, por meio de uma maior eficiência nas trocas gasosas pelas plantas, assim como é apresentado na Figura 7-A, onde as plantas inoculadas com *A. colombiana* demonstraram maiores taxas de assimilação fotossintética em comparação aos tratamentos não inoculados, para as condições de irrigado ($p=0,0200$) e re-irrigado ($p=0,0206$).

Um fato importante que deve ser destacado é a capacidade das plantas de milho aumentarem as suas taxas de assimilação fotossintética quando foram re-irrigadas, isso fica evidente em todos os tratamentos, tanto inoculados quanto não inoculados. Embora, nos tratamentos inoculados a recuperação nas taxas

fotossintéticas foram superiores em relação aos tratamentos não inoculados, sendo essas diferenças estatisticamente significantes.

O estresse salino age sob as plantas de forma semelhante ao estresse hídrico, reduzindo o potencial osmótico do solo em relação a planta (TAIZ e ZEIGER, 2017). Dentro desse contexto, um estudo realizado com plantas de arroz (*Oriza sativa* L.), inoculadas e não inoculadas com o FMA - *Claroideoglossum etunicatum* -, demonstrou que a taxa fotossintética (A), a condutância estomática (gs) e a taxa de transpiração (E) foram maiores nos tratamentos inoculados em relação aos tratamentos não inoculados. Além disso, o mesmo estudo retrata que o estresse salino reduz de forma significativa A, gs e E em ambos os tratamentos, inoculados e não inoculados (PORCEL et al., 2015).

O mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos decorre de processos fisiológicos e moleculares que controlam a transpiração vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2017). Somado a isso, o ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal que em elevadas concentrações modula o mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos (SHARMA e ZHENG, 2019), atuando diretamente no fechamento das células guarda (MATHUR e ROY, 2021). Dessa forma, o ABA se destaca pela importância no metabolismo vegetal, participando de processos fisiológicos, tal como a resposta ao estresse (ULLAH et al., 2017). Assim como observado por Ren et al. (2019), os quais identificaram que o estresse hídrico aumentou significativamente as concentrações de ABA nas folhas de planta de milho.

Sendo assim, acredita-se que a associação micorrízica entre FMA e planta hospedeira pode regular diversos processos físicos e bioquímicos na planta como a regulação no metabolismo do ABA (BEGUM et al., 2019). Quiroga et al. (2018) observaram que plantas de milho inoculadas com FMA - *Rhizophagus irregularis* – tiveram aumentos significativos no conteúdo de ABA, enquanto outros autores (REN et al., 2019) perceberam que a inoculação de FMA não afetou a concentração de ABA, quando as plantas de milho estavam sob condições hídricas ótimas. Portanto, como o ABA está intimamente ligado

com taxa de condutância estomática, infere-se que a inoculação tenha efeito direto na concentração de ABA nas folhas de milho.

No entanto, para esse trabalho, não foram realizadas análises do conteúdo de ABA ou enzimas do estresse oxidativo. A avaliação desses parâmetros poderiam elucidar a compreensão dos resultados e inferir o papel da inoculação de *A. colombiana*, *S. indica* e co-inoculação no metabolismo vegetal, principalmente, no que tange ao processo de modulação metabólica por parte da inoculação em diferentes condições hídricas.

6.4 Determinação dos índices de reflectância

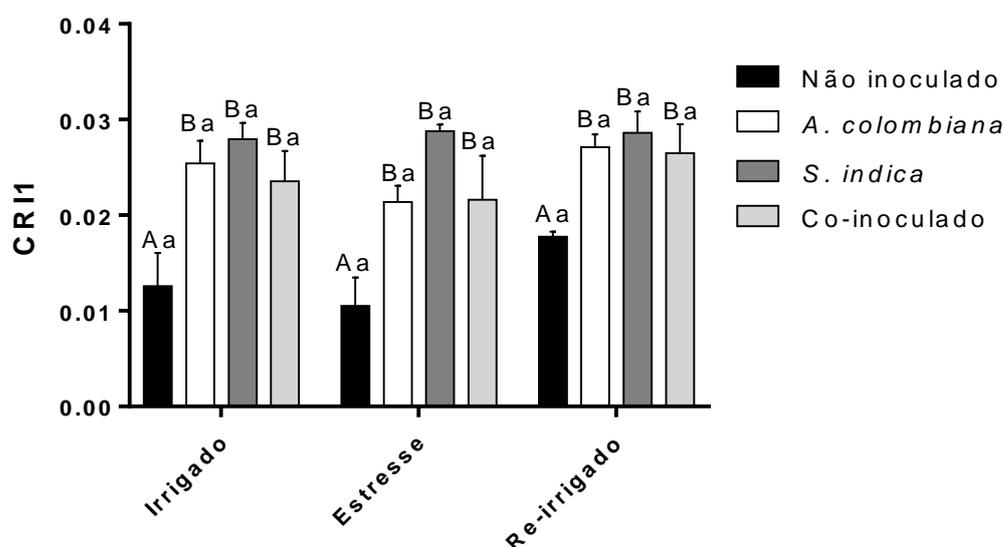


Figura 8. Níveis de carotenoides (CR1), calculados a partir dos espectros de reflectância mensurados pelo espectrômetro, em folhas de plantas de milho não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana*, *S. indica* e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. Para cada condição de inoculação, barras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$). Entre tratamentos de condições de inoculação distintas, barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$).

Na Figura 8, observa-se que para todas as condições hídricas, os níveis de carotenoides para os tratamentos inoculados com *A. colombiana*, *S. indica* e co-inoculado são estatisticamente superiores em comparação aos tratamentos não-inoculados. Destacando os tratamentos sob condições de estresse hídrico,

foi observado que as plantas dos tratamentos não-inoculados possuem menores teores de carotenoides nas folhas, quando comparados com os tratamentos inoculados por *A. colombiana* ($p=0,0042$), *S. indica* ($p<0,0001$) e co-inoculado ($p=0,0008$). Sendo que, entre os tratamentos inoculados com *A. colombiana* e *S. indica* não houve diferenças significativas ($p=0,1254$), assim como em relação aos tratamentos inoculados com *A. colombiana* e co-inoculado ($p>0,9999$) e inoculados com *S. indica* e co-inoculado ($p=0,0735$). Enquanto isso, para os tratamentos re-irrigados os teores de carotenoides nas folhas das plantas apresentaram comportamento semelhante aos tratamentos sob estresse e irrigados, isso é corroborado pela ausência de diferenças significativas entre as mesmas condições de inoculação nas diferentes condições hídricas, as letras minúsculas semelhantes entre condições hídricas distintas evidenciam esse comportamento.

Como citado anteriormente, o estresse hídrico influencia na atividade de enzimas fotossintéticas (ex. rubisco) e enzimas antioxidantes, em decorrência do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MATHUR e ROY, 2021). O excesso de ROS prejudica o funcionamento do aparato fotossintético das plantas (SHARMA e ZHENG, 2019), em consequência dos danos da peroxidação lipídica nas membranas tilacóides dos cloroplastos das células vegetais, sendo assim, os carotenoides agem como moléculas antioxidantes, prevenindo o processo de peroxidação lipídica (RAMEL et al., 2012).

O mecanismo de regulação na síntese de carotenoides varia de acordo com a espécie vegetal, além da intensidade e do período do estresse. Embora a maioria dos estudos demonstrem que o estresse ocasione em maiores teores de carotenoides, alguns autores relataram um feedback negativo em relação ao conteúdo de carotenoides em plantas sob estresse hídrico, como, por exemplo, tomate cereja (AL HASSAN et al., 2015), trigo (HAMMAD e ALI, 2014), sorgo (ARIVALAGAN e SOMASUNDARAM, 2015; AL HASSAN et al., 2016), girassol (MANIVANNAN; et al., 2014) e algumas plantas da família *Asteraceae* (YADAV et al., 2014; CICEVAN et al., 2016).

Todavia, o interessante a ser ressaltado na figura, são os maiores teores de carotenoides nos tratamentos inoculados. Bahadur et al. (2019) relataram que

o estabelecimento da simbiose entre os FMAs ocorre por sinalização bioquímica, sendo que, dentre essas moléculas, são citados as estrigolactonas, as quais são um grupo de fitohormônios baseados em carotenoides. Isso sugere que os maiores teores de carotenoides presentes nos tratamentos inoculados podem estar relacionados com a sinalização bioquímica entre os inóculos e as plantas de milho.

Outros autores destacaram que plantas inoculadas com fungos micorrízicos apresentam sistemas de defesa antioxidante melhores em comparação com plantas não inoculadas, sob condições de estresse hídrico, de tal forma que relacionaram esse efeito à inoculação de FMA e o consequente aumento no teor de carotenoides em plantas de alface (BASLAM e GOICOECHEA, 2012).

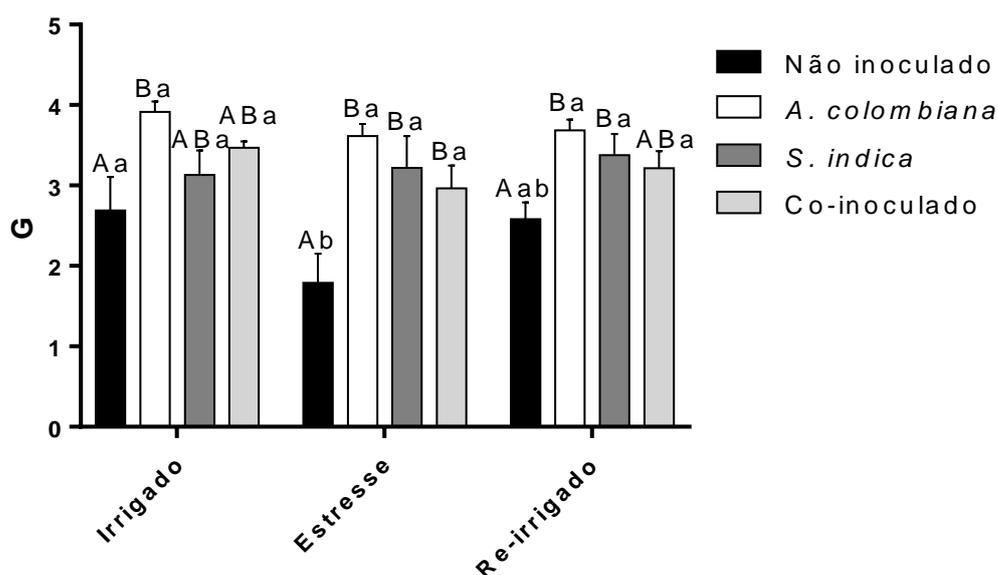


Figura 9. Níveis de índice de verde – Greenness index (G), calculados a partir dos espectros de reflectância mensurados pelo espectrômetro, em folhas de plantas de milho não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana*, *S. indica* e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. Para cada condição de inoculação, barras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$). Entre tratamentos de condições de inoculação distintas, barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$).

A Figura 9 apresenta os índices de verde nas folhas das plantas de milho, esse índice é utilizado para mensurar o conteúdo de clorofila nas folhas de

espécies vegetais. Os resultados evidenciam que para os tratamentos irrigados, os tratamentos não-inoculados apresentaram teores de clorofila nas folhas em relação significativamente menores em relação aos tratamentos inoculados com *A. colombiana* ($p=0,0004$), no entanto, em relação aos tratamentos inoculados com *S. indica* ($p=0,6640$) e co-inoculado ($p=0,0515$), não houve diferenças significativas. Os menores valores observados correspondem aos tratamentos não-inoculados submetidos ao estresse hídrico, sendo que existe diferença significativa entre os tratamentos submetidos ao estresse e os tratamentos irrigados, evidenciadas pelas letras minúsculas distintas ($p=0,0155$).

Em contrapartida, deve-se destacar que dentro de todas as condições hídricas, os tratamentos inoculados com *A. colombiana*, *S. indica* e co-inoculado apresentaram teores de clorofila estatisticamente semelhantes entre si, sendo que essas semelhanças são observadas a partir das letras maiúsculas iguais entre os tratamentos.

Mesmo que para os tratamentos irrigados, os tratamentos inoculados com o fungo *S. indica* não sejam estatisticamente distintos dos tratamentos não inoculados ($p=0,6640$), nas demais condições hídricas (estresse e re-irrigado), existem diferenças significativas, respectivamente $p<0,0001$ e $p=0,0469$. Dessa forma, os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com os dados apresentados no trabalho realizado por Bertolazi et al. (2019) com plantas de arroz (Wild Type) inoculadas com o fungo *S. indica*, onde plantas inoculadas apresentaram maiores índices de clorofila em comparação aos tratamentos não-inoculados.

Já para os tratamentos inoculados com *A. colombiana*, alguns autores obtiveram resultados semelhantes com a inoculação de fungos micorrízicos, sendo que o fato desses tratamentos apresentarem maiores teores de clorofila podem estar relacionados com a maior absorção de nitrogênio, em consequência da inoculação (JANOWSKA e ANDRZEJAK, 2017; AL-MALIKI et al., 2021). Essa correlação é mencionada por Majkowska-Gadomska et al. (2016), estes autores realizaram um estudo com três cultivares distintos de tomate inoculados e não-inoculados, com fungos micorrízicos do gênero *Glomus*, e observaram que a inoculação aumentou os índices de verde nas

plantas inoculadas, relacionando os resultados com a maior absorção nutricional decorrente do aumento da área superficial da raiz pelas hifas fúngicas. Isso decorre do fato de o teor de clorofila nas folhas ser um parâmetro relacionado com a concentração de nitrogênio nas plantas e a capacidade fotossintética das mesmas (AMMAR et al., 2020).

Em relação aos tratamentos co-inoculados, é interessante ressaltar o trabalho realizado por Xu et al. (2020), pois esses autores avaliaram a inoculação concomitante, entre fungo endofítico (*P. liquidambaris*) e fungos micorrízicos arbusculares da rizosfera, constando que a dupla inoculação modulou a comunidade de FMA, favorecendo espécies do gênero *Gigaspora* e, que ocorreram efeitos sinérgicos entre os inóculos.

Por fim, o milho (*Zea mays* L.) tem sua produtividade dependente da disponibilidade de nitrogênio, pois o uso de fertilizantes a base de nitrogênio elevam os níveis de clorofila nas folhas. No entanto, a aplicação de fertilizantes nitrogenados de forma isolada não é suficiente para que os índices de verde aumentem, sendo necessária presença de outros macronutrientes, como o fósforo (P) e o potássio (K), para que as plantas de milho tenham aumento em biomassa (ZIELEWICZ et al., 2021). Portanto, para corroborar com isso, o trabalho de Szulc et al., 2021 demonstra a possibilidade do uso desses índices de verde, mensurados nas folhas, como uma ferramenta para inferir a produtividade nas plantas de milho.

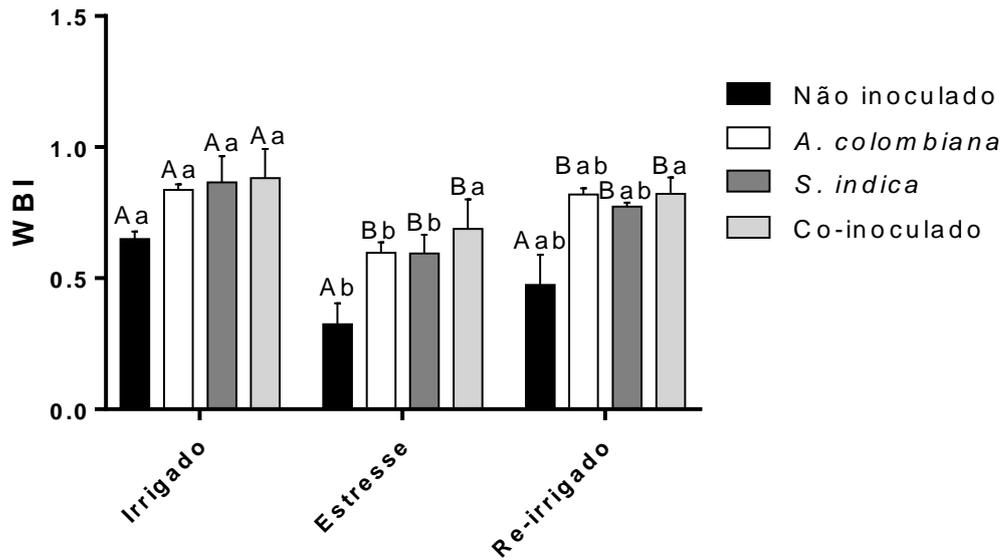


Figura 10. Níveis de água – Water Band Index (WBI), calculados a partir dos espectros de reflectância mensurados pelo espectrômetro, em folhas de plantas de milho não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana*, *S. indica* e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. Para cada condição de inoculação, barras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$). Entre tratamentos de condições de inoculação distintas, barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$).

A Figura 10 demonstra os valores médios de WBI calculados para as folhas de milho dos tratamentos inoculados e não-inoculados, sob condições hídricas distintas. Assim como apresentado por Peñuelas et al. (1997) e Claudio et al. (2006), esses valores de WBI mensurados pelos espectros de reflectância (p_{900} / p_{970}), permitem inferir os níveis de água nas folhas das espécies vegetais e possibilitam a detecção de estresse hídrico.

Logo, os resultados apresentados na Figura 10 demonstram que para a condição hídrica irrigado, todos os tratamentos, tanto inoculados quanto não inoculados, apresentaram níveis elevados, sendo que não houve diferenças significativas entre as diferentes condições de inoculação e o controle (não inoculado). No entanto, ao submeter as plantas ao estresse, observa-se que as plantas inoculadas com *A. colombiana*, *S. indica* e co-inoculadas possuem maiores níveis de água do que as plantas não inoculadas, essas comparações evidenciam diferenças significativas, sendo respectivamente $p=0,0094$, $p=0,0099$ e $p=0,0003$.

Portanto, a partir do valor de p , é possível observar que a co-inoculação favoreceu os níveis de água nas folhas, das plantas submetidas ao estresse, de forma mais significativa ($p=0,0003$) do que os tratamentos inoculados de forma isolada, tendo como medida a comparação em relação aos tratamentos não inoculados.

Quanto aos tratamentos inoculados com *S. indica*, os altos teores de água nas folhas estão correlacionados com o trabalho publicado por Hussin et al. (2017), pois estes autores demonstraram que a influência do fungo endofítico *S. indica* nas relações hídricas das plantas, evidenciando que sob condições limitantes de água as plantas de *Chenopodium quinoa* apresentaram melhor tolerância aos estresse hídrico.

Enquanto isso, nos tratamentos inoculados com o FMA, *A. colombiana*, também foram observados valores maiores tanto nas condições de estresse hídrico, quanto nas condições irrigado e re-irrigado. Os resultados obtidos nesse trabalho estão de acordo com outros trabalhos já apresentados tais como o de Augé (2001) e Quiroga et al. (2018), os quais relatam os benefícios dos FMA nas relações hídricas do vegetal com o ambiente, aumentando a absorção de água pelo organismo. Somado a isso, Duc et al. (2018) também constataram que esses benefícios da inoculação de FMA em plantas de tomate, a partir da mitigação dos efeitos adversos oriundos do estresse hídrico.

Já para os tratamentos co-inoculados, a literatura carece de trabalhos que correlacionem a co-inoculação de MPCV com os níveis de água nas folhas das plantas. No entanto, nesse trabalho em questão foi observado que a co-inoculação de *A. colombiana* e *S. indica* aumentou de forma significativa os níveis de água nas folhas das plantas de milho, para as condições de estresse e re-irrigado, quando comparados aos tratamentos não inoculados, respectivamente $p=0,0003$ e $p=0,0005$.

6.5 Acumulação de macro e micronutrientes

Tabela 1. Teor de macronutrientes [Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Enxofre (S)] **nas raízes das plantas de milho** não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana* ou *S. indica*, e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. Para cada condição de inoculação, as mesmas letras maiúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$). Entre tratamentos de condições de inoculação distintas, as mesmas letras minúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$).

		Macronutrientes (g/kg)					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Não inoculado	Irrigado	4,33 ± 0,08 Abc	0,57 ± 0,05 Ab	3,5 ± 0,35 Ab	2,97 ± 0,12 Ac	1,07 ± 0,26 Ac	0,49 ± 0,13 Aa
	Estresse	3,37 ± 0,50 Bc	0,54 ± 0,04 Ab	3,2 ± 0,63 Ab	2,25 ± 0,45 Ab	0,47 ± 0,03 Ab	0,89 ± 0,09 Ac
	Re-irrigado	4,82 ± 0,36 Ac	0,64 ± 0,05 Ab	3,08 ± 0,95 Ab	4,08 ± 0,95 Aa	0,62 ± 0,13 Ac	1,55 ± 0,30 Ac
<i>A. colombiana</i>	Irrigado	5,99 ± 0,29 Aab	0,78 ± 0,06 Aa	5,75 ± 0,43 Aa	9,88 ± 0,63 Ba	3,43 ± 0,46 Bb	4,40 ± 0,61 Ba
	Estresse	8,03 ± 0,42 Ba	0,90 ± 0,03 Aa	4,83 ± 0,14 Aa	4,17 ± 0,07 Ca	1,05 ± 0,29 Cb	3,22 ± 0,61 Bb
	Re-irrigado	5,99 ± 0,09 Aab	0,81 ± 0,02 Aab	5,67 ± 0,14 Aa	15,17 ± 1,51 Aa	5,46 ± 0,83 Aa	6,66 ± 0,31 Aa
<i>S. indica</i>	Irrigado	7,28 ± 0,49 Aba	0,73 ± 0,08 Aa	6,08 ± 0,38 Aa	6,92 ± 0,64 Ab	4,04 ± 0,48 Aab	3,11 ± 0,06 Ba
	Estresse	7,81 ± 0,16 Aa	0,67 ± 0,03 Ab	6,10 ± 0,26 Aa	4,71 ± 0,07 Ba	1,04 ± 0,08 Bb	4,48 ± 0,53 Aa
	Re-irrigado	6,74 ± 0,25 Ba	0,67 ± 0,07 Ab	6,05 ± 0,64 Aa	6,67 ± 0,29 Aa	3,95 ± 0,19 Ab	5,59 ± 0,26 Aab
Co-inoculado	Irrigado	6,50 ± 0,31 Aa	0,81 ± 0,02 Aba	6,20 ± 1,01 Aa	6,67 ± 0,14 ABb	5,39 ± 0,39 Aa	4,42 ± 0,41 Aa
	Estresse	6,50 ± 0,57 Ab	0,67 ± 0,06 Bb	4,08 ± 0,38 Bb	5,50 ± 0,33 Ba	2,67 ± 0,47 Ba	3,59 ± 0,26 Bab
	Re-irrigado	7,27 ± 0,18 Aa	0,83 ± 0,06 Aa	6,30 ± 0,35 Aa	8,38 ± 0,55 Aa	6,13 ± 0,87 Aa	4,82 ± 0,57 Ab

Tabela 2. Teor de micronutrientes [Ferro (Fe), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Manganês (Mn) e Boro (B)] **nas raízes de plantas de milho** não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana* ou *S. indica*, e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. Para cada condição de inoculação, as mesmas letras maiúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$). Entre tratamentos de condições de inoculação distintas, as mesmas letras minúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$).

		Micronutrientes (mg/kg)				
		Fe	Zn	Cu	Mn	B
Não inoculado	Irrigado	1348 ± 113,14 Bc	11,00 ± 1,41 Ac	4,50 ± 0,71 Bc	81,50 ± 4,95 Bc	39,00 ± 4,24 Aa
	Estresse	2766 ± 306,85 Aa	9,67 ± 1,53 Ac	11,67 ± 1,15 Ab	102,67 ± 6,43 Bb	40,00 ± 3,46 Aa
	Re-irrigado	2649,33 ± 278,20 Aa	12,67 ± 1,53 Ac	10,33 ± 1,53 ABc	228,67 ± 40,50 Aa	44,67 ± 4,62 Aa
<i>A. colombiana</i>	Irrigado	3454,67 ± 226,14 Ab	19,00 ± 1,00 Ab	20,33 ± 2,08 Bb	130,33 ± 12,50 Ac	38,00 ± 3,46 Aa
	Estresse	3445,33 ± 231,32 Aa	22,67 ± 2,52 Aa	29,33 ± 3,51 Aa	103,33 ± 7,57 Ab	44,00 ± 3,46 Aa
	Re-irrigado	1564 ± 379,92 Bb	17,67 ± 1,53 Abc	20,00 ± 1,73 Bb	102,67 ± 3,51 Ab	44,00 ± 3,46 Aa
<i>S. indica</i>	Irrigado	2693,33 ± 325,85 Ab	28,33 ± 1,53 Aa	19,00 ± 1,73 Ab	305,67 ± 46,76 Aa	46,00 ± 3,46 Aa
	Estresse	2684 ± 218,76 Aa	17,00 ± 1,00 Bb	8,33 ± 1,15 Bb	216,00 ± 30,79 Ba	42,00 ± 6,00 Aa
	Re-irrigado	1846,67 ± 71,81 Bab	18,33 ± 2,89 Bb	14,67 ± 1,53 Abc	290,00 ± 36,06 Aba	42,67 ± 4,62 Aa
Co-inoculado	Irrigado	4585,33 ± 430,71 Aa	22,00 ± 2,65 Ab	35,67 ± 1,53 Aa	213,00 ± 23,39 Ab	44,00 ± 3,46 Aa
	Estresse	2714,67 ± 84,32 Ba	24,00 ± 1,73 Aa	27,67 ± 2,52 Ba	284,33 ± 17,16 Aa	38,00 ± 3,46 Aa
	Re-irrigado	1611 ± 276,01 Cb	24,00 ± 2,00 Aa	28,00 ± 3,61 Ba	229,00 ± 25,94 Aa	42,00 ± 0,00 Aa

Tabela 3. Teor de macronutrientes [Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Enxofre (S)] nas partes aéreas das plantas de milho não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana* ou *S. indica*, e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. Para cada condição de inoculação, as mesmas letras maiúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$). Entre tratamentos de condições de inoculação distintas, as mesmas letras minúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$).

		Macronutrientes (g/kg)					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Não inoculado	Irrigado	7,69 ± 0,98 Aa	0,75 ± 0,04 Ab	6,88 ± 1,94 Ab	4,26 ± 1,24 Aa	2,69 ± 0,44 Ab	0,64 ± 0,07 Aa
	Estresse	5,60 ± 0,90 Ab	0,82 ± 0,10 Ab	5,57 ± 1,13 Ab	6,63 ± 1,11 Aa	2,48 ± 0,26 Ab	0,26 ± 0,06 Bb
	Re-irrigado	5,43 ± 0,81 Ab	0,80 ± 0,12 Ab	7,08 ± 1,42 Ab	5,38 ± 1,00 Aa	2,49 ± 0,55 Ac	0,31 ± 0,10 Ba
<i>A. colombiana</i>	Irrigado	10,47 ± 0,04 Aa	2,33 ± 0,57 Aa	12,17 ± 0,52 Aab	4,54 ± 0,26 Ba	4,24 ± 0,35 Aa	0,46 ± 0,05 Aab
	Estresse	8,57 ± 0,49 Aab	1,50 ± 0,50 Aab	15,0 ± 2,95 Aa	4,71 ± 0,90 Ba	2,75 ± 0,33 Ab	0,48 ± 0,07 Aa
	Re-irrigado	11,02 ± 1,69 Aa	1,90 ± 0,28 Aa	13,67 ± 3,47 Aa	7,96 ± 1,35 Aa	4,34 ± 0,44 Aa	0,45 ± 0,05 Aa
<i>S. indica</i>	Irrigado	10,04 ± 0,50 Aa	1,84 ± 0,07 Aa	16,17 ± 1,38 Aa	6,42 ± 0,36 Aa	4,17 ± 0,76 Aa	0,34 ± 0,05 Ab
	Estresse	10,71 ± 1,45 Aa	1,51 ± 0,23 Aab	13,58 ± 2,08 Aa	7,42 ± 0,71 Aa	4,29 ± 0,51 Aa	0,41 ± 0,10 Aab
	Re-irrigado	10,30 ± 0,47 Aa	1,75 ± 0,23 Aa	13,08 ± 1,70 Aa	7,21 ± 0,63 Aa	4,67 ± 1,06 Aa	0,43 ± 0,06 Aa
Co-inoculado	Irrigado	10,34 ± 2,00 Aa	1,99 ± 0,31 Aa	15,33 ± 1,94 Aa	5,96 ± 0,97 Aa	4,63 ± 0,57 Aa	0,53 ± 0,06 Aab
	Estresse	9,32 ± 0,58 Aa	2,09 ± 0,17 Aa	17,08 ± 1,44 Bb	5,17 ± 0,97 Aa	4,04 ± 0,19 Aab	0,44 ± 0,06 Aab
	Re-irrigado	8,71 ± 0,59 Aa	2,09 ± 0,33 Aa	17,08 ± 0,72 Aa	8,08 ± 1,94 Aa	4,75 ± 0,99 Aa	0,40 ± 0,07 Aa

Tabela 4. Teor de micronutrientes [Ferro (Fe), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Manganês (Mn) e Boro (B)] nas raízes de plantas de milho não-inoculadas, inoculadas com *A. colombiana* ou *S. indica*, e co-inoculadas (*A. colombiana* + *S. indica*) nas diferentes condições hídricas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. Para cada condição de inoculação, as mesmas letras maiúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$). Entre tratamentos de condições de inoculação distintas, as mesmas letras minúsculas não diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n = 5$).

		Micronutrientes (mg/kg)				
		Fe	Zn	Cu	Mn	B
Não inoculado	Irrigado	353,50 ± 7,78 Ab	33,50 ± 0,71 Aa	4,50 ± 0,71 Aa	142,50 ± 0,71 Aa	68,50 ± 9,19 Aa
	Estresse	232,67 ± 43,66 Ab	23,33 ± 1,53 Ba	3,33 ± 0,58 Ab	69,67 ± 12,34 Bb	57,33 ± 4,04 Aab
	Re-irrigado	234,33 ± 36,02 Ab	21,67 ± 2,89 Ba	2,33 ± 0,58 Ab	84,00 ± 9,54 Bb	57,33 ± 4,04 Ab
<i>A. colombiana</i>	Irrigado	604,33 ± 79,78 Aa	14,67 ± 2,52 Ab	4,67 ± 0,58 Aa	72,00 ± 7,21 Ab	46,00 ± 3,46 Ab
	Estresse	648,33 ± 55,90 Aa	16,00 ± 3,61 Aab	5,33 ± 0,58 Aa	68,33 ± 11,02 Ab	46,00 ± 3,46 Ab
	Re-irrigado	451,67 ± 30,92 Aa	12,33 ± 0,58 Ab	4,67 ± 0,58 Aa	66,33 ± 4,73 Ab	44,00 ± 3,46 Ab
<i>S. indica</i>	Irrigado	465,33 ± 84,05 Aab	28,00 ± 5,00 Aa	4,33 ± 0,58 Aa	85,00 ± 6,24 Bb	46,00 ± 3,46 Cb
	Estresse	420,67 ± 38,48 Aab	19,33 ± 3,79 ABab	4,33 ± 0,58 Aab	153,00 ± 25,63 Aa	63,33 ± 4,16 Ba
	Re-irrigado	511,00 ± 131,92 Aa	19,00 ± 5,57 Bab	4,33 ± 0,58 Aa	144,00 ± 38,51 Aa	78,00 ± 5,29 Aa
Co-inoculado	Irrigado	519,33 ± 63,89 ABab	14,33 ± 1,53 Ab	5,33 ± 0,58 Aa	80,00 ± 9,17 Ab	58,33 ± 8,50 Aab
	Estresse	440,67 ± 53,41 Ba	12,33 ± 0,58 Ab	4,00 ± 1,00 Aab	54,67 ± 18,18 Ab	44,00 ± 3,46 Bb
	Re-irrigado	647,33 ± 92,87 Aa	11,33 ± 1,15 Ab	5,00 ± 1,00 Aa	81,67 ± 12,01 Ab	44,00 ± 3,46 Bb

As Tabelas 1 e 3 destacam o teor dos macronutrientes, nas raízes e partes aéreas das plantas de milho, respectivamente. A princípio deve-se destacar que os teores de N, nas raízes dos tratamentos não inoculados sob estresse, foram significativamente inferiores em relação aos tratamentos inoculados com *A. colombiana* ($p < 0,0001$), *S. indica* ($p < 0,0001$) e co-inoculados ($p < 0,0001$). Já, nas partes aéreas, o mesmo comportamento é observado em relação aos tratamentos não inoculados e os tratamentos inoculados com *S. indica* ($p = 0,0002$) e co-inoculados ($p = 0,0088$), embora para os tratamentos inoculados com *A. colombiana* não houve diferenças significativas ($p = 0,0620$).

Enquanto isso, considerando os tratamentos sob estresse, os teores de fósforo nas raízes diferem significativamente entre os tratamentos não inoculados e os tratamentos inoculados com *A. colombiana* ($p < 0,0001$). Sendo que, em relação aos tratamentos inoculados com *S. indica* ($p = 0,0923$) e co-inoculados ($p = 0,1088$), os valores não diferem pelo teste de Tukey. Quanto as partes aéreas, os tratamentos não inoculados sob estresse apresentam valores inferiores em relação aos tratamentos co-inoculados ($p = 0,0012$), embora para os tratamentos inoculados com *A. colombiana* ($p = 0,2504$) e *S. indica* ($p = 0,2283$), não há diferenças significativas.

Por fim, em relação ao potássio, podemos observar que os tratamentos não inoculados apresentaram teores médios inferiores em relação a todos os tratamentos inoculados e co-inoculados, independente da condição hídrica. Sendo que, a única relação que não apresentou diferença significativa foi entre os tratamentos não inoculados e os tratamentos co-inoculados, sob estresse, pois o valor de $p = 0,6662$ demonstra que diferem pelo teste de Tukey.

Portanto, os resultados indicam que os microrganismos utilizados neste estudo podem ser considerados promotores do crescimento vegetal, uma vez que a inoculação e co-inoculação favoreceu a absorção dos macronutrientes (N, P e K) das plantas submetidas ao estresse hídrico. Sendo assim, a inoculação, tanto isolada quanto concomitante resultou em um favorecimento no desenvolvimento vegetal das plantas de milho, neste caso, a partir de uma maior oferta nutricional para a planta (BAKHSHANDEH et al., 2019). Somado a isso, como as concentrações de N, P e K nos tratamentos inoculados sob estresse se

mantiveram altas, pode-se inferir que esses microrganismos tenham resultado em um processo de resistência sistemática, favorecendo a tolerância ao estresse hídrico (BAKHSHANDEH et al., 2019). Diversos estudos já demonstraram que a inoculação, tanto de *S. indica* quanto de FMAs, favorecem a absorção dos macronutrientes essenciais, - nitrogênio, fósforo e potássio - pois a inoculação é capaz de modular o transporte desses nutrientes, amplificando a absorção dos mesmos (ZHAO et al., 2015 ;WU et al., 2019).

Os resultados aqui encontrados com relação aos teores de nitrogênio e fósforo nas partes aéreas e raízes, evidenciam resultados que corroboram com os trabalhos de Van der Heijden et al. (2015) e Walder et al. (2012), pois estes autores demonstraram que os FMAs são capazes de fornecer grande quantidade destes nutrientes para as plantas hospedeiras. Enquanto isso, Wang et al. (2017) descreveu a inoculação de plantas com os FMAs favoreceram a captação de potássio e sulfato, pela planta, Feddermann et al. (2010) destacou o mesmo comportamento para o zinco e Jacott et al. (2017) para o cobre.

Os FMAs são capazes de modular a expressão de genes vegetais relacionados ao metabolismo do carbono, modulando o a produção de açúcares e lipídios, assim como o transporte de fósforo, nitrogênio, potássio, sulfato e íons metálicos (WANG et al., 2017). Neste contexto, recentemente foi demonstrado que a inoculação de plantas com FMAs favorece a absorção de alguns nutrientes, entre eles o N, através das aquaporinas, uma vez que estas proteínas são mais expressas nestas plantas (QUIROGA et al., 2020). A modulação da expressão de aquaporinas em plantas inoculadas por FMAs também favoreceu o acúmulo de nutrientes mesmo em plantas expostas ao estresse hídrico, pois as mesmas favoreceram a absorção de nutrientes essenciais, que aumentaram a capacidade das plantas em reter água e manter o metabolismo mesmo nestas condições (QUIROGA et al., 2020).

Sabe-se que a condição nutricional é fundamental para que as plantas possam superar eventuais estresses que, porventura, sejam submetidas (RUIZ-LOZANO et al., 2012). Os resultados encontrados neste estudo demonstram que plantas inoculadas com os FMAs e *S. indica* favoreceram a absorção de nutrientes por estas plantas, mesmo sob a condição de estresse hídrico (Tabelas

1 e 3). Pode-se considerar que isso se deva tanto as modulações fisiológicas, tais quais expressão de proteínas responsáveis pela absorção de água e nutrientes, quanto ao aumento da área de exploração do solo pelas plantas, através das hifas destes microrganismos, que absorvem água e nutrientes em áreas em que as raízes das plantas não conseguem alcançar (BÁRZANA et al., 2012; BÁRZANA et al., 2014; QUIROGA et al., 2020). A condição nutricional das plantas inoculadas encontradas neste estudo, explica, em parte, os resultados vistos nas taxas fotossintéticas das mesmas, em que foi possível observar maior capacidade de realizar trocas gasosas, mesmo em condições de estresse hídrico. Possivelmente a capacidade destas plantas de captar e acumular água, mesmo nestas condições, permitiu que elas fossem capazes de manter a taxa de transpiração e conseqüentemente, as trocas gasosas (RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2010; LIU et al., 2015).

Os resultados encontrados neste estudo também evidenciam os benefícios da inoculação do fungo endofítico *S. indica* nas plantas de milho. Esse fungo tem sido objeto de estudo em muitos trabalhos, por possuir efeitos na promoção de crescimento vegetal semelhantes aos efeitos dos FMAs. Os resultados observados neste estudo também demonstram isso, uma vez que este fungo, tal qual os FMAs, também favoreceram a absorção de nutrientes. Estes resultados corroboram com os encontrados por Varma et al. (2012), em que a simbiose do *S. indica* com as raízes vegetais permitiu uma maior aquisição de nitrogênio e fósforo do solo.

Além disso, para os outros macro e micronutrientes analisados, também é possível observar os efeitos da inoculação do *S. indica*. Segundo Oelmüller et al. (2009), este microrganismo atua na promoção do crescimento vegetal através de diversos mecanismos, sendo possível destacar: maior absorção de nutrientes, os efeitos da inoculação na ciclagem de P, S e C; a capacidade de prover maior resistência a estresses como o hídrico, biótico e salino. Todos esses fatores torna o *S. indica* uma possível ferramenta para a biotecnologia vegetal, principalmente se utilizado como bioinoculante.

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que tanto o *S. indica* quanto o *A. colombiana* favoreceram a absorção de macro e

micronutrientes pelas plantas de milho, sendo o mesmo observado para as plantas co-inoculadas com ambos microrganismos. No entanto, de uma maneira geral, a co-inoculação não difere estatisticamente dos valores médios observados nos tratamentos isolados (Tabelas 1 a 4). Mesmo que haja algumas pequenas diferenças estatísticas, se verificado de forma geral, é possível observar que a co-inoculação, correspondem com os demais tratamentos inoculados, não sendo possível notar nenhum efeito sinérgico proveniente desta co-inoculação.

7 CONCLUSÃO

O trabalho em questão teve como principal objetivo avaliar os efeitos da co-inoculação do fungo micorrízico arbuscular – *Acaulospora colombiana* – com o fungo endofítico – *Serendipita indica* nas plantas de milho. Assim, conclui-se que a associação concomitante entre as plantas de milho e os dois inóculos, correspondente aos tratamentos co-inoculados, foram benéficos para o desenvolvimento vegetal, no que tange a absorção de macro e micronutrientes. Embora os tratamentos co-inoculados apresentaram resultados semelhantes aos tratamentos inoculados pelo *A. colombiana* e *S. indica*, de forma isolada, em relação às concentrações de micro e macronutrientes nas partes aéreas e raízes das plantas de milho. Já, em relação as condições hídricas impostas, não houve diferenças significativas capazes de inferir que a co-inoculação tenha sido favorável para os tratamentos sob estresse.

Por fim, é possível inferir que as espécies de FPCV escolhidas para o trabalho, não apresentaram competição interespecífica, ou seja, os microrganismos não competiram pelos mesmos recursos, de tal forma que pudesse comprometer o metabolismo e desenvolvimento vegetal das plantas de milho. No entanto, serão necessários mais estudos para elucidar os mecanismos relacionados a inoculação das plantas com estes fungos, principalmente no que tange ao entendimento da interação destes fungos durante este processo de colonização.

8 REFERÊNCIAS

AL-MALIKI, S. et al. Effects of arbuscular mycorrhiza and organic wastes on soil carbon mineralisation, actinomycete and nutrient content in maize plants (*Zea mays* L.). **Malaysian Journal of Soil Science**, v. 25, p. 107–124, 2021.

AL HASSAN, M. et al. Effects of salt and water stress on plant growth and on accumulation of osmolytes and antioxidant compounds in cherry tomato. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 43, n. 1, p. 1–11, 2015.

AL HASSAN, M. et al. Stress tolerance mechanisms in *Juncus*: Responses to salinity and drought in three *Juncus* species adapted to different natural environments. **Functional Plant Biology**, v. 43, n. 10, p. 949–960, 2016.

AMMAR, A. et al. Comparative physiological behavior of fig (*Ficus carica* L.) cultivars in response to water stress and recovery. **Scientia Horticulturae**, v. 260, n. 108881, 2020.

AN, Z. et al. Methodology of Analyzing Maize Density Loss in Smallholder 's Fields and Potential Optimize Approach. **Agriculture**, v. 11, n. 480, 2021.

ANDREA, M. C. DA S. et al. Variability and limitations of maize production in Brazil: Potential yield, water-limited yield and yield gaps. **Agricultural Systems**, v. 165, p. 264–273, 2018.

ANLI, M. et al. Biofertilizers as Strategies to Improve Photosynthetic Apparatus, Growth, and Drought Stress Tolerance in the Date Palm. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

ARIVALAGAN, M.; SOMASUNDARAM, R. Effect of propiconazole and salicylic acid on the growth and photosynthetic pigments in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. under drought condition. **Journal of Ecobiotechnology**, v. 7, p. 17–23, 2015.

AUGÉ, R. M. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, v. 11, p. 3–42, 2001.

AVERILL, C.; TURNER, B. L.; FINZI, A. C. Mycorrhiza-mediated competition between plants and decomposers drives soil carbon storage. **Nature**, 2014.

BAHADUR, A. et al. Mechanistic insights into arbuscular mycorrhizal fungi-

mediated drought stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 1–18, 2019.

BAKHSHANDEH, E. et al. Plant growth promoting microorganisms can improve germination, seedling growth and potassium uptake of soybean under drought and salt stress. **Plant Growth Regulation**, v. 90, n. 1, p. 123–136, 2019.

BASLAM, M.; GOICOECHEA, N. Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. **Mycorrhiza**, v. 22, n. 5, p. 347–359, 2012.

BASU, S.; RABARA, R. C.; NEGI, S. AMF: The future prospect for sustainable agriculture. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 102, p. 36–45, 2018.

BEGUM, N. et al. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–15, 2019.

BEGUM, N. et al. Improved drought tolerance by AMF inoculation in maize (*Zea mays*) involves physiological and biochemical implications. **Plants**, v. 8, n. 579, p. 1–20, 2019.

BEGUM, N. et al. Co-inoculation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and the Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Improve Growth and Photosynthesis in Tobacco Under Drought Stress by Up-Regulating Antioxidant and Mineral Nutrition Metabolism. **Microbial Ecology**, 2021.

BERTOLAZI, A. A. et al. Inoculation with *Piriformospora indica* is more efficient in wild-type rice than in transgenic rice over-expressing the vacuolar H⁺-PPase. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–16, 2019.

BRASIL. Atos do Poder Legislativo. Lei nº 13.101, de 27 de janeiro de 2015. Diário Oficial da União, Brasília, 28 de jan. de 2015. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2015-2018/2015/lei/L13101.htm.

Acesso em: 15 de maio de 2021.

CAMERON, D. D. et al. Mycorrhiza-induced resistance : more than the sum of its parts ? **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 10, p. 539–545, 2013.

CHANDRA, P. et al. Strategies to mitigate the adverse effect of drought stress on crop plants—influences of soil bacteria: A review. **Pedosphere**, v. 31, n. 3, p. 496–509, 2021.

CICEVAN, R. et al. Screening for drought tolerance in cultivars of the ornamental genus *Tagetes* (Asteraceae). **PeerJ**, v. 6, p. 1–20, 2016.

CLAUDIO, H. C. et al. Monitoring drought effects on vegetation water content and fluxes in chaparral with the 970 nm water band index. **Remote Sensing of Environment**, v. 103, n. 3, p. 304–311, 2006.

CLARK, R. B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 458-460, 1975.

CUNHA, B. A. DA et al. Influência da época de semeadura na severidade de doenças foliares e na produtividade do milho safrinha. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 4, p. 424–427, 2019.

CZERNIAK, M. J.; STÜRMER, S. L. Produção de inoculante micorrízico on farm utilizando resíduos da indústria florestal. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 38, n. 6, p. 1712–1721, 2015.

DEL BARRIO-DUQUE, A. et al. Beneficial Endophytic Bacteria-*Serendipita indica* Interaction for Crop Enhancement and Resistance to Phytopathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–24, 2019.

DIAS, T. et al. The Free-Living Stage Growth Conditions of the Endophytic Fungus *Serendipita indica* May Regulate Its Potential as Plant Growth Promoting Microbe. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–15, 2020.

DUC, N. H.; CSINTALAN, Z.; POSTA, K. Arbuscular mycorrhizal fungi mitigate negative effects of combined drought and heat stress on tomato plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 132, p. 297–307, 2018.

FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO**. Disponível em: <www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 1 jun. 2021.

FEDDERMANN, N. et al. Functional diversity in arbuscular mycorrhiza – the role of gene expression , phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. **Fungal**

Ecology, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2010.

FERROL, N.; TAMAYO, E.; VARGAS, P. The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 22, p. 6253–6565, 2016.

GHORBANI, A. et al. Piriformospora indica confers salinity tolerance on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through amelioration of nutrient accumulation, K⁺/Na⁺ homeostasis and water status. **Plant Cell Reports**, v. 38, n. 9, p. 1151–1163, 2019.

GILL, S. S. et al. Piriformospora indica: Potential and Significance in Plant Stress Tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 332, p. 1–20, 2016.

GOLDNER, K. Especialistas discutem o futuro do setor de biotecnologia no Espírito Santo. Instituto de Desenvolvimento Educacional e Industrial do Espírito Santo, 2019. Disponível em: <<https://portaldaindustria-es.com.br/publicacao/especialistas-discutem-o-futuro-do-setor-de-biotecnologia-no-espírito-santo>>. Acesso em: 30 de maio de 2021.

HALLASGO, A. M. et al. The fungal endophyte serendipita williamsii does not affect phosphorus status but carbon and nitrogen dynamics in arbuscular mycorrhizal tomato plants. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 233, p. 1–17, 2020.

HAMMAD, S. A. R.; ALI, O. A. M. Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 1, p. 133–145, 2014.

HEIDARIANPOUR, M. B.; ALIASGHARZAD, N.; OLSSON, P. A. Positive effects of co-inoculation with *Rhizophagus irregularis* and *Serendipita indica* on tomato growth under saline conditions, and their individual colonization estimated by signature lipids. **Mycorrhiza**, v. 30, n. 4, p. 455–466, 2020.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859–8873, 2013.

HODGE, A.; STORER, K. Arbuscular mycorrhiza and nitrogen : implications for individual plants through to ecosystems. p. 1–19, 2015.

HOSSEINI, F.; MOSADDEGHI, M. R.; DEXTER, A. R. Effect of the fungus *Piriformospora indica* on physiological characteristics and root morphology of wheat under combined drought and mechanical stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 107–120, 2017.

HUMPHREYS, C. P. et al. Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. **Nature Communications**, v. 1, n. 103, p. 7, 2010.

HUSSIN, S. et al. Influence of the root endophyte *Piriformospora indica* on the plant water relations, gas exchange and growth of *Chenopodium quinoa* at limited water availability. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 203, n. 5, p. 373–384, 2017.

JACKSON M. L. Soil chemical analysis, 2nd edn. Prentice Hall, New Jersey, 1965.

JACOTT, C. N.; MURRAY, J. D.; RIDOUT, C. J. Trade-offs in arbuscular mycorrhizal symbiosis: Disease resistance, growth responses and perspectives for crop breeding. **Agronomy**, v. 7, n. 4, p. 1–18, 2017.

JANOWSKA, B.; ANDRZEJAK, R. Effect of mycorrhizal inoculation on development and flowering of *Tagetes patula* L. “Yellow Boy” and *Salvia splendens* Buc’hoz ex Etl. “Saluti Red”. **Acta Agrobotanica**, v. 70, n. 2, p. 6–11, 2017.

KALAJI, H. M. et al. Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. 2016.

KALRA Y. Handbook of reference methods for plant analysis, 1st edn. CRC Press, Boca Raton, 1997.

KUMAR V.; SAHAI, V.; BISARIA, V. S. High-density spore production of *Piriformospora indica*, a plant growth-promoting endophyte, by optimization of nutritional and cultural parameters. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 3169–3175, 2011.

LIU, H. et al. *Piriformospora indica*-induced phytohormone changes and root colonization strategies are highly host-specific. **Plant Signaling and Behavior**, v. 14, n. 9, p. 1–13, 2019.

LOPES, J. R. F. **Variabilidade espaço-temporal da pluviometria no semiárido brasileiro e sua relação com a produtividade do milho.** [s.l.]

Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, 2016.

MACLEAN, A. M.; BRAVO, A.; HARRISON, M. J. Plant signaling and metabolic pathways enabling arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Cell**, v. 29, n. 10, p. 2319–2335, 2017.

MAJKOWSKA-GADOMSKA, J.; DOBROWOLSKI, A.; MIKULEWICZ, E. The Effect of Mycorrhizal Inoculum on the Leaf Greenness Index and Yield of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Plants Grown in a Heated Plastic Tunnel. **Acta Agrophysica**, v. 23, n. 2, p. 445–453, 2016.

MANIVANNAN, P. et al. Drought stress-induced modification on growth and pigments composition in different genotypes of *Helianthus annuus* L. **Current Botany**, v. 5, p. 7–13, 2014.

MARTINS, M. A.; TOMASELLA, J.; DIAS, C. G. Maize yield under a changing climate in the Brazilian Northeast: Impacts and adaptation. **Agricultural Water Management**, v. 216, p. 339–350, 2019.

MATHUR, P.; ROY, S. Insights into the plant responses to drought and decoding the potential of root associated microbiome for inducing drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 172, n. 2, p. 1016–1029, 2021.

MISHRA, J.; SINGH, R.; ARORA, N. K. Plant Growth-Promoting Microbes: Diverse Roles in Agriculture and Environmental Sustainability. In: **Probiotics and Plant Health**. Singapore: Springer Nature, p. 71–111, 2017.

MORTE, A.; LOVISOLO, C.; SCHUBERT, A. Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense*-*Terfezia clavervyi*. **Mycorrhiza**, v. 10, n. 3, p. 115–119, 2000.

NAAMALA, J.; SMITH, D. L. Relevance of plant growth promoting microorganisms and their derived compounds, in the face of climate change. **Agronomy**, v. 10, n. 8, 2020.

NUCCIO, M. L. et al. Where are the drought tolerant crops? An assessment of more than two decades of plant biotechnology effort in crop improvement. **Plant Science**, v. 273, p. 110–119, 2018.

OELMÜLLER, R. et al. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with

multiple biotechnological applications. **Symbiosis**, v. 49, n. 1, p. 1–17, 2009.

ONU – Organização das Nações Unidas. População mundial deve ter mais 2 bilhões de pessoas nos próximos 30 anos. **ONU News**, 2019. Disponível em: <<https://news.un.org/pt/story/2019/06/1676601>>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

ONU – Organização das Nações Unidas. Objetivos do Desenvolvimento Sustentável. **Nações Unidas Brasil**, 2021. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>>. Acesso em: 16 maio de 2021.

OPITZ, M. W. et al. Serendipita indica changes host sugar and defense status in *Arabidopsis thaliana*: cooperation or exploitation? **Planta**, v. 253, n. 3, p. 1–14, 2021.

OUKARROUM, A., SCHANSKER, G., STRASSER, R. J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 137, p. 188–199, 2009.

PEÑUELAS, J. et al. Estimation of plant water concentration by the reflectance Water Index WI (R_{900} / R_{970}). **International Journal of Remote**, v. 18, n. 13, p. 2869–2875, 1997.

PETERS J. B. Wisconsin Procedures for Soil Testing, Plant Analysis and Feed & Forage Analysis: Plant Analysis. Department of Soil Science, College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin-Extension, Madison, W.I., 2005.

PHILLIPS, J. M., HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158–161, 1970.

PORCEL, R. et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis ameliorates the optimum quantum yield of photosystem II and reduces non-photochemical quenching in rice plants subjected to salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 185, p. 75–

83, 2015.

QUIROGA, G. et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and salicylic acid regulate aquaporins and root hydraulic properties in maize plants subjected to drought. **Agricultural Water Management**, v. 202, p. 271–284, 2018.

RAMEL, F. et al. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. **Plant Physiology**, v. 158, n. 3, p. 1267–1278, 2012.

REN, A. T. et al. Arbuscular mycorrhizal fungus alters root-sourced signal (abscisic acid) for better drought acclimation in *Zea mays* L. seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 167, p. 103824, 2019.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Fungal endophytes : diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, p. 314–330, 2009.

SABRA, M. et al. Beneficial root endophytic fungi increase growth and quality parameters of sweet basil in heavy metal contaminated soil. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, n. November, 2018.

SÁNCHEZ-BLANCO, M. J. et al. Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 6, p. 675–682, 2004.

SANDERS, I. R. Mycorrhizal symbioses: How to be seen as a good fungus. **Current Biology**, v. 21, n. 14, p. R550–R552, 2011.

SATTAR, A. et al. Terminal drought and heat stress alter physiological and biochemical attributes in flag leaf of bread wheat. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, p. 1–14, 2020.

SHAHABIVAND, S.; PARVANEH, A.; ALILOO, A. A. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* affected growth, cadmium partitioning and chlorophyll fluorescence of sunflower under cadmium toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, n. July, p. 496–502, 2017.

SHARMA, A.; ZHENG, B. Melatonin mediated regulation of drought stress: Physiological and molecular aspects. **Plants**, v. 8, n. 7, 2019.

SHERAMETI, I. et al. The root-colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers

drought tolerance in Arabidopsis by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 6, p. 799–807, 2008.

SINGH, A. Conjunctive use of water resources for sustainable irrigated agriculture. **Journal of Hydrology**, v. 519, n. PB, p. 1688–1697, 2014.

SINGH, A. Managing the water resources problems of irrigated agriculture through geospatial techniques: An overview. **Agricultural Water Management**, v. 174, p. 2–10, 2016.

SINGH, A. Assessment of different strategies for managing the water resources problems of irrigated agriculture. **Agricultural Water Management**, v. 208, n. June, p. 187–192, 2018.

STRASSER, R. J., SRIVASTAVA, A., TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: **Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation**, p. 445-483, 2000.

STRASSER, R. J., SRIVASTAVA, A., TSIMILLI-MICHAEL, M. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: **Chlorophyll fluorescence: a Signature of photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration**. p. 321-362, 2004.

STREET, M. et al. The root endophyte fungus Piriformospora indica leads to early flowering , higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant , Coleus forskohlii. n. March 2015, p. 37–41, 2012.

SZULC, P. et al. Spad leaf greenness index: Green mass yield indicator of maize (zea mays l.), genetic and agriculture practice relationship. **Plants**, v. 10, n. 5, 2021.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. [s.l: s.n.].

THE INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). **World Meteorological Organization - WMO**. Disponível em: <<https://www.ipcc.ch/>>.

- ULLAH, A. et al. Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, p. 271–284, 2017.
- UMANATH, M.; PARAMASIVAM, R.; DURAI, T. T. Farmers' Perception on Environmental Degradation Due to Indiscriminate Use of Modern Practices: A Case Study from Madurai District, Tamil Nadu. **Current World Environment**, v. 11, n. 1, p. 291–295, 2016.
- VAN DER HEIJDEN, M. G. A. et al. Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. **New Phytologist**, v. 205, n. 4, p. 1406–1423, 2015.
- VARMA, A. et al. Piriformospora indica: A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. **Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 117–131, 2012a.
- VARMA, A. et al. **Fungal associations 2nd Edition**. [s.l: s.n.]. v. 9
- VERESOGLOU, S. D.; CHEN, B.; RILLIG, M. C. Soil Biology & Biochemistry Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 46, p. 53–62, 2012.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.
- VIAN, A. L. et al. Variabilidade espacial da produtividade de milho irrigado e sua correlação com variáveis explicativas de planta. **Ciencia Rural**, v. 46, n. 3, p. 464–471, 2016.
- VIGANI, G. et al. Root bacterial endophytes confer drought resistance and enhance expression and activity of a vacuolar H⁺-pumping pyrophosphatase in pepper plants. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 9, 2018.
- VIMAL, S. R. et al. Soil-Plant-Microbe Interactions in Stressed Agriculture Management: A Review. **Pedosphere**, v. 27, n. 2, p. 177–192, 2017.
- VINCENT, P. L. D. Zea Mays (Maize, Corn). In: **eLS. John Wiley & Sons, LTD: Chichester**, p. 11, 2012.
- WALDER, F. et al. Mycorrhizal networks: Common goods of plants shared under unequal terms of trade. **Plant Physiology**, v. 159, n. 2, p. 789–797, 2012.
- WANG, X. et al. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and

rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 3, p. 173–181, 2011.

WANG, W. et al. Nutrient Exchange and Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. **Molecular Plant**, v. 10, n. 9, p. 1147–1158, 2017.

XU, F. J. et al. Endophytic fungus improves peanut drought resistance by reassembling the root-dwelling community of arbuscular mycorrhizal fungi. **Fungal Ecology**, v. 48, p. 100993, 2020.

YADAV, R. K. et al. Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, n. October, p. 70–83, 2014.

ZIELEWICZ, W. et al. By-Plant Prediction of Dry Matter Yields at Various Growth Stages of Maize Plants (*Zea mays* L .) Using Leaf Greenness Indicator in Climatic Conditions of Poland. **Applied Sciences**, v. 11, n. 9513, p. 14, 2021.