



YULIMAR CASTRO MOLINA

**IMPACT OF BACTERIAL ISOLATES AND CONSORTIA ON
THE GROWTH AND RESPONSE OF POTATO (*SOLANUM
TUBEROSUM* L.) TO THERMAL STRESS *IN VITRO* AND *IN
VIVO***

**LAVRAS-MG
2023**

YULIMAR CASTRO MOLINA

**IMPACT OF BACTERIAL ISOLATES AND CONSORTIA ON THE GROWTH AND
RESPONSE OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) TO THERMAL STRESS *IN
VITRO* AND *IN VIVO***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Ederson da Conceição Jesus
Orientador

Prof (a) Dra. Joyce Doria Rodrigues
Co-orientadora

**LAVRAS-MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Castro Molina, Yulimar.

Impact of bacterial isolates and consortia on the growth and response of potato (*Solanum tuberosum* L.) to thermal stress *in vitro* and *in vivo* / Yulimar Castro Molina. – 2023.

108p.

Orientador(a): Ederson da Conceição Jesus.

Coorientador(a): Joyce Doria Rodrigues.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1.Agriculture. 2.Micropropagation. 3.Biostimulants. I. da Conceição Jesus, Ederson. II. Rodrigues, Joyce Doria. III. Título.

YULIMAR CASTRO MOLINA

**IMPACTO DE ISOLADOS E CONSÓRCIOS BACTERIANOS NO CRESCIMENTO
E RESPOSTA DA BATATA (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) AO ESTRESSE
TÉRMICO *IN VITRO* E *IN VIVO***

**IMPACT OF BACTERIAL ISOLATES AND CONSORTIA ON THE GROWTH AND
RESPONSE OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) TO THERMAL STRESS *IN
VITRO* AND *IN VIVO***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção de título de Doutor

APROVADA em 14 de setembro de 2023.

Dr^a. Cristina Ferreira Silva DBI/UFLA

Dr^a. Joyce Doria Rodrigues DAG/UFLA

Dr^a. Carolina Weigert Galvão UEPG

Dr^a. Vera Lúcia dos Santos UFMG

Prof. Dr. Ederson da Conceição Jesus
Orientador

Prof (a) Dra. Joyce Doria Rodrigues
Co-orientadora

**LAVRAS – MG
2023**

AGRADECIMENTOS

À Deus, que é infinitamente misericordioso, pela bênção da minha vida, pela força para superar as adversidades.

A meu amor, minha vida, meu amigo, meu filho, Santiago, amor maior que inspira cada passo meu.

A minha mãe, Isabel Molina pela crença nos meus sonhos, pela ajuda e pelo amor.

Aos meus irmãos, Ronal, Nancy e Reny, minha gratidão sempre.

Ao meu orientador, prof. Ederson da Conceição Jesus, pelos ensinamentos em contribuir para a minha formação e pela ajuda para alcançar essa meta.

A minha co-orientadora Professora Joyce Doria Rodrigues por ter permitido que eu realizasse parte deste trabalho no Laboratório de Cultura de tecidos. Obrigada pelos bons conselhos e pela sua disponibilidade em sempre me ajudar.

A Paolo, Alejandra e Eli amigos que me abrigaram quando chegamos, obrigada pela ajuda.

Aos meus amigos, que viraram família Robert, Cristina, Lisette, Milena e Liliana, que me apoiaram nos momentos mais difíceis dessa jornada. Obrigada pela amizade, obrigada por tudo!

A minhas amigas de laboratório Gracielle e Luna pela grande ajuda durante a execução dos experimentos.

Ao Laboratório de Cultura de tecidos pela realização dos experimentos e contribuição para o meu amadurecimento profissional.

A equipe técnica do laboratório de Microbiologia Agrícola e do laboratório de cultura de tecidos.

A Universidade Federal de Lavras – UFLA, pela oportunidade de realização deste trabalho, e aos seus professores pela contribuição à minha formação profissional.

À Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, por toda contribuição na minha formação.

A todos os meus amigos e familiares pelo apoio e incentivo.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001”.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

As mudanças climáticas são uma das maiores preocupações das últimas décadas para os pesquisadores, agricultores, economistas e governos. Os especialistas nessa área mostram os danos que essas mudanças provocam na agricultura. No entanto, a própria agricultura faz parte das causas das mudanças climáticas globais, como é a agricultura convencional. Para garantir a produção de alimentos a longo prazo, é necessário desenvolver práticas agrícolas sustentáveis baseadas em abordagens conservacionistas. Estas práticas devem permitir aos agricultores obter benefícios econômicos, garantindo ao mesmo tempo uma produção estável a longo prazo e minimizando o impacto negativo no ambiente. Neste contexto, o uso de inoculantes microbianos desempenha um papel fundamental e podem ser considerados como um dos principais impulsionadores para uma agricultura sustentável e não tão vulnerável às mudanças climáticas. Diferentes microrganismos são propostos como biofertilizantes, bioestimulantes e agentes de biocontrole para melhorar o crescimento e a produtividade das plantas, além de sua adaptação a estresses abióticos e bióticos, em diferentes sistemas de produção como seu uso em culturas *in vitro*. Portanto, neste estudo, avaliou-se o potencial de nove bactérias multifuncionais em promover o crescimento de duas cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) usadas em condições *in vitro* e *in vivo*. Os resultados mostraram que atributos das bactérias como a produção de hormônios e da enzima ACC deaminase influenciam no aumento do crescimento das plantas, melhoraram sua capacidade adaptativa *in vivo* e aumentam a produção de tubérculos. Da mesma forma, micro plantas de batata cv Ágata foram biotizadas com consórcios microbianos, formados com as melhores cepas e submetidas ao estresse térmico. As micro plantas apresentaram maior taxa de crescimento *in vitro* e *in vivo*. Suas respostas fisiológicas e bioquímicas ao estresse térmico foram melhoradas, como demonstrado pela maior ativação das enzimas antioxidantes que minimizaram o impacto nocivo de H₂O₂ (SOD, APX e CAT) e malondialdeído nos tecidos da planta. O conteúdo de pigmentos fotossintéticos e osmólitos também aumentaram, mantendo a formação de tubérculos sob essas condições de estresse. Os resultados mostram que cultivar plantas com inoculantes microbianos individuais ou em consórcios pode ter um lugar estratégico no cultivo *in vitro* e em ambientes sob estresse abiótico.

Palavras-chaves: Agricultura. Micropropagação. Bioestimulantes. Estresse abiótico

ABSTRACT

Climate change is one of the biggest concerns of recent decades for researchers, farmers, economists and governments. Experts on this field show the damage it causes to agriculture; however, agriculture itself is part of the causes of global climate change, as is conventional agriculture. In order to guarantee food production in the long term, it is necessary to develop sustainable agricultural practices based on conservationist approaches. These practices should allow farmers to obtain economic benefits while guaranteeing stable long-term production and minimizing the negative impact on the environment. In this context, the use of microbial inoculants plays a fundamental role and can be considered one of the main drivers for sustainable agriculture that is not so vulnerable to climate change. Different microorganisms are proposed as biofertilizers, biostimulants, and biocontrol agents to improve plant growth and productivity, in addition to their adaptation to abiotic and biotic stresses, in different production systems such as in *in vitro* culture. Therefore, in this study, we evaluated the ability of nine multifunctional bacteria to promote the growth and production of two potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) under *in vitro* and *in vivo* conditions. The results show that bacterial attributes such as the hormones production and enzyme ACC deaminase activity influence plant growth, improve the plant's adaptive capacity *in vivo*, and increase tuber production. Similarly, micro plants of potato cv Ágata were biotized with microbial consortia formed with the best strains and subjected to heat stress. The inoculated micro plants showed a higher growth rate *in vitro* and *in vivo*. Their physiological and biochemical responses to heat stress were improved, as shown by the greater activation of the antioxidant enzymes that minimize the harmful impact of H₂O₂ (SOD, APX, and CAT) and Malondialdehyde on the plant's tissues. The contents of photosynthetic pigments and osmolytes were also increased, maintaining tuber formation under these stress conditions. The results show that cultivating plants with individual microbial inoculants or in consortia can find a strategic place in *in vitro* cultivation and environments under abiotic stress.

Key words: Agriculture. Micropropagation. Biostimulants. Abiotic stress

LIST OF FIGURES

ARTICLE 1

- Figure 1.** Quantitative determination of phytohormone biosynthesis in PGPB expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$. (A) IAA production at 3, 4, 5, 6, and 9 days of incubation in medium supplemented with 0.5 mg mL L-Tryptophan; (B) GA₃ production at 2, 4, and 6 days of incubation; and (C) SA production at 2,4 and 6 days of incubation..... 41
- Figure 2.** Quantitative determination of ACCd activity in PGPB, expressed in terms of concentration of $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein hr}^{-1}$ after seven days of incubation..... 42
- Figure 3.** Effect of biotization on the number of nodes in potato micro plants. Number of nodes cultivar Duvira (A), graphical representation of the development of biotized micro plants cv Duvira (B), number of nodes cultivar Ágata (C) and graphical representation of the development of biotized micro plants cv Ágata (D). Averages with a common letter are not significantly different ($p < 0.05$) 46
- Figure 4.** Percentage survival of biotized and non-biotized micro plants of potato cultivars Duvira and Ágata under *in vivo* conditions..... 47
- Figure 5.** Effect of biotization with PGPB on tuber formation in cv Duvira and Ágata. (A) Number and (B) fresh weight of tubers (B) in cv Duvira and Ágata. (C) Duvira inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 (C) and its uninoculated control (D), cv Ágata inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 (D) and non-inoculated control (E). Averages with a common letter are not significantly different ($p < 0.05$). 52
- Figure 6.** Effect of re-inoculation with PGPB on cv Duvira and Ágata tuber formation. The number of tubers (A), fresh weight of tubers (B), cv Duvira inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 (C), uninoculated control (D), cv Ágata inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 (D) and uninoculated control (E). Averages with common letters are not significantly different ($p < 0.05$) 54

ARTIGO 2

- Figura 1.** Efeito da biotização no crescimento de micro plantas de batata cv Ágata após de 30 dias em condições *in vitro*. (A) Comprimento da parte aérea e raiz, (B) biomassa seca da parte aérea e raiz e (C) fotografia do desenvolvimento das micro plantas biotizadas e comparadas com o controle não

inoculado. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899) e **Controle:** Não inoculado. Médias com letra comum não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) n=8..... 82

Figura 2. Efeito da biotização no número de nós e taxa de sobrevivência de micro plantas de batata cv Ágata após de 30 dias em condições *in vitro*. (A) Número de nós e (B) taxa de sobrevivência. T1: *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); T2: *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); T3: *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899) e Controle: Não inoculado. Médias com letra comum não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) n=8..... 83

Figura 3. Efeito da inoculação com consórcios microbianos no crescimento e produção de plantas de batata cv Ágata submetidas a estresse gradual térmico, com 60 dias de crescimento e avaliadas após de 10 dias de recuperação ao estresse. (A) Crescimento (B) biomassa seca (C) número de tubérculos (D) peso de tubérculos e (E) fotografia do desenvolvimento das plantas inoculadas e comparadas com o controle não inoculado com estresse e não inoculado sem estresse. T1: *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); T2: *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); T3: *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); T4: Não inoculado/com estresse e T5: Não inoculado/sem estresse. Médias com letra comum não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) n=5..... 85

Figura 4. Efeito da inoculação com consórcios microbianos na formação de estolões em plantas de batata cv Ágata submetidas a estresse gradual térmico, com 60 dias de crescimento e avaliadas após de 10 dias de recuperação ao estresse. (A) Número de estolões (B) fotografia da formação de estolões das plantas inoculadas e comparadas com o controle não inoculado com estresse e não inoculado sem estresse. T1: *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); T2: *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); T3: *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); T4: Não inoculado/com estresse e T5: Não inoculado/sem estresse. Médias com letra comum não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) n=5..... 86

Figura 5. 5 Efeitos da inoculação de consórcios microbianos sobre (A) teor de clorofila total (B) carotenoides em plantas de batata mantidas sob condições de estresse térmico e após 10 dias de recuperação em casa de vegetação. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. As barras claras representam o estresse térmico e as escuras representam a fase de recuperação. Os valores (média ± erro padrão) de cada tratamento foram obtidos a partir de três repetições biológicas (n = 3). Letras diferentes representam dados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P <0,05) 87

Figura 6. Efeitos da inoculação de consórcios microbianos sobre o conteúdo relativo de água em plantas de batata mantidas sob condições de estresse térmico e após 10 dias de recuperação em casa de vegetação. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. Os valores (média ± erro padrão) de cada tratamento foram obtidos a partir de três repetições biológicas (n = 3). Letras diferentes representam dados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P <0,05) 88

Figura 7. Efeitos da inoculação de consórcios microbianos no acúmulo de (A) Peroxido de hidrogênio (B) malondialdeído em plantas de batata após 10 dias de recuperação ao estresse térmico. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. Os valores (média ± erro padrão) de cada tratamento foram obtidos a partir de cinco repetições biológicas (n = 5). Letras diferentes representam dados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P <0,05) 90

Figura 8. Efeitos da inoculação de consórcios microbianos na atividade enzimática em plantas de batata após 10 dias de recuperação ao estresse térmico. (A) SOD (B) CAT (C) APX (D) proteína. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum*

brasilense + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. Os valores (média ± erro padrão) de cada tratamento foram obtidos a partir de cinco repetições biológicas (n= 5). Letras diferentes representam dados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P <0,05) 92

Figura 9.

Conteúdo de hormônios endógenos (auxinas e ácido salicílico) em plantas de batata após 10 dias de recuperação ao estresse térmico. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. Os valores (média ± erro padrão) de cada tratamento foram obtidos a partir de cinco repetições biológicas (n= 5). Letras diferentes representam dados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P <0,05) 93

LIST OF TABLES

ARTICLE 1-

Table 1.	The bacterial strains used in the experiments	35
Table 2	Effects of biotization with PGPB on growth variables of potato cv. Duvira after 30 days under <i>in vitro</i> conditions.....	43
Table 3	Effects of biotization with PGPB on growth variables in potato cv. Ágata, evaluated after 30 days under <i>in vitro</i> conditions.....	45
Table 4	Effects of biotization with PGPB on growth variables in potato cv. Duvira evaluated after 25 days in a greenhouse. Acclimatization phase (A) and after re-inoculation (B).....	48
Table 5	Effects of biotization with PGPB on growth variables in potato cv. Ágata evaluated after 25 days in the greenhouse. Acclimatization phase (A) and after re-inoculation (B).....	50

ARTIGO 2-

Tabela 1.	Tratamentos experimentais.....	75
Tabela 2.	Teor de prolina e compostos fenólicos em folhas de plantas de batata inoculadas e não inoculadas sob estresse térmico e após 10 dias de recuperação em casa de vegetação. Letra diferente significa diferença significativa ($p < 0,05$) (n=3)	89

RESUMO

PRIMEIRA PARTE	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV).....	16
2.2 Endófitos bacterianos.....	17
2.3 Interação planta-microrganismos.....	18
2.4 Consórcios microbianos.....	18
2.5 Papel das BPCV na mitigação do estresse abiótico.....	19
2.6 Técnica de cultura de tecido.....	20
2.7 Biotização e culturas de tecidos vegetais <i>in vitro</i>.....	21
2.8 Aspectos importantes da cultura de batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	21
REFERÊNCIAS.....	23
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	28
ARTIGO 1 - The inoculation of <i>Azospirillum brasilense</i> in vitro and in vivo benefit the biotization, survival and production of potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	29
ARTIGO 2 - Potencial de consórcios microbianos para estimular a termotolerância em batata (<i>Solanum tuberosum</i> L) modulando sistemas antioxidantes e fitohormônios endógenos.....	69

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas agrícolas estão sob pressão para a produtividade de forma sustentável para atender à demanda por alimentos e fibras para uma população global crescente com terras em condições cada vez piores e sob mudanças climáticas extremas (BRAJESH et al., 2018). O aproveitamento dos microrganismos conhecidos como Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV) pode contribuir significativamente para alcançar tal objetivo, minimizando os impactos no ambiente e os efeitos deletérios à saúde humana (CHEN et al., 2019). As plantas liberam uma grande quantidade de carbono orgânico na rizosfera na forma de exsudatos de raízes, mucilagem, células de raízes e tecidos desprendidos (VAN et al., 2019). Essas substâncias sustentam as comunidades de microrganismos no solo e na planta (KUZYAKOV et al., 2019). Em troca, esses microrganismos desempenham papéis funcionais na regulação da aquisição de nutrientes pelas plantas, na resistência das plantas a estresse biótico e abiótico, bem como na promoção do crescimento e determinação da produtividade (LIU et al., 2017). Dentre esses microrganismos, estão as BPCV. A inoculação de plantas com essas bactérias é amplamente utilizada para aumentar o desenvolvimento e benefício da maioria das culturas (EGAMBERDIEVA et al., 2019) e, atualmente, desempenha um papel importante como estratégia para aliviar o estresse nas plantas (SERGAKI et al., 2018). Além disso, consórcios microbianos constituídos principalmente por bactérias têm sido utilizados para obter características desejáveis e que atuem por complementariedade (DANG e LOVELL, 2016).

A Batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma das culturas alimentícias mais importantes do mundo, mas seu cultivo é afetado por inúmeros agentes e fatores, incluindo pragas, doenças e altas exigências de fertilizantes que têm associado problemas ambientais, como contaminação dos solos (ALOO et al., 2020). O cultivo da batata tem sido um dos primeiros beneficiários dos avanços da biotecnologia convencional e moderna, o que resultou no uso frequente da técnica de cultivo *in vitro* nesta cultura para melhoramento genético (MOHAPATRA et al., 2017). Para produzir mudas e sementes de batata mais vigorosas e livres de doenças, a batata pode ser rapidamente micropropagada em larga escala pelo cultivo de meristemas e pontas de brotos, e pela proliferação por brotos axilares desenvolvidos a partir de estacas nodais cultivadas *in vitro* (LEMESSA et al., 2019).

A presença de microrganismos é frequentemente encontrada durante os ciclos de micropropagação *in vitro*. Estes microrganismos endofíticos proporcionam melhorias no crescimento das plantas e sua resistência ao estresse durante as diversas etapas da micropropagação, bem como na fase de aclimatização (KANANI et al., 2020). A biotização de plantas *in vitro* por BPCV é considerada uma condição estratégica para o estabelecimento de uma eficiente associação planta-bactéria (PANDEY et al. 2022) e um método confiável para melhorar o crescimento das plantas e seu potencial adaptativo ao ambiente *in vivo* (TKACHENKO et al., 2015; BEZERRA et al., 2020). Este método promove importantes alterações fisiológicas e bioquímicas que proporcionam tolerância a uma série de fatores de estresse bióticos e abióticos e se refletem em melhor aclimatização, aumento de crescimento e da produção.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV)

No final da década de 1970, Kloepper e colaboradores estabeleceram o termo rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR na sigla em inglês) para descrever *Pseudomonas* spp. isoladas da rizosfera que, após a inoculação de sementes, colonizavam as raízes das plantas rapidamente e aumentavam o rendimento das culturas (KLOEPPER e SCHROTH, 1978; KLOEPPER et al., 1980). Após esse estudo pioneiro, o conceito foi adotado e desenvolvido por diversos pesquisadores, de modo que o número de publicações associadas ao PGPR vem crescendo exponencialmente desde a década de 1990 (FINKEL et al., 2017). Mais recentemente, o conceito de PGPR foi estendido a qualquer bactéria ou qualquer microrganismo que apresente características promotoras do crescimento de plantas (MA Y, 2019).

O termo bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) tem sido cada vez mais utilizado para se referir a bactérias que estimulam o crescimento de plantas através de diferentes mecanismos, isoladamente ou em combinação (FUKAMI et al. 2016). De acordo com esta definição, os rizóbios, que têm sido estudados e utilizados em inoculantes comerciais há mais de um século, também são considerados BPCV (FAHDE et al., 2023). Sem dúvida, um dos grupos de microrganismos mais pesquisados e utilizados, além dos rizóbios, é o *Azospirillum*. Este grupo possui uma notável capacidade de beneficiar uma ampla variedade de espécies vegetais (FUKAMI et al., 2018). As BPCV podem ser classificadas com base em suas

atividades funcionais em: (1) biofertilizantes, quando as mesmas aumentam a disponibilidade de nutrientes às plantas; (2) fitoestimuladoras, quando promovem o crescimento das plantas, geralmente através da produção de fitohormônios; (3) rizoremediadoras, quando eliminam ou reduzem o nível de poluentes orgânicos degradantes do solo; e (4) efeito de biocontrole, quando controlam doenças, principalmente devido à produção de antibióticos e metabólitos antifúngicos (GAMEZ et al., 2019).

2.2 Endófitos bacterianos

Os endófitos foram originalmente descritos por Anton de Bary em 1866, referindo-se aos microrganismos que colonizam as folhas e caules internamente. Tais microrganismos podem ser encontrados desde as raízes até as estruturas aéreas das plantas, vivendo uma parte ou todo o seu ciclo de vida dentro de suas plantas hospedeiras sem causar danos ou doenças aparentes (LIU et al., 2017).

As raízes das plantas também são colonizadas internamente (endosfera radicular) por uma gama diversificada de endófitos bacterianos. A entrada de endófitos bacterianos nos tecidos radiculares ocorre frequentemente através de fissuras ou pontos de emergência de raízes laterais (MACHADO et al., 2021).

De acordo com Pinski (2019), as raízes são a via de entrada mais comum para endófitos bacterianos. Seu grupo de pesquisa descreveu cinco estágios da colonização endofítica: (1) quimiotaxia para exsudatos radiculares; (2) aderência ao rizoplano; (3) formação de biofilme; (4) penetração na superfície radicular; e (5) colonização interna. As rizodeposições constituídas por exsudatos, mucilagens e detritos celulares atraem as bactérias para a rizosfera, desempenhando, assim, um papel no primeiro estágio da colonização radicular endofítica (LAKSHMANAN et al., 2014). A colonização microbiana da rizosfera bem-sucedida, pode ser diretamente dependente da capacidade de utilizar os nutrientes secretados pela planta. Uma vez estabelecidas como parte da comunidade da rizosfera, as bactérias podem se tornar endófitas, entrando através de fissuras ou pontos de emergência na superfície da raiz (PINSKI et al., 2019).

Bactérias epífitas e bactérias endofíticas podem utilizar mecanismos semelhantes para promover o crescimento vegetal. A principal diferença é que as bactérias endofíticas não são expostas a mudanças descontroladas nas condições do solo, como variações no pH, temperatura e teor de água do solo, que podem dificultar a proliferação das bactérias na rizosfera e no solo circundante e que competem por sítios de ligação às superfícies radiculares (GLICK et al., 2012). Além disso, o uso de bactérias endofíticas poderia facilitar o crescimento das plantas na

agricultura, horticultura, silvicultura e a remoção de poluentes do meio ambiente, pois são mais persistentes na planta (SANTOYO et al., 2016).

2.3 Interação planta-microrganismos

Na natureza, as plantas vivem em um ambiente rico em microrganismos e devem interagir com alguns nocivos e outros benéficos (HACQUARD et al., 2017). Diferentes trabalhos revelaram os sinais microbianos que são reconhecidos pelos receptores imunológicos das plantas, desencadeando respostas de defesa ou simbióticas (CHENG et al., 2019; HWANG et al., 2017; PENG et al., 2018). Descobriu-se também que sistemas microbianos de secreção de proteínas carregam moléculas que afetam as funções das células vegetais. Além disso, foram identificados mecanismos de desenvolvimento tanto em microrganismos como em plantas, que coordenam a formação de órgãos especializados para a troca e produção de nutrientes durante interações simbióticas (como exemplo a formação de nódulos) e patogênicas (como exemplo a formação de galhas) (HACQUARD et al., 2016; DOLATABADIAN, 2020)

A interação planta-microrganismo é um sistema muito complexo que envolve a planta, o solo e as bactérias (SEGURA & RAMOS, 2013). A interação não afeta apenas a fisiologia da planta, mas também regula a fauna do solo, a taxa de respiração microbiana, a saúde do solo e a ciclagem de nutrientes (CHAPARRO et al., 2012). As plantas se comunicam com a comunidade microbiana do solo através de sinais químicos que constituem proteínas, ácidos graxos, flavonóides, açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos que criam um ambiente único para a sobrevivência dos microrganismos do solo (PURI et al., 2020).

2.4 Consórcios microbianos

Um consórcio bacteriano é geralmente composto por duas ou mais bactérias de espécies diferentes, compatíveis em uma interação sinérgica ou complementar. Em alguns casos, uma mistura de diferentes estirpes da mesma espécie pode apresentar atividades melhoradas e também ser considerada um consórcio (SANTOYO et al., 2021). Por outro lado, o sucesso e a eficiência dos consórcios bacterianos em condições de campo dependem do tipo e função das cepas utilizadas, onde alguns aspectos requerem atenção especial, incluindo a adaptação a condições climáticas adversas, sobrevivência e persistência no solo após a inoculação e condições muito diferentes daquelas de um ambiente controlado, como a casa de vegetação (GOSAL et al., 2017).

Nesta década, a investigação sobre a engenharia do microbioma vegetal e a criação de comunidades microbianas sintéticas (SynComs) com o objetivo de melhorar a produtividade e resiliência das culturas, tornou-se um tema de grande relevância (LIU et al., 2020; TRIVEDI et al., 2020). O consórcio pode combinar vários modos de ação, o que provavelmente proporciona uma melhor resposta ao estresse quando comparado ao uso de microrganismos individuais com suas capacidades específicas (POZO et al., 2021).

Shilev e colaboradores (2020) demonstraram que consórcios formados por isolados que produzem ácido indol-3-acético e solubilizam fosfatos inorgânicos foram mais eficientes em promover o crescimento de plantas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) do que cepas aplicadas individualmente. Da mesma forma, os membros de um consórcio podem facilitar o estabelecimento e a operação de cepas alvo através da cooperação sinérgica (SUN et al., 2022).

Os benefícios da interação entre consórcios diferentes podem ser observados, como no uso combinado de BPCV e fungos micorrízicos arbusculares (FMA), onde diferentes tipos de plantas conseguiram maior resistência ao estresse salino e melhor mineralização do fósforo orgânico em comparação com plantas inoculadas com qualquer um dos microrganismos individualmente (VORHOLT et al., 2017).

2.5 Papel das BPCV na mitigação do estresse abiótico

Os estresses abióticos como salinidade, seca, altas e baixas temperaturas, poluição pode inibir o desenvolvimento vegetal devido ao dano oxidativo dos radicais livres produzidos em suas células. Esses radicais atacam componentes celulares vitais, como o DNA e as membranas celulares (GLICK et al., 2015). As BPCV empregam diferentes mecanismos para influenciar o comportamento vegetal sob condições de estresse abiótico. Um desses mecanismos é a produção de substâncias que regulam o crescimento, como as auxinas (KIM et al., 2017). O ácido indolacético (AIA), que estimula a divisão celular tanto no caule como na raiz, ajuda a combater a perda de biomassa causada pelo retardamento do crescimento devido ao estresse abiótico (RIEMANN et al., 2015).

Um mecanismo de ação para aliviar o estresse nas plantas é desempenhado pela síntese da ACC-deaminase, que está relacionada à redução da ação inibitória do etileno (SINGH et al., 2022). A atividade desta enzima nas bactérias é capaz de reduzir a produção de etileno nas plantas através da metabolização do 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) (presente em exsudatos radiculares), convertendo-o em α -cetobutirato e amônio (MOON et al., 2022). Isto permite que o sistema radicular se desenvolva, promovendo uma maior absorção de

nutrientes e água (NASCIMENTO et al., 2016). As BPCV também podem promover o crescimento das plantas aumentando a giberelina, melhorando a germinação das sementes e o desenvolvimento de caules, folhas, flores e frutos. Além disso, a citocinina induzida pôr as bactérias resulta em aumento do desenvolvimento radicular, atividade do câmbio vascular, diferenciação celular e dominância apical (GOUDA et al., 2018; KHAN et al., 2020). Sob condições de estresse, os inoculantes de BPCV podem aumentar as concentrações de ácido abscísico, jasmonatos e brassinosteroides nas plantas. Em condições de seca, as citocininas aumentam o ácido abscísico, o que causa o fechamento dos estômatos para reduzir a perda de água foliar (ARORA et al., 2020).

2.6 Técnica de cultura de tecidos

O cultivo *in vitro* é uma técnica utilizada para a multiplicação de plantas no interior de tubos de ensaio ou em recipientes similares de vidro em condições assépticas (BIDABADI et al., 2020). A técnica apresenta vantagens importantes como: (1) propagar material livre de doenças; (2) tornar os métodos de propagação vegetativa tradicionais mais rápidos; (3) produzir material vegetal em pouco espaço e em larga escala, com qualidade e quantidade superiores aos métodos convencionais, e, conseqüentemente, com custos de produção reduzidos (ESPOSITO, 2017). A micropropagação permite, ainda, que um grande número de plantas, idênticas à planta mãe, seja obtido a partir de diferentes explantes num curto período de tempo e dentro de uma pequena área, produzindo mudas livres de doenças, independentemente da época e das condições ambientais (BRONDANI et al., 2012). Além disso, a técnica apresenta como vantagens o aumento da taxa de multiplicação de clones valiosos, ganhos ou seleção genética mais rápidas e maiores rendimentos nas plantações (NAVROVSKI et al., 2014). Também constitui um sistema modelo para estudos científicos básicos e é um instrumento sustentável para a conservação *ex situ* de espécies vegetais (SARASAN et al., 2006). Esta metodologia biotecnológica explora a totipotência natural das células vegetais, envolvendo uma ampla gama de técnicas em condições assépticas. Os meios nutricionais utilizados nessas metodologias são compostos por sais inorgânicos (macro e micronutrientes), sacarose, mioinositol e vitaminas conhecido como meio basal de Murashige e Skoog (MS) (Murashige e Skoog, 1962) e comumente são acrescentados com fitohormônios (auxinas, citocininas, giberelinas) que podem ser modificados de acordo a espécie vegetal (WENDLING et al., 2014; MONFORT et al., 2018).

2.7 Biotização e culturas de tecidos vegetais *in vitro*

Nos últimos anos, várias pesquisas têm se dedicado a estudar o estímulo do crescimento vegetal proporcionado por microrganismos. Isso tem levado a uma mudança na percepção das contaminações bacterianas na cultura de tecidos vegetais, despertando o interesse em investigar como os microrganismos endofíticos, sobretudo as bactérias, podem afetar o processo de micropropagação vegetal (LIM et al., 2018; 2023).

O termo biotização foi introduzido pela primeira vez pelo cientista Herman E.B (1996) em seu artigo sobre os benefícios de bactérias e fungos cocultivados com plantas durante a micropropagação. Após a colonização, foi demonstrado que esses microrganismos, especificamente bactérias, têm a capacidade de estabelecer uma relação simbiótica artificial com plantas cultivadas *in vitro* (BOTTA et al., 2013). Essa relação beneficia o processo de micropropagação ao modificar a fisiologia das plantas e aumentar a produção de metabólitos secundários (KRASOVA et al., 2022). Portanto, as bactérias inoculadas podem aumentar a disponibilidade de nutrientes e fitohormônios, ao mesmo tempo que reduzem os estresses bióticos e abióticos enfrentados pelo material de cultura de tecidos vegetais *in vitro* (SOUMARE et al., 2021).

Os microrganismos utilizados na biotização podem aumentar a capacidade da planta de tolerar vários estresses ambientais, como seca, salinidade e temperaturas extremas. A permanência de microrganismos benéficos no tecido vegetal garante a disponibilidade de hormônios, enzimas e outros compostos relacionados ao estresse que ajudam as plantas a lidar com condições adversas (PAPIK et al., 2020) Isto é particularmente importante ante às mudanças climáticas e aos crescentes desafios ambientais (KHARE et al., 2018).

2.8 Aspectos importantes da cultura de batata (*Solanum tuberosum* L)

A batata é cultivada mundialmente como fonte de carboidratos (SINGH et al., 2019). A relação custo-benefício da produção de semente de batata (tubérculos) e a qualidade da semente, dependem diretamente da eficácia dos métodos utilizados para obtenção de tubérculos, como semente básica (BUCKSETH et al., 2016). A batata tem um alto teor de aminoácidos essenciais e carboidratos e é uma importante fonte de vitamina C e minerais, principalmente ferro, zinco, potássio e magnésio é um componente principal da dieta de muitas pessoas ao redor do mundo. Também fornecem fibra dietética (através da casca da batata), carotenóides, flavonóides, compostos fenólicos (JONES, 1994; HAVERKORT et al., 2013; ŠEVČÍKOVÁ et al., 2017).

A fotossíntese e o status de carboidratos relacionados, juntamente com o equilíbrio dos fitohormônios, pertencem aos fatores essenciais na regulação do desenvolvimento das plantas de batata, incluindo a formação de tubérculos (BASERA et al., 2018)

A batata, por sua adaptabilidade, sua capacidade produtiva e sua contribuição nutricional e como componente de sistemas diversificados de cultivo, tem uma longa história de ajudar a aliviar a insegurança alimentar e contribuir para melhorar a renda familiar em tempos de crise e expansão populacional atual (ANDRIVON, 2017). Existem controvérsias sobre a origem da batata. Entretanto, há fortes evidências que seja nativa de duas áreas da América do Sul, onde biótipos silvestres ainda existem: uma que envolve as terras altas da Cordilheira dos Andes, que vão do Peru ao Norte da Argentina, e outra que envolve as terras baixas do Centro-sul do Chile (SCOTT et al 2011).

3. REFERÊNCIAS

- ARORA, N. K., FATIMA, T., MISHRA, I., & VERMA, S. (2020). **Microbe-based inoculants: role in next green revolution**. Environmental Concerns and Sustainable Development: Volume 2: Biodiversity, Soil and Waste Management, 191-246.
- ALOO, B.N., MBEGA, E.R. & MAKUMBA, B.A. (2020). **Rhizobacteria-Based Technology for Sustainable Cropping of Potato (*Solanum tuberosum* L.)**. Potato Res. 63, 157–177. <https://doi.org/10.1007/s11540-019-09432-1>
- BASERA, M., CHANDRA, A., KUMAR, V. A., & KUMAR, A. (2018). **Effect of brassinosteroids on *in vitro* proliferation and vegetative growth of potato**. Pharma Innov, 7, 4-9.
- BIDABADI, S. S., and JAIN, S. M. (2020). **Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration**. Plan. Theory 9:702. doi: 10.3390/plants9060702
- BOTTA, A. L., SANTACECILIA, A., ERCOLE, C., CACCHIO, P., DEL GALLO, M. (2013). ***In vitro* and *in vivo* inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum***. N Biotechnol. 30, 666–674. doi: 10.1016/j.nbt.2013.01.001
- BRAJESH K SINGH, PANKAJ TRIVEDI, SAURABH SINGH, CATRIONA A MACDONALD and JAY PRAKASH VERMA. (2018). **Emerging microbiome technologies for sustainable increase in farm productivity and environmental security**. Microbiology Australia 39(1) 17-23 <https://doi.org/10.1071/MA18006>
- CHENG YT, ZHANG L, HE SY. **Plant-Microbe Interactions Facing Environmental Challenge**. Cell Host Microbe. 2019 Aug 14;26(2):183-192. doi: 10.1016/j.chom.2019.07.009. PMID: 31415751; PMCID: PMC6697056.
- DANG, H., & LOVELL, C. R. (2016). **Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments**. Microbiology and molecular biology reviews, 80(1), 91-138.
- DOLATABADIAN A. **Plant-Microbe Interaction**. Biology (Basel). 2020 Dec 30;10(1):15. doi: 10.3390/biology10010015..
- EGAMBERDIEVA, D., WIRTH, S., BELLINGRATH-KIMURA, S. D., MISHRA, J., and ARORA, N. K. (2019). **Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils**. Front. Microbiol. 10:2791.
- FAHDE, SARA, SAID BOUGHRIBIL, BADREDDINE SIJILMASSI, and AHMED AMRI. 2023. **"Rhizobia: A Promising Source of Plant Growth-Promoting Molecules and Their Non-Legume Interactions: Examining Applications and Mechanisms"** Agriculture 13, no. 7: 1279. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071279>
- FUKAMI J, NOGUEIRA MA, ARAUJO RS, HUNGRIA M (2016) **Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense***. AMB Express 6:1. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>

FUKAMI, J., CERZINI, P. & HUNGRIA, M. ***Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation.** AMB Expr 8, 73 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>

GLICK, B.R. **Introduction to Plant Growth-Promoting Bacteria.** In **Beneficial Plant-Bacterial Interactions**; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 1–28.

GOUDA, S., KERRY, R. G., DAS, G., PARAMITHIOTIS, S., SHIN, H. S., & PATRA, J. K. (2018). **Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture.** Microbiological research, 206, 131-140.

GOSAL, S.K.; KAUR, J. **Microbial Inoculants: A Novel Approach for Better Plant Microbiome Interactions.** In **Probiotics in Agroecosystem**; Springer: Singapore, 2017; pp. 269–289. ISBN 9789811040597.

HACQUARD S, KRACHER B, HIRUMA K, MUNCH PC, GARRIDO-OTER R, THON MR, WEIMANN A, DAMM U, DALLERY J-F, HAINAUT M, et al. (2016). **Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi.** Nat. Commun 7, 11362.

HACQUARD S, SPAEPEN S, GARRIDO-OTER R, and SCHULZE-LEFERT P (2017). **Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota.** Annu. Rev. Phytopathol 55, 565–589.

HERMAN, E. B. **Beneficial effects of bacteria and fungi on plant tissue cultures.** Agricell Rep. 27:26-27; 1996a.

HWANG H-H, YU M, and LAI E-M (2017). **Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications.** Arab. B 15, e0186.

JONES, M. G. K. (1994). ***In vitro* culture of potato.** In **Plant cell and tissue culture** (pp. 363-378). Dordrecht: Springer Netherlands.

KANANI, P., MODI, A., & KUMAR, A. (2020). **Biotization of endophytes in micropropagation: A helpful enemy.** In **Microbial Endophytes** (pp. 357-379). Woodhead Publishing.

KHARE, E., MISHRA, J., and ARORA, N. K. (2018). **Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects.** Front. Microbiol. 9, 2732. doi: 10.3389/fmicb.2018.02732

KHAN, N., BANO, A., ALI, S., & BABAR, M. A. (2020). **Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses.** Plant Growth Regulation, 90, 189-203.

KIM, A. Y., SHAHZAD, R., KANG, S. M., SEO, C. W., PARK, Y. G., PARK, H. J., & LEE, I. J. (2017). **IAA-producing *Klebsiella variicola* AY13 reprograms soybean growth during flooding stress.** Journal of crop science and biotechnology, 20, 235-242.

KRASOVA, Y. V., TKACHENKO, O. V., SIGIDA, E. N., LOBACHEV, Y. V., BURYGIN, G. L. (2022). **Lipopolysaccharide and flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7 influence**

callus morphogenesis and plant regeneration in wheat. World J. Microbiol. Biotechnol. 38, 62. doi: 10.1007/s11274-022-03247-y

KUZYAKOV Y, RAZAVI B.S. 2019. **Rhizosphere size and shape: temporal dynamics and spatial stationarity.** Soil Biol Biochem. 135: 343– 60.

LEMESSA S. D., WATEBAJI M. D., YISMAW M. A., YILDIZ F. 2019. **Climate change adaptation strategies in response to food insecurity: the paradox of improved potato varieties adoption in eastern Ethiopia.** Cogent Food & Agriculture, 5(1) doi: 10.1080/23311932.2019.1640835.1640835

LIM, S. L., SUBRAMANIAM, S., BASET MIA, M. A., RAHMAH, A. R. S., & GHAZALI, A. H. A. (2023). **Biotization of *in vitro* oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and its plant-microbe interactions.** Frontiers in Plant Science, 14, 1150309.

LIM, S.-L., SUBRAMANIAM, S., ZAMZURI, I., AMIR, H. G. (2018b). **Growth and biochemical profiling of artificially associated micropropagated oil palm plantlets with *Herbaspirillum seropedicae*.** J. Plant Interact. 13, 173–181. doi: 10.1080/17429145.2018.1451564

LIU H, CARVALHAIS LC, CRAWFORD M, SINGH E, DENNIS PG, PIETERSE CM, et al.2017. **Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria.** Front Microbiol ;8:2552.

LIU, H., BRETTELL, L. E., QIU, Z., AND SINGH, B. K. (2020). **Microbiome-mediated stress resistance in plants.** Trends Plant Sci. 25, 733–743. doi: 10.1016/j.tplants.2020.03.014

MOHAPATRA P. P., BATRA V. K. **Tissue culture of potato (*Solanum tuberosum* L.): a review.** International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2017;6(4):489–495. doi: 10.20546/ijcmas.2017.604.058.

MONFORT, L. E. F., BERTOLUCCI, S. K. V., LIMA, A. F., DE CARVALHO, A. A., MOHAMMED, A., BLANK, A. F., & PINTO, J. E. B. P. (2018). **Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*.** Industrial Crops and Products, 116, 231-239.

MOON, Y. S., & ALI, S. (2022). **Possible mechanisms for the equilibrium of ACC and role of ACC deaminase-producing bacteria.** Applied Microbiology and Biotechnology, 106(3), 877-887.

NASCIMENTO, F. X., ROSSI, M. J., & GLICK, B. R. (2016). **Role of ACC deaminase in stress control of leguminous plants. Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes,** 179-192.

PANDEY, S. S., JAIN, R., BHARDWAJ, P., THAKUR, A., KUMARI, M., BHUSHAN, S., & KUMAR, S. (2022). **Plant Probiotics–Endophytes pivotal to plant health.** Microbiological Research, 127148.

PAPIK, J., FOLKMANOVA, M., POLIVKOVA-MAJOROVA, M., SUMAN, J., and UHLIK, O. (2020). **The invisible life inside plants: deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity.** Biotechnol. Adv. 44, 107614. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107614

- PENG Y, VAN WERSCH R, and ZHANG Y (2018). **Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity**. *Mol. Plant. Microbe. Interact* 31, 403–409.
- POZO, M. J., ZABALGOGEAZCOA, I., VAZQUEZ, DE ALDANA, B. R., AND MARTINEZ-MEDINA, A. (2021). **Untapping the potential of plant mycobiomes for applications in agriculture**. *Curr. Opin. Plant Biol.* 60:102034. doi: 10.1016/j.pbi.2021.102034
- RIEMANN, M., DHAKAREY, R., HAZMAN, M., MIRO, B., KOHLI, A., & NICK, P.(2015). **Exploring jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses**. *Frontiers in Plant Science*, 6, artículo 1077. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01077>
- SANTOYO, G., GUZMÁN-GUZMÁN, P., PARRA-COTA, F. I., SANTOS-VILLALOBOS, S. D. L., OROZCO-MOSQUEDA, M. D. C., & GLICK, B. R. (2021). **Plant growth stimulation by microbial consortia**. *Agronomy*, 11(2), 219.
- SEGURA, A., & RAMOS, J. L. (2013). **Plant–bacteria interactions in the removal of pollutants**. *Current opinion in biotechnology*, 24(3), 467-473.
- SERGAKI, C., LAGUNAS, B., LIDBURY, I., GIFFORD, M. L. & SCHÄFER, P (2018) **Challenges and approaches in microbiome research: from fundamental to applied**. *Front. Plant Sci.* 9, 1205.
- ŠEVČÍKOVÁ, H., MAŠKOVÁ, P., TARKOWSKÁ, D., MAŠEK, T., & LIPAVSKÁ, H. (2017). **Carbohydrates and gibberellins relationship in potato tuberization**. *Journal of plant physiology*, 214, 53-63.
- SHILEV, S., BABRIKOVA, I., & BABRIKOV, T. (2020). **Consortium of plant growth-promoting bacteria improves spinach (*Spinacea oleracea* L.) growth under heavy metal stress conditions**. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(4), 932-939.
- SINGH, P., & SINGH, K. (2019). **Role of micronutrients in potato cultivation**. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4S), 128-130.
- SINGH, R. P., MA, Y., & SHADAN, A. (2022). **Perspective of ACC-deaminase producing bacteria in stress agriculture**. *Journal of Biotechnology*, 352, 36-46.
- SOUMARE, A., DIÉDHIOU, A. G., ARORA, N. K., TAWFEEQ AL-ANI, L. K., NGOM, M., FALL, S. & SY, M. O. (2021). **Potential role and utilization of plant growth promoting microbes in plant tissue culture**. *Frontiers in Microbiology*, 12, 649878.
- SUN, X., XU, Z., XIE, J., HESSELBERG-THOMSEN, V., TAN, T., ZHENG, D. & KOVÁCS, Á. T. (2022). ***Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions**. *The ISME journal*, 16(3), 774-787.
- TRIVEDI, P., LEACH, J. E., TRINGE, S. G., SA, T., and SINGH, B. K. (2020). **Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health**. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 607–621. doi: 10.1038/s41579-020-0412-1

VAN BRUGGEN AH, GOSS EM, HAVELAAR A, VAN DIEPENINGEN AD, FINCKH MR, MORRIS, JR., JG. 2019. **One Health - cycling of diverse microbial communities as a connecting force for soil, plant, animal, human and ecosystem health.** *Sci Total Environ.* 664:927–37.

VORHOLT, J. A., VOGEL, C., CARLSTRÖM, C. I., & MÜLLER, D. B. (2017). **Establishing causality: opportunities of synthetic communities for plant microbiome research.** *Cell host & microbe*, 22(2), 142-155.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTICLE 1. The inoculation of *Azospirillum brasilense* *in vitro* and *in vivo* benefit the biotization, survival and production of potato (*Solanum tuberosum* L.)

Manuscrito submetido na revista Rhizosphere

Yulimar Castro Molina^{1,2}, Joyce Dória Rodrigues³, Ana Milena Gómez Sepúlveda¹, Luna Queiroz Carvalho³, Moacir Pasqual³, Ederson da Conceição Jesus^{4*}

¹Biology Department, Federal University of Lavras, Lavras 37200-000, MG, Brazil

²Biology Department, University of the Andes, 5101, Mérida, Venezuela

³Agriculture Department, Federal University of Lavras, Lavras 37200-000, MG, Brazil

⁴Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR-465, Km 7, Seropédica 23897-970, RJ, Brazil

E-mails:

yulimarcastromolina@gmail.com,

joyce.doria@ufla.br,

ana.gomez1490@gmail.com,

luna.carvalho@estudante.ufla.br

mpasqual@ufla.br,

ederson.jesus@embrapa.br

Abstract

Bacterial inocula can improve seedling production in potato micropropagation by stimulating plant growth and adaptation to *in vivo* conditions. In this work, 9 bacterial strains were tested for hormone production, ACC deaminase activity, and their influence on plant development and tuber yield of two potato cultivars under *in vitro* and *in vivo* conditions. Our results show that bacterial biotization significantly promoted seedling growth *in vitro* and *in vivo*, enhancing

seedling adaptive capacity and tuber yield. The survival rate of biotized seedlings was 1.3 times higher than that of control seedlings. In addition, biotization with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 and *Rhizobium tropici* CIAT 899 strains significantly stimulated at least one growth parameter in both cultivars and under *in vitro* and *in vivo* conditions. Although, *A. brasilense* Ab-V5 benefited both cultivars consistently in the different stages of potato production, in addition, plants responded better when they were re-inoculated, recording an average gain of 1.2 and 1.3 times in stem and root length, and of 1.1 times for total dry biomass, in addition, I had a significant increase of 1.9 times in the number of tubers compared to the control. Overall, bacterial biotization induced strain-dependent effects on the growth of the two potato cultivars. We find that biotization with *A. brasilense* Ab-V5 not only improves the quality of potato planting material produced *in vitro*, but also benefits the plant's performance and survivability under *in vivo* conditions, thus increasing the number and weight of tubers.

Keywords:

Metabolic screening; Hormones; ACCd activity; Acclimatization; Plant–microorganism interaction

1. Introduction

Micropropagation has great commercial potential due to the rate of propagation and the ability to produce vigorous disease-free plants (Castro-Restrepo et al., 2022). Generally, the micropropagation technique is performed under entirely aseptic conditions: during the establishment of *in vitro* cultures, the explant is superficially sterilized to eliminate all microorganisms (Liang et al., 2019). Therefore, when it comes to plant tissue culture, bacteria have often been described as contaminants (El-Banna et al., 2021; Romadanova et al., 2022).

However, due to the current knowledge about the performance of endophytic microorganisms and associative bacteria in promoting growth and inducing stress tolerance,

there has been an increasing interest in their use in some of the steps of micropropagation, which is known as "Biotization" (Soumare et al., 2021). This term was first introduced by Herman (1996) in his article on the benefits of bacteria and fungi co-cultured with plants during micropropagation. The idea of biotization began with the study conducted by Herman (1987) on potato (*Solanum tuberosum* L), where he observed that contamination in potato micropropagation actually increased seedling growth (Kanani et al., 2020).

Bacteria that interact positively and benefit the plant are known as plant growth-promoting bacteria (PGPB) (Tkachenko et al., 2015; 2021). Many PGPB can synthesize phytohormones and other organic compounds that improve plant growth and productivity (Maggini et al., 2019). PGPB appear to have a beneficial effect when they are introduced into the *in vitro* culture system, increasing plant multiplication, shoot elongation, and rooting rates, as well as improving the effectiveness of micropropagation through success at the acclimatization stage (Kanani et al., 2020; Somaure et al., 2021). According to Sousa et al. (2022), the effect of bacterial indole-3-acetic acid (IAA) from the strain identified as N39, isolated from the rhizospheric soil of *Axonopus catharinensis* Valls, favored the *in vitro* rhizogenesis and acclimatization stages in apple tree rootstock 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*), resulting in rooted seedlings of high quality. In addition to the production of auxins such as IAA, PGPB also produce other compounds such as gibberellic acid (GA) and salicylic acid (SA), considered an important mechanism that stimulates plant growth and productivity (Arkhipova et al., 2020). Likewise, explants growing under controlled and very sensitive environmental conditions are more likely to be impaired and therefore need to be strengthened before facing *in vivo* conditions (Kanani et al., 2020). To this end, the enzyme ACC deaminase (ACCd) that converts the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) into ammonium and α -ketobutyrate and is produced by PGPB protects plants from excessive ethylene concentrations by decreasing abiotic stress (Ozimek et al., 2018).

Research on PGPB has been increasing, and several *in vitro* and *in vivo* experiments have been conducted on different crops (Orlikowska et al., 2017). Potato (*Solanum tuberosum* L.), considered the world's third most important food crop after rice and wheat (Trdan et al., 2019), is one of these crops. It is a crop with high fertilizer demand for optimal yield (Naqqash et al., 2016). Several initiatives have been established to promote efficient potato production, including searching for tolerant genotypes and increasing micropropagation efficiency (Kanani et al., 2020). Bacteria of the genus *Azospirillum*, *Bacillus*, and *Bradyrhizobium* are models in studies of beneficial plant-microorganism interactions and can stimulate the growth of potato seedlings inoculated *in vitro* (Quambusch and Winkelmann., 2018). Kargapolova et al. (2020) demonstrated the efficacy of inoculation with *Ochrobactrum citisi* in potato micro plants, where a 50% increase in the mitotic index of root meristem cells and a 34% increase in aerial part length were reported under *in vivo* conditions.

Therefore, this study aimed to evaluate the capacity and growth promotion efficacy of nine bacterial strains on *in vitro* and *in vivo* plants of two potato cultivars. We tested the hypothesis that they possess multiple PGPB characteristics and can be used as biostimulants in tissue culture through the biotization technique.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

The strains used in this study are listed in Table 1. All strains were provided by the Agricultural Microbiology culture collection of the Federal University of Lavras (CCMA-UFLA) and the Johanna Döbereiner Biological Resource Center, Embrapa Agrobiologia, Brazil (CCBD). The bacteria were preserved in nutrient broth (peptone 5 g L⁻¹, yeast extract 3 g L⁻¹, and sodium chloride 5 g L⁻¹) with glycerol 40 % in the freezer (4°C).

For inoculum preparation, the strains were cultured for 48 hours at 25 °C in 7 mL of nutrient broth at 120 rpm. Subsequently, the cells were centrifuged at 530 g for 10 min and washed twice with 1 mL of sterile distilled water. Finally, the cell pellets were resuspended in 10 mL of sterile distilled water, and the concentration of the suspension was adjusted to 1.5×10^8 CFU mL⁻¹ (according to the 0.5 tube of the McFarland scale).

Table 1

The bacterial strains used in the experiments.

Strain	Species	Geographic origin
BR 935	<i>Rhizobium leucanae</i>	Cipó-BA, Brazil
Ab-V6 (= CNPS02084)	<i>Azospirillum brasilense</i>	Curitiba-PR, Brazil
Ab-V5 (= CCMA1291)	<i>Azospirillum brasilense</i>	Curitiba-PR, Brazil
CCMA0088	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Arcos-MG, Brazil
CCMA0122	<i>Sinorhizobium fredii</i>	Luminárias-MG, Brazil
CIAT899	<i>Rhizobium tropici</i>	Colombia
CCMA0401	<i>Bacillus subtilis</i>	Alto Garças-MT, Brazil
CCMA0004	<i>Bacillus megaterium</i>	Confresa-MT, Brazil
CCMA0112	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Luminárias-MG, Brazil

2.2. Biochemical characterization of bacteria

The analyses of auxin production, gibberellins, salicylic acid, and ACC deaminase activity were performed using as inoculum the bacterial strains initially grown in nutrient broth at 25 °C for 48 h.

2.2.1. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis

The production of IAA acid was evaluated by Salkowski's technique, according to Blanco and Castro (2021). The bacterial inocula were prepared as described previously. One hundred microliters of each inoculum was added to 7 mL of trypticase soy broth (TSB) supplemented with 0.5 mg/mL L-tryptophan (L-tryptophan; Sigma - Aldrich). Each treatment was performed in triplicate and kept at 25 °C with shaking at 120 rpm on an orbital shaker for nine days. Controls consisted of tubes with TSB medium with tryptophan and without bacteria.

Measurements were made at 3, 4, 5, 6, and 9 days after inoculation. A pink-to-red coloration was considered positive for IAA production. Subsequently, absorbances were read at 530 nm on a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific™ Multiskan™). The concentrations of synthesized IAA were calculated by interpolating the absorbance results from a standard curve with commercial IAA (BIOCHEM) in the range of 10-200 mg mL⁻¹.

2.2.2. Gibberellic acid (GA₃) biosynthesis

Quantification of GA₃ was performed by the DNPH (2,4 - Dinitrophenylhydrazine) method (Graham and Thomas., 1961) modified by Sagar (2017). The strains were grown in falcon tubes with 10 mL of nutrient broth for 48 hours at 25 °C and shaking at 120 rpm for six days. Samples were centrifuged at 530 g for 10 min and GA₃ quantification was performed in the supernatant at 2, 4, and 6 days after inoculation. Absorbances were read at 430 nm on a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific™ Multiskan™). GA₃ concentration was calculated from the regression equation of the standard curve of pure gibberellic acid (Sigma) prepared from 10 to 100 mg dissolved in absolute alcohol and expressed in µg mL⁻¹.

2.2.3. Quantification of bacterial salicylic acid (SA)

In vitro screening to determine SA-producing strains was performed following the protocol of De Meyer (1997) modified by Islam (2019). The strains were grown in 5 mL of Tris-HCl buffered casamino acid medium (100 mM Tris-HCl; pH 7.5) (0.25 g MgSO₄ .7 H₂O; 0.9 g K₂HPO₄ and 5 g casamino acids in one liter of H₂O) and incubated at 25 °C with shaking at 120 rpm for 72 hours. Subsequently, the cells were centrifuged at 400 g for 15 min, and the pH of the culture supernatants was adjusted to 2.0 – 2.5 using 1N HCl. Then, SA was extracted from the supernatant with trichloromethane (CHCl₃) in a 3:1 ratio (v/v) (culture supernatant:3; CHCl₃:1) and shaken vigorously. For the quantitative study, a volume of 2.5 mM FeCl₃ was added to CHCl₃. Consequently, the purple Fe-SA complex developed in the aqueous phase, and the absorbance was measured at 520 nm in a microplate spectrophotometer (Thermo

Scientific™ Multiskan™). SA levels were quantified by comparing the corresponding values with the standard curve created using different commercial SA concentrations (250, 125, 62.5, and 31.25 g mL⁻¹).

2.2.4. ACC deaminase Activity (ACCd)

ACCd activity was assayed according to the method of Penrose & Glick (2003), which measures the amount of product α -ketobutyrate released after ACC hydrolysis. An aliquot of 250 μ l of the bacterial suspension was transferred to tubes with DF minimum salt medium (Dworkin & Foster, 1958) supplemented with five mM ACC and incubated at 26 °C for 48 hours in orbital shaking at 120 rpm. All strains were assayed in triplicate. ACCd activity was measured at 96, 120, 144, and 168 hours after inoculation. In each measurement, 500 μ l of cell culture were taken and transferred to a sterile microcentrifuge tube, then centrifuged at 530 g for 20 minutes. The cell pellets obtained were resuspended in 100 μ l of 0.1 M Tris- HCl pH 8.5. Subsequently, three microliters of toluene was added to the cell suspension and shaken vigorously. A 100 μ l aliquot of "toluenized cells" was preserved in a freezer for protein quantification.

Next, 10 μ l of 0.5 M ACC and 100 μ l of 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.5 were added. The mixture was stirred briefly and incubated at 30°C for 30 min. Subsequently, 690 μ l of 0.56 N HCl and 150 μ l of 2,4-dinitrophenylhydrazine (0.2% 2,4-dinitrophenylhydrazine in 2N HCl) were added, and the samples were incubated at 30°C for 30 min. After the incubation, 1 ml of NaOH (2N) was added to each sample, and the positive strains developed a coffee color. Finally, a volume of 300 μ l was transferred to a microplate. The absorbances were read on a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific™ Multiskan™) in terms of α -ketobutyrate production at 540 nm compared with the standard curve of α -ketobutyrate, which ranged from 0.1 to 20 μ mol (Mamoru and Shimomura, 1978). Next, the total protein concentration of the toluenized bacterial cells was estimated using bovine serum albumin (BSA) to create the protein

calibration curve (Bradford, 1976). One unit of ACC deaminase activity was expressed as the amount of α -ketobutyrate released in μmol per milligram of cell protein per hour.

3. Plant material, inoculation, and *in vitro* growth conditions

The experiment was conducted in the Tissue Culture Laboratory, Department of Agriculture, Federal University of Lavras (UFLA). The plant material was provided by the Genetics and Phytopathology Laboratories of UFLA. To establish *in vitro* cultures, nodal segments of potato cultivars Duvira and Ágata were used as explants. The size of the nodal segments was standardized at 2 cm length with one leaf and one lateral bud and were placed in test tubes containing 15 mL of Murashige-Skoog nutrient medium (Murashige et al., 1962) free of hormones and added with 20 g L⁻¹ of sucrose and 6 g L⁻¹ of agar. The pH of the medium was adjusted to 5.8. The tubes were then transferred to a rack and kept in a growth room for seven days at a temperature of 25 °C, a 16-hour photoperiod, and a light intensity of about 40 $\mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Immediately after this time, the explants of each cultivar were inoculated with different bacteria. For inoculation, a volume of 0.1 mL of the resulting bacterial suspension (10⁸ cells mL⁻¹) was added to the test tubes to obtain a final bacterial concentration of 10⁷ cells mL⁻¹. Subsequently, the tubes were sealed with plastic film and placed in the growth room under the same conditions for 23 days. An entirely randomized design was established with ten treatments (the nine strains and the control treatment, without inoculation) and four replicates. Each treatment consisted of 24 seedlings (six per replicate) for Duvira and Ágata.

At the end of this period, eight micro plants of each treatment and each cultivar were removed from the tubes. The root system was washed to remove residues from the medium and dried with paper towels, and the following morphometric variables were evaluated: leaf fresh mass, root fresh mass, leaf dry mass, root dry mass, number of nodes, root length, and shoot length.

3.1. Acclimatization and re-inoculation of potato seedlings cv Duvira and cv Ágata in a greenhouse.

For *in vivo* adaptation, treatments with 30 days of *in vitro* growth were transferred to plastic cups with a commercial substrate and were taken to the greenhouse at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ during the day and $16 \pm 2^\circ\text{C}$ at night. The substrate was sterilized for three consecutive days for one hour prior to the transfer. A polypropylene bag with holes was placed in each pot to provide a humid chamber and avoid dehydration by changing the substrate and environment. The bag was removed for 2 hours daily for two days. Next, one group of plants (eight seedlings per treatment, for both cv Duvira and cv Ágata) were re-inoculated with three milliliters of bacterial inoculum seven days after transplanting. The remaining group of seedlings was maintained with a single inoculation.

The plants were watered daily by automatic irrigation and fertilized once a week with 10 mL of a half strength Hoagland solution (Hoagland and Arnon, 1950) as Jarstfer and Sylvia (1992) reported. The survival rate and morphometric variables of the seedlings were again recorded after 25 days, including tuber production, to determine the performance of the seedlings during the acclimatization and re-inoculation process.

All statistical analyses were performed using the INFOSFAT software. Data were analyzed by applying analysis of variance (ANOVA) with Tukey's test at a significance level of $p < 0.05$. The Shapiro-Wilk test was applied to verify the normal distribution of the data. Values of morphometric variables were reported as mean values \pm standard error ($n = 8$).

4. Results

4.1. Biosynthesis of Indol-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA₃), and salicylic acid (SA) in PGPB

All bacteria were able to synthesize at least one phytohormone. In the case of IAA production, which is the main auxin in plants and an important indicator of plant growth

promotion, the results show the formation of two major groups of auxin-producing bacteria (Fig.1A). One group was formed by the strains *B. japonicum* CCMA0088, *A. brasilense* Ab-V5, Ab-V6, and *S. fredii* CCMA0122; the other was formed by bacteria of the genus *Bacillus* and *Rhizobium*. The highest IAA concentration was reached between the fifth and sixth day of incubation for most of the strains evaluated, with a concentration of $54.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *B. japonicum* strain CCMA0088, followed by strains Ab-V5 and Ab-V6, with respective concentrations of 48.3 and $46.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of IAA. The other strains had an IAA production between 17.8 and $9.9 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Regarding GA_3 production, the nine strains were markedly divided into three groups (Fig.1B). The first group was formed by the *A. brasilense* Ab-V5 and Ab-V6, which synthesized the highest GA_3 concentrations (13 and $10.02 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). A second group was formed by the three strains of the genus *Bacillus*, *R. tropici* CIAT 899, and *B. japonicum* CCMA0088, with values between 5.09 and $2.08 \mu\text{g mL}^{-1}$. Finally, the third group was formed by the control and the *S. fredii* CCMA0122. All strains synthesized the highest GA_3 amounts of after 96 hr of incubation.

As for the production of salicylic acid (SA), bacteria of the genus *Azospirillum*, *Bacillus*, and the *R. tropici* strain were identified as the most outstanding producers on the sixth day of incubation. *A. brasilense* Ab-V5 produced $9.8 \mu\text{g mL}^{-1}$, followed by *B. megaterium* with $9.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ of SA. *B. japonicum* CCMA0088 and *R. leucaneae* BR935 produced the lowest SA amounts (1.3 and $1.72 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectively (Fig. 1C).

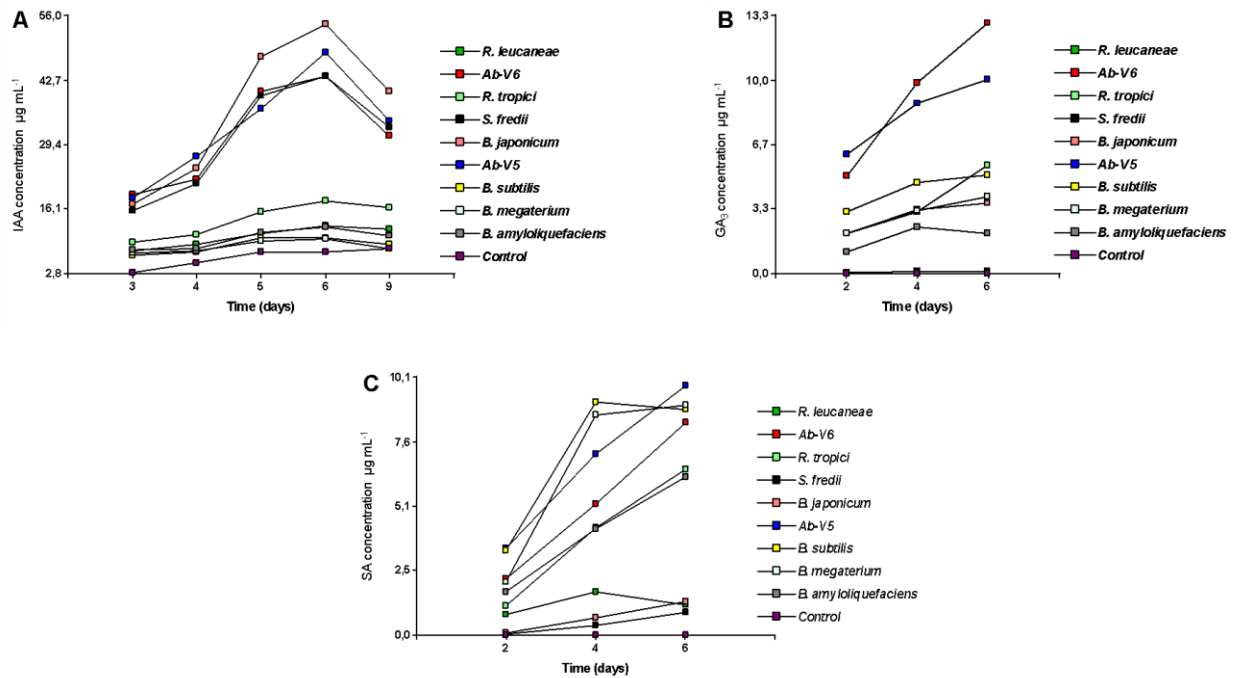


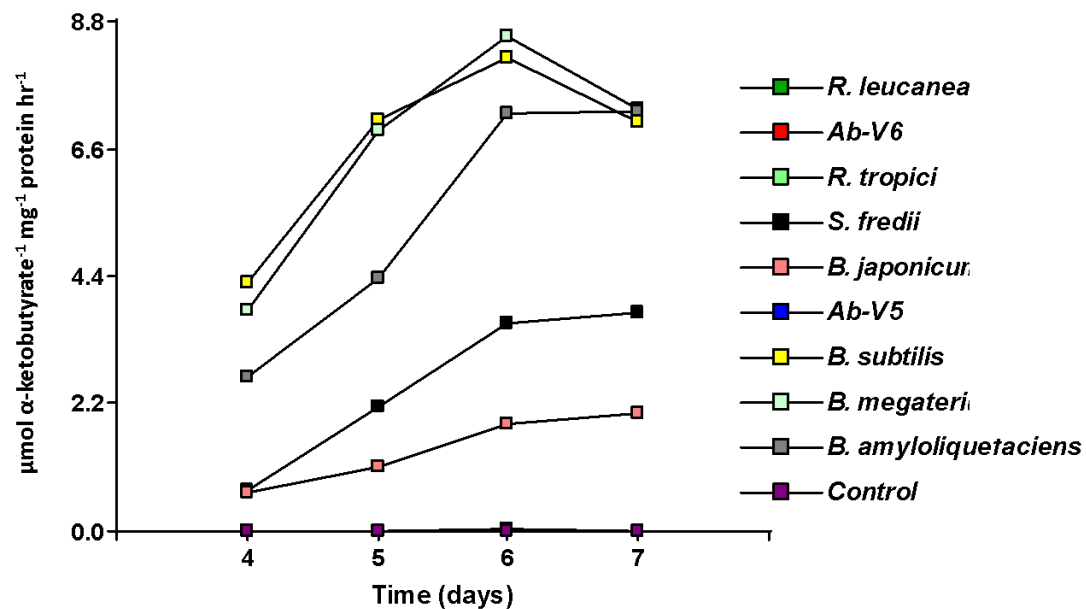
Fig. 1. Quantitative determination of phytohormone biosynthesis in PGPB expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$. (A) IAA production at 3, 4, 5, 6, and 9 days of incubation in medium supplemented with 0.5 mg mL⁻¹ L-Tryptophan; (B) GA₃ production at 2, 4, and 6 days of incubation; and (C) SA production at 2, 4 and 6 days of incubation.

4.2. Determination of ACC deaminase activity (ACCd) in PGPB

ACC deaminase activity was observed in five of the nine evaluated strains, in the range of 8.51 - 2.04 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate per mg cell protein per hour}$, between the sixth and seventh day of incubation (Fig. 2). The highest ACC deaminase activities were exhibited by *B. megaterium* CCMA0004 (8.51 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein hr}^{-1}$) followed by *B. subtilis* CCMA0401 (8.12 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein hr}^{-1}$), and *B. amyloliquefaciens* CCMA0112 (7.16 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein hr}^{-1}$). ACC deaminase activity also increased with incubation time. It increased 1.6, 1.2, and 1.1-fold after 24 h in cultures of *B. amyloliquefaciens* CCMA0112, *B. megaterium* CCMA0004, and *B. subtilis* CCMA0401,

respectively. *S. fredii* CCMA 0122 and *B. japonicum* CCMA0088 produced the highest amounts on the sixth day, with 3.75 and 2.04 $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein hr}^{-1}$, respectively. No ACC deaminase activity was detected in *A. brasilense* Ab-V5 and Ab-V6. Regarding *R. tropici* CIAT 899, Ormeño et al. (2012) demonstrated the presence of the *acdS* gene in the genome of the strain; however, *R. tropici* CIAT 899 did not show ACC deaminase activity by the colorimetric method used in this work.

Fig. 2. Quantitative determination of ACCd activity in PGPB, expressed in terms of concentration of $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein hr}^{-1}$ after seven days of incubation.



5. Effect of biotization on growth parameters of potato cv Duvira and cv Ágata propagated *in vitro*

The response to inoculation differed between the two potato cultivars. Two bacteria, *Azospirillum brasilense* Ab-V5 and *Rhizobium tropici* CIAT 899, significantly promoted at least one growth variable in both cultivars.

In Duvira cultivar, four strains promoted a significant increase in shoot length of 41.3 % (*A. brasilense* Ab-V5), 33.2 % (*S. fredii* CCMA 0122), 21.09 % (*A. brasilense* Ab-V6), and 17.2 % (*R. tropici* CIAT 899) compared to uninoculated micro plants. Root length increased significantly with *S. fredii* CCMA 0122, *A. brasilense* Ab-V5, and *A. brasilense* Ab-V6 by 29.6 %, 25.4 %, and 24.8 %, respectively. Dry biomass was increased 3.7, 3.4, and 2.28 times upon biotization with *A. brasilense* Ab-V5, *S. fredii* CCMA 0122, and *R. tropici* CIAT 899 compared to the control (Table 2).

Table 2

Effects of biotization with PGPB on growth variables of potato cv. Duvira after 30 days under *in vitro* conditions.

<i>In vitro</i> Duvira cultivar	Lenght (cm)		Dry weight (mg)		
	Shoot	Root	Shoot	Root	Total biomass
<i>R. leucaneae</i>	3.6 ± 0.1 ^e	1.3 ± 0.1 ^{ef}	10.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	10.0 ^d
Ab-V6	8.3 ± 0.1 ^c	4.1 ± 0.1 ^a	30.0 ± 0.0 ^c	10.0 ± 0.0 ^{de}	40.1 ^{cd}
<i>R. tropici</i>	7.7 ± 0.1 ^c	3.3 ± 0.1 ^{bc}	110.0 ± 0.0 ^b	50.1 ± 0.0 ^b	160.1 ^b
<i>S. fredii</i>	10.8 ± 0.1 ^b	4.3 ± 0.1 ^a	130.0 ± 0.0 ^{ab}	110.0 ± 0.0 ^a	240.1 ^{ab}
<i>B. japonicum</i>	5.7 ± 0.1 ^d	3.3 ± 0.1 ^{bc}	20.0 ± 0.0 ^c	10.0 ± 0.0 ^d	30.0 ^c
Ab-V5	12.3 ± 0.1 ^a	4.1 ± 0.1 ^a	150.0 ± 0.0 ^a	110.0 ± 0.0 ^a	260.0 ^a
<i>B. subtilis</i>	3.8 ± 0.1 ^e	2.0 ± 0.1 ^{de}	10.0 ± 0.0 ^d	10.0 ± 0.0 ^d	20.1 ^d
<i>B. megaterium</i>	3.3 ± 0.1 ^e	2.1 ± 0.1 ^d	30.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	30.0 ^c
Control	7.2 ± 0.1 ^d	3.1 ± 0.1 ^c	40.0 ± 0.0 ^c	30.1 ± 0.0 ^c	70.1 ^c

The data are the average of 8 randomly selected micro plants. Values in the table with different letters indicate a statistically significant difference by Tukey's test ($P < 0.05$).

In the case of the *Ágata* cultivar, the micro plants biotized with *A. brasilense* Ab-V5 and *B. megaterium* CCMA0004 showed the best performance, as they showed a significant increase in all morphometric variables compared to the uninoculated control. The plants inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 showed the highest values in all growth variables by approximately 25, 48, 78.5, 72.7, and 76 % for stem length, root length, stem dry weight, root dry weight, and total biomass, respectively. Potato micro plants showed significant increases of 16.6 % in stem height and 43.7 % in root length when inoculated with *B. megaterium* CCMA0004. Also, the total dry biomass was significantly higher than that of uninoculated plants, showing an increase of 70 % (Table 3).

R. leucaenae BR935 inoculation had a negative effect, decreasing the growth of micro plants in both cultivars (Tables 2 and 3). Concerning *B. amyloliquefaciens* CCMA0112, the growth of the bacterium increased considerably in the culture medium (MS), negatively affecting the development of the micro plants of both cultivars, therefore, *in vitro* and *in vivo* growth promotion results with this strain were not shown.

Except for the strain *A. brasilense* Ab-V5, which was effective for both cultivars, differences were observed between the strains of bacteria that promoted the growth of potato micro plants in the two cultivars. The strains *S. fredii* CCMA 0122 and *A. brasilense* Ab-V6, which positively increased some growth parameters in Duvira, decreased growth in *Ágata*. In turn, the strains belonging to the genus *Bacillus*, such as *B. subtilis* CCMA0401 and *B. megaterium* CCMA0004, were those that promoted the growth of the micro plants of cv *Ágata* but with a negative effect on the micro plants of cultivar Duvira.

Table 3

Effects of biotization with PGPB on growth variables in potato cv. *Ágata*, evaluated after 30 days under *in vitro* conditions.

<i>In vitro</i> <i>Ágata</i> cultivar	Lenght (cm)		Dry weight (mg)		
	Shoot	Root	Shoot	Root	Total biomass
<i>R. leucaneae</i>	3.8 ± 0.1 ^f	1.5 ± 0.1 ^e	20.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^{de}	20.0 ^c
Ab-V6	3.3 ± 0.1 ^f	1.9 ± 0.1 ^e	10.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^{cde}	10.0 ^c
<i>R. tropici</i>	6.8 ± 0.1 ^d	3.9 ± 0.1 ^c	90.0 ± 0.0 ^b	50.0 ± 0.0 ^b	140.0 ^b
<i>S. fredii</i>	6.5 ± 0.1 ^d	3.9 ± 0.1 ^c	10.0 ± 0.0 ^c	0.00 ± 0.0 ^e	10.0 ^c
<i>B. japonicum</i>	10.6 ± 0.1 ^c	5.1 ± 0.1 ^b	110.0 ± 0.0 ^b	50.0 ± 0.0 ^b	160.0 ^b
Ab-V5	12.5 ± 0.1 ^a	6.9 ± 0.1 ^a	140.0 ± 0.0 ^a	110.0 ± 0.0 ^a	250.0 ^a
<i>B. subtilis</i>	11.8 ± 0.1 ^b	3.6 ± 0.1 ^c	110.0 ± 0.0 ^{ab}	50.0 ± 0.0 ^b	160.0 ^{ab}
<i>B. megaterium</i>	12.0 ± 0.1 ^{ab}	6.4 ± 0.1 ^a	120.0 ± 0.0 ^{ab}	80.0 ± 0.0 ^{ab}	200.0 ^{ab}
Control	10.1 ± 0.1 ^c	3.6 ± 0.1 ^c	30.0 ± 0.0 ^c	30.0 ± 0.0 ^{cde}	60 ^c

Data are the average of 8 randomly selected micro plants. Values in the table with different letters indicate a statistically significant difference by Tukey's test ($P < 0.05$).

5.1 Influence of biotization on the development of the number of nodes in potato micro plants cv *Duvira* and cv *Ágata*

The number of nodes per micro plant was recorded after four weeks under *in vitro* conditions. Significant differences were observed between genotypes and inoculation treatments. Plants inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 developed 1.7 times more nodes than control micro plants in cultivar *Duvira*. In addition, *S. fredii* CCMA 0122, *A. brasilense* Ab-V6, and *R. tropici* CIAT 899 increased the number of nodes 1.6, 1.4, and 1.3 times respectively (Fig. 3A), producing significant positive effects on the development of micro plants compared to the control (Fig. 3B). In the case of the cultivar *Ágata*, the highest number of nodes was stimulated by inoculation with *A. brasilense* Ab-V5 and *B. megaterium* CCMA 0004, with an increase of 1.4 times, followed by *B. subtilis* CCMA 0401, which favored an increase in the number of nodes of 1.3 times over the control micro plants (Fig. 3C), promoting the shoot and root growth (Fig. 3D).

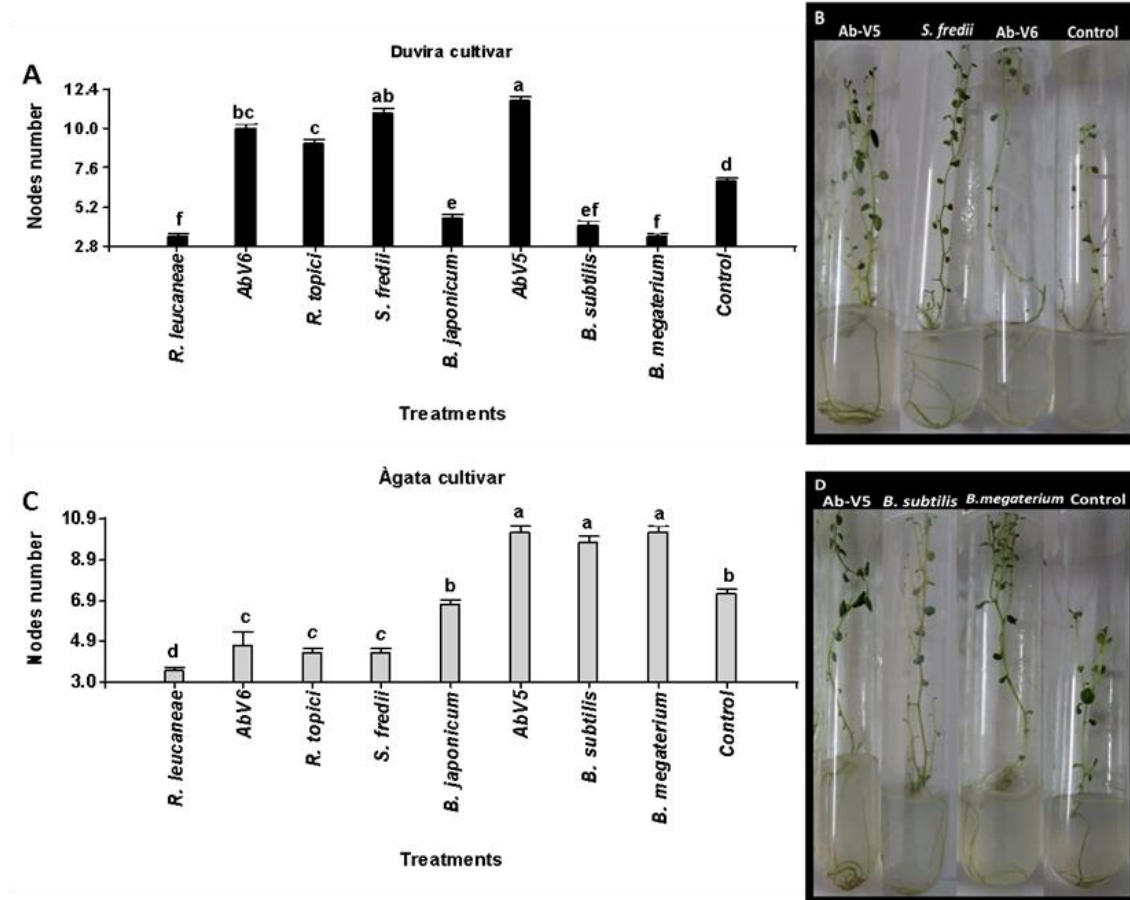


Fig. 3. Effect of biotization on the number of nodes in potato micro plants. Number of nodes cultivar Duvira (A), graphical representation of the development of biotized micro plants cv Duvira (B), number of nodes cultivar Ágata (C) and graphical representation of the development of biotized micro plants cv Ágata (D). Averages with a common letter are not significantly different ($p < 0.05$).

5.2 Effect of biotization on survival of seedlings of cv Duvira and cv Ágata under *in vivo* conditions

In general, the seedlings were successfully acclimatized in the greenhouse. Seedling survival during this phase resulted better in those treatments where bacteria promoted *in vitro* rooting. Biotization affected the survival of potato seedlings ranging from 50 % to 100 %, depending on the cultivar, and also contrasting with 75 % and 87.5 % survival of uninoculated

seedlings. The survival percentage in both cultivars was 100% for seedlings biotized with *A. brasilense* Ab-V5, *R. tropici* CIAT 899, and *S. fredii* CCMA 0122, in addition to recovering turgor in the leaves five days after transplanting. In the cultivar Duvira, *A. brasilense* Ab-V6, *B. subtilis* CCMA 0401 and *B. megaterium* CCMA 0004 100, 75, and 87.5 % of the seedlings, respectively.

As for the cultivar Ágata, the seedling survival rate was 87.5 % with the *A. brasilense* Ab-V6 and *B. subtilis* CCMA 0401; and 100 % with *B. megaterium* CCMA 0004. The treatment inoculated with *R. leucaenae* BR935 showed a reduction in survival rate in the Duvira cultivar of 50 % and 62.5 % in the Ágata cultivar (Fig. 4).

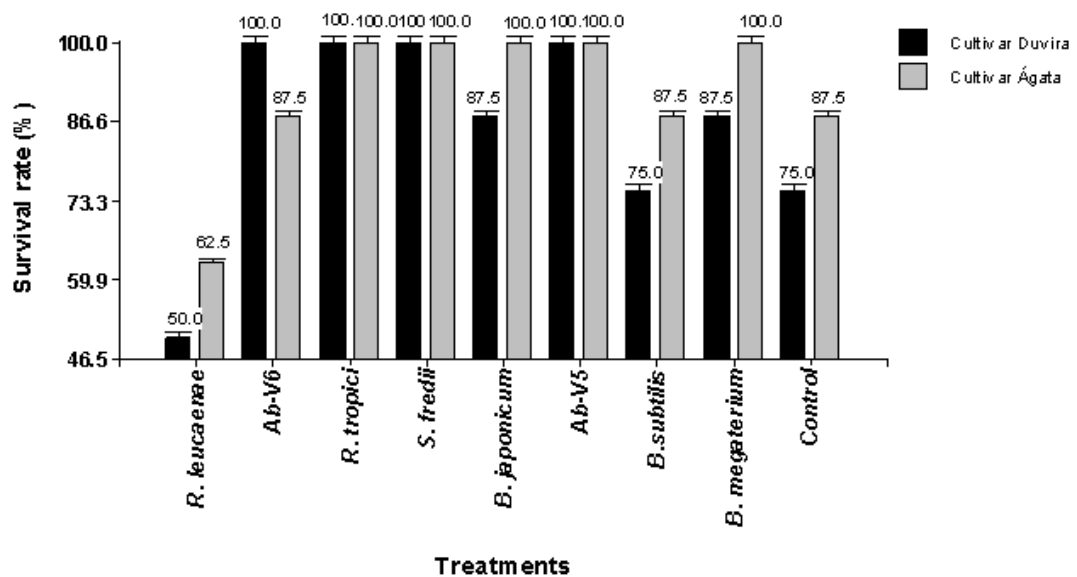


Fig. 4. Percentage survival of biotized and non-biotized micro plants of potato cultivars Duvira and Ágata under *in vivo* conditions

6. Evaluation of the effect of biotization on the performance of potato seedlings cv Duvira and Ágata in the acclimatization and re-inoculation phase

When the micro plants were transferred to soil, a positive influence of biotization on *in vivo* adaptation was observed. *A. brasilense* Ab-V5, *R. tropici* CIAT 899, *S. fredii* CCMA 0122, and *A. brasilense* Ab-V6 stimulated a significant increase in all physiological variables

of cv Duvira in the acclimatization phase (Table 4A). The highest values in stem and root length was stimulated by *A. brasilense* Ab-V5 with an increase of 33.5 and 39.6 %, respectively. Regarding total dry biomass, *A. brasilense* Ab-V6 provided the highest increase, with a value of 74%.

The positive effect was maintained after reinoculation with *A. brasilense* Ab-V5, *R. tropici* CIAT 899, *S. fredii* CCMA 0122, and *A. brasilense* Ab-V6: shoot and root growth were significantly superior in the inoculated plants compared to control plants. Increases between 41.3 and 26.6 %, for stem length, and 46.3 and 28 %, for root length, were observed in plants inoculated with these strains. They also showed an increase in the total dry biomass between 80 and 75 % (Table 4B).

It should be noted that plants subjected to a second inoculation manifested a better development than those with a single inoculation. The average gains in stem length with *A. brasilense* Ab-V5 and *A. brasilense* Ab-V6 were 1.4 times. In root length, the increase was 1.3-fold with *R. tropici* CIAT 899, followed by *A. brasilense* Ab-V5 with 1.2-fold and *S. fredii* CCMA 0122 with 1.1-fold. Similarly, inoculations with *A. brasilense* Ab-V5 and *A. brasilense* Ab-V6 in the total dry biomass variable increased 1.1 and 1.02 times, respectively.

Table 4

Effects of biotization with PGPB on growth variables in potato cv. Duvira evaluated after 25 days in a greenhouse. Acclimatization phase (A) and after re-inoculation (B).

A)	<i>In vivo</i>		Duvira cultivar			
	Treatments	Length (cm)		Dry weight (g)		
		Shoot	Root	Shoot	Root	Total biomass
	<i>R. leucaenae</i>	3.84 ± 0.3 ^g	2.02 ± 0.4 ^{fg}	0.31 ± 0.1 ^c	0.08 ± 0.1 ^c	0.39 ± 0.1 ^c
	Ab-V6	13.78 ± 0.3 ^c	14.58 ± 0.4 ^c	1.91 ± 0.1 ^a	1.25 ± 0.1 ^a	3.16 ± 0.1 ^a

B)	Treatments	Length (cm)		Dry weight (g)		
		Shoot	Root	Shoot	Root	Total biomass
Acclimatization	<i>R. tropici</i>	16.86 ± 0.3 ^{ab}	13.74 ± 0.4 ^{bc}	1.20 ± 0.1 ^b	1.02 ± 0.1 ^a	2.22 ± 0.1 ^b
	<i>S. fredii</i>	14.76 ± 0.3 ^{bc}	12.41 ± 0.4 ^c	1.34 ± 0.1 ^b	1.27 ± 0.1 ^a	2.61 ± 0.1 ^{ab}
	<i>B. japonicum</i>	9.57 ± 0.3 ^c	8.84 ± 0.4 ^{de}	0.42 ± 0.1 ^c	0.36 ± 0.1 ^{bc}	0.78 ± 0.1 ^c
	Ab-V5	17.61 ± 0.3 ^a	17.06 ± 0.4 ^a	1.39 ± 0.1 ^b	0.83 ± 0.1 ^{ab}	2.22 ± 0.1 ^b
	<i>B. subtilis</i>	8.48 ± 0.3 ^{ef}	7.02 ± 0.4 ^{ef}	0.33 ± 0.1 ^c	0.22 ± 0.1 ^c	0.55 ± 0.1 ^c
	<i>B. megaterium</i>	8.52 ± 0.3 ^{ef}	8.39 ± 0.4 ^{de}	0.42 ± 0.1 ^c	0.21 ± 0.1 ^c	0.63 ± 0.1 ^c
	Control	11.74 ± 0.3 ^d	10.30 ± 0.4 ^d	0.52 ± 0.1 ^c	0.30 ± 0.1 ^c	0.82 ± 0.1 ^c
Reinoculation	<i>R. leucaenae</i>	4.01 ± 0.1 ^f	2.21 ± 0.2 ^{ef}	0.45 ± 0.1 ^c	0.10 ± 0.1 ^c	0.55 ± 0.1 ^c
	Ab-V6	15.21 ± 0.1 ^b	15.13 ± 0.2 ^b	2.12 ± 0.1 ^a	2.06 ± 0.1 ^a	4.18 ± 0.1 ^a
	<i>R. tropici</i>	17.74 ± 0.1 ^a	15.07 ± 0.2 ^b	1.55 ± 0.1 ^b	1.12 ± 0.1 ^b	2.67 ± 0.1 ^b
	<i>S. fredii</i>	15.31 ± 0.1 ^b	13.60 ± 0.2 ^{bc}	1.26 ± 0.1 ^b	1.06 ± 0.1 ^b	2.32 ± 0.1 ^b
	<i>B. japonicum</i>	10.20 ± 0.1 ^{cd}	8.21 ± 0.2 ^d	0.37 ± 0.1 ^c	0.29 ± 0.1 ^c	0.66 ± 0.1 ^c
	Ab-V5	19.02 ± 0.1 ^a	18.31 ± 0.2 ^a	2.14 ± 0.1 ^a	1.18 ± 0.1 ^b	3.32 ± 0.1 ^{ab}
	<i>B. subtilis</i>	10.02 ± 0.1 ^{cd}	8.11 ± 0.2 ^d	0.51 ± 0.1 ^c	0.32 ± 0.1 ^c	0.83 ± 0.1 ^c
	<i>B. megaterium</i>	7.11 ± 0.1 ^e	8.15 ± 0.2 ^d	0.38 ± 0.1 ^c	0.24 ± 0.1 ^c	0.62 ± 0.1 ^c
Control	11.16 ± 0.1 ^c	9.82 ± 0.2 ^d	0.48 ± 0.1 ^c	0.35 ± 0.1 ^c	0.83 ± 0.1 ^c	

Data are the average of 8 randomly selected micro plants. Values in the table with different letters indicate a statistically significant difference by Tukey's test ($P < 0.05$).

In the case of cv Ágata, *A. brasilense* Ab-V5, *B. japonicum* CCMA0088, *B. megaterium* CCMA0004, and *R. tropici* CIAT 899 provided a significant increase in stem length compared to the control during the acclimatization phase. This increase ranged from 27 to 13 %. The increase in root growth of plants inoculated with *A. brasilense* Ab-V5, *B. japonicum* CCMA0088, and *B. megaterium* CCMA0004 was of 37, 33, and 28 %, respectively. On the other hand, stem and root dry mass were higher in treatments with *A. brasilense* Ab-V5 (65 and 82 %), *R. tropici* CIAT 899 (54 and 61 %), *B. japonicum* CCMA0088 (43 and 63 %), and *B. megaterium* CCMA0004 (40 and 64 %) (Table 5A).

Likewise, re-inoculation in plants of cv. Ágata promoted the increase of different variables. Inoculation with *A. brasilense* Ab-V5, *R. tropici* CIAT 899, *B. megaterium* CCMA0004, and *B. japonicum* CCMA0088 increased stem and root length, with values

between 39 and 21%. The plants with significant higher dry biomass were those re-inoculated with *A. brasilense* Ab-V5, *R. tropici* CIAT 899, *B. megaterium* CCMA0004, *B. japonicum* CCMA0088, and *B. subtilis* CCMA0401. Moreover, the average gain between the first and second inoculation in the treatment with *A. brasilense* Ab-V5 was 1.1-fold in stem length and 1.2-fold in root length. In total dry biomass, the mean value increased from 4.15 to 5.08 grams in this treatment. *B. subtilis* CCMA0401 promoted plant growth after re-inoculation, with significant differences in all morphometric parameters. In this treatment, the average gain between the first and second inoculation was 1.2 and 1.3 times in stem and root length, and for stem and root dry biomass was 1.7 and 3.1 times, respectively (Table 5B).

Table 5

Effects of biotization with PGPB on growth variables in potato cv. Ágata evaluated after 25 days in the greenhouse. Acclimatization phase (A) and after re-inoculation (B).

A)	<i>In vivo</i>		Ágata cultivar			
	Treatments	Length (cm)		Dry weight (g)		
		Shoot	Root	Shoot	Root	Total biomass
Acclimatization	<i>R. leucaenae</i>	4.06 ± 0.3 ^e	2.16 ± 0.3 ^c	0.12 ± 0.1 ^e	0.10 ± 0.1 ^d	0.22 ± 0.1 ^{ed}
	Ab-V6	7.00 ± 0.3 ^d	5.04 ± 0.3 ^{cd}	0.41 ± 0.1 ^{ee}	0.27 ± 0.1 ^{cd}	0.68 ± 0.1 ^{cd}
	<i>R. tropici</i>	14.40 ± 0.3 ^b	5.76 ± 0.3 ^{bc}	1.61 ± 0.1 ^b	0.93 ± 0.1 ^b	2.54 ± 0.1 ^b
	<i>S. fredii</i>	6.94 ± 0.3 ^d	3.20 ± 0.3 ^e	0.29 ± 0.1 ^{de}	0.13 ± 0.1 ^d	0.42 ± 0.1 ^{de}
	<i>B. japonicum</i>	15.34 ± 0.3 ^b	7.66 ± 0.1 ^a	1.30 ± 0.1 ^b	0.99 ± 0.1 ^b	2.29 ± 0.1 ^b
	Ab-V5	17.00 ± 0.3 ^a	8.24 ± 0.3 ^a	2.12 ± 0.1 ^a	2.03 ± 0.1 ^a	4.15 ± 0.1 ^a
	<i>B. subtilis</i>	12.34 ± 0.3 ^c	5.88 ± 0.3 ^{bc}	0.63 ± 0.1 ^{cd}	0.25 ± 0.1 ^{cd}	0.88 ± 0.1 ^{cd}
	<i>B. megaterium</i>	14.60 ± 0.3 ^b	7.20 ± 0.3 ^{ab}	1.24 ± 0.1 ^b	1.00 ± 0.1 ^b	2.24 ± 0.1 ^b
	Control	12.50 ± 0.3 ^c	5.16 ± 0.3 ^{cd}	0.74 ± 0.1 ^c	0.36 ± 0.1 ^c	1.1 ± 0.1 ^c
B)	Treatments	Length (cm)		Dry weight (g)		
		Shoot	Root	Shoot	Root	Total biomass
	<i>R. leucaenae</i>	3.81 ± 0.2 ^e	3.11 ± 0.1 ^{de}	0.17 ± 0.2 ^e	0.15 ± 0.1 ^{de}	0.33 ± 0.1 ^{de}
Ab-V6	8.03 ± 0.2 ^d	5.36 ± 0.1 ^c	0.55 ± 0.2 ^c	0.31 ± 0.1 ^{cd}	0.86 ± 0.1 ^{cd}	

Reinoculation	<i>R. tropici</i>	16.0 ± 0.2 ^b	6.41 ± 0.1 ^c	1.27 ± 0.2 ^b	0.87 ± 0.1 ^b	2.14 ± 0.1 ^b
	<i>S. fredii</i>	5.19 ± 0.2 ^e	4.03 ± 0.1 ^{cd}	0.31 ± 0.2 ^d	0.20 ± 0.1 ^{de}	0.51 ± 0.1 ^{de}
	<i>B. japonicum</i>	14.82 ± 0.2 ^b	6.91 ± 0.1 ^b	1.05 ± 0.2 ^b	0.74 ± 0.1 ^b	1.79 ± 0.1 ^b
	Ab-V5	19.13 ± 0.2 ^a	10.31 ± 0.1 ^a	2.47 ± 0.2 ^a	2.61 ± 0.1 ^a	5.08 ± 0.1 ^a
	<i>B. subtilis</i>	14.31 ± 0.2 ^c	8.06 ± 0.1 ^{ab}	1.08 ± 0.2 ^b	0.78 ± 0.1 ^b	1.86 ± 0.1 ^b
	<i>B. megaterium</i>	15.13 ± 0.2 ^b	7.85 ± 0.1 ^{ab}	1.13 ± 0.2 ^b	0.88 ± 0.1 ^b	2.01 ± 0.1 ^b
	Control	11.7 ± 0.2 ^{cd}	5.20 ± 0.1 ^c	0.58 ± 0.2 ^c	0.41 ± 0.1 ^{cd}	0.99 ± 0.1 ^{cd}

Data are the average of 8 randomly selected micro plants. Values in the table with different letters indicate a statistically significant difference by Tukey's test ($P < 0.05$).

6.1. Effect of biotization with PGPB on tuber formation and weight in cv Duvira and cv Ágata.

After 25 days of acclimatization, only inoculation with *A. brasilense* Ab-V5 promoted significant differences in the number and weight of tubers in plants with a single inoculation. Specifically, this treatment showed increases of 1.6 times, in cv Duvira, and 2.3 times, in the cv Ágata, for the number of tubers (Fig. 5A). Likewise, the treatment with *A. brasilense* Ab-V5 increased the tuber fresh weight 3.8 times in cv Duvira and 2.3 times in cv Ágata (Fig. 5B). Inoculations with *R. tropici* CIAT 899 and *S. fredii* CCMA 0122 in the cultivar Duvira promoted high values in these variables, but without significant differences.

Regarding cv Ágata, the treatments *R. tropici* CIAT 899 and *B. megaterium* CCMA0004 presented a higher number and weight of tubers compared to non-inoculated seedlings, although this difference was not statistically significant.

Biotization in cv Duvira significantly improved tuber formation with *A. brasilense* Ab-V5 (Fig. 5C) (Fig. 5D). Similarly, in the cultivar Ágata, biotization with *A. brasilense* Ab-V5 favored tuber growth and formation (Fig. 5E) compared to uninoculated plants (Fig. 5F).

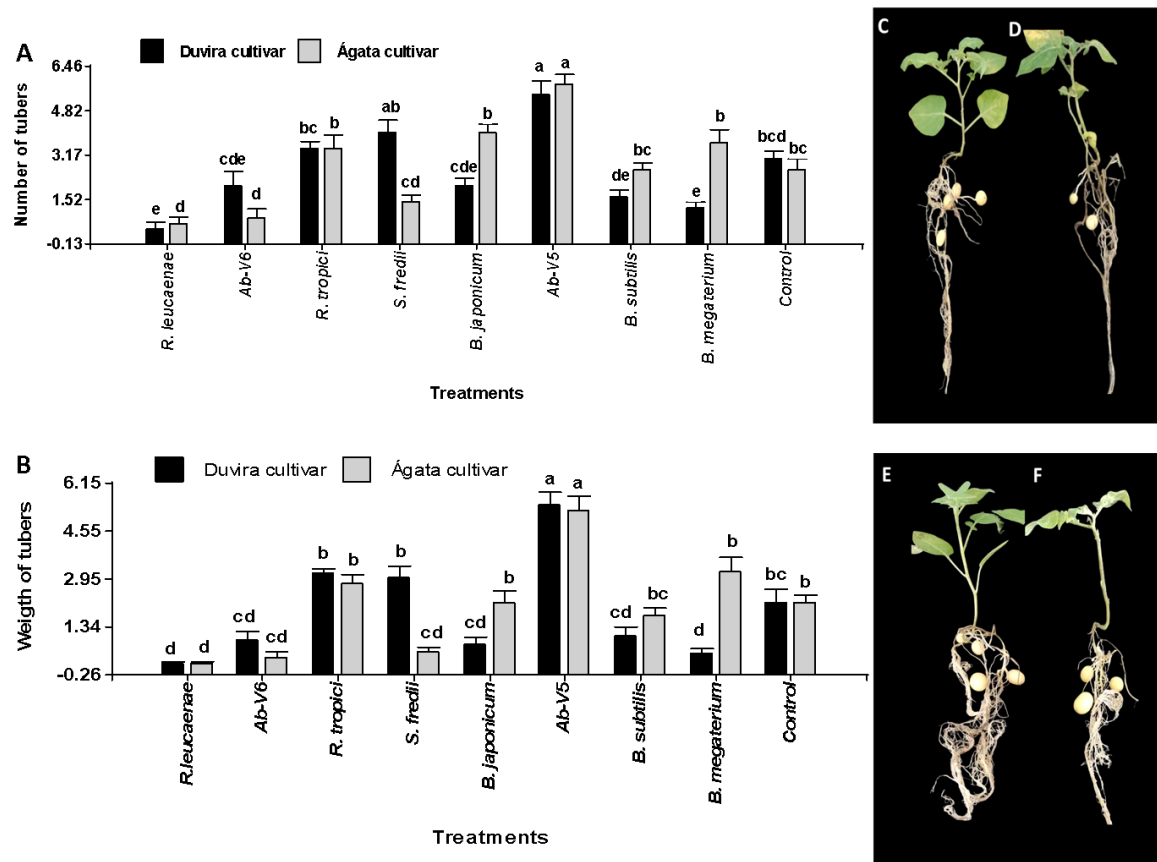
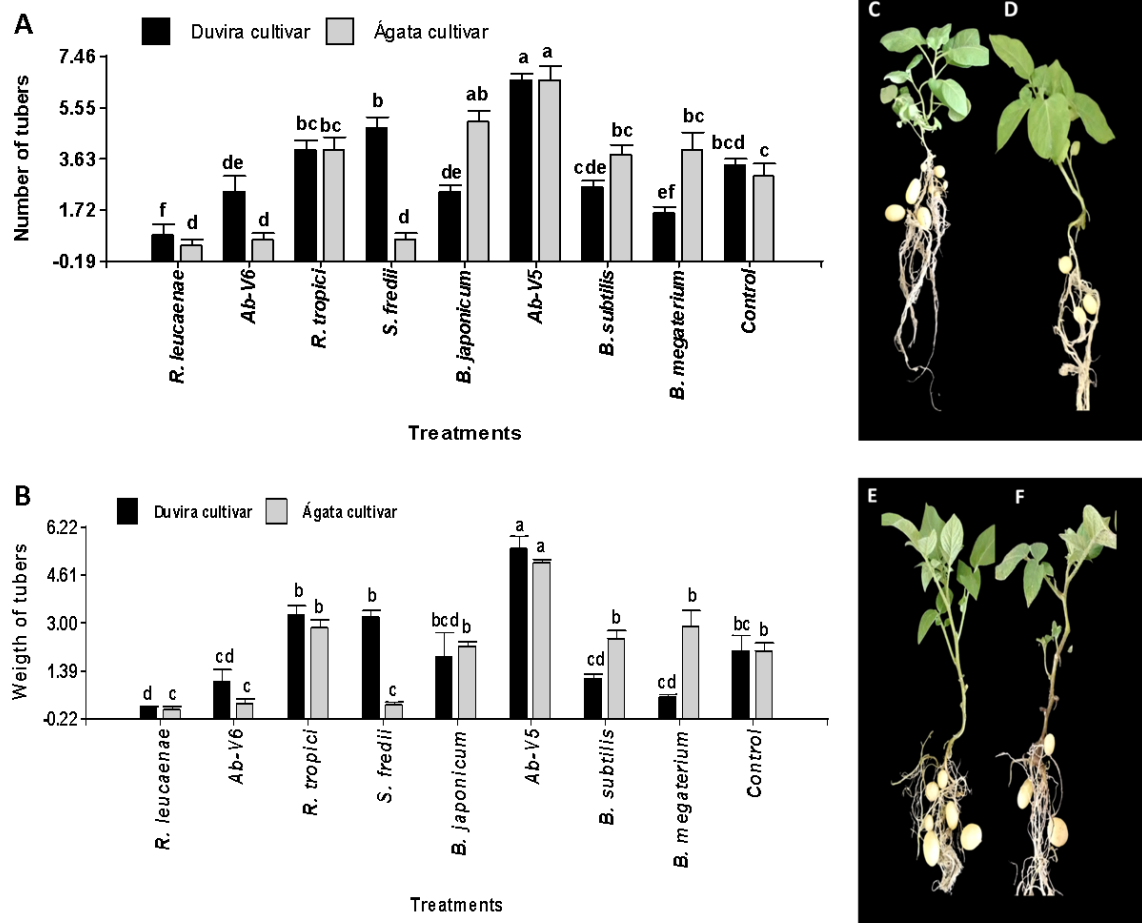


Fig. 5. Effect of biotization with PGPB on tuber formation in cv Duvira and Ágata. (A) Number and (B) fresh weight of tubers (B) in cv Duvira and Ágata. (C) Duvira inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 (C) and its uninoculated control (D), cv Ágata inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 (D) and non-inoculated control (E). Averages with a common letter are not significantly different ($p < 0.05$).

6.2 Effect of PGPB re-inoculation on tuber formation and weight in cv Duvira and cv Ágata.

Plants of cultivar Duvira re-inoculated with *A. brasilense* strain Ab-V5 showed a higher number of tubers, with a significant 1.9-fold increase compared to the control. For the cultivar



Ágata, two strains increased the number of tubers, *A. brasilense* Ab-V5 by 2.2 times and *B. japonicum* CCMA0088 by 1.6 times (Fig. 6A). If we compare the number of tubers in singly inoculated and the re-inoculated treatments, we observe that *A. brasilense* Ab-V5 increased 1.2 times in cv Duvira, and 1.2 times when co-inoculated with *B. japonicum* CCMA0088 in cv Ágata. Regarding tuber fresh weight, only *A. brasilense* Ab-V5 strain statistically outperformed the controls, both in Duvira and Ágata, with 2.6 and 2.4-fold increases, respectively (Fig. 6B). The inoculation with *A. brasilense* Ab-V5 promoted a good plant physiological development in cv Duvira (Fig. 6C) compared to the control (Fig. 6D), maintaining the same effect in Ágata (Fig. 6E and F).

Fig. 6. Effect of re-inoculation with PGPB on cv Duvira and Ágata tuber formation. The number of tubers (A), fresh weight of tubers (B), cv Duvira inoculated with *A. brasilense* Ab-

V5 (C), uninoculated control (D), cv Ágata inoculated with *A. brasilense* Ab-V5 (D) and uninoculated control (E). Averages with common letters are not significantly different ($p < 0.05$).

7. Discussion

7.1. Growth-promoting functions of bacteria

Beneficial bacteria play essential roles that positively affect, directly or indirectly, plant growth and development. In this study, 50 % of the bacterial strains evaluated exhibited at least three PGPB traits. Among these characteristics, the production of phytohormones, such as auxins and gibberellins, which regulate many biological processes in the plant, stands out (Kargapolova et al., 2020). This ability is widespread among rhizobacteria, and different biosynthetic pathways have been identified (Amara et al., 2015). According to the literature, more than 80 % of soil bacteria in the rhizosphere can produce auxins, especially indole-3-acetic acid (IAA), playing a compensatory role, especially in micro propagated plants that are in a suboptimal environment with insufficient endogenous production (Spaepen and Vanderleyden, 2011). For example, this is the case of the genus *Azospirillum*, whose species are commonly characterized as major auxin producers (Andrade et al., 2019). IAA interferes with plant growth through various cellular functions such as cell division and other functions (Park et al., 2021).

Our results show that *A. brasilense* Ab-V5 and *A. brasilense* Ab-V6 produced significant amounts of IAA. *A. brasilense* Ab-V5 was the strain that best improved the *in vitro* growth and rooting of potato micro plants and seedlings in both two cultivars. However, *S. fredii* CCMA 0122, that benefited cv Duvira, and *B. japonicum* CCMA0088, *B. megaterium* CCMA0004, and *B. subtilis* CCMA0401, that benefited cv Ágata, also produced significant amounts of IAA, which might have had a positive impact on the growth of the plants *in vitro*.

IAA-producing bacteria usually rely on the presence of L-tryptophan; however, the optimal concentration and maximum productivity vary according to the bacterial species (Di et al., 2016). Bacterial IAA not only promotes root growth but also triggers many different physiological signals in plants, such as secondary metabolism and developmental stages (Park et al., 2021). In addition, it also promotes responses to abiotic stress responses and interactions with pathogens (Donati et al., 2013; Shani et al., 2017) through its intricate interconnection with other plant hormones (Sharma et al., 2021).

Similarly, the bacteria evaluated produced gibberellins in significant amounts with values from 13 to 5.09 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Stem length was the most stimulated variable under *in vitro* conditions, with up to 41 % increase. This is probably due to gibberellins' biosynthesis, which acts as a growth promoter and regulates various developmental processes such as stem elongation, seed germination, sexual expression, and fruit formation (Keswani et al., 2022). Several studies have reported that the bacterial genera *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, and *Bacillus* exhibit physiologically desirable traits such as the production of IAA, cytokinins, gibberellins, riboflavin, and Nod factors, which play diverse roles in enhancing plant growth and productivity (Costacurta et al., 1995; Adedayo et al., 2022; Keswani et al., 2020; Mekonnen & Kibret, 2021). Ormeño et al. (2012) discovered genes in the genome of *Rhizobium tropici* CIAT 899 involved in the metabolism of plant growth regulators, including IAA. This strain can synthesize IAA by two or three tryptophan-dependent pathways. According to Eddie et al. (2016), IAA production by bacteria can occur by four different tryptophan-dependent pathways (TRP), called indol-3-acetamide, indol-3-pyruvic acid, indol-3-acetonitrile, and tryptamine. The indol-3-pyruvic acid (IPyA) pathway is the most utilized by plants, pathogenic microorganisms, and plant growth-promoting of genera such as *Rhizobium*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* and *Enterobacter*. In the case of *R. tropici* CIAT

899, the production of IAA by IPyA is strongly inhibited by NH_4^+ accumulation (Eddie et al., 2016).

Other phytohormones, such as salicylic acid, also play an essential role in plant stress relief by modulating the activities of antioxidant enzymes (Shanmugam and Narayanasamy, 2008). The SA synthesis in bacteria is concomitant with the biosynthesis of siderophores, the SA is an essential precursor or intermediate for synthesizing catechol-type microbial siderophores such as yersiniabactin, pyoverdine, and pyochelin (Bakker et al., 2014). Moreover, it has been shown to play a crucial role as a regulator of systemic acquired resistance (SAR) against abiotic stress (Tortora et al., 2011). In our study, the genera *Azospirillum* and *Bacillus* synthesized amounts of salicylic acid from 9.8 up to $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. These same bacteria allowed a better adaptation and development of plants under *in vivo* conditions. Egamberdieva et al. (2017) reported SA production by root-associated bacteria such as *B. licheniformis* MML2501 ($18 \mu\text{g mL}^{-1}$) and *Pseudomonas* sp. PRGB06 ($6.8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Also, SA production was reported for *Pseudomonas tremae* bacteria with values of $57.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ and *Curtobacterium herbarum* $46.22 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Islam et al., 2019), showing that phytohormones biosynthesis differs by bacterial strain (Forchetti et al., 2010).

As a strategy to improve plant adaptation to stress conditions, ACC deaminase-producing bacteria can influence plant growth directly or indirectly (Glick, 2014). The biochemical evaluation of bacteria by quantifying the amount of α -ketobutyrate produced is necessary and feasible to confirm the positive character of ACCd production, so the method used in this study is widely accepted for the identification of ACCd-producing rhizobacteria (Penrose and Glick, 2001). In our experiments, five strains represented by the genera *Bacillus*, *Sinorhizobium*, and *Bradyrhizobium* have ACCd activities. No strain of the genus *Azospirillum* was positive for ACCd. According to Joe et al. (2022), despite possessing all plant growth-

promoting traits, most *Azospirillum* spp. are considered negative for ACC deaminase (*acdS*) activity except a few strains of *Azospirillum lipoferum* (AZm5 4B, CRT1, CN1, N4, and TW3).

7.2. Influence of biotization on potato *in vitro* growth

Biotized plants benefit from microbial presence through improved photosynthetic efficiency and biomass production. Generally, PGPB improve growth by releasing necessary compounds that aid micropropagation and rooting (Quambusch and Winkelmann, 2018). In our study, we demonstrated that biotization with the strains of the genus *Azospirillum*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Sinorhizobium* identified as phytohormone producers (IAA, GA, and SA) promoted root formation and increases in total dry biomass of up to 82% in the case of biotization with *A. brasilense* Ab-V5.

ACC deaminase activity is another critical characteristic of bacteria that promotes plant growth. Bacteria of the genera *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, and *Rhizobium* have been reported to produce ACC deaminase with the ability to increase plant growth parameters, as well as decrease biotic and abiotic stress (Tiwari et al., 2018). In this study, the strains of the genera *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, and *Sinorhizobium* with ACC deaminase activity significantly increased the vegetative parameters of length and biomass weight in potato micro plants compared to uninoculated micro plants.

However, the effects of biotization with different bacterial strains on the growth of potato micro plants *in vitro* were very different, indicating the specificity of the bacterium's interaction with the plant genotype. A study by Weinert et al. (2010) determined that potato genotype is one of the factors shaping the rhizosphere-associated microbial community. Five potato cultivars and two strains were evaluated. Differences in bacterial communities between plant genotypes were significant in some cultivars, suggesting a rather subtle influence of plant genotype on tuber-associated bacteria.

7.3. Impact of biotization on *in vivo* adaptation and tuber formation

In transplanting micro plants to the greenhouse, the plant faces obstacles in the growth and development stages as stress is caused by various factors such as decreased gas exchange, low humidity, reduced photosynthetic capacity, and roots with few root hairs (Kanani et al., 2020). A critical factor in adapting micro plants in the soil is good root development (Akin-Idowu et al., 2009). In this study, the five strains that promoted plant growth *in vitro* contributed to obtaining high-quality rooted cuttings and a high survival rate of up to 100% during acclimatization, improving their performance in *in vivo* conditions. The *A. brasilense* Ab-V5 strain positively affected *in vitro* micro plant growth in both cultivars and promoted *in vivo* seedling development with up to 3-fold gains in dry biomass after re-inoculation. The *A. brasilense* Ab-V6 strain also positively affected the acclimatization of micro plants of the cultivar Duvira, and increases of 75 % in total dry biomass were observed with re-inoculation. However, this effect was not reflected on the number of tubers, which was smaller than the number of tubers in control plants of both cultivars. Similarly, the strain *B. Subtilis* CCMA0401 also favored the growth of plants of the cultivar Ágata with significant differences in all morphometric parameters during the acclimatization phase, but this was not reflected on tuber production. The inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 benefited both cultivars consistently at the different steps of potato production, that is, under tissue culture, acclimatization, and growth and production under controlled conditions. These results highlight the importance of studying PGPB inoculation at different states of crop production.

According to Kargapolova et al. (2020), potato seedlings grown *in vitro* and in aeroponic systems have been shown to benefit from inoculation with *A. brasilense* strain Sp245, increasing plant aerial part length and root development. Other studies have shown that inoculation with *A. brasilense* can alter carbon partitioning to the roots, increasing root branches, specific root length, and root hair length, which are morphological characteristics that

help in the acquisition of nutrients and water from the soil (Hungria et al., 2022). According to Santos et al. (2021), despite the ability to fix N₂, the most significant contribution of inoculation with *A. brasilense* (especially strains Ab-V5 and Ab-V6) has been attributed to plant growth-promoting effects. *A. brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 have been effective in maize and wheat crops in Brazil (Hungria et al., 2010). In our study, tuber formation in plants inoculated with *A. brasilense* strain Ab-V5 of the cultivar Duvira, and Ágata increased 2.2-fold. This shows that this bacterium can benefit potato plants' development and increase tubers' formation and fresh weight. Our results show that this effect is strain specific because strains Ab-V5 and Ab-V6 of *A. brasilense* had different effects.

8. Conclusion

The present study demonstrates the beneficial effect of bacteria producing IAA, GA, SA, and ACC deaminase on *in vitro* plants of potato cv Duvira and cultivar Ágata. Biotization with PGPB improves the development of micro plants and, therefore, can be exploited to increase the survival and development of potatoes *in vitro* and improve their *in vivo* adaptation. Even though the response of potato micro plants to inoculation is highly variable both *in vitro* and *in vivo*, it was found that inoculation with strains of the genus *Azospirillum*, *Bacillus*, *Sinorhizobium*, and *Bradyrhizobium* increases the efficiency of potato clonal micropropagation and allows the production of higher quality seedlings. The strain *A. brasilense* Ab-V5 showed promising results, favoring tuber production.

CRediT authorship contribution statement

Yulimar Castro: Conceptualization, investigation, formal analysis and writing. Joyce Doria: Supervision. Ana Gomez and Luna Queiroz: Investigation. Moacir Pasqual: availability of laboratory, greenhouse and other resources, Ederson da Conceição: Supervision, review and editing.

Acknowledgments

The authors extend thanks to Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing the necessary equipment, financial and technical support for the experiments.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

Adedayo, A.A., Babalola, O.O., Prigent-Combaret, C., Cruz, C., Stefan, M., Kutu, F., Glick, B.R., 2022. The application of plant growth-promoting rhizobacteria in *Solanum lycopersicum* production in the agricultural system: a review. PeerJ. May 31;10: e13405.

doi: 10.7717/peerj.13405.

Akin-Idowu, P.E., Ibitoye, D.O., Ademoyegun, O.T., 2009. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. Afr. J. Biotechnol. 8 (16), 3782–3788.

Amara, U., Khalid, R., and Hayat, R. 2015., “Soil bacteria and phytohormones for sustainable crop production” in *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem. Sustainable development and biodiversity. Vol. 12.* ed. D. K. Maheshwari (Cham: Springer), 87–103.

Andrade, F.M.; Assis Pereira, T.; Souza, T.P.; Sales Guimarães, P.H.; Martins, A.D.; Schwan, R.F.; Dória, J., 2019. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. Microbiol. Res. 223–225, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.005>.

Arkhipova, T.; Martynenko, E.; Sharipova, G.; Kuzmina, L.; Ivanov, I.; Garipova, M.; Kudoyarova, G., 2020. Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on the Content of Abscisic Acid and Salt Resistance of Wheat Plants. *Plants*. 9, 1429.

<https://doi.org/10.3390/plants9111429>

Bakker, P.A.H.M., Ran, L. & Mercado-Blanco, J., 2014. Rhizobacterial salicylate production provokes headaches! *Plant Soil* 382, 1–16

<https://doi.org/10.1007/s11104-014-2102-0>

Blanco Carrero, E. L., y Castro Molina, Y., 2021. Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1), 6–16.

<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.84808>

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Castro-Restrepo, D., Dominguez, M. I., Gaviria-Gutiérrez, B., Osorio, E., & Sierra, K., 2022. Biotization of Endophytes *Trichoderma asperellum* and *Bacillus subtilis* in *Mentha spicata* Micro plants to Promote Growth, Pathogen Tolerance and Specialized Plant Metabolites. *Plants*, 11(11), 1474.

DOI: [10.3390/plants11111474](https://doi.org/10.3390/plants11111474)

Costacurta, A., Vanderleyden, J., 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol*.21(1):1-18.

doi: 10.3109/10408419509113531.

Di, D-W., Zhang, C., Luo, P., An, C-W., Guo, G-Q., 2016. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? *Plant Growth Regul* 78:275–285.

De Meyer, G.; Höfte, M., 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*, 87, 588–593.

Donati, AJ., Lee, H-I., Leveau, JHJ., Chang, W-S., 2013. Effects of indole-3-acetic acid on the transcriptional activities and stress tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS One* 8(10) 76559.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076559>

Dworkin, M., & Foster, J. W. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*, 75(5), 592–603.

<https://doi.org/10.1128/jb.75.5.592-603.1958>

Eddie Luidy, Ima.da, Amanda Alves de Paiva, Rolla dos Santos., André Luiz, Martinez de Oliveira., Mariangela, Hungria., Elisete Pains, Rodrigues., 2017. Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. *Research in Microbiology*, 168 (3), 283-292.

<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.010>

Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd_Allah, E. F., & Hashem, A., 2017. Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in microbiology*, 8, 2104.

DOI.10.3389/fmicb.2017.02104

El-Banna, AN., El-Mahrouk, ME., Dewir, YH., Farid, MA., Abou Elyazid, DM., Schumacher, HM., 2021. Endophytic Bacteria in Banana *In Vitro* Cultures: Molecular Identification, Antibiotic Susceptibility, and Plant Survival. *Horticulturae*. 7(12):526.

<https://doi.org/10.3390/horticulturae7120526>

Forchetti, G., Masciarelli, O., Izaguirre, MJ., Alemano, S., Alvarez, D., Abdala, G., 2010. Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi. *Curr Microbiol* 61:485–493

Glick, BR., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res*.169:30–39.

Graham, HD., Thomas, LB., 1961. Rapid, simple colorimetric method for the determination of micro quantities of gibberellic acid. *J Pharm Sci*. Jan; 50:44-8.

doi: 10.1002/jps.2600500110. PMID: 13707719.

Herman, E. B. 1996a. Beneficial effects of bacteria and fungi on plant tissue cultures. *Agricell Rep*. 27:26-27;

Herman, E. B. 1987. Contaminants promote potato micropropagation. *Agricell Report* 9:38.

Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, 347(2nd edit).

Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M. *et al.* 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331, 413–425.

<https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>

Hungria, M.; Barbosa, J.Z.; Rondina, A.B.L.; Nogueira, M.A., 2022. Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Agron. J.* 114, 2969–2980.

<https://doi.org/10.1002/agj2.21150>

Islam, MN., Ali, MS., Choi, SJ., Park, YI., Baek, KH., 2019. Salicylic Acid-Producing Endophytic Bacteria Increase Nicotine Accumulation and Resistance against Wildfire Disease in Tobacco Plants. *Microorganisms*.8(1):31.

doi: 10.3390/microorganisms8010031.

Jarstfer, A.G., Sylvia, D.M., 1992. Inoculum production and inoculation strategies for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Metting, F.B. (Ed.), *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 349e377.

Joe, M.M., Benson, A., Walitang, D.I. *et al.* 2022. Development of ACCd producer *A. brasilense* mutant and the effect of inoculation on red pepper plants. *3 Biotech* 12, 252.

<https://doi.org/10.1007/s13205-022-03300-5>

Kanani, P., Modi, A., & Kumar, A. 2020. Biotization of endophytes in micropropagation: A helpful enemy. Em A. Kumar & V. K. Singh (Orgs.), *Microbial Endophytes* (p. 357–379). Woodhead Publishing.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818734-0.00015-2>

Kargapolova, K. Yu., Burygin, G. L., Tkachenko, O. V., Evseeva, N. V., Pukhalskiy, Y. V., & Belimov, A. A., 2020. Effectiveness of inoculation of in vitro-grown potato micro plants with rhizosphere bacteria of the genus *Azospirillum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 141(2), 351–359.

<https://doi.org/10.1007/s11240-020-01791-9>

Keswani, C., Singh, H. B., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y.-W., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., & Sansinenea, E., 2020. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(3), 1013–1034.

<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10300-8>

Keswani, C., Singh, S. P., García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., Rajput, V. D., Minkina, T. M., Ortiz, A., & Sansinenea, E., 2022. Biosynthesis and beneficial effects of microbial gibberellins on crops for sustainable agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(3), 1597–1615.

<https://doi.org/10.1111/jam.15348>

Liang, C., Wu, R., Han, Y., Wan, T., & Cai, Y., 2019. Optimizing Suitable Antibiotics for Bacterium Control in Micropropagation of Cherry Rootstock Using a Modified Leaf Disk Diffusion Method and E Test. *Plants*, *8*(3), Art. 3.

<https://doi.org/10.3390/plants8030066>

Maggini, V., Mengoni, A., Gallo, E. R., Biffi, S., Fani, R., Firenzuoli, F., & Bogani, P., 2019. Tissue specificity and differential effects on *in vitro* plant growth of single bacterial endophytes isolated from the roots, leaves and rhizospheric soil of *Echinacea purpurea*. *BMC Plant Biology*, *19*(1), 284.

<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1890-z>

Mamoru, Honma & Tokuji, Shimomura., 1978. Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid, *Agricultural and Biological Chemistry*, *42*:10, 1825-1831.

DOI: 10.1080/00021369.1978.10863261

Mekonnen, H., & Kibret, M., 2021. The roles of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable vegetable production in Ethiopia. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(1), 1-11.

Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-97.

Naqqash, T., Hameed, S., Imran, A., Hanif, M. K., Majeed, A., & van Elsas, J. D., 2016. Differential Response of Potato Toward Inoculation with Taxonomically Diverse Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Frontiers in Plant Science*, 7.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00144>

Orlikowska, T., Nowak, K., & Reed, B., 2017. Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(3), 487–508.
<https://doi.org/10.1007/s11240-016-1144-9>

Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L.G.P. et al.2012. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* 13, 735.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-735>

Ozimek, E., Jaroszuk-Ściseł, J., Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., Tyśkiewicz, R., Słomka, A., Nowak, A., & Hanaka, A., 2018. Synthesis of Indoleacetic Acid, Gibberellic Acid and ACC-Deaminase by *Mortierella* Strains Promote Winter Wheat Seedlings Growth under Different Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3218.

<https://doi.org/10.3390/ijms19103218>

Park, S., Kim, A.-L., Hong, Y.-K., Shin, J.-H., & Joo, S.-H., 2021. A highly efficient auxin-producing bacterial strain and its effect on plant growth. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 19, 179.

<https://doi.org/10.1186/s43141-021-00252-w>

Penrose, DM., Glick, BR., 2001. Levels of ACC and related compounds in exudate and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Can J Microbiol.* Apr;47(4):368-72.

doi: 10.1139/w01-014. PMID: 11358177.

Penrose, D. M., & Glick, B. R., 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118(1), 10–15.

<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x>

Quambusch, M., and Winkelmann, T., 2018. Bacterial endophytes in plant tissue culture: mode of action, detection, and control. *Methods Mol. Biol.* 1815, 69–88.

doi: 10.1007/978-1-4939-8594-4_4

Romadanova, NV., Tolegen, AB., Kushnarenko, SV., Zholdybayeva, EV., Bettoni, JC., 2022. Effect of Plant Preservative Mixture™ on Endophytic Bacteria Eradication from *in vitro*-Grown Apple Shoots. *Plants*. 11(19):2624.

<https://doi.org/10.3390/plants11192624>

Sagar A. Desai. 2017. Isolation and characterization of gibberellic acid (GA₃) producing rhizobacteria from sugarcane roots. *Bioscience Discovery*, 8(3): 488-494.

<http://biosciencediscovery.com> and <http://jbsd.in>

Santos, Mariana Sanches., Nogueira, Marco Antonio., Hungria, Mariangela., 2021. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*.2021;45:e0200128.

DOI: 10.36783/18069657rbc20200128

Sharma, M., Singh, D., Saksena, HB., Sharm,a M., Tiwari, A., Awasthi, P., Botta, HK., Shukla, BN., Laxmi, A., 2021. Understanding the intricate web of phytohormone signalling in modulating root system architecture. *Int J Mol Sci* 22:5503.

<https://doi.org/10.3390/ijms22115508>

Shani, E., Salehin, M., Zhang, Y., Sanchez, SE., Doherty, C., Wang, R., 2017. Plant stress tolerance requires auxin-sensitive Aux/IAA transcriptional repressors. *Curr Biol* 27:437–444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.12.016>

Shanmugam, P., and Narayanasamy, M., 2008. Optimization and production of salicylic acid by rhizobacterial strain *Bacillus licheniformis* MML2501. *Int. J. Microbiol.* 6, 1–15

Soumare, A., Diédhiou, A. G., Arora, N. K., Tawfeeq Al-Ani, L. K., Ngom, M., Fall, S., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Kouisni, L., & Sy, M. O., 2021. Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture. *Frontiers in Microbiology*, 12.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649878>

Souza, J.A., Bettoni, J.C., Dalla Costa, M., Baldissera, T.C., dos Passos, J.M., Primieri, S., 2022. *In vitro* rooting and acclimatization of ‘Marubakaido’ apple rootstock using indole-3-acetic acid from rhizobacteria. *Communication in Plant Sciences* 12, 16–23.

Spaepen, S., and Vanderleyden, J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:a001438.

doi: 10.1101/cshperspect.a001438

Tiwari, G., Duraivadivel, P., Sharma, S., & P., H., 2018. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing beneficial rhizobacteria ameliorate the biomass characters of *Panicum maximum* Jacq. By mitigating drought and salt stress. *Scientific Reports*, 8(1), Art. 1.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35565-3>

Tkachenko, O. V., Evseeva, N. V., Boikova, N. V., Matora, L. Yu., Burygin, G. L., Lobachev, Y. V., & Shchyogolev, S. Yu., 2015. Improved potato microclonal reproduction with the plant growth-promoting rhizobacteria *Azospirillum*. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(3), 1167–1174.

<https://doi.org/10.1007/s13593-015-0304-3>

Tkachenko, O. V., Evseeva, N. V., Terentyeva, E. V., Burygin, G. L., Shirokov, A. A., Burov, A. M., Matora, L. Yu., & Shchyogolev, S. Yu., 2021. Improved Production of High-Quality Potato Seeds in Aeroponics with Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Potato Research*, 64(1), 55–66.

<https://doi.org/10.1007/s11540-020-09464-y>

Tortora, ML., Díaz-Ricci, JC., Pedraza, RO., 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch Microbiol.*193(4):275-86.

doi: 10.1007/s00203-010-0672-7.

Trdan, S., Vučajnk, F., Bohinc, T., & Vidrih, M., 2019. The effect of a mixture of two plant growth-promoting bacteria from Argentina on the yield of potato, and occurrence of primary potato diseases and pest – short communication. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 69(1), 89–94.

<https://doi.org/10.1080/09064710.2018.1492628>

Weinert, N., Meincke, R., Gottwald, C., Heuer, H., Schloter, M., Berg, G. and Smalla, K., 2010. Bacterial diversity on the surface of potato tubers in soil and the influence of the plant genotype. *FEMS Microbiology Ecology*, 74: 114-123.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00936.x>

ARTIGO 2 -Potencial de consórcios microbianos para estimular a termotolerância em batata (*Solanum tuberosum* L) modulando sistemas antioxidantes e fitohormônios endógenos.

Manuscrito adaptado às normas da Journal of Plant Growth Regulation

Yulimar Castro Molina^{1,2}, Joyce Dória Rodrigues³, Ana Milena Gómez Sepúlveda¹, Gracielle Vidal Silva³, Moacir Pasqual³, Ederson da Conceição Jesus⁴

¹Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

²Departamento de Biologia, Universidade dos Andes, Mérida, Venezuela

³Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

⁴Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR 465, Km 7, Seropédica, RJ, Brasil

RESUMO

O estresse térmico é uma das principais condições ambientais que afetam negativamente o desenvolvimento das plantas e a capacidade de produção das culturas. Para neutralizar esses efeitos prejudiciais, consórcios de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) são empregados como abordagens ecológicas e sustentáveis. Este estudo foi realizado para investigar se diferentes consórcios microbianos formados entre combinações de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 com *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* e *Rhizobium tropici* CIAT 899 têm potencial para manter o crescimento e a produtividade da batata sob estresse térmico. Analisamos tendências na concentração de clorofila, conteúdo relativo de água, osmólitos, enzimas antioxidantes e estresse oxidativo, mudanças nos níveis fitohormonais, promoção de crescimento *in vitro* e *in vivo*, taxa de sobrevivência *in vivo* e produção de tubérculos. Algumas avaliações foram medidas no momento do estresse e, outras, após 10 dias de recuperação. Plantas inoculadas com os consórcios *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + *Rhizobium tropici* CIAT 899 apresentaram maior taxa de crescimento *in vitro* e *in vivo*, produção de biomassa seca com aumentos de 2 e 1,6 vezes respectivamente na biomassa aérea, e de 3 e 2 vezes na raiz em relação as plantas não inoculadas sob estresse O número e peso de tubérculos também foram maiores nesses consórcios, com aumentos de 21% no número de tubérculos e 16% no peso. Da mesma forma, esses consórcios mantiveram um maior teor de clorofila, proteínas solúveis, prolina e atividades das enzimas SOD, CAT e APX em comparação com plantas não inoculadas sob estresse. Os resultados

sugerem que os consórcios microbianos têm o potencial de estimular o crescimento da planta e manter o rendimento da batata sob estresse térmico, regulando os sistemas fisiológicos e bioquímicos da planta.

Palavras chaves: *Azospirillum brasilense* Ab-V5; biotização; estresse térmico; atividade enzimática.

INTRODUÇÃO

A mudança climática é um fenômeno mundial caracterizado pelo aumento simultâneo de temperatura, dióxido de carbono e seca, que afetam consideravelmente o metabolismo das plantas, limitando seu desenvolvimento e sobrevivência (Habib-ur-Rahman et al., 2022). Segundo estimativas do Grupo Intergovernamental de especialistas sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2023) a trajetória do aquecimento global está em torno de 3,5°C até 2100, com margem de erro entre 2,2°C e 3,5°C dependendo das políticas públicas aplicadas. A capacidade adaptativa de alguns sistemas humanos e naturais é limitada com o aquecimento global de 1,5°C e, com cada aumento no aquecimento, as perdas e os danos aumentam (*AR6 Synthesis Report*, [s.d.]). O estresse causado por ondas de calor nas plantas é definido como o aumento da temperatura acima de um nível tolerável e por um período de tempo suficiente para produzir danos severos em nível morfológico, fisiológico e bioquímico, afetando o crescimento e a produção das culturas (Abdellatif et al., 2022) e representam uma ameaça aos ecossistemas globais (Bahar et al., 2020).

As plantas possuem sistemas reguladores para múltiplas vias bioquímicas e mecanismos de defesa que previnem dentro de faixas específicas de temperatura danos celulares resultantes de aumentos da temperatura (Sakamoto & Kimura, 2018). Apesar disso, sob condições de estresse térmico, muitas enzimas-chave nos processos bioquímicos de produção de energia e síntese de proteínas são afetadas negativamente (M. S. et al., 2021), o que leva a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que em altas concentrações comprometem a funcionalidade das células e, portanto, o desenvolvimento e produtividade da planta (Pooja & Munjal, 2019).

Atualmente, várias técnicas são utilizadas para aumentar a produtividade de plantas em situações de estresse. Isso inclui métodos convencionais, melhoramento por meio de indução de mutações por métodos clássicos e engenharia genética (Saharan et al., 2022). No entanto, as limitações associadas a essas abordagens destacam a necessidade de encontrar abordagens

eficientes e econômicas para melhorar a tolerância das plantas a diferentes tipos de estresse (Phour & Sindhu, 2022).

Há evidências crescentes demonstrando que o uso de bioinoculantes à base de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) auxilia na tolerância das plantas ao estresse abiótico, impactando não apenas uma parte da planta, mas também ajudando a mitigar os efeitos do estresse na planta como um todo (Ahluwalia et al., 2021; Barnawal et al., 2019; Batool et al., 2020; Chiappero et al., 2019; Tariq et al., 2020; Zheng et al., 2018). As BPCV melhoram a morfologia da raiz, aumentando o sistema radicular, aumentando a disponibilidade de água e nutrientes e produzindo metabólitos secundários para beneficiar as plantas (Ansari et al., 2021; N. Khan & Bano, 2019; Li et al., 2020). Portanto, essa estratégia constitui meio seguro e sustentável de mitigar o estresse abiótico, resultando em maior produtividade agrícola. (Phour & Sindhu, 2022).

O cultivo de batata (*Solanum tuberosum* L.) ocupa o quarto lugar em volume de produção depois do arroz, trigo e milho no mundo e fornece uma fonte barata de proteína, aminoácidos essenciais, carboidratos, antioxidantes e vitaminas (Duguma & Aga, 2019). Nessa cultura, o impacto benéfico de consórcios microbianos no crescimento e na produção já foi demonstrado e associado diretamente ao aumento da aquisição de nutrientes e modulação dos níveis hormonais das plantas ou indiretamente à produção de sideróforos, antibióticos, além do alívio a estresse biótico ou abiótico por meio da produção de enzimas como ACC deaminase e indução de resistência sistêmica (Pfeiffer et al., 2017; Trdan et al., 2019; Z. Wang et al., 2021).

Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi determinar se diferentes consórcios microbianos tem o potencial para promover o crescimento de plantas em condições *in vitro* e *in vivo*, e a produtividade de batata por meio da regulação de características fisiológicas, bioquímicas e agrônômicas sob estresse térmico. As bactérias utilizadas neste trabalho pertencem a alguns dos gêneros mais estudados na promoção do crescimento: *Azospirillum brasiliense* Ab-V5; *Rhizobium tropici* CIAT 899; *Bacillus subtilis* e *B. megaterium*. As combinações entre esses microrganismos podem servir como uma abordagem eficaz e sustentável para melhorar o crescimento, o conteúdo de nutrientes e as atividades enzimáticas da batata sob condições de estresse térmico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de crescimento *in vitro*.

Mudas de batata cv. Ágata foram micropropagadas por explantes nodais padronizados em 2 cm de comprimento com uma folha e uma gema lateral e foram cultivados em tubos com 15 mL de meio MS, mantidos a uma temperatura de 25 °C; fotoperíodo de 16 horas e intensidade de luz cerca de 40 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2 Bactérias utilizadas

Os microrganismos utilizados neste estudo foram *Azospirillum brasilense* Ab-v5 (CCMA 1291), *Bacillus megaterium* (CCMA 0004), *Bacillus subtilis* (CCMA0401) da Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, e *Rhizobium tropici* CIAT 899 cedido pelo laboratório de solo da Universidade Federal de Lavras. Em outros estudos, estas bactérias foram caracterizadas como produtoras de ácido indol acético, sideróforos, solubilizantes de fósforo e potássio e antagonistas contra fitopatógenos (Imada et al., 2017; Sagar et al., 2022; Silva et al., 2022).

2.3 Desenho experimental

O efeito dos consórcios microbianos no crescimento de micro plantas de batata foi estudado em experimentos *in vitro* durante 30 dias de crescimento. Foi estabelecido um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (3 consórcios bacterianos e o controle não inoculado) e 4 repetições. Cada repetição foi constituída por 6 mudas. Os tratamentos experimentais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos experimentais

Tratamento	Inóculo	Descrição do inóculo
Tratamento 1 (T1)	Ab-V5 + 0104	<i>Azospirillum brasilense</i> + <i>Bacillus subtilis</i>
Tratamento 2 (T2)	Ab-V5 + 0004	<i>Azospirillum brasilense</i> + <i>Bacillus megaterium</i>
Tratamento 3 (T3)	Ab-V5 + CIAT 899	<i>Azospirillum brasilense</i> +

Rhizobium tropici CIAT 899

Tratamento 4 (T4)	Sem inóculo	Água destilada estéril
-------------------	-------------	------------------------

2.4 Preparação de inóculos e biotização de explantes

O inóculo bacteriano foi preparado pela transferência de duas alças de cada bactéria para 7 ml de caldo nutriente e incubado a 25 °C a 120 rpm por 48 h. As células foram coletadas por centrifugação (530 g por 10 min) e lavadas duas vezes com água destilada estéril. O pellet foi ressuspenso em 10 mL de água e a concentração bacteriana foi ajustada para $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de acordo com a escala de McFarland. Para a preparação dos consórcios, foi utilizada a metodologia descrita por (Blanco et al., 2021), na qual cada inóculo bacteriano foi misturado na proporção de 1:1 e mantido em agitação por 20 minutos a 90 rpm em temperatura ambiente para homogeneizar a suspensão celular. Previamente foi realizado um teste de compatibilidade entre as bactérias. Seguidamente, explantes nodais com 7 dias de crescimento foram biotizados com 100 µL de cada consórcio microbiano. O controle foi inoculado com 100 µl de água destilada estéril. Os tubos foram lacrados com filme plástico e colocados na sala de crescimento por um período de 23 dias nas mesmas condições descritas anteriormente, completando assim 30 dias de crescimento em condições *in vitro*.

2.5 Medição de parâmetros de crescimento em microplantas, avaliação da taxa de sobrevivência e re-inoculação de plântulas.

Ao final de 30 dias em condições *in vitro*, oito microplantas de cada tratamento foram retiradas aleatoriamente dos tubos para medição do comprimento da parte aérea e da raiz (cm), massa fresca e seca da parte aérea e da raiz (mg) e número de nós. As raízes dessas plantas foram previamente lavadas para remover os resíduos do meio e secas com papel toalha.

Outro grupo de plantas (n= 16) foi plantado em vasos de 2 kg (uma plântula por vaso) com substrato estéril misturado com areia na proporção de 1:1 (v / v). A esterilização do substrato consistiu em três autoclavagens a 121 °C por 1 hora, com intervalos de 24 horas de manutenção a temperatura ambiente entre elas. Para manter uma câmara úmida e evitar a desidratação das micro plantas pela mudança de substrato e ambiente, uma sacola de polipropileno com furos foi colocada em cada vaso. A sacola foi removida por 2 horas

diariamente durante 2 dias. A taxa de sobrevivência foi avaliada sete dias após o transplante, quando as plântulas foram re-inoculadas com 3 mL dos consórcios microbianos. A irrigação foi realizada regularmente a cada 2 dias e fertilizadas uma vez por semana com 10 ml de solução Hoagland (Hoagland e Arnon,1950) a metade da potência conforme relatado por Jarstfer and Sylvia (1992). As plantas foram mantidas em casa de vegetação a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o dia e $15 \pm 1^\circ\text{C}$ à noite por 30 dias.

2.6. Tratamento de Estresse por Calor Gradual

O grupo de plantas transferidas para os vasos de 2 kg, foram utilizadas para o experimento de estresse térmico. O efeito da inoculação com consórcios microbianos no crescimento e adaptação de mudas de batata submetidas ao estresse pelo aumento de temperatura, foi avaliado na fase V3 do ciclo da batata (50-60 dias de crescimento), onde se inicia a estolonização e a formação do tubérculo. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados com três repetições (n=15). Os tratamentos experimentais incluíram:

Tratamento 1 (T1) = *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104)

Tratamento 2 (T2) = *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004)

Tratamento 3 (T3) = *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899)

Tratamento 4 (T4) = Não inoculado / com estresse

Tratamento 5 (T5) = Não inoculado / sem estresse

Cinco plantas de batata por tratamento foram selecionadas aleatoriamente e induzidas a estresse térmico durante 5 dias por meio da exposição a aumentos de temperaturas de 4 graus, iniciando com 26°C até 42°C (em diferentes intervalos de tempo e com 24 horas de recuperação). Este estresse gradual implementado permitiu diferenciar entre a resposta da planta em termos de “thermo-priming” e a resposta de plantas inoculadas com consórcios microbianos.

Finalmente, amostras de tecido vegetal foram coletadas em cada tratamento, após o estresse final de 30 min a 42°C , para as análises de pigmentos fotossintéticos, conteúdo relativo

de água, prolina e fenóis totais. Seguidamente, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação para a recuperação (ou liberação do estresse) a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 dias. Ao final do experimento, as plantas foram retiradas dos vasos para avaliar variáveis morfológicas como: comprimento da parte aérea e raiz (cm), biomassa fresca e seca (g) da parte aérea e raiz, número de estolões, número e peso de tubérculos (g). Amostras de tecido foliar e radicular também foram coletadas para análise de pigmentos fotossintéticos, conteúdo relativo de água, prolina, fenóis totais, conteúdo de hormônios (auxinas e ácido salicílico) e atividade antioxidante.

2.7 Pigmentos fotossintéticos

A extração da clorofila foi realizada conforme descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Quatro plantas por tratamento foram selecionadas aleatoriamente e a terceira folha contada a partir da ponta da planta foi coletada. As folhas foram coletadas em papel alumínio e mantidas em gelo. Posteriormente, 0,1 g de tecido foliar de cada amostra foi homogeneizado com 5 ml de acetona 80% (V/V) gelada. O extrato foi filtrado e o volume completado para 10 mL com acetona 80% (V/V). As absorbâncias foram medidas nos comprimentos de onda de 663 e 647 nm para clorofilas e 470 nm para carotenoides em um espectrofotômetro de microplaca (Thermo Scientific™ Multiskan™). As clorofilas A, B e total foram quantificadas usando as equações 1, 2 e 3. E o conteúdo de carotenoides foi calculado usando a equação 4 (Lichtenthaler e Wellburn, 1983).

Equação 1= Clorofila a: $12.25 \times (A_{663}) - 2,79 \times (A_{647})$

Equação 2= Clorofila b: $21.50 \times (A_{647}) - 5.10 \times (A_{663})$

Equação 3= Clorofila total: clorofila a + clorofila b

Equação 4= Carotenoides: $(1000 \times (A_{470}) - 1.82 \times Ca - 85.02 \times Cb) / 198$

2.8 Conteúdo Relativo de Água da folha

O conteúdo de água foi determinado em folhas jovens totalmente expandidas de quatro plantas de cada tratamento seguindo a método de (Zeng et al., 2013). As folhas foram secas a 70°C por 48 h. O conteúdo médio de água foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Conteúdo de água} = [(\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / \text{peso fresco}] \times 100$$

2.9 Fenóis totais

Os compostos fenólicos solúveis totais foram estimados utilizando o método de (Singleton & Rossi, 1965) usando catecol como padrão. As folhas foram coletadas em papel alumínio e mantidas em gelo, posteriormente 100 mg do tecido foliar foram triturados com 3 ml de metanol a 80% (V/V) num almofariz arrefecido. O extrato obtido foi centrifugado a 7500 g por 15 min. O sobrenadante foi utilizado para medir a quantidade de compostos fenólicos usando uma mistura composta por 30 µl de extrato de cada amostra, 120 µl de carbonato de sódio 7% (Na₂CO₃) e 150 µl de reagente Folin-Ciocalteu 50% v/v, e protegida da luz por 30 min. A absorbância foi lida a 765 nm em um espectrofotômetro de microplaca (Thermo Scientific™ Multiskan™). A solução de trabalho de catecol foi preparada nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 140 µg.mL.

2.10 Conteúdo de prolina

Uma extração com ácido sulfosalicílico a 3% foi preparada a partir de 100 mg de tecido vegetal seco e 10 mL do extrator, incubados à temperatura ambiente por 60 min.

Para a determinação de prolina, 1 mL de reagente de ninidrina ácida recém-preparado (2,5 g de ninidrina dissolvidos em 60 mL de ácido acético e 40 mL de ácido fosfórico) foi misturado com 0,5 mL do extrato da planta e aquecido a 100 °C por 60 minutos. Finalmente, a absorbância foi medida a 520 nm. O conteúdo de prolina foi estimado comparando a absorbância com uma curva padrão de L-prolina (Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos em µmolg⁻¹.

2.11 Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica

A concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinada de acordo com Velikova e colaboradores (2000). Para isso, amostras de folhas e raízes previamente maceradas em nitrogênio líquido com polivinilpirrolidona (PVPP) foram homogeneizadas com 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. O homogeneizado foi centrifugado a 840 g por 10 minutos. Posteriormente, alíquotas de 90 µL do sobrenadante foram adicionados de 45 µL de tampão fosfato 10 mM (pH 7) e 90 µL de iodeto de potássio 1 M (IK). A concentração de H₂O₂ do sobrenadante foi calculada comparando sua absorbância a 390 nm com uma curva de calibração padrão de H₂O₂ (250µM) e a concentração foi expressa como µmol g biomassa⁻¹.

A peroxidação lipídica foi realizada de acordo com o protocolo de Buege & Aust, (1978), quantificando no espectrofotômetro o complexo formado entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA) que deriva da degradação lipídica devido à sua peroxidação. A quantificação da complexo formado foi feita a 535 nm e 600 nm, e expressa em nmol de malondialdeído (MDA) por grama de biomassa ($\text{nmol g}_{\text{biomassa}}^{-1}$).

2.12 Proteínas e enzimas antioxidantes

Para análise de proteínas e enzimas, 200 mg de tecidos vegetais (folha e raiz) foram moídos em almofariz com nitrogênio líquido e 0,1% de PVPP até obter um pó fino. Seguidamente, foi adicionado 1,5 mL de tampão (fosfato de potássio 400 mM, pH 7,8; EDTA 10 mM e ácido ascórbico 200 mM). A mistura foi centrifugada a 840 g por 10 minutos. O sobrenadante foi imediatamente coletado e congelado a -20°C para ser usado na quantificação de proteínas e enzimas antioxidantes (Biemelt et al., 1998).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) EC, EC (1.15.1.1) foi determinada de acordo com o método proposto por Giannopolitis & Ries (1977) com base na capacidade dessa enzima de inibir a redução química do azul de nitro-tetrazólio (NBT) induzida pela luz. A atividade enzimática foi determinada a 560 nm em um espectrofotômetro de microplaca (Thermo Scientific™ Multiskan™). Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibiu em 50% a redução química (fotooxidação) do NBT induzida pela luz e expressa como uma unidade de enzima mg^{-1} de proteína.

A atividade da catalase (CAT, EC. 1.11.1.6) foi avaliada seguindo a cinética do consumo de H_2O_2 a 240 nm; 15 em 15 segundos por 3 min, de acordo com o método estabelecido por Havir & McHale (1987). A atividade da CAT foi calculada com base no coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e relatado como milimoles de H_2O_2 reduzido $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade de ácido ascórbico peroxidase (APX, EC. 1.11.1.11) foi determinada avaliando as mudanças de absorbância a 290 nm em períodos de 15 em 15 segundos por 3 min, seguindo a metodologia descrita por Nakano & Asada (1981). A atividade APX foi calculada com base no coeficiente de extinção molar do ascorbato ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressa em milimoles de ascorbato oxidado $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Para a determinação de proteína solúvel, foi usando o método de Bradford com o reagente Comassie-blue G-250. A leitura foi feita a 595 nm e uma curva padrão foi feita com albumina de soro bovino (Bradford, 1976).

2.13 Quantificação de hormônios endógenos (auxinas e ácido salicílico) em plantas de batata inoculadas e sob estresse térmico.

Cinco repetições para cada tratamento foram usadas para analisar os hormônios endógenos em folhas de batata cv Ágata após de 10 dias de recuperação do estresse térmico.

A extração e quantificação de auxinas (AIA) foi realizada conforme o protocolo descrito por Anthony & Street (1970). O material vegetal (60 mg de tecido foliar fresco) foi moído em um almofariz com nitrogênio líquido e foi ressuspensionado em tampão Na-fosfato 0,01 M, pH 7. A absorbância do sobrenadante foi medida a 530 nm em um espectrômetro de microplaca (Thermo Scientific™ Multiskan™). O branco consistiu em tampão Na-fosfato 0,01 M, pH 7. Uma curva padrão foi realizada com AIA comercial. Os resultados obtidos foram expressos em μg de AIA por mg de tecido fresco ($\mu\text{g AIA}\cdot\text{mg}^{-1}\text{biomassa fresca}$).

Para a determinação do ácido salicílico (AS) endógeno, foram utilizados 100 mg de tecido vegetal de acordo com o protocolo proposto por Paul & Vineetha (2014) e modificado por El-Alwany & Banni (2022). O método do cloreto férrico baseia-se na reação do ácido salicílico com cloreto férrico (FeCl_3) para formar um complexo colorido (salicilato férrico). A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de ácido salicílico presente na amostra. A quantificação foi realizada medindo-se a absorbância do complexo no comprimento de onda de 540 nm, o branco utilizado foi o etanol puro. Previamente foi realizada uma curva padrão de ácido salicílico comercial dissolvido em etanol nas concentrações de 5,10,15,20,30,40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.14 Análise estatística

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Posteriormente, foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com um nível de significância de $p < 0,05$ utilizando o software INFOSFAT (Di Rienzo et al., 2020). Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Os gráficos foram plotados usando o software INFOSFAT.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito da biotização com consórcios microbianos no crescimento de micro plantas de batata cv Ágata.

A promoção do crescimento das micro plantas inoculadas com os consórcios microbianos foi evidente. Em relação à parte aérea, os consórcios T2 (*A. brasilense* Ab-V5+B. *megaterium*) e T3 (*A. brasilense* Ab-V5+*R. tropici* CIAT 899) promoveram significativamente o crescimento das micro plantas, com aumentos do comprimento em 55 e 50% em relação às micro plantas não inoculadas. O comprimento da raiz foi ainda mais promovido com o consórcio (*A. brasilense* Ab-V5+B. *megaterium*), com aumentos significativos de 2 vezes em relação ao comprimento das micro plantas não inoculadas. O consórcio T3 (*A. brasilense* Ab-V5+*R. tropici* CIAT 899) aumentou 1.5 vez e o tratamento T1 (*A. brasilense* Ab-V5+B. *subtilis*) não resultou em diferenças significativas comparado ao controle (Fig.1A). Com relação à biomassa seca da parte aérea, os mesmos tratamentos T2 e T3 apresentaram aumentos de 70 e 55% respectivamente e na biomassa da raiz o aumento foi de 50 e 39% em comparação ao controle (Fig. 1B). Os diferentes efeitos dos consórcios microbianos na promoção do crescimento de micro plantas de batata podem ser observados na figura 1C.

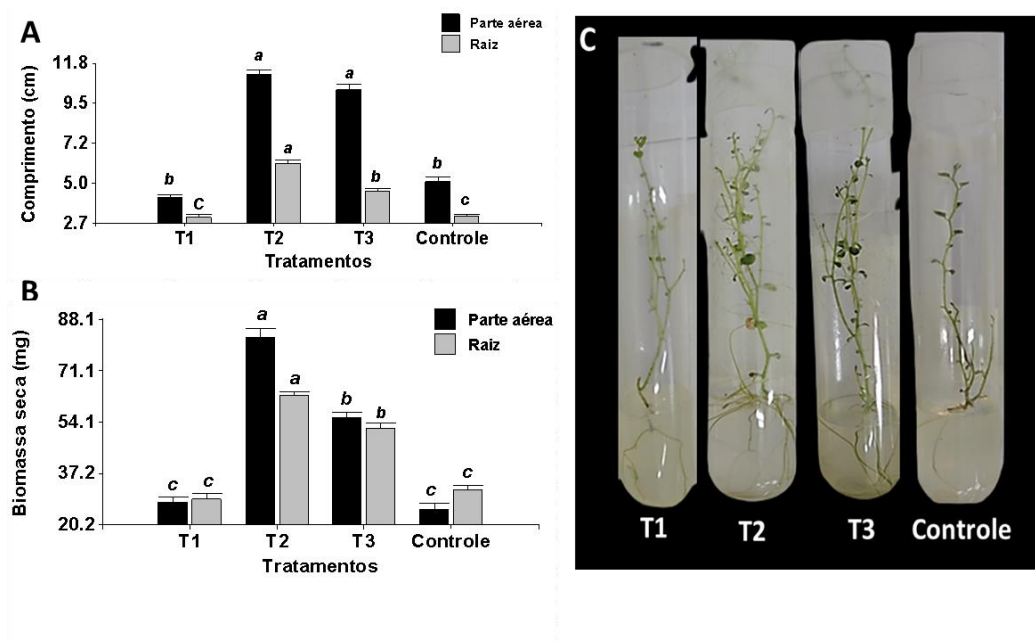


Figura 1. Efeito da biotização no crescimento de micro plantas de batata cv Ágata após de 30 dias em condições *in vitro*. (A) Comprimento da parte aérea e raiz, (B) biomassa seca da parte aérea e raiz e (C) fotografia do

desenvolvimento das micro plantas biotizadas e comparadas com o controle não inoculado. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899) e **Controle:** Não inoculado. Médias com letra comum não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) $n=8$.

Em relação ao número de nós o consórcio *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* beneficiou o crescimento do caule das micro plantas, aumentando o número de nós em até 1,5 vez em comparação às micro plantas não inoculadas, seguido do consórcio *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899 com incrementos de 1,3 vez. O tratamento T1 (*A. brasilense* Ab-V5+B. *subtilis*) não resultou em diferenças significativas em relação ao controle (Fig. 2A).

Quando as micro plantas de batata foram transferidas de condições *in vitro* para *in vivo*, a sobrevivência do grupo controle foi de $70\pm 8\%$ (Fig. 2B) e a inoculação dos consórcios microbianos (T1, T2 e T3) aumentou significativamente a sobrevivência. A porcentagem maior foi com o consórcio T2 (*A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium*), com $87\pm 5\%$, seguido pelo consórcio T3 (*A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899) com $83 \pm 3\%$, correspondendo a aumentos na adaptação das plantas de 1,2 e 1,1 vez, respectivamente (Fig. 2B). O tratamento T1 não teve diferenças significativas em relação ao controle e os outros tratamentos.

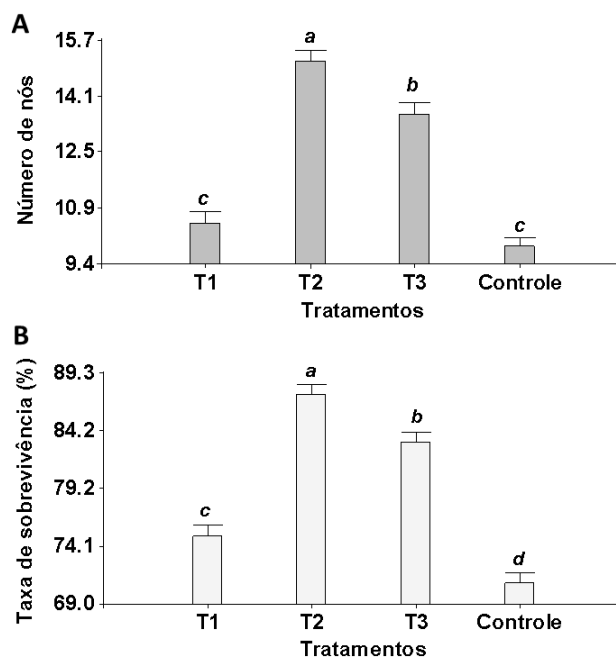


Figura 2. Efeito da biotização no número de nós e taxa de sobrevivência de micro plantas de batata cv Ágata após de 30 dias em condições *in vitro*. (A) Número de nós e (B) taxa de sobrevivência. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899) e **Controle:** Não inoculado. Médias com letra comum não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) $n=8$.

3.2 Consórcios microbianos regulam o crescimento da batata sob estresse térmico.

Nossos resultados mostraram que apesar do aumento no estresse térmico, o tratamento T2 (*A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium*) promoveu aumento de 1,3 vez no comprimento da parte aérea e 15 vez na raiz em relação ao T4 não inoculado sob estresse, e ainda aumento significativo de 12 vez no crescimento da raiz, em comparação com o controle não inoculado e sem estresse (T5) (Fig. 3). Da mesma forma, o tratamento T3 (*A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899) diferiu de forma significativa com o tratamento controle sob estresse, de 11 vez na parte aérea e 1,2 na raiz. O consórcio T1 (*A. brasilense* Ab-V5 + *B. subtilis*) foi afetado negativamente pelo estresse térmico, apresentando valores iguais ao controle não inoculado sob estresse (Fig. 3A). Da mesma forma, a interação planta-microrganismo dos tratamentos T2 e T3 reverteu o efeito negativo do estresse térmico sobre a biomassa seca, pois causou aumentos de 2 e 1,6 vezes, respectivamente, na biomassa aérea, e de 3 e 2 vezes na raiz em comparação com o controle não inoculado sob estresse (T4) (Fig. 3B).

Os tubérculos coletados após 10 dias de recuperação do estresse térmico do tratamento com o consórcio *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* apresentou quantidade e peso significativamente maiores (7,6 e 4,79 respectivamente) que os das plantas do controle, sugerindo efeito benéfico na formação e enchimento de tubérculos em plantas submetidas a estresse térmico. O sinergismo deste consórcio com a planta se reflete no aumento do número de tubérculos em 21% e no seu peso de 16% em comparação com as plantas não inoculadas e sem stress (Fig. 3C e D). O tratamento T3 também apresentou diferenças significativas em relação ao controle não inoculado e sob estresse, enquanto o consórcio T1 não apresentou diferenças com os controles. As diferenças nos atributos de crescimento e produção de plantas de batata entre consórcios microbianos e controles são representadas na Figura 3E.

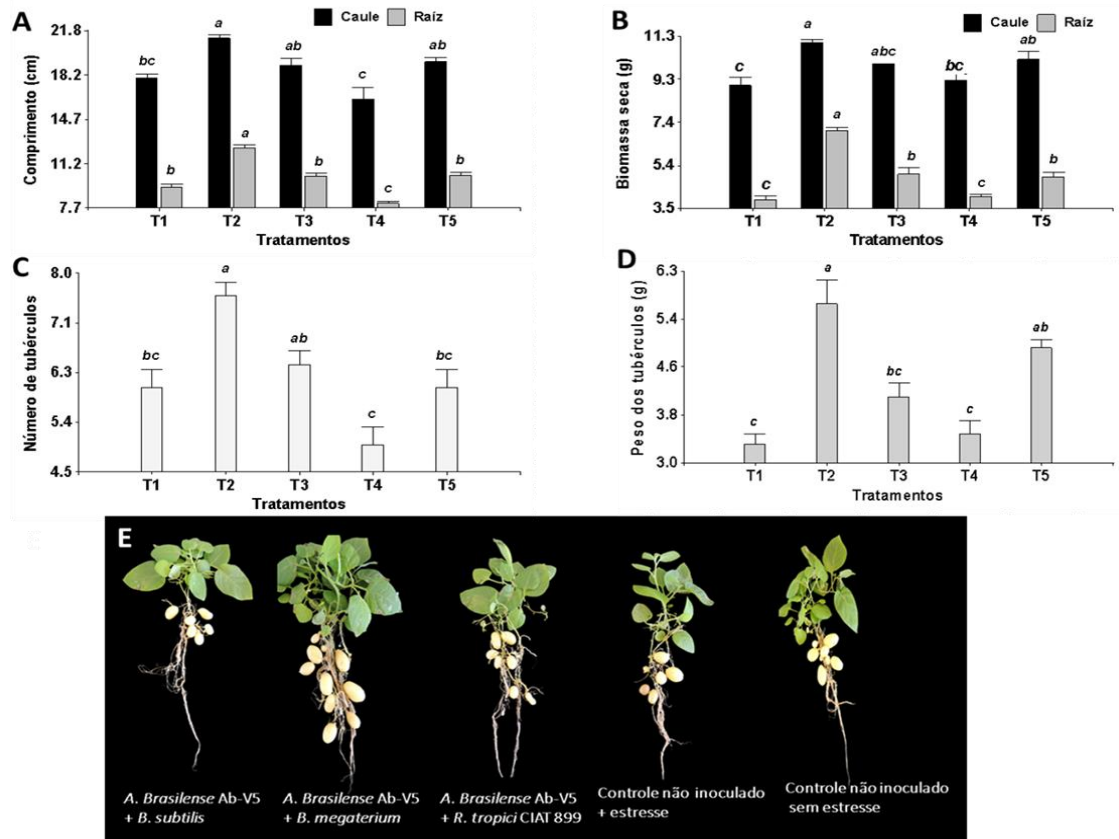


Figura 3. Efeito da inoculação com consórcios microbianos no crescimento e produção de plantas de batata cv Ágata submetidas a estresse gradual térmico, com 60 dias de crescimento e avaliadas após de 10 dias de recuperação ao estresse. (A) Crescimento (B) biomassa seca (C) número de tubérculos (D) peso de tubérculos e (E) fotografia do desenvolvimento das plantas inoculadas e comparadas com o controle não inoculado com estresse e não inoculado sem estresse. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. Médias com letra comum não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) $n=5$.

A formação dos tubérculos foi resultado do desenvolvimento dos estolões nas plantas de batata, onde ocorre um espessamento na ponta dos estolões que dão origem aos tubérculos. O maior número de estolões (3,8 estolões em média) formados nas plantas inoculadas com o consórcio *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* também explica o maior número de tubérculos neste tratamento. Os demais consórcios não diferem significativamente dos controles (Fig.

4A). A Figura 4B mostra uma fotografia comparando o tratamento T2 *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* com os controles não inoculados sob estresse e sem estresse.

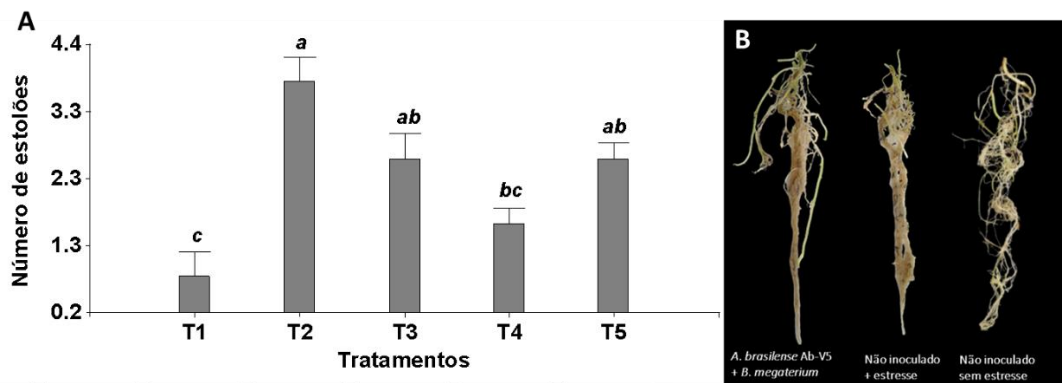


Figura 4. Efeito da inoculação com consórcios microbianos na formação de estolões em plantas de batata cv Ágata submetidas a estresse gradual térmico, com 60 dias de crescimento e avaliadas após de 10 dias de recuperação ao estresse. (A) Número de estolões (B) fotografia da formação de estolões das plantas inoculadas e comparadas com o controle não inoculado com estresse e não inoculado sem estresse. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. Médias com letra comum não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) $n=5$.

3.3 Influência dos consórcios microbianos no teor de clorofila total, carotenoides e conteúdo relativo de água em extratos de folha de batata após do estresse e após dez dias de recuperação em casa de vegetação.

A inoculação com consórcios microbianos não proporcionou diferenças significativas no teor de clorofila total avaliado no último estresse. No entanto, após 10 dias de recuperação, as plantas inoculadas com os tratamentos T2 (*A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium*) e T3 (*A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899) aumentaram a produção total de clorofila em 49 e 35%, respectivamente, em comparação com as plantas controle não inoculadas sob estresse (T4), também o tratamento T2 aumentou 1,6 vez o teor de clorofila em comparação com o tratamento não inoculado sem estresse (T5) (Fig. 5A).

Em relação ao teor de carotenoides, não houve diferenças significativas entre os consórcios microbianos e os controles na fase de estresse. Já na fase de recuperação, o maior valor foi observado nas plantas controle sem estresse (T5) com média de 1.27 mg g^{-1} . Os consórcios *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* e *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899 tiveram valores com diferenças significativas em comparação com as plantas controle sob estresse (Fig. 5B).

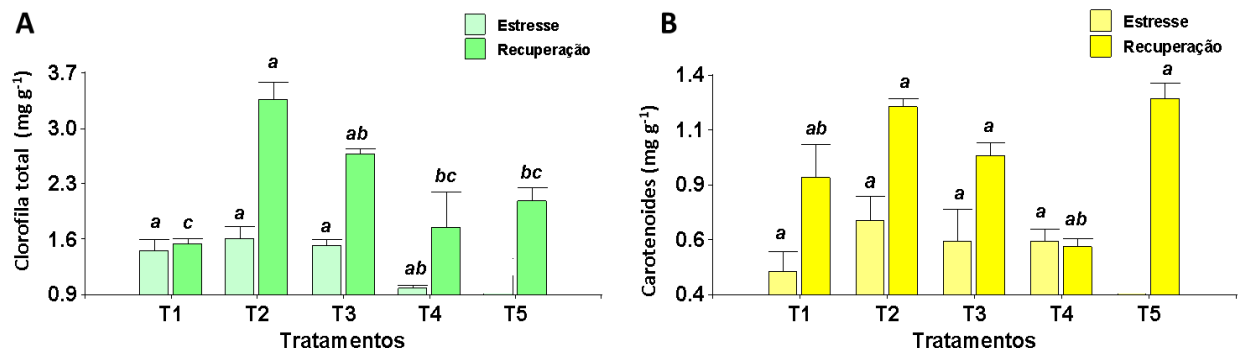


Fig. 5 Efeitos da inoculação de consórcios microbianos sobre (A) teor de clorofila total (B) carotenoides em plantas de batata mantidas sob condições de estresse térmico e após 10 dias de recuperação em casa de vegetação. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. As barras claras representam o estresse térmico e as escuras representam a fase de recuperação. Os valores (média ± erro padrão) de cada tratamento foram obtidos a partir de três repetições biológicas (n = 3). Letras diferentes representam dados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05)

Como esperado, o maior conteúdo relativo de água nas folhas foi observado nas plantas controle não estressadas (94%) se comparado àquele das plantas sob estresse. Os conteúdos de água dos tratamentos T2 (*A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium*) e T3 (*A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899) foram significativamente maiores àqueles do controle não inoculado sob estresse, na ordem de 83,5 e 83 %, respectivamente. Tanto o tratamento inoculado com *A. brasilense* Ab-V5 + *B. subtilis* (T1) quanto o controle não inoculado (T4) foram afetados negativamente pelo estresse térmico. Na fase de recuperação, dos tratamentos inoculados (T1 e T2) tiveram diferenças significativas com o controle não inoculado sob estresse (Fig. 6).

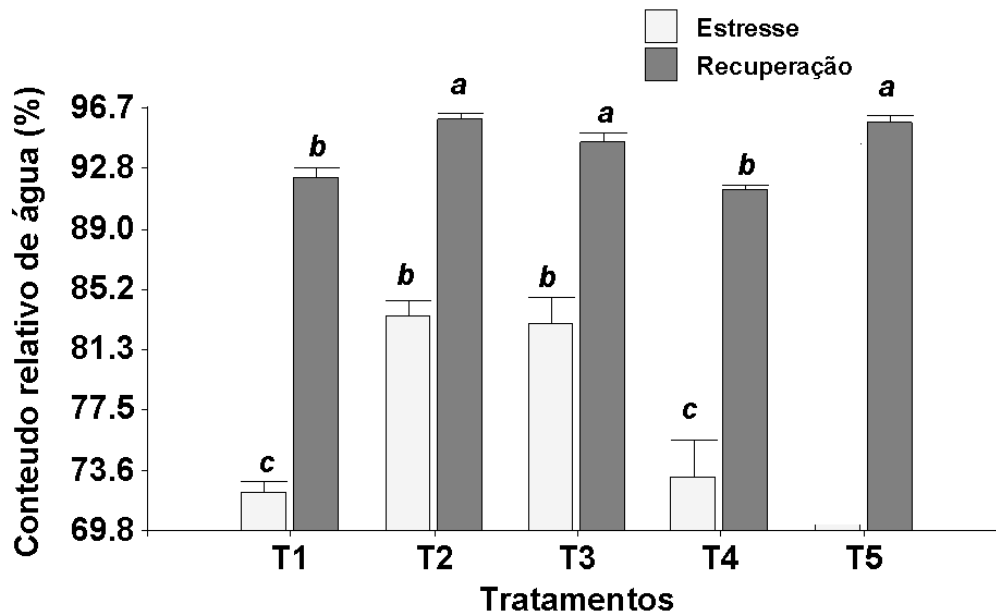


Fig. 6 Efeitos da inoculação de consórcios microbianos sobre o conteúdo relativo de água em plantas de batata mantidas sob condições de estresse térmico e após 10 dias de recuperação em casa de vegetação. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. Os valores (média \pm erro padrão) de cada tratamento foram obtidos a partir de três repetições biológicas (n = 3). Letras diferentes representam dados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05)

3.4 Estimativa de atividades antioxidantes não enzimáticas e enzimáticas em plantas de batata inoculadas e não inoculadas após estresse térmico.

3.4.1 Efeito de consórcios bacterianos no acúmulo de osmólitos (prolina), carotenoides e conteúdo de fenóis totais.

O teor de prolina foi menor nas plantas não inoculadas sob estresse e com o consórcio *A. brasilense* Ab-V5 + *B. subtilis* (T1). No entanto, a inoculação de *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* (T2) e *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899 (T3) melhorou significativamente a síntese de osmólitos na condição de estresse, aumentando em 2 vezes o teor de prolina com o consórcio T2. Na fase de recuperação, apesar da diminuição do teor de prolina, os tratamentos T2 e T3 mantiveram diferenças significativas em relação aos controles não inoculados sob estresse e sem estresse (Tabela 2).

Os carotenoides são pigmentos naturais encontrados nas plantas e desempenham um papel importante na proteção contra o estresse oxidativo. Durante o estresse térmico, as plantas dos tratamentos T2 (*A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium*) e T3 (*A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899) aumentaram a produção de carotenoides 1,7 e 1,2 vez respectivamente, como um efeito positivo para a planta se protegerem contra os danos causados pelos radicais livres. O tratamento T1 (*A. brasilense* Ab-V5 + *B. subtilis*) não se diferenciou significativamente dos controles não inoculados sob estresse e sem estresse. Na fase de recuperação, as plantas diminuíram os teores de carotenoides, porém o consórcio T2 manteve diferenças significativas com todos os outros tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Teor de prolina e compostos fenólicos em folhas de plantas de batata inoculadas e não inoculadas sob estresse térmico e após 10 dias de recuperação em casa de vegetação. Letra diferente significa diferença significativa ($p < 0,05$) ($n=3$)

Tratamentos	Condições de Estresse		Condições de recuperação	
	Prolina ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ tecido foliar)	Fenóis totais (eq.catecol. mg^{-1} tecido foliar)	Prolina ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ tecido foliar)	Fenóis totais (eq.catecol. mg^{-1} tecido foliar)
(T1) <i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	9.80 \pm 0.40 ^c	9.26 \pm 0.6 ^c	6.00 \pm 0.28 ^d	7.22 \pm 0.2 ^{bc}
(T2) <i>A. brasilense</i> + <i>B. megaterium</i>	17.60 \pm 0.41 ^a	14.22 \pm 0.12 ^a	15.20 \pm 0.36 ^a	12.01 \pm 0.1 ^a
(T3) <i>A. brasilense</i> + <i>R. tropici</i> CIAT 899	13.40 \pm 0.40 ^b	10.28 \pm 0.07 ^b	10.20 \pm 0.28 ^b	8.36 \pm 0.3 ^b
(T4) Controle não inoculado + estresse	9.20 \pm 0.39 ^{cd}	8.05 \pm 0.8 ^{cd}	5.80 \pm 0.20 ^d	6.9 \pm 0.8 ^c
(T5) Controle não inoculado sem estresse	7.60 \pm 0.40 ^d	9.01 \pm 0.2 ^c	8.20 \pm 0.36 ^c	8.14 \pm 0.3 ^b

3.4.2 Acúmulo de peróxido de hidrogênio e malondialdeído

O acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA) foi medido nas folhas e raiz das plantas inoculadas e não inoculadas após 10 dias de recuperação do estresse térmico como um indicador de estresse oxidativo. Plantas inoculadas com o consórcio *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* (T2) apresentaram níveis significativamente reduzidos de 5.18 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ na folha e 3.48 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ na raiz, enquanto o consórcio *A. brasilense*

Ab-V5 + *B. subtilis* (T1) e plantas não inoculadas sob estresse térmico (T4) acumularam 7,14 e 11,5 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ nas folhas e concentraram na raiz valores de 7,06 e 10,82 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ respectivamente (Figura 7A).

O malondialdeído (MDA) é o produto da peroxidação lipídica e pode servir como um marcador de estresse oxidativo. As plantas de batata do tratamento T2 e T3 também apresentaram níveis inferiores de de MDA em condições de estresse térmico tanto na folha quanto na raiz, em relação aos controles, observando-se uma maior redução no tecido radicular (Fig. 7B). O consórcio *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* (T2) foi mais eficaz, proporcionando uma redução com valores de 5,03 na folha e 3,99 $\mu\text{mol MDA g}^{-1}$ na raiz, do que nas plantas controle não inoculadas sob estresse, que tiveram valores de 16,04 nas folhas e 15,48 $\mu\text{mol MDA g}^{-1}$ na raiz. Em temperaturas normais (T5), as plantas apresentaram valores intermediários de 5,08 na folha e 5,22 $\mu\text{mol MDA g}^{-1}$ na raiz.

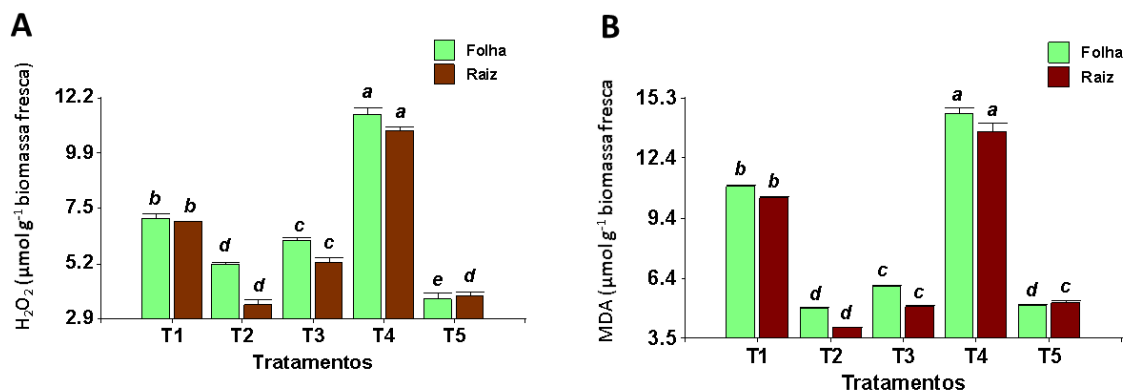


Fig. 7 Efeitos da inoculação de consórcios microbianos no acúmulo de (A) Peroxido de hidrogênio (B) malondialdeído em plantas de batata após 10 dias de recuperação ao estresse térmico. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. Os valores (média \pm erro padrão) de cada tratamento foram obtidos a partir de cinco repetições biológicas (n = 5). Letras diferentes representam dados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05)

3.4.3 Capacidade de regulação de Antioxidantes enzimáticos por consórcios microbianos em plantas de batata sob estresse térmico.

Na atividade da superóxido dismutase (SOD), os resultados indicaram que houve aumento da atividade enzimática em todas as plantas sob estresse. No entanto, uma melhora significativa na atividade de SOD de plantas tratadas com *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* (T2) e *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899 (T3) foi observada em comparação com plantas de controle de estresse térmico, com aumento de 1,2 vez nas folhas e aumento de 1,3 vez nas raízes (Fig. 8A).

As plantas acumularam maiores quantidades de H_2O_2 e MDA durante o estresse térmico. Portanto, espera-se que a atividade da enzima catalase (CAT) também aumente. Como pode ser visto na figura (Fig. 8B) a atividade CAT teve aumentos de 23% nas folhas e 25% nas raízes com o consorcio *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* (T2) em comparação com as plantas não inoculadas e sob estresse. Sem estresse, as plantas não inoculadas apresentaram valores médios de 112 Unidades de CAT (mg^{-1} de proteína) nas folhas e raízes. Na enzima Ascorbato peroxidase (APX) em comparação com as plantas controle sob estresse térmico, observou-se uma melhora significativa dessa enzima nas plantas de batata inoculadas com o tratamento *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* (T2) e *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899 (T3) onde a quantidade da enzima quase dobrou. O consorcio *A. brasilense* Ab-V5 + *B. subtilis* (T1) não teve diferenças significativas com os controles (Fig. 8C). O conteúdo de proteína solúvel também aumentou nas plantas de batata sob estresse (Fig. 8D). Maior produção de proteína foi observada nas plantas tratadas com o consórcio T2 apresentando aumentos de 41% nas raízes e 34% nas folhas. Tanto nas enzimas quanto no teor de proteína, observou-se uma tendência de maior efeito benéfico dos consórcios na raiz.

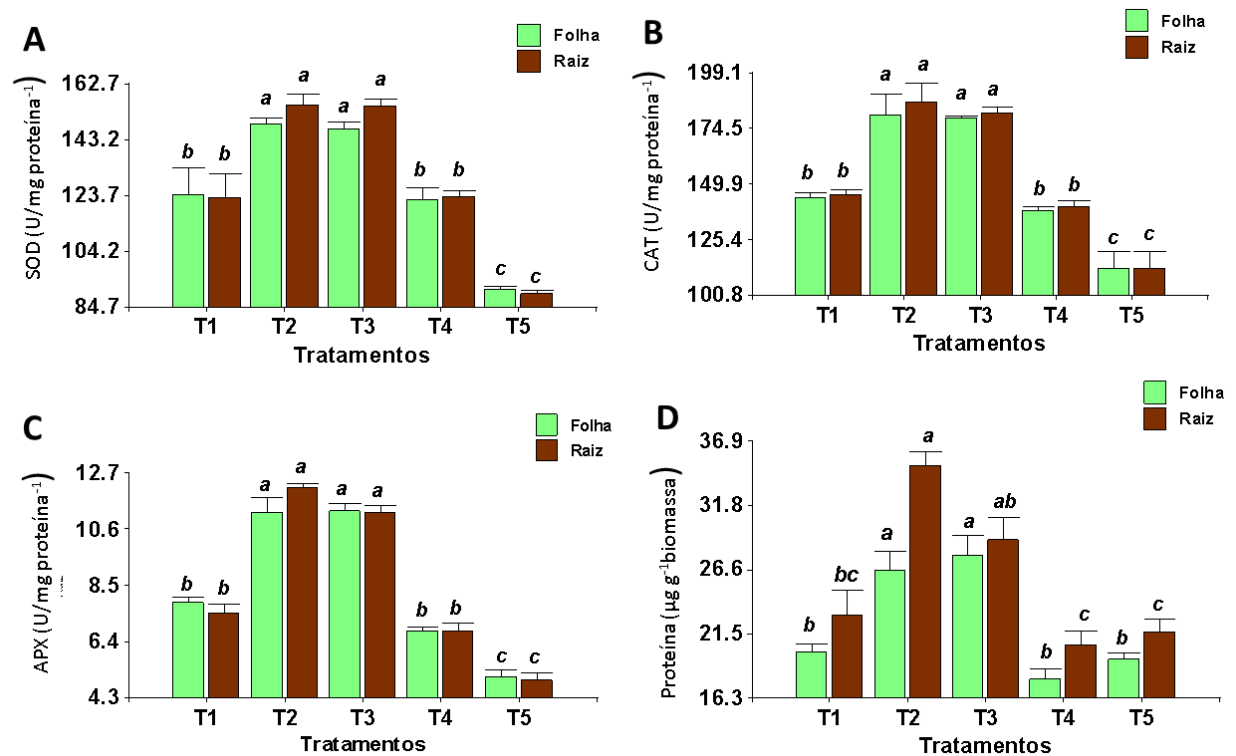


Fig. 8 Efeitos da inoculação de consórcios microbianos na atividade enzimática em plantas de batata após 10 dias de recuperação ao estresse térmico. (A) SOD (B) CAT (C) APX (D) proteína. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. Os valores (média ± erro padrão) de cada tratamento foram obtidos a partir de cinco repetições biológicas (n = 5). Letras diferentes representam dados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05)

3.5 Efeitos dos consórcios microbianos no conteúdo de hormônios endógenos de plantas de batata após sua recuperação.

Os teores de auxina endógena (AIA) e ácido salicílico foram avaliados em tecido foliar das plantas de batata inoculadas e não inoculadas após 10 dias de recuperação do estresse térmico (Fig.9). Os resultados das auxinas mostraram um aumento significativo no teor de AIA nos tratamentos *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* (T2) e *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899 (T3) (1,3 e 1,2 vez, respectivamente), enquanto o consórcio T1 (*A. brasilense* Ab-V5 + *B. subtilis*) não apresentou diferenças significativas com os controles. O conteúdo de ácido salicílico apresentou uma resposta diferente, uma vez que nenhum dos consórcios bacterianos resultou em diferenças significativas em relação aos controles.

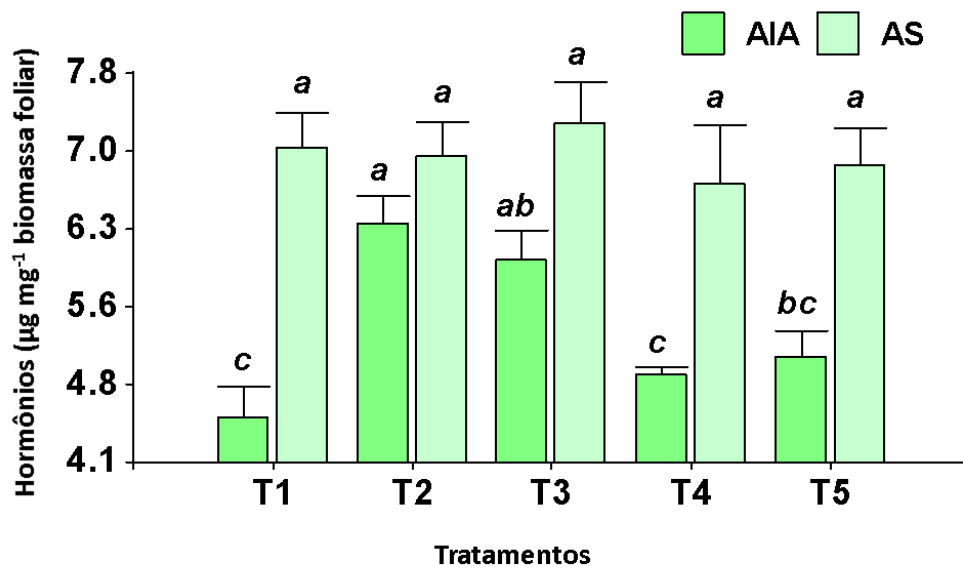


Fig. 9 Conteúdo de hormônios endógenos (auxinas e ácido salicílico) em plantas de batata após 10 dias de recuperação ao estresse térmico. **T1:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* (Ab-V5 + 0104); **T2:** *Azospirillum brasilense* + *Bacillus megaterium* (Ab-V5 + 0004); **T3:** *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* (Ab-V5 + CIAT 899); **T4:** Não inoculado/com estresse e **T5:** Não inoculado/sem estresse. Os valores (média ± erro padrão) de cada tratamento foram obtidos a partir de cinco repetições biológicas (n = 5). Letras diferentes representam dados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05)

4. DISCUSSÃO

4.1 Promoção de crescimento de micro plantas biotizadas com consórcios microbianos

Em nosso estudo, foi evidenciado o benefício da biotização com consórcios microbianos baseados em *Azospirillum brasilense* Ab-V5 combinado com as bactérias *Bacillus megaterium* e *Rhizobium tropici* CIAT899, tanto na promoção do crescimento quanto na adaptação das micro plantas às condições *in vivo*. O tratamento T2 (*Azospirillum brasilense* Ab-V5+ *Bacillus megaterium*) se destacou em todos os parâmetros avaliados em condições *in vitro*, com destaque no maior desenvolvimento radicular que poderia ter influenciado uma maior porcentagem de plantas adaptadas às condições *in vivo*. A sobrevivência das micro plântulas após o transplante é fator determinante da viabilidade econômica do uso da técnica de micropropagação (Kargapolova et al., 2020). Diferentes argumentos têm sido propostos para explicar como as rizobactérias beneficiam as plantas. Elas incluem sua capacidade de produzir fitohormônios ou reguladores de crescimento, como ácido indol acético (AIA), citocininas e giberelinas (Albdaiwi et al., 2019).

4.2 Influência de consórcios microbianos no crescimento e produção de plantas de batata sob estresse térmico

A batata é sensível ao calor e seu crescimento, rendimento e qualidade do tubérculo são fortemente influenciados pelo estresse térmico. Altas temperaturas causam alterações anatômicas, fisiológicas, morfológicas e moleculares (Trapero-Mozos et al., 2018) e o uso de microrganismos promotores de crescimento está sendo cada vez mais estudado para neutralizar seus efeitos (Khan et al., 2020). Em nosso trabalho, os consórcios formados pelas cepas *A. brasilense* Ab-V5 e *B. megaterium* exerceram efeitos positivos nas características morfológicas das plantas de batata, o que confirma que o estado fisiológico das plantas inoculadas com este consórcio poderia, portanto, ser uma explicação para a maior tolerância ao estresse térmico. Da mesma forma, foi observada variação na produtividade de tubérculos das plantas inoculadas e não inoculadas após o estresse, expressa pelas diferenças no número de tubérculos e seus pesos. As plantas tratadas com os consórcios *A. brasilense* Ab-V5 com *B. megaterium* e *R. tropici* CIAT 899 apresentaram capacidade de sustentar maior número de tubérculos e com maior peso, apesar da implementação do estresse térmico na fase fenológica de formação de estolões e enchimento de tubérculos. Os benefícios desses consórcios podem ser por seus mecanismos de ação na promoção do crescimento, como é a produção de fitohormônios.

As BPCV promovem o crescimento e rendimento das plantas através de vários mecanismos (Kaushal & Wani, 2016). Algumas cepas (por exemplo, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*) modulam diretamente a fisiologia da planta através da biossíntese de hormônios vegetais e produção de enzimas como a ACC deaminase; outras aumentam a absorção de nutrientes e nitrogênio sob condições estressantes, avaliaram duas cultivares de batata sob estresse hídrico, a cultivar Santae (tolerante à seca) e a cv PRI-Red (sensível à seca) e foram inoculadas com *Bacillus subtilis* HAS31, mostrando o efeito benéfico da cepa altamente significativo no crescimento da cultura e na produção de tubérculos. No entanto, em nosso trabalho, o consórcio formado pelas cepas *A. brasilense* Ab-V5 e *B. subtilis* produziu efeito negativo tanto na fase *in vitro* das plantas de batata quanto durante o estresse. Essa diminuição pode ser devido à interferência negativa nos mecanismos de interação entre plantas e o consórcio, bem como possíveis interações negativas

entre as próprias bactérias, um vez que o uso de *Azospirillum* em outras combinações foi benéfico (Lobo et al., 2023).

4.3 Compostos modulados por consórcios microbianos envolvidos na tolerância ao estresse térmico em plantas de batata

A clorofila serve como um indicador valioso da saúde geral da planta (Padilla et al., 2018). Em nossa pesquisa, o teor de clorofila total diminuiu nas folhas de todas as plantas submetidas ao estresse térmico. O tratamento T2 (*A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium*) teve uma diminuição de 23% em comparação com as plantas controle não inoculadas e não estressadas. Entretanto, comparando o tratamento T2 com as plantas não inoculadas e sob estresse, o teor de clorofila foi 1.7 vezes maior, demonstrando que a taxa de degradação total da clorofila em plantas tratadas com o consorcio T2 foi mais lenta do que em plantas sem inoculação. Na fase de recuperação, dois consórcios microbianos (*A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* e *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899) aumentaram significativamente o conteúdo de clorofila total com valores máximos de 39%. O teor de carotenoides tanto na fase de estresse quanto de recuperação, não tiveram diferenças significativas. Barbosa et al. (2008) relataram que, de maneira geral, o teor de carotenoides é mais baixo em relação aos demais pigmentos fotossintetizantes.

Em outros estudos, foi demonstrado que um consórcio entre *B. subtilis*, *B. thuringiensis* e *B. megaterium* aumentaram significativamente as atividades metabólicas, incluindo clorofila, riboflavina, L-asparagina e conteúdo de aspartato, em plantas de grão de bico (*Cicer arietinum*) sob estresse hídrico (Meenakshi et al., 2019).

A capacidade das BPCV de melhorar o teor de água em plantas estressadas tem sido relacionada principalmente ao aumento de reguladores de crescimento, como auxinas e ácido abscísico, nas plantas, bem como à produção de solutos compatíveis, como a prolina (Filgueiras et al., 2019). O teor relativo de água é um dos parâmetros importantes que determinam o nível de tolerância ao estresse abiótico nas plantas. A redução do teor de água nas folhas resulta no fechamento do poro dos estômatos, na diminuição da fotossíntese e na aceleração dos processos de senescência (M. Kaushal & Wani, 2016). No presente estudo, os consórcios microbianos *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* e *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899 melhoraram

o teor de água durante o estresse e na fase de recuperação, o que também pode estar relacionado à capacidade das raízes de aumentar a absorção de água.

Esses mesmos consórcios, além de melhorarem o teor de clorofila e conteúdo da água nas folhas, também tiveram papel positivo no acúmulo de prolina e fenóis, tanto no estresse quanto na fase de recuperação. O acúmulo de osmoprotetores é uma das respostas comuns na planta à mudança no potencial osmótico (Bresson et al., 2013). Os tratamentos T2 e T3 tiveram maiores acúmulos de prolina e fenóis com valores significativos em comparação às plantas não inoculadas.

No entanto, foi relatado que a inoculação com bactérias benéficas pode diminuir o teor de prolina em comparação com plantas estressadas não inoculadas, conforme relatado por Bruno et al. (2020) que observaram uma diminuição significativa na concentração de prolina em plantas de sorgo inoculadas com três cepas potenciais redutoras de cromo e termotolerantes (CRT-PGPB) de locais contaminados com Cr e identificadas como *Bacillus cereus* TCR17, *Providencia rettgeri* TCR21 e *Myroides odoratimimus*. As plantas utilizam o acúmulo de prolina como fonte de carbono e nitrogênio para sobreviver, esses são mecanismos comuns que as plantas utilizam para manter seu conteúdo de água quando são inoculadas com bactérias promotoras de crescimento e quando estão sob estresse hídrico (Odoh, 2017).

4.4 Consórcios microbianos reduzem alterações bioquímicas em plantas de batata induzidas por estresse térmico

As plantas, quando são confrontadas com o estresse, acumulam espécies reativas de oxigênio (ERO), como o peróxido de hidrogênio H_2O_2 , e produtos degradados da peroxidação dos lipídios, como MDA, formaldeído, que causam danos aos tecidos vegetais durante a exposição ao estresse (Mano et al., 2019). Para evitar o efeito adverso das ERO, as plantas induzem um sistema de defesa antioxidante que elimina o excesso desses radicais (Sarker et al., 2020). Nossos resultados indicaram que o equilíbrio osmótico e os altos teores de clorofila nos consórcios *A. brasilense* Ab-V5 com *B. megaterium* e *R. tropici* CIAT 899 contribuíram para a prevenção de dano celular, menor acúmulo de H_2O_2 e MDA. Em um estudo com plantas de arroz co-inoculadas com três isolados de *Bacillus* sp., mostraram melhor controle da peroxidação lipídica em plantas inoculadas em condições normais e de estresse salino, em comparação com plantas controle (Khan et al., 2021).

As principais enzimas antioxidantes que desempenham um papel eficaz na remoção de EROS são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (Khan

& Bano, 2019). Nossos resultados mostram que as plantas de batata inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* e *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899 mantiveram um sistema enzimático eficiente para enfrentar o estresse térmico e garantir a recuperação das plantas. O consórcio *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* aumentou principalmente as quantidades de antioxidantes não enzimáticos e as atividades de enzimas relacionadas ao sistema antioxidante em plantas de batata.

Outros estudos já mostraram o efeito positivo de consórcios para aliviar o estresse em plantas. A coinoculação do fungo micorrízico arbuscular (*Glomus mosseae*) e da bactéria promotora de crescimento (*Pseudomonas mendocina*) na cultura de alface (*Lactuca sativa* L.) aumentou os níveis da enzima catalase em condições de seca (Kohler et al., 2008), enquanto Fukami et al. (2017) mostraram efeito positivo da inoculação de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 e de seus metabólitos na expressão de genes relacionados à síntese da enzima SOD e das enzimas sequestradoras de H₂O₂ (CAT e APX) em folhas e raízes de milho.

4.5 Regulação de fitohormônios endógenos pelos consórcios microbianos

Vários autores sugeriram uma relação direta entre o crescimento da planta e a produção de AIA por bactérias (Hamid et al., 2021; Jacoby & Kopriva, 2019; Sayyed R.Z, 2019; Mohanty et al., 2021). A produção de AIA por rizobactérias é considerada um atributo de BPCV mais importantes em condições de estresse (Bhupenchandra et al., 2020), já sendo relatadas nas espécies usadas nesse estudo (Caradonia et al., 2020; Fatima & Arora, 2021; Ilyas et al., 2020).

Em nossos resultados, os consórcios microbianos *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* e *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899 possivelmente influenciaram a modulação do teor de auxinas nas plantas após a recuperação do estresse térmico, pois o teor de AIA variou significativamente nesses tratamentos em comparação com plantas não inoculadas sob estresse e sem estresse. Tem sido sugerido que o AIA secretado por bactérias da rizosfera pode interferir no crescimento e desenvolvimento da planta, uma vez que isso pode alterar o nível de AIA endógeno da planta (Castillo et al., 2015; Saravanakumar & Samiyappan, 2007).

Embora alguns estudos tenham mostrado que inoculantes bacterianos possam melhorar os níveis endógenos de SA e, portanto, contribuir para o crescimento e desenvolvimento de plantas sob condições de estresse abiótico (Shahzard et al., 2017), alterações significativas nos níveis desses hormônios nas plantas inoculadas após recuperação do estresse térmico não foram observadas em nosso estudo. Isso poderia sugerir que os níveis desse hormônio foram ajustados durante o tempo de recuperação.

5. CONCLUSÃO

Dois dos consórcios microbianos (*A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* e *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899) melhoraram a maioria das variáveis analisadas, mostrando seu potencial para beneficiar o crescimento da batata e melhorar sua resistência ao estresse térmico. O consorcio *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* se destacou em todos os parâmetros avaliados tanto em condições normais quanto em condições de estresse, aumentando o conteúdo de hormônios endógenos que refletem no aumento da biomassa das plantas, desenvolvimento radicular e maior número de estolões que se refletiu no número e peso dos tubérculos. A inoculação com este consórcio também ajudou as plantas a ativarem fortemente a atividade enzimática, contribuindo para reduzir a carga de ERO nas plantas após do estresse térmico. Os resultados obtidos neste estudo foram promissores, apoiando o uso dos consórcios bacterianos como uma abordagem sustentável e sem impacto negativo no meio ambiente para aumentar o desempenho das plantas de batata em condições de estresse abiótico e reforçam a importância de pesquisas adicionais para elucidar as interações entre microrganismos, vislumbrando a produção de inoculantes mistos como uma alternativa de maior sucesso à biotecnologia microbiana.

REFERENCIAS

- Abdellatif, I. M. Y., Yuan, S., Na, R., Yoshihara, S., Hamada, H., Suzaki, T., Ezura, H., & Miura, K. (2022). Functional Characterization of Tomato Phytochrome A and B1B2 Mutants in Response to Heat Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), Artigo 3. <https://doi.org/10.3390/ijms23031681>
- Ahluwalia, O., Singh, P. C., & Bhatia, R. (2021). A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability*, 5, 100032. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2021.100032>

- Albdaiwi, R. N., Khyami-Horani, H., Ayad, J. Y., Alananbeh, K. M., & Al-Sayaydeh, R. (2019). Isolation and Characterization of Halotolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria From Durum Wheat (*Triticum turgidum* subsp. Durum) Cultivated in Saline Areas of the Dead Sea Region. *Frontiers in Microbiology*, *10*.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01639>
- Ansari, F. A., Jabeen, M., & Ahmad, I. (2021). *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *18*(12), 3855–3870.
<https://doi.org/10.1007/s13762-020-03045-9>
- Anthony, A., & Street, H. E. (1970). A Colorimetric Method for the Estimation of Certain Indoles. *New Phytologist*, *69*(1), 47–50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1970.tb04048.x>
- AR6 Synthesis Report: Climate Change 2023 — IPCC*. ([s.d.]). Recuperado 17 de agosto de 2023, de <https://www.ipcc.ch/report/sixth-assessment-report-cycle/>
- Bahar, N. H. A., Lo, M., Sanjaya, M., Van Vianen, J., Alexander, P., Ickowitz, A., & Sunderland, T. (2020). Meeting the food security challenge for nine billion people in 2050: What impact on forests? *Global Environmental Change*, *62*, 102056.
<https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2020.102056>
- Barbosa, J. Z., Scopel, W., & Vieira, M. L. (2008). Procedimentos para extração de pigmentos fotossintetizantes em espécies frutíferas. *Evidência*, *8*(1–2), Artigo 1–2.
<https://doi.org/10.18593/eba.v8i1-2.1871>
- Barnawal, D., Singh, R., & Singh, R. P. (2019). Chapter Six - Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Drought Tolerance: Regulating Growth Hormones and Osmolytes. Em A. K. Singh, A. Kumar, & P. K. Singh (Orgs.), *PGPR Amelioration in*

Sustainable Agriculture (p. 107–128). Woodhead Publishing.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00006-9>

Batool, T., Ali, S., Seleiman, M. F., Naveed, N. H., Ali, A., Ahmed, K., Abid, M., Rizwan, M., Shahid, M. R., Alotaibi, M., Al-Ashkar, I., & Mubushar, M. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports*, *10*(1), Artículo 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73489-z>

Bresson, J.; Varoquaux, F.; Bontpart, T.; Touraine, B.; Vile, D. 2013. The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytol*, *200*, 558–569

Bhupenchandra, I., Devi, S. H., Basumatary, A., Dutta, S., Singh, L. K., Kalita, P., Bora, S. S., Devi, S. R., Saikia, A., Sharma, P., Bhagowati, S., Tamuli, B., Dutta, N., & Borah, K. (2020). Biostimulants: Potential and Prospects in Agriculture. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, 20–35. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2020/v21i1430244>

Biemelt, S., Keetman, U., & Albrecht, G. (1998). Re-Aeration following Hypoxia or Anoxia Leads to Activation of the Antioxidative Defense System in Roots of Wheat Seedlings. *Plant Physiology*, *116*(2), 651–658. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.651>

Blanco, E. L., Rada, F., Castro, Y., & Paolini, J. (2021). Selección de un consorcio microbiano promotor del crecimiento de plántulas de cebolla en condiciones de umbráculo. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, *38*(2), Artículo 2. <https://www.produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/35501>

Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, *52*, 302–310. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)

- Caradonia, F., Ronga, D., Flore, A., Barbieri, R., Moulin, L., Terzi, V., & Francia, E. (2020). Biostimulants and cherry rootstock increased tomato fruit yield and quality in sustainable farming systems. *Italian Journal of Agronomy*, *15*(2), Artigo 2. <https://doi.org/10.4081/ija.2020.1553>
- Castillo, P., Molina, R., Andrade, A., Vigliocco, A., Alemanno, S., & Cassán, F. D. (2015). Phytohormones and Other Plant Growth Regulators Produced by PGPR: The Genus *Azospirillum*. Em F. D. Cassán, Y. Okon, & C. M. Creus (Orgs.), *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols* (p. 115–138). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_7
- Chiappero, J., Cappellari, L. del R., Sosa Alderete, L. G., Palermo, T. B., & Banchio, E. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita* grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content. *Industrial Crops and Products*, *139*, 111553. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111553>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Duguma, H., & Aga, M. (2019). *Role of Nitrogen on Potato Production: A Review*. *7*, 36–42. <https://doi.org/10.11648/j.jps.20190702.11>
- El-Alwany, A., & Banni, A. (2022). Spectrophotometric Quantification of Endogenous Salicylic Acid in Priming Wheat Tissue with *Puccinia Triticina* F. Sp. *Tritici*. *AlQalam Journal of Medical and Applied Sciences*, 119–125. <https://journal.utripoli.edu.ly/index.php/Alqalam/article/view/74>
- Fatima, T., & Arora, N. K. (2021). *Pseudomonas entomophila* PE3 and its exopolysaccharides as biostimulants for enhancing growth, yield and tolerance responses of sunflower

under saline conditions. *Microbiological Research*, 244, 126671.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126671>

Filgueiras, L.; Silva, R.; Almeida, I.; Vidal, M.; Baldani, J.I.; Meneses, C.H.S.G. 2019. *Gluconacetobacter diazotrophicus* mitigates drought stress in *Oryza sativa*, L. *Plant Soil*, 451, 57–73.

Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>

Habib-ur-Rahman, M., Ahmad, A., Raza, A., Hasnain, M. U., Alharby, H. F., Alzahrani, Y. M., Bamagoos, A. A., Hakeem, K. R., Ahmad, S., Nasim, W., Ali, S., Mansour, F., & EL Sabagh, A. (2022). Impact of climate change on agricultural production; Issues, challenges, and opportunities in Asia. *Frontiers in Plant Science*, 13.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.925548>

Hamid, B., Zaman, M., Farooq, S., Fatima, S., Sayyed, R. Z., Baba, Z. A., Sheikh, T. A., Reddy, M. S., El Enshasy, H., Gafur, A., & Suriani, N. L. (2021). Bacterial Plant Biostimulants: A Sustainable Way towards Improving Growth, Productivity, and Health of Crops. *Sustainability*, 13(5), Artigo 5. <https://doi.org/10.3390/su13052856>

Havir, E. A., & McHale, N. A. (1987). Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiology*, 84(2), 450–455.

<https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>

Ilyas, N., Mazhar, R., Yasmin, H., Khan, W., Iqbal, S., Enshasy, H. E., & Dailin, D. J. (2020). Rhizobacteria Isolated from Saline Soil Induce Systemic Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) against Salinity Stress. *Agronomy*, 10(7), Artigo 7.

<https://doi.org/10.3390/agronomy10070989>

Imada, E. L., Rolla Dos Santos, A. A. de P., Oliveira, A. L. M. de, Hungria, M., & Rodrigues, E. P. (2017). Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by

ammonium. *Research in Microbiology*, 168(3), 283–292.

<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.010>

Jacoby, R. P., & Kopriva, S. (2019). Metabolic niches in the rhizosphere microbiome: New tools and approaches to analyse metabolic mechanisms of plant–microbe nutrient exchange. *Journal of Experimental Botany*, 70(4), 1087–1094.

<https://doi.org/10.1093/jxb/ery438>

Kanani, P., Modi, A., & Kumar, A. (2020). 15 - Biotization of endophytes in micropropagation: A helpful enemy. In A. Kumar & V. K. Singh (Eds.), *Microbial Endophytes* (p. 357–379). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818734-0.00015-2>

Kargapolova, K. Yu., Burygin, G. L., Tkachenko, O. V., Evseeva, N. V., Pukhalskiy, Y. V., & Belimov, A. A. (2020). Effectiveness of inoculation of in vitro-grown potato microplants with rhizosphere bacteria of the genus *Azospirillum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 141(2), 351–359. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01791-9>

Kaushal, M., & Wani, S. P. (2016). Plant-growth-promoting rhizobacteria: Drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Annals of Microbiology*, 66(1), 35–42. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1112-3>

Kaushal, N., Gupta, K., Bhandhari, K., Kumar, S., Thakur, P., & Nayyar, H. (2011). Proline induces heat tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants by protecting vital enzymes of carbon and antioxidative metabolism. *Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology*, 17(3), 203–213. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0078-2>

Khan, M. A., Hamayun, M., Asaf, S., Khan, M., Yun, B.-W., Kang, S.-M., & Lee, I.-J.

(2021). Rhizospheric *Bacillus* spp. Rescues Plant Growth Under Salinity Stress via

- Regulating Gene Expression, Endogenous Hormones, and Antioxidant System of *Oryza sativa* L. *Frontiers in Plant Science*, 12.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.665590>
- Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., & Khan, N. A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00462>
- Khan, M. I. R., Iqbal, N., Masood, A., Per, T. S., & Khan, N. A. (2013). Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. *Plant Signaling & Behavior*, 8(11), e26374.
<https://doi.org/10.4161/psb.26374>
- Khan, N., Ali, S., Tariq, H., Latif, S., Yasmin, H., Mehmood, A., & Shahid, M. A. (2020). Water Conservation and Plant Survival Strategies of Rhizobacteria under Drought Stress. *Agronomy*, 10(11), Artigo 11. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111683>
- Khan, N., & Bano, A. (2019). Exopolysaccharide producing rhizobacteria and their impact on growth and drought tolerance of wheat grown under rainfed conditions. *PLOS ONE*, 14(9), e0222302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222302>
- Kohler, J., Hernández, J. A., Caravaca, F., Roldán, A., Kohler, J., Hernández, J. A., Caravaca, F., & Roldán, A. (2008). Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biology*, 35(2), 141–151. <https://doi.org/10.1071/FP07218>
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Sheikh, I., Kumar, V., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2020). Amelioration of drought stress in Foxtail millet (*Setaria italica* L.) by P-solubilizing drought-tolerant microbes with multifarious plant growth promoting attributes. *Environmental Sustainability*, 3(1), 23–34. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00094-1>

- Li, H., Guo, Q., Jing, Y., Liu, Z., Zheng, Z., Sun, Y., Xue, Q., & Lai, H. (2020). Application of *Streptomyces pactum* Act12 Enhances Drought Resistance in Wheat. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(1), 122–132. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09968-z>
- Lobo, L. L. B., da Silva, M. S. R. de A., Carvalho, R. F., & Rigobelo, E. C. (2023). The Negative Effect of Coinoculation of Plant Growth-Promoting Bacteria Is Not Related to Indole-3-Acetic Acid Synthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(4), 2317–2326. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10706-1>
- Lopes, E. A. P., Silva, A. D. A. da, Mergulhão, A. C. do E. S., Silva, E. V. N. da, Santiago, A. D., & Figueiredo, M. do V. B. (2019). CO-INOCULATION OF GROWTH PROMOTING BACTERIA AND *Glomus clarum* IN MICROPROPAGATED CASSAVA PLANTS. *Revista Caatinga*, 32, 152–166. <https://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n116rc>
- M. S., A., Sridharan, K., Puthur, J. T., & Dhankher, O. P. (2021). Priming with Nanoscale Materials for Boosting Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(35), 10017–10035. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03673>
- Mano, J., Biswas, Md. S., & Sugimoto, K. (2019). Reactive Carbonyl Species: A Missing Link in ROS Signaling. *Plants*, 8(10), 391. <https://doi.org/10.3390/plants8100391>
- Meenakshi, Annapurna, K., Govindasamy, V., Ajit, V., & Choudhary, D. K. (2019). Mitigation of drought stress in wheat crop by drought tolerant endophytic bacterial isolates. *Vegetos*, 32(4), 486–493. <https://doi.org/10.1007/s42535-019-00060-1>
- Mohanty, P., Singh, P. K., Chakraborty, D., Mishra, S., & Pattnaik, R. (2021). Insight Into the Role of PGPR in Sustainable Agriculture and Environment. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2021.667150>

- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867–880.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Odoh, C. (2017). *Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Bioprotectant bioinoculant for Sustainable Agrobiolgy. A Review*. 4, 123–142.
<https://doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.05.014>
- Padilla, F. M., de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., Giménez, C., & Thompson, R. B. (2018). Different Responses of Various Chlorophyll Meters to Increasing Nitrogen Supply in Sweet Pepper. *Frontiers in Plant Science*, 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01752>
- Pande, S., & Kost, C. (2017). Bacterial Unculturability and the Formation of Intercellular Metabolic Networks. *Trends in Microbiology*, 25(5), 349–361.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.015>
- Paul, M., & Vineetha, M. (2014). *ESTIMATION OF SALICYLIC ACID IN EUCALYPTUS LEAVES USING SPECTROPHOTOMETRIC METHODS*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/ESTIMATION-OF-SALICYLIC-ACID-IN-EUCALYTPUS-LEAVES-Paul-Vineetha/3e7f20110241ba4c2aa66d9ef71aef25ac554ef0>
- Petrillo, C., Vitale, E., Ambrosino, P., Arena, C., & Isticato, R. (2022). Plant Growth-Promoting Bacterial Consortia as a Strategy to Alleviate Drought Stress in *Spinacia oleracea*. *Microorganisms*, 10(9), Artigo 9.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10091798>
- Pfeiffer, S., Mitter, B., Oswald, A., Schloter-Hai, B., Schloter, M., Declerck, S., & Sessitsch, A. (2017). Rhizosphere microbiomes of potato cultivated in the High Andes show

- stable and dynamic core microbiomes with different responses to plant development. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(2), fiw242. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw242>
- Phour, M., & Sindhu, S. S. (2022). Mitigating abiotic stress: Microbiome engineering for improving agricultural production and environmental sustainability. *Planta*, 256(5), 85. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03997-x>
- Pooja, & Munjal, R. (2019). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants Under High Temperature. Em *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants* (p. 337–352). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119468677.ch14>
- Rezaei-Chiyaneh, E., Amirnia, R., Amani Machiani, M., Javanmard, A., Maggi, F., & Morshedloo, M. R. (2020). Intercropping fennel (*Foeniculum vulgare* L.) with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by PGPR inoculation: A strategy for improving yield, essential oil and fatty acid composition. *Scientia Horticulturae*, 261, 108951. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108951>
- Sagar, A., Yadav, S. S., Sayyed, R. Z., Sharma, S., & Ramteke, P. W. (2022). *Bacillus subtilis*: A Multifarious Plant Growth Promoter, Biocontrol Agent, and Bioalleviator of Abiotic Stress. Em M. T. Islam, M. Rahman, & P. Pandey (Orgs.), *Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting* (p. 561–580). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85465-2_24
- Saharan, B. S., Brar, B., Duhan, J. S., Kumar, R., Marwaha, S., Rajput, V. D., & Minkina, T. (2022). Molecular and Physiological Mechanisms to Mitigate Abiotic Stress Conditions in Plants. *Life*, 12(10), Artigo 10. <https://doi.org/10.3390/life12101634>
- Sakamoto, T., & Kimura, S. (2018). Plant Temperature Sensors. *Sensors*, 18(12), Artigo 12. <https://doi.org/10.3390/s18124365>

- Saravanakumar, D., & Samiyappan, R. (2007). ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(5), 1283–1292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03179.x>
- Sarker, U., Oba, S., & Daramy, M. A. (2020). Nutrients, minerals, antioxidant pigments and phytochemicals, and antioxidant capacity of the leaves of stem amaranth. *Scientific Reports*, *10*, 3892. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60252-7>
- Shi, Q., Bao, Z., Zhu, Z., Ying, Q., & Qian, Q. (2006). Effects of Different Treatments of Salicylic Acid on Heat Tolerance, Chlorophyll Fluorescence, and Antioxidant Enzyme Activity in Seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Regulation*, *48*(2), 127–135. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-5482-6>
- Silva, L. I. da, Oliveira, I. P. de, Jesus, E. da C., Pereira, M. C., Pasqual, M., Araújo, R. C. de, & Dória, J. (2022). Fertilizer of the Future: Beneficial Bacteria Promote Strawberry Growth and Yield and May Reduce the Need for Chemical Fertilizer. *Agronomy*, *12*(10), Artigo 10. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102465>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Soumare, A., Diédhiou, A. G., Arora, N. K., Tawfeeq Al-Ani, L. K., Ngom, M., Fall, S., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Kouisni, L., & Sy, M. O. (2021). Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.649878>
- Szota, C., Farrell, C., Williams, N. S. G., Arndt, S. K., & Fletcher, T. D. (2017). Drought-avoiding plants with low water use can achieve high rainfall retention without

- jeopardising survival on green roofs. *The Science of the Total Environment*, 603–604, 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.061>
- Tariq, A., Ahmed, A., & Abdullah, H. (2020). PGPR BIOSTIMULANTS AS EFFECTIVE DROUGHT MITIGATING AGENTS. *Technium: Romanian Journal of Applied Sciences and Technology*, 2(7), Artigo 7.
<https://www.techniumscience.com/index.php/technium/article/view/1719>
- Trapero-Mozos, A., Morris, W. L., Ducreux, L. J. M., McLean, K., Stephens, J., Torrance, L., Bryan, G. J., Hancock, R. D., & Taylor, M. A. (2018). Engineering heat tolerance in potato by temperature-dependent expression of a specific allele of HEAT-SHOCK COGNATE 70. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1), 197–207.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12760>
- Trdan, S., Vučajnk, F., Bohinc, T., & Vidrih, M. (2019). The effect of a mixture of two plant growth-promoting bacteria from Argentina on the yield of potato, and occurrence of primary potato diseases and pest – short communication. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 69(1), 89–94.
<https://doi.org/10.1080/09064710.2018.1492628>
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Science*, 151(1), 59–66.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Wang, L.-J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Liu, G.-J., Cheng, J.-S., Luo, H.-B., & Li, S.-H. (2010). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *BMC Plant Biology*, 10(1), 34.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-34>
- Wang, Z., Li, Y., Zhao, Y., Zhuang, L., Yu, Y., Wang, M., Liu, J., & Wang, Q. (2021). A microbial consortium-based product promotes potato yield by recruiting rhizosphere

- bacteria involved in nitrogen and carbon metabolisms. *Microbial Biotechnology*, 14(5), 1961–1975. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13876>
- Zeng, F., Shabala, L., Zhou, M., Zhang, G., & Shabala, S. (2013). Barley responses to combined waterlogging and salinity stress: Separating effects of oxygen deprivation and elemental toxicity. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00313>
- Zhang, H., Ge, Y., Xie, X., Atefi, A., Wijewardane, N. K., & Thapa, S. (2022). High throughput analysis of leaf chlorophyll content in sorghum using RGB, hyperspectral, and fluorescence imaging and sensor fusion. *Plant Methods*, 18, 60. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00892-0>
- Zheng, W., Zeng, S., Bais, H., LaManna, J. M., Hussey, D. S., Jacobson, D. L., & Jin, Y. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Reduce Evaporation and Increase Soil Water Retention. *Water Resources Research*, 54(5), 3673–3687. <https://doi.org/10.1029/2018WR022656>

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inoculação de bactérias individuais e consórcios microbianos em plantas de batata *in vitro* e *in vivo* provou ser uma estratégia eficaz para melhorar a adaptação e produção das plantas sob condições de estresse térmico. A resposta é dependente das espécies bacterianas usadas. A presença de consórcios microbianos em plantas de batata sob estresse térmico pode ter contribuído para a melhoria da tolerância das plantas através da ativação de mecanismos de defesa e da regulação do estresse oxidativo, por tanto pode ser considerada como uma estratégia sustentável para melhorar a produção agrícola em condições de estresse.

O papel das bactérias promotoras do crescimento vegetal como ferramenta para reduzir o estresse abiótico tem sido extensivamente documentado. Apesar dos avanços científicos, é crucial obter uma compreensão mais completa e aprofunda dos mecanismos de resposta desencadeados pelos microrganismos, a fim de melhorar o crescimento vegetal e aumentar o rendimento das culturas através da utilização de técnicas e estratégias que ajudem a lidar com as mudanças climáticas de forma mais eficaz.

Além disso, graças aos atuais avanços tecnológicos, temos a capacidade de fornecer uma solução que permita desenhar, formular e aplicar inoculantes bacterianos com o propósito de melhorar a capacidade das plantas para resistir ao stress abiótico.

Uma nova geração de inoculantes bacterianos destinados a mitigar o estresse abiótico em plantas se beneficiaria de iniciativas recentes envolvendo a bioprospecção de consórcios formados com diferentes cepas.