



**DANIELE MARIA MARQUES**

**DÉFICIT HÍDRICO E DOSES DE NITROGÊNIO NA  
MORFOFISIOLOGIA E PRODUÇÃO DE GENÓTIPOS DE  
MILHO INOCULADOS POR *Azospirillum brasilense***

**LAVRAS-MG  
2019**

**DANIELE MARIA MARQUES**

**DÉFICIT HÍDRICO E DOSES DE NITROGÊNIO NA MORFOFISIOLOGIA E  
PRODUÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO INOCULADOS POR *Azospirillum*  
*brasiliense***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutora.

PhD. Paulo César Magalhães  
Orientador

Dr. Thiago Corrêa de Souza  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2019**

**DANIELE MARIA MARQUES**

**DÉFICIT HÍDRICO E DOSES DE NITROGÊNIO NA MORFOFISIOLOGIA E  
PRODUÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO INOCULADOS POR *Azospirillum*  
*brasiliense***

**WATER DEFICIT AND NITROGEN DOSES IN MORPHOPHYSIOLOGY AND  
GRAIN PRODUCTION IN MAIZE GENOTYPES INOCULATED BY *Azospirillum*  
*brasiliense***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutora.

Aprovada em 11 de julho de 2019.

Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva - UNIFENAS

Dra. Kamila Rezende Dázio de Souza - UNIFAL

Prof. Dr. Marcelo Polo - UNIFAL

Dra. Vânia Aparecida Silva - EPAMIG

PhD. Paulo César Magalhães  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2019**

*Aos meus pais José Fagundes e Maria Auxiliadora pelo exemplo e sinônimo de amor, respeito e humildade!*

Dedico!

## AGRADECIMENTOS

A Energia Cósmica (Deus) pela oportunidade de crescimento, aprendizado e evolução!  
Aos mentores espirituais pelo amor, auxílio e amparo nesta jornada da vida!

Aos meus pais José e Maria Auxiliadora por todo amor, amparo, sustentação e exemplo de ser humano. Por serem o amor que afaga e a disciplina que corrige. Esse título é nosso!

Ao meu orientador Dr. Paulo por ser sinônimo de ética e exemplo profissional! Obrigada por toda credibilidade e apoio nesta etapa! O senhor faz parte desta conquista!

Ao meu coorientador Thiago pelo incentivo, confiança e amizade! Gratidão por acreditar, e por sempre estar presente em todos os momentos.

Ao meu amigo Adriano Bortolotti que acompanhou toda essa jornada, desde da graduação! Gratidão pelo exemplo de ser humano, por sempre ser essa pessoa amiga, parceira, e acima de tudo por ser incentivador de pessoas!

Ao pesquisador Dr. Ivanildo Marriel pela credibilidade e incentivo!

Ao pesquisador Émerson Borghi pela amizade e parceria!

Aos meus amigos botânicos Nathalle e Elias, obrigada pela partilha de momentos especiais vividos! Por aquela conversa que sempre trazia esperança e força!

Aos meus amigos de Sete Lagoas Maris, Carnot, Lindão (Renan) e André! Vocês são um presente que a vida me proporcionou. Gratidão por compartilhar comigo muito mais que momentos, por compartilhar vida!

As minhas amigas Livia e Cláudia, vocês fazem parte dessa história! Gratidão pelo auxílio na minha evolução pessoal.

As minhas amigas de Campos Gerais, Sebastiana, Natália e Cionara. Obrigada por todo apoio nesta caminhada!

Aos amigos Edimar, Ana Raíssa e Jucely! Passamos por momentos bons e ruins na jornada acadêmica, mas sempre soubemos o significado da palavra solidariedade e amizade uns com os outros.

Ao meu amigo e vô da Embrapa seu Dedé! Gratidão pela palavra amiga e por aquele cafezinho que sempre aquecia o coração!

Ao Gilberto (Juju) por todo conhecimento prático transferido a mim! Pela preocupação e zelo pelo trabalho! Gratidão, Jujuzinho!

Ao meu parceiro de pesquisa Carlos Júnior! Obrigada por sempre estar presente e contribuindo para a conclusão desta etapa! Você foi essencial para a realização desta pesquisa.

Ao professor Dr. Valdemar Faquin pela inspiração na docência.

Aos amigos de laboratório Naia, Roniel, Caroline, Lorena, Athos e Fernando pela partilha do conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada pela oportunidade de desenvolver meu doutorado. E ao coordenador da Pós Evaristo Castro pelo incentivo.

A Embrapa Milho e Sorgo por possibilitar toda estrutura necessária para realização dos meus trabalhos.

A Capes pelo financiamento dos meus estudos.

Aos funcionários da Embrapa Milho e Sorgo.

A todos que de alguma forma foram importantes para a conquista desta etapa e por contribuir com a minha evolução pessoal!

**Gratidão! Namastê!**

*“Conhece-te a ti mesmo e conhecerás os deuses e o universo.”*

-Sócrates

## RESUMO GERAL

O estresse hídrico e a deficiência de nitrogênio no solo são os estresses abióticos que mais limitam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Apresentam-se como a principal consequência na redução da produtividade das culturas. O milho é um dos cereais mais responsivos à condição hídrica, e muitas vezes é cultivado sob condições de déficit hídrico e baixa fertilidade. A tolerância das plantas de milho ao déficit hídrico proveniente de veranicos precisa ser melhorada afim de que satisfaçam as demandas de alimentos em áreas com disponibilidade limitada de recursos hídricos e em baixa fertilidade dos solos. Neste sentido, o uso de rizobactérias surge como uma ferramenta para amenização desses efeitos deletérios resultantes da seca e do baixo nitrogênio aplicado no solo. A inoculação por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas proporciona aumento no sistema radicular, constituindo estratégia de adaptação das plantas em condição de déficit hídrico, que poderá refletir em tolerância e em maior produtividade das culturas. Além disso, essas rizobactérias têm a capacidade de realizar a fixação biológica do nitrogênio. Assim, devido as várias respostas envolvendo os genótipos das plantas, da própria bactéria, e as condições ambientais, surge a necessidade de compreender melhor os mecanismos envolvidos nesta interação. Para isso, foram realizados dois experimentos em casa de vegetação e dois em campo. Para os dois primeiros experimentos foram avaliadas características ecofisiológicas, morfologia foliar e radicular e absorção de nutrientes. No primeiro ensaio foi avaliado as respostas da combinação de várias estirpes de *Azospirillum brasilense* na presença e ausência de déficit hídrico, utilizando um genótipo de milho sensível a seca. O inoculante Az1 atenuou os efeitos deletérios causados pela seca e promoveu o melhor crescimento do sistema radicular, resultando na tolerância das plantas de milho ao déficit hídrico. No segundo, a avaliação foi a mesma que no primeiro experimento com a diferença no genótipo do milho que apresenta tolerância a seca. A inoculação por Az1, Az2 e Az3 pode melhorar o crescimento vegetal, absorção de nutrientes e mitigar os efeitos do déficit hídrico no desenvolvimento das plantas de milho. A partir dos resultados destes dois experimentos foi instalado o experimento em campo com variação na dose de nitrogênio aplicado no solo, utilizando o genótipo de milho sensível a seca e os dois inoculantes mais responsivos. Foi observado o efeito de mitigação do déficit hídrico e da aplicação de nitrogênio no solo com os inoculantes Az1 e Az2. As respostas morfofisiológicas foram melhoradas com a presença de *A. brasilense*. Além disso, foi possível observar o aumento na produtividade com a inoculação por Az2. Na interação dos estresses abióticos do déficit hídrico e do baixo nitrogênio, *A. brasilense* melhora a morfofisiologia e a produção das plantas de milho.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Seca; Adubação Nitrogenada; Rizobactérias; Produtividade de grãos.

## GENERAL ABSTRACT

Water stress and soil nitrogen deficiency are the abiotic stresses that most limit plant growth and development. They are presented as the main consequence in reducing the productivity of crops. Maize is one of the cereals most responsive to the water condition, and is often grown under conditions of water deficit and low fertility. The tolerance of maize plants to water deficit from drought periods, needs to be improved in order to meet the demands of food in areas with limited availability of water resources and low soil fertility. In this sense, the use of rhizobacteria appears as a tool to ameliorate these deleterious effects resulting from drought and low nitrogen applied to the soil. The inoculation by rhizobacteria that promote plant growth provides an increase in the root system, constituting a strategy of adaptation of plants in the condition of water deficit, which may reflect in tolerance and in higher productivity of crops. In addition, these rhizobacteria have the ability to perform biological nitrogen fixation. Thus, due to the various responses involving plant genotypes, bacteria, and environmental conditions, there is a need to better understand the mechanisms involved in this interaction. For that, two experiments were carried out in a greenhouse and two in the field. For the first two experiments we evaluated ecophysiological characteristics, foliar and root morphology and nutrient absorption. In the first trial the responses of the combination of several strains of *Azospirillum brasilense* in the presence and absence of water deficit were evaluated using a drought sensitive genotype. The inoculant Az1 attenuated the deleterious effects caused by drought and promoted the best growth of the root system, resulting in the tolerance of maize plants to water deficit. In the second, the evaluation was the same as in the first experiment with the difference in the maize genotype that shows drought tolerance. Az1, Az2 and Az3 inoculation can improve plant growth, nutrient uptake and mitigate the effects of water deficit on the development of maize plants. From the results of these experiments we carried out two other experiments in the field varying dose of nitrogen applied in the soil and by using a genotype sensitive to drought and the two more responsive inoculants. The effect of water deficit mitigation and soil nitrogen application with Az1 and Az2 inoculants was observed. The morphophysiological responses were improved with the presence of *A. brasilense*. In addition, it was possible to observe the increase in productivity with the Az2 inoculation. In the interaction of the abiotic stresses of the water deficit and of the low nitrogen, *A. brasilense* improves the morphophysiology and the production of the maize plants.

Keywords: *Zea mays* L.; Drought; Nitrogen fertilization; Rizobacteria; Grain productivity.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Aspectos gerais da cultura do milho .....	13
2.2 Efeito do estresse hídrico no crescimento e desenvolvimento das plantas .....	14
2.3 Efeito do nitrogênio no desenvolvimento das plantas.....	16
2.4 Uso de rizobactérias para atenuar estresses abióticos .....	17
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	20
REFERÊNCIAS .....	21
CAPÍTULO II - Trocas gasosas, morfologia radicular e nutrientes em plantas de milho inoculadas com <i>Azospirillum brasilense</i> cultivadas em duas condições hídricas .....	26
RESUMO: .....	26
1 INTRODUÇÃO .....	26
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Material vegetal e microbiológico, condições de crescimento e design experimental .....	28
2.2 Características ecofisiológicas .....	29
2.3 Morfologia radicular e macronutrientes nos tecidos.....	29
2.4 Análise dos dados.....	30
3 RESULTADOS .....	30
4 DISCUSSÃO .....	35
5 CONCLUSÃO .....	38
REFERÊNCIAS .....	39
CAPÍTULO III - <i>Azospirillum brasilense</i> favorece características morfofisiológicas e acúmulo de nutrientes em milho cultivado sob dois regimes hídricos.....	43
RESUMO: .....	43
1 INTRODUÇÃO .....	43
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 Design experimental, material vegetal e microbiológico e condições de crescimento .....	45
2.2 Variáveis biométricas e massa seca .....	46
2.3 Características ecofisiológicas .....	46
2.4 Morfologia radicular e macronutrientes nos tecidos .....	47
2.5 Análise dos dados.....	47
3 RESULTADOS .....	47
4 DISCUSSÃO .....	51
4.1 <i>Azospirillum brasilense</i> em milho sob condição irrigada .....	51

4.2 <i>Azospirillum brasilense</i> em milho sob déficit hídrico.....	53
5 CONCLUSÃO .....	55
REFERÊNCIAS .....	56
CAPÍTULO IV - <i>Azospirillum brasilense</i> na amenização dos efeitos da interação dos estresses hídrico e baixo nitrogênio em plantas de milho cultivadas em campo .....	60
RESUMO: .....	60
1 INTRODUÇÃO .....	60
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1 Design experimental, material vegetal e microbiológico e condições de crescimento .....	61
2.2 Características ecofisiológicas e teor de pigmentos.....	63
2.3 Análise enzimática em amostras de solo rizosférico.....	64
2.4 Área foliar, componentes da produção e eficiência no uso do nitrogênio .....	64
2.5 Análise dos dados.....	65
3 RESULTADOS .....	65
4 DISCUSSÃO .....	71
5 CONCLUSÃO .....	75
REFERÊNCIAS .....	75

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

### 1 INTRODUÇÃO

As plantas, de maneira geral, ao longo do seu desenvolvimento podem ser expostas a vários estresses ambientais. O déficit hídrico proveniente da seca é o estresse abiótico que mais reduz a produtividade das culturas, impactando negativamente a sustentabilidade agrícola (KERRY et al., 2018). Esta condição adversa afeta os cereais, como o milho, desde da germinação, desempenho das plântulas até o enchimento dos grãos. O déficit hídrico também reduz a absorção de nitrogênio pelas plantas (PARAJULI et al., 2018). Além disso, espera-se que o rendimento de grãos seja ainda mais impactado pelas perspectivas das mudanças climáticas atuais e futuras. Também, o cultivo do milho na segunda safra (safrinha) é muito propício a períodos com déficit hídrico, principalmente nas fases reprodutivas e enchimento de grãos.

Aliado a esse fator, os solos com deficiência em nitrogênio limitam a produção do milho. Os efeitos dos estresses abióticos relacionados ao déficit hídrico e ao baixo nitrogênio no solo reduzem a fotossíntese, área foliar e aceleram a senescência das folhas. O impacto no rendimento dos grãos pode chegar a uma redução da produção em até 82% quando as plantas de milho são expostas a esses dois fatores (KHAN et al., 2018; PARAJULI et al., 2018).

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) podem melhorar as respostas aos estresses abióticos dos vegetais (VAN OOSTEN et al., 2017; DAR et al., 2018; KAUSHAL, 2019). As PGPR são um suporte para o desenvolvimento das plantas em ambientes estressantes (KAUSHAL; WANI, 2015). A promoção do crescimento das plantas é assumida como uma consequência de uma combinação de vários mecanismos (fisiológicos, bioquímicos e morfológicos), possivelmente agindo de forma aditiva ou como uma cascata. A maioria dos estudos refere-se à produção de fitormônios (KAUSHAL, 2019). Ao mesmo tempo essas rizobactérias podem realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MARTINS et al., 2016; ZEFFA et al., 2019); melhorar o crescimento radicular e aumentar a absorção de água e íons (KAUSHAL, 2019). O gênero *Azospirillum* é capaz de colonizar um vasto número de espécies de plantas melhorando o crescimento, desenvolvimento e a produtividade em condições agronômicas (CASSÁN et al., 2014).

O conhecimento e a seleção de estipes de *A. brasilense* mais eficientes em diferentes condições ambientais é importante para o sucesso desta tecnologia. Além disso, no mercado comercial, a associação de mais de uma estirpe potencializa os resultados da inoculação. Neste sentido, o estudo dos mecanismos desencadeados pelas estirpes de *A. brasilense* nas plantas de

milho pode ajudar na busca de práticas agrícolas sustentáveis e, possivelmente, revelar o uso destas bactérias como estratégia para mitigar os efeitos de estresses bióticos e abióticos na produtividade agrícola (FUKAMI et al., 2018).

Todavia, é importante considerar que a interação do déficit hídrico, nitrogênio no solo e *A. brasilense* com as plantas são bastantes dinâmicas, considerando a genética da própria bactéria, estágio vegetativo da planta, tipo e fertilidade do solo, além da condição ambiental (COELHO et al., 2017). As respostas dessas bactérias com o déficit hídrico dependem da intensidade e duração do estresse (NASEEM et al., 2018). Assim, é importante considerar que esta rizobactéria pode diferir em suas propriedades de conferir tolerância à seca e ao baixo nitrogênio aplicado no solo, o que justifica seleção de bactérias mais eficazes (GARCÍA et al., 2017).

A seleção de genótipos de milho que sejam mais eficientes na interação com as rizobactérias sob as condições ambientais diversas garantem práticas agrícolas mais sustentáveis e resilientes. Os resultados da associação e os mecanismos de *A. brasilense* com genótipos tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico podem proporcionar maiores rendimentos de grãos em condições de seca e de baixa disponibilidade de nitrogênio no solo.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar as respostas morfofisiológicas e produtividade das plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* sob déficit hídrico e doses de nitrogênio.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais da cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta de ciclo anual, monocotiledônea, planta C4, pertencente à família das Poáceas. É um dos cereais mais antigos cultivados no mundo. A produção desta cultura ocorre em climas que variam desde a zona temperada até a tropical. Para a obtenção de maior produtividade, o milho necessita de 380 a 550 mm de água, dependendo do clima. O ciclo vegetativo do milho pode variar de 110 a 180 dias após a emergência no solo, dependendo dos fatores climáticos prevalentes no local.

O Brasil é o 3º maior produtor mundial de milho, ocupando o 2º lugar em exportação deste cereal (CONAB, 2018). A dinâmica da produção desta cultura mudou nos últimos anos, deixando de ser atribuído somente à alimentação humana e animal, mas também como commodity exportável e como matriz energética na produção de etanol. A produção média de grãos brasileira, apesar dos avanços tecnológicos na nutrição das plantas e manejo do solo, ainda é muito baixa considerando o potencial desta cultura (CONAB, 2018; PETEAN et al., 2019).

Em função das características edafoclimáticas, as épocas de semeadura safra/safrinha podem variar de acordo com cada região geográfica. O cultivo na época da safrinha apresenta menor potencial de produtividade, e geralmente com o maior ciclo das plantas. O milho safrinha enfrenta condições menos favoráveis ao cultivo, especialmente menor índice pluviométrico e temperaturas mais baixas existentes nesta época, após a colheita da safra verão.

As plantas de milho apresentam metabolismo fotossintético C4, sendo caracterizadas como eficientes no uso de água e nitrogênio. A via C4 da fotossíntese permite a redução da abertura estomática e, conseqüentemente, diminuição na transpiração. Contudo, a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase) tem uma afinidade maior com o seu substrato bicarbonato que a Rubisco para CO<sub>2</sub>, refletindo nas altas taxas de assimilação de carbono (HÜTSCH; SCHUBERT, 2017; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017). Além disso, devido a ação da PEPcase ocorre aumento na concentração CO<sub>2</sub> nos sítios de carboxilação da rubisco, resultando na supressão da oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato e, portanto, da fotorrespiração (DING et al., 2015; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017). Assim, o milho é caracterizado por um sistema altamente produtivo na assimilação de carbono. Entretanto, os estresses abióticos como o déficit hídrico, temperatura, baixo nitrogênio e fertilidade dos solos são fatores que interferem nas atividades fisiológicas das plantas de milho e, portanto, na

produção dos grãos e na matéria seca (PARAJULI et al., 2018; DJEMEL et al., 2019; ZEFFA et al., 2019).

## 2.2 Efeito do estresse hídrico no crescimento e desenvolvimento das plantas

O estresse hídrico proveniente da seca é resultado do desequilíbrio entre a disponibilidade de água no solo e a demanda evaporativa. A seca está entre os estresses abióticos mais destrutivos que vem se intensificando nas últimas décadas (VURUKONDA et al., 2016). A sua intensidade pode variar de curto, moderado, prolongado a extremamente severo, restringindo fortemente a produtividade agrícola mundial.

Para lidar com o estresse hídrico, as plantas apresentam mecanismos de escape, fuga e tolerância (JUENGER, 2013; RASOOL et al., 2019). Escape envolve mudanças evoluídas ou plásticas na fenologia, para que os principais períodos de crescimento e reprodução não coincidam com o período de déficit. Neste mecanismo ocorre o florescimento e maturidade fisiológica precoce, plasticidade no desenvolvimento e remobilização de fotoassimilados para o grão. A fuga é definida como a capacidade das plantas em manter alto potencial hídrico nos tecidos mesmo em condições de baixa umidade. Para este processo as plantas aumentam o desenvolvimento radicular e reduzem a condutância estomática e área foliar para diminuir a transpiração. A tolerância é a habilidade das plantas em resistir ao déficit com baixo potencial hídrico nos tecidos. Este mecanismo é possível pela manutenção do turgor celular por meio do ajuste osmótico, com aumento da elasticidade e decréscimo no tamanho das células e, portanto, tolerância à dessecação. A tolerância permite a recuperação após períodos de desidratação e seca.

O milho é uma das culturas mais suscetíveis ao déficit hídrico (DJEMEL et al., 2019), por apresentar simultaneamente o tempo de antese com veranicos na safra e invernos secos na safrinha, em algumas regiões brasileiras. O déficit hídrico reduz a germinação e o desenvolvimento das plântulas por interferência no processo de embebição e de alongamento celular. A velocidade de germinação é comprometida nesta condição. À medida que o teor de água do solo diminui, ocorre a redução da velocidade de germinação e restrições mais severas passam a prejudicar o desenvolvimento das plântulas. Além disso, na fase de germinação o déficit de água limita o número de plantas por área (estande).

Logo após a germinação, o déficit hídrico na fase vegetativa reduz o crescimento das plantas, e a disponibilidade e o transporte dos nutrientes no solo (VURUKONDA et al., 2016). A baixa disponibilidade hídrica reduz o transporte dos nutrientes até as raízes. A seca, portanto,

diminui a difusão e o fluxo de massa dos nutrientes solúveis na água, tais como nitrato, sulfato, Ca, Mg (CLAIR; LYNCH, 2010), afetando a nutrição e o crescimento- vegetal.

O florescimento feminino (estilo-estigma) é retardado pela baixa disponibilidade de água, gerando dessincronização deste com o pendão e culminando em perdas de produtividade (ARAUS et al., 2011; DJEMEL et al., 2019). Na fase de enchimento de grãos, a restrição da água compromete o transporte de nutrientes e a alocação dos fotoassimilados.

Uma das primeiras respostas das plantas ao déficit hídrico é a limitação estomática (SOUZA et al., 2013; REIS et al., 2018), que reduz a condutância estomática e a transpiração. Esta resposta é um mecanismo evolutivo para diminuir a perda de água para a atmosfera (ÁVILA et al., 2017). O fechamento dos estômatos durante as condições de déficit hídrico reduz a absorção de CO<sub>2</sub>, diminuindo o carbono no mesófilo das folhas e assim, reduzindo a taxa fotossintética e o desenvolvimento das plantas (MUTAVA et al., 2015; DAR et al., 2018). Além disso, a redução nos teores de clorofila devido ao déficit de água, especialmente em folhas mais velhas, pode ser outro fator para a limitação da fotossíntese (AHAMAD et al., 2014).

A inibição da fotossíntese, por sua vez, leva à superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SOUZA et al., 2013). As EROs podem causar vários danos nas plantas como peroxidação lipídica, deterioração das membranas, degradação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (KAUSHAL; WANI, 2016). Em consequência da geração excessiva das EROs ocorre à indução de senescência, que contribui para a remobilização de nutrientes antes da morte das folhas. A senescência foliar induzida pela seca causa a abscisão das folhas e previne a perda de água através da transpiração. Durante este processo, ocorrem alterações bioquímicas e moleculares como a condensação da cromatina, peroxidação, inchaço nos tilacóides e degradação das clorofilas e proteína (RASOOL et al., 2019).

O estresse hídrico afeta o metabolismo das raízes, causando alterações na morfologia/arquitetura dos vegetais (RAHDARI; HOSEINI, 2012). A redução no potencial hídrico do solo resulta na desidratação das células, inibindo a expansão e a divisão celular, resultando em estresse osmótico (KAUSHAL; WANI 2016). A escassez de água desencadeia não apenas a senescência de áreas verdes das plantas, mas também em células meristemáticas das raízes, que sofrem aumento de tamanho, desintegração das membranas plasmáticas e de outras organelas celulares (RASOOL et al., 2019).

O déficit hídrico altera a atividade das enzimas do metabolismo de nitrogênio e carbono, e na taxa de crescimento das plantas (milho) (SILVA et al., 2019). Em condições de baixa disponibilidade hídrica as plantas absorvem menor quantidade de nutrientes (VURUKONDA et al., 2016).

### 2.3 Efeito do nitrogênio no desenvolvimento das plantas

O nitrogênio (N) é um elemento mineral que compõem 1-5% da matéria seca total das plantas. É constituinte integral de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas, coenzimas, fitormônios e metabólitos secundários (AHAMAD et al., 2014). Assim, a assimilação do N é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas, além de apresentar efeitos marcantes sobre a biomassa e a produtividade das culturas (TAIZ; ZEIGER, 2013). As principais fontes de N absorvidas pelas plantas superiores são nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Geralmente, na aplicação de fertilizantes nitrogenados apenas 40-50% é utilizado pela cultura, o restante é perdido no sistema solo-planta podendo resultar em problemas ambientais (HAWKESFORD et al., 2012).

Para o processo de produção das culturas não leguminosas como milho, trigo e arroz os fertilizantes nitrogenados são um dos maiores custos para os agricultores (TEIXEIRA FILHO et al., 2017). O uso destes fertilizantes deve ser cuidadosamente controlado para garantir um maior rendimento e manejo adequado do N no solo. Uma vez que tanto a produção quanto a aplicação desses fertilizantes colaboram para o acréscimo na emissão dos gases  $\text{CO}_2$  e  $\text{NO}_2$ , responsáveis pelo aumento do efeito estufa sobre a Terra. Inclusive, o uso constante de insumos químicos e em altas doses contribuem com os impactos negativos nos agroecossistemas. A erosão, contaminação de águas superficiais e subterrâneas, resíduos químicos nos solos, efeitos nos organismos edáficos e aquáticos são consequências do manejo inadequado do solo. A aplicação de N no solo pode ainda levar a perdas por volatilização, desnitrificação e lixiviação.

A adubação nitrogenada no milho para maior rendimento de grãos (eficiência no uso do N) é em média de 100-150 kg de N  $\text{ha}^{-1}$ , em regiões tropicais (BREDA et al., 2019). Além disso, é o nutriente mais exportado nesta cultura, com aproximadamente 75% do N sendo translocado para o grão (NEUMANN et al., 2005). Deste modo, a deficiência de N inibe fortemente o desenvolvimento das plantas e sua produtividade.

As principais razões da deficiência de N nos solos são a baixa eficiência de recuperação dos fertilizantes nitrogenados aplicados (FAGERIA, 2014). Este fato acontece por ocorrer perdas por volatilização, lixiviação, desnitrificação e erosão do solo (CUNHA et al., 2016). Partes do N, também, é imobilizada em materiais orgânicos não decompostos e pela população microbiana do solo.

Os sintomas de deficiência de N são plantas raquíticas, folhas estreitas, clorose foliar, menor altura do dossel e, em gramíneas, o perfilhamento e o número de sementes são reduzidos. As plantas apresentam duas respostas a deficiência de acordo com Hawkesford et al. (2012): na

primeira fase a expansão foliar é reduzida sem alterar a fotossíntese e o crescimento radicular é estimulado. Na segunda fase, após a contínua deficiência de N ocorre a quebra das moléculas dos ácidos nucleicos e proteínas nas folhas, geralmente associadas a senescência foliar. Além disso, ocorre o colapso da RUBISCO, limitando a capacidade máxima fotossintética das plantas, inibindo o crescimento vegetal.

Aproximadamente 90% do movimento de N no solo até as raízes das plantas é por fluxo de massa (AHAMAD et al., 2014). Em condições de déficit hídrico, este movimento é drasticamente reduzido e as plantas sofrem limitação na absorção deste nutriente, que contribui para perdas no rendimento de grãos. Devido a este déficit de água, a absorção de N é limitada pela quantidade de N que entra em contato com as raízes, o que pode refletir em deficiência deste elemento mesmo sob alta concentração no solo (VASCONCELOS et al., 2016). Em resposta a esse déficit de água, as plantas podem investir em raízes mais profundas explorando o perfil do solo. Porém, os nutrientes concentrados na superfície seca do solo podem ficar indisponíveis para a absorção das plantas.

O metabolismo do N tem um papel importante na tolerância à seca, visto que os processos fisiológicos das plantas responsivos ao déficit hídrico envolvem o metabolismo do N (WANG et al., 2017). A maioria dos solutos e proteínas produzidos durante uma resposta ao estresse são compostos contendo N, como aminoácidos, amidas, betaínas. Assim, a maior absorção de nitrogênio pode atenuar os efeitos deletérios decorrentes do déficit hídrico nos cereais.

#### 2.4 Uso de rizobactérias para atenuar estresses abióticos

Para mitigar o efeito resultante do déficit hídrico e da baixa disponibilidade de N nos solos na produção de grãos na cultura do milho, várias pesquisas vêm sendo realizadas visando a interação de plantas com microrganismos (bioestimulantes/biofertilizantes) (KAUSHAL, 2019; COELHO et al., 2017). O papel microbiano na adaptação das plantas aos estresses ambientais está ganhando atenção devido ser uma estratégia de fácil execução, com custos baixos e ecologicamente viável (FUKAMI et al., 2018).

O emprego de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) é ferramenta importante e promissora para a agricultura sustentável. PGPR oferece alternativa atraente economicamente e ecologicamente correta para aumentar a disponibilidade de água e nutrientes (PRASSAD et al., 2019). As PGPR habitam a rizosfera/sistema radicular formando um complexo ecológico que influencia o crescimento e a produtividade através das suas atividades metabólicas e dos múltiplos mecanismos que são gerados dessa interação com as plantas (VAN

OOSTEN et al., 2017). Os efeitos mais comumente observados pelas PGPR são o aumento do número e comprimento das raízes laterais e dos tricomas radiculares (VACHERON et al., 2013), proporcionando maior exploração do perfil dos solos.

Além disso, Pii et al. (2019) relataram que as PGPR podem representar uma ferramenta valiosa para melhorar a nutrição vegetal, uma vez que na agricultura o N tem sido fornecido as plantas via aplicação de fertilizantes. Assim, na busca crescente pela sustentabilidade dos sistemas de produção, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é alternativa visando à economia de fertilizantes nitrogenados, que pode suplementar ou mesmo substituir este uso de fertilizantes (CUNHA et al., 2016).

O gênero *Azospirillum* é capaz de colonizar um grande número de espécies de plantas cultivadas melhorando o crescimento, desenvolvimento e a produtividade (DAR et al., 2018). Esta bactéria é capaz de colonizar várias espécies de plantas monocotiledôneas, incluindo culturas importantes como trigo, milho e arroz (YADAV; SARKAR, 2019).

A promoção do crescimento das plantas por *Azospirillum brasilense* ocorre como consequência da combinação de vários mecanismos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos (BASHAN; BASHAN, 2010), possivelmente agindo de forma aditiva ou como efeito cascata. Os benefícios trazidos pela associação desta bactéria com as plantas são a síntese de várias substâncias reguladoras do crescimento, como os fitormônios (BARNAWAL et al., 2019); fixação biológica do N (REVOLTI et al., 2018); solubilização de fosfato e ferro (GALINDO et al., 2016; REVOLTI et al., 2018); biocontrole de fitopatógenos (DAR et al., 2018) e proteção das plantas contra estresses abióticos (KAUSHAL, 2019).

O uso de *Azospirillum*, devido aos efeitos positivos apresentados no crescimento e na nutrição vegetal, pode ser considerado bioestimulante de plantas (VAN OOSTEN et al., 2017).

Dobbelaere et al. (2003) relataram que a inoculação com *A. brasilense* é eficiente nas culturas mesmo em solos com alto teor de N disponível, o que indica que as respostas das plantas ocorrem não apenas por causa da fixação de N<sub>2</sub>, mas devido a produção de substâncias reguladoras do crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas (FUKAMI et al., 2017).

Nas raízes, *Azospirillum* provoca modificações na arquitetura radicular, as quais estão relacionadas ao aumento no número de radículas e no comprimento da raiz, podendo refletir em maior exploração de solo (VACHERON et al., 2013) e absorção de nutrientes (DAR et al., 2018). Neste sentido, as raízes desempenham papéis-chave na aquisição de água do solo. Em condições de déficit hídrico, tem sido observado que a distribuição e estrutura, e não a quantidade de raízes é que determina a estratégia mais eficiente para extrair água em solos secos. Assim, as plantas inoculadas por *A. brasilense* apresentando raízes mais compridas podem explorar os perfis mais profundos dos solos. Além disso, a inoculação pode ainda induzir

a sinalização hormonal da raiz para a parte aérea, regulando o crescimento foliar e outros processos fisiológicos das plantas (BARNAWAL et al., 2019).

Em áreas tropicais é possível ocorrer frequentemente períodos de seca (MARTINS et al., 2016), que são comumente associados ao uso ineficiente de N pelas plantas, representando um déficit na produção (MARTINS et al., 2018). Assim, o uso de técnicas biológicas, como a inoculação por *A. brasilense*, pode melhorar as respostas morfofisiológicas das plantas e a eficiência no uso de fertilizantes, representando uma alternativa sustentável para o cultivo dos cereais. Além disso, deve-se se atentar para os benefícios econômicos e ambientais proporcionados por esta rizobactéria com a inoculação, seja em ambiente com déficit de água ou com disponibilidade hídrica.

O estudo dos mecanismos desencadeados por *A. brasilense* nas plantas pode ajudar na busca de práticas agrícolas sustentáveis e, possivelmente, revelar o uso destas bactérias como estratégia para mitigar os efeitos de estresses bióticos e abióticos na produtividade agrícola (FUKAMI et al., 2018). No entanto, é importante considerar que a interação da *A. brasilense* com as plantas são bastantes dinâmicas, considerando a genética da própria bactéria, estágio vegetativo da planta, tipo e a fertilidade do solo, além da condição ambiental (COELHO et al., 2017). Além disso, as respostas dessas bactérias com o déficit hídrico dependem da intensidade e duração do estresse (NASEEM et al., 2018). Assim, é importante considerar que estas rizobactérias podem diferir em suas propriedades de conferir tolerância à seca e a baixa fertilidade dos solos, o que justifica seleção de estirpes de *A. brasilense* mais eficazes (GARCÍA et al., 2017).

Nas plantas de milho, a seleção de genótipos que sejam mais eficientes na interação com as rizobactérias podem conferir aumento na produtividade. O genótipo DKB 390 possui como característica tolerância a seca e a adaptação a diferentes tipos de solo e manejo (SOUZA et al., 2013). Já o BRS 1040 é caracterizado como genótipo com sensibilidade ao déficit hídrico. Assim, o conhecimento dos mecanismos da interação de estirpes de *A. brasilense* com estes materiais podem aumentar a eficiência da inoculação com ganhos no rendimento de grãos em condições de seca e baixo nitrogênio no solo.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O milho safrinha é a principal época de cultivo deste cereal no Brasil. Assim, devido às condições climáticas como o menor índice pluviométrico e temperaturas mais baixas existentes nesta época, este cereal está sujeito ao déficit hídrico. Além disso, a ameaça das mudanças climáticas vem alterando significativamente o volume de chuvas em diversas áreas do globo, gerando períodos severos de seca em muitos locais. O déficit hídrico resultante da seca é o fator que mais impacta o rendimento dos grãos das culturas, além de reduzir a absorção de nitrogênio pelas plantas. Aliado a toda esta problemática, o manejo ineficiente dos solos com a baixa disponibilidade de nitrogênio é o segundo fator mais limitante da produção dos cereais. A tolerância do milho ao déficit hídrico e à baixa disponibilidade de nitrogênio precisa ser melhorada afim de satisfazer as demandas de alimentos em áreas com disponibilidade limitada de recursos hídricos e de baixa fertilidade dos solos.

O emprego de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) é uma ferramenta importante e promissora para a agricultura sustentável. No cenário atual, as PGPR apresentam-se como uma alternativa economicamente atraente e ecologicamente correta para aumentar a disponibilidade de água e nutrientes (incluindo o nitrogênio). Os resultados das interações da *A. brasilense* com os genótipos de milho, déficit hídrico e baixo nitrogênio no solo podem ser bastante dinâmicos. Assim, todos estes fatores precisam ser estudados para melhorar a compreensão do efeito da inoculação nas respostas dos vegetais frente ao déficit hídrico e da baixa disponibilidade de nitrogênio no solo.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, Rashid et al. Does nitrogen fertilization enhance drought tolerance in sunflower? A review. **Journal of Plant Nutrition**. v. 37, n. 6, p. 942-963, 2014.
- ARAUS, J. L.; SÁNCHEZ, C.; EDMEADES, G. O. Phenotyping maize for adaptation to drought. 2011. In: MONNEVEUX, P.; RIBAUT, J. M. (Ed.). **Drought phenotyping in crops: from theory to practice**. Texcoco: CGIAR Generation Challenge Programme, p. 263-283, 2011.
- ÁVILA, R., MAGALHAES, P. C., DE ALVARENGA, A. A., LAVINSKY, A. D. O., CAMPOS, C. N., DE SOUZA, T. C., & GOMES JÚNIOR, C. C. Drought-tolerant maize genotypes invest in root system and maintain high harvest index during water stress. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 3, p. 450-460, 2017.
- BARNAWAL, D.; SINGH, R.; SINGH, R. P. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Drought Tolerance: Regulating Growth Hormones and Osmolytes. 2019. In: **PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture**. Woodhead Publishing, p. 107-128, 2019.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. In: **Advances in Agronomy**. Academic Press, p. 77-136, 2010.
- BREDA, F. A. F. et al. Modulation of nitrogen metabolism of maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Archives of Microbiology**. v. 201, n. 4, p. 547-558, 2019.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. et al. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **PLoS One**. v. 12, n. 3, p. e0174576, 2017.
- CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440-459, 2014.
- CLAIR, S. B. S.; LYNCH, J. P. The opening of Pandora's Box: climate change impacts on soil fertility and crop nutrition in developing countries. **Plant and Soil**. v. 335, n. 1-2, p. 101-115, 2010.
- COELHO, A. E.; TOCHETTO, C.; TUREK, T. L.; MICHELON, L. H.; FIOREZE, S. L. Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* em plantas de milho submetidas à restrição hídrica. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 16, n. 2, p. 186-192, 2017.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. **Safra 2018/19**, v. 6, p. 68-83, 2018.

- CUNHA, F. N. et al. Performance of different genotypes of maize subjected to inoculation with *Azospirillum brasilense*. **African Journal of Agricultural Research**. v. 11, n. 39, p. 3853-3862, 2016.
- DAR, Z. M.; MASOOD, A.; MUGHAL, A. H.; ASIF, M.; MALIK, M. A. Review on plant growth promoting rhizobacteria and its effect on plant growth. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. v. 7, n. 3, p. 2802-2804, 2018.
- DJEMEL, A.; ÁLVAREZ-IGLESIAS, L.; SANTIAGO, R.; MALVAR, R. A.; PEDROL, N.; REVILLA, P. Algerian maize populations from the Sahara desert as potential sources of drought tolerance. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 41, n. 1, p. 12, 2019.
- DING, Z. et al. Identification of photosynthesis-associated C4 candidate genes through comparative leaf gradient transcriptome in multiple lineages of C3 and C4 species. **PLoS One**. v. 10, n. 10, p. e0140629, 2015.
- DOBBELAERE S, VANDERLEYDEN J, OKON Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**.v. 22, p. 107-149, 2003.
- FAGERIA, N. K. Nitrogen harvest index and its association with crop yields. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, n. 6, p. 795-810, 2014.
- FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**. v. 7, n. 1, p. 153, 2017.
- FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**. v. 8, n. 1, p. 73, 2018.
- GALINDO, F. S., TEIXEIRA FILHO, M. C. M., BUZETTI, S., SANTINI, J. M. K., ALVES, C. J., NOGUEIRA, L. M., LUDKIEWICZ, M. G. Z.; ANDREOTTI, M.; BELLOTTE, J. L. M. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 40, 2016.
- GARCÍA, J. E.; MARONICHE, G.; CREUS, C.; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, R.; RAMIREZ-TRUJILLO, J. A.; GROPPA, M.D. In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. **Microbiological Research**. v. 202, p. 21-29, 2017.
- HAWKESFORD, M. et al. Functions of macronutrients. 2012. In: **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic Press. p. 135-189, 2012.
- HÜTSCH, B. W.; SCHUBERT, S. Harvest index of maize (*Zea mays* L.): Are there possibilities for improvement? 2017. In: **Advances in Agronomy**. Academic Press, p. 37-82, 2017.
- JUENGER, T. E. Natural variation and genetic constraints on drought tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 16, n. 3, p. 274-281, 2013.

KAUSHAL, M.; WANI, S. P. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. **Annals of Microbiology**. v. 66, n. 1, p. 35-42, 2016.

KAUSHAL, M. Portraying Rhizobacterial Mechanisms in Drought Tolerance: A Way Forward Toward Sustainable Agriculture. 2019. In: **PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture**. p. 195-216, 2019.

KERRY, R. G.; PATRA, S.; GOUDA, S.; PATRA, J. K.; DAS, G. Microbes and Their Role in Drought Tolerance of Agricultural Food Crops. 2018. In: **Microbial Biotechnology**. Springer, Singapore. p. 253-273, 2018.

KHAN, N. et al. Interaction between PGPR and PGR for water conservation and plant growth attributes under drought condition. **Biologia**, v. 73, n. 11, p. 1083-1098, 2018.

MARTINS, D. C. et al. Produtividade de duas cultivares de milho submetidas ao tratamento de sementes com bioestimulantes fertilizantes líquidos e *Azospirillum* sp. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 2, p. 217-228, 2016.

MARTINS, M. R., JANTALIA, C. P., REIS, V. M., DÖWICH, I., POLIDORO, J. C., ALVES, B. J. R. et al. Impact of plant growth-promoting bacteria on grain yield, protein content, and urea-15 N recovery by maize in a Cerrado Oxisol. **Plant and Soil**. v. 422, n. 1-2, p. 239-250, 2018.

MUTAVA, R.N.; PRINCE, S. J. K.; SYED, N. H.; SONG, L.; VALLIYODAN, B.; CHEN, W.; NGUYEN, H. T. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: a comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 86, p. 109-120, 2015.

NGUMBI, E.; KLOEPPER, J. Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. **Applied Soil Ecology**. v. 105, p. 109-125, 2016.

NASEEM, H.; AHSAN, M.; SHAHID, M. A.; KHAN, N. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. **Journal of Basic Microbiology**. v. 58, n. 12, p. 1009-1022, 2018.

NEUMANN, M.; SANDINI, I. E.; LUSTOSA, S. B. C.; OST, P. R.; ROMANO, M. A.; FALBO, M. K.; PANSERA, E. R. Rendimentos e componentes de produção da planta de milho (*Zea mays* L.) para silagem, em função de níveis de adubação nitrogenada em cobertura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. v.4, n.3, p. 418-427, 2005.

PARAJULI, S., OJHA, B. R., & FERRARA, G. O. Quantification of secondary traits for drought and low nitrogen stress tolerance in inbreds and hybrids of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Plant Genetics and Breeding**. v. 2, n. 1, p. 1-13, 2018.

PETEAN, C. C. et al. Polímeros orgânicos com ureia dissolvida e doses de nitrogênio no milho. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 62, 2019.

PII, Y. et al. *Azospirillum brasilense* inoculation counteracts the induction of nitrate uptake in maize plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 4, p. 1313-1324, 2019.

- PRASAD, M.; SRINIVASAN, R.; CHAUDHARY, M.; CHOUDHARY, M.; JAT, L. K. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture: Perspectives and Challenges. 2019. In: **PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture**. p. 129-157, 2019.
- RAHDARI, P.; HOSEINI, S. M. Drought stress: a review. **International Journal of Agronomy and Plant Production**. v. 3, n. 10, p. 443-446, 2012.
- RASOOL, S.; MIR, B. A.; REHMAN, M.; AMIN, I.; MIR, M. U. R.; AHMAD, S. B. Abiotic Stress and Plant Senescence. 2019. In: **Senescence Signalling and Control in Plants**. Academic Press. p. 15-27, 2019.
- REIS, C. O.; MAGALHÃES, P. C.; AVILA, R. G.; ALMEIDA, L. G.; RABELO, V. M.; CARVALHO, D. T.; CABRAL, D. F.; KARAM, D.; SOUZA, T. C. Action of N-Succinyl and N, O-Dicarboxymethyl Chitosan Derivatives on Chlorophyll Photosynthesis and Fluorescence in Drought-Sensitive Maize. **Journal of Plant Growth Regulation**. p. 1-12, 2018.
- REVOLTI, L. T. M.; CAPRIO, C. H.; MINGOTTE, F. L. C.; MÔRO, G. V. *Azospirillum* spp. potential for maize growth and yield. **African Journal of Biotechnology**. v. 17, n. 18, p. 574-585, 2018.
- SILVA, E. R.; ZOZ, J.; OLIVEIRA, C. E. S.; ZUFFO, A. M.; STEINER, F.; ZOZ, T.; VENDRUSCOLO, E. P. Can co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* alleviate adverse effects of drought stress on soybean (*Glycine max* L. Merrill.)? **Archives of Microbiology**. p. 1-11, 2019.
- SOUZA, T. C. de; CASTRO, E. M. de; MAGALHÃES, P. C.; LINO, L. de O.; ALVES, E. T.; ALBUQUERQUE, P. E. P. de. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 35, p. 3201-3211, 2013.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2013. **Fisiologia Vegetal**. 5ª Ed. – Porto Alegre: Artmed, p. 114, 2013.
- TEIXEIRA FILHO, M. C. M., GALINDO, F. S., BUZETTI, S., BOLETA, E. H. M. The Effect of N Fertilization on Wheat under Inoculation with *Azospirillum brasilense*. 2017. In: **Nitrogen in Agriculture-Updates**. IntechOpen. p. 1-23, 2017.
- VACHERON, J.; DESBROSSES, G.; BOUFFAUD, M. L.; TOURAINÉ, B.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; MULLER, D.; LEGENDRE, L.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; PRIGENT-COMBARET, C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Science**. v. 4, p. 356, 2013.
- VAN OOSTEN, M. J.; PEPE, O.; PASCALE, S.; SILLETTI, S.; MAGGIO, A. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**. v. 4, n. 1, p. 5, 2017.
- VASCONCELOS, A. C. P. et al. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and N fertilization of corn in the Cerrado biome. **Revista Ceres**. v. 63, n. 5, p. 732-740, 2016.

VURUKONDA, S. S. K. P.; VARDHARAJULA, S.; SHRIVASTAVA, M.; SKZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**. v. 184, p. 13-24, 2016.

WANG, H. et al. Drought enhances nitrogen uptake and assimilation in maize roots. **Agronomy Journal**. v. 109, n. 1, p. 39-46, 2017.

YADAV, K. K.; SARKAR, S. Biofertilizers, Impact on Soil Fertility and Crop Productivity under Sustainable Agriculture. **Environment and Ecology**. v. 37, n. 1, p. 89-93, 2019.

ZEFFA, D. M., PERINI, L. J., SILVA, M. B., DE SOUSA, N. V., SCAPIM, C. A., DE OLIVEIRA, A. L. M., et al. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PloS One**. v. 14, n. 4, p. 1-19, 2019.

## **CAPÍTULO II - Trocas gasosas, morfologia radicular e nutrientes em plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* cultivadas em duas condições hídricas**

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar as trocas gasosas, morfologia radicular e a concentração de nutrientes em plantas de milho inoculadas por *A. brasilense* em duas condições hídricas. O experimento foi realizado em casa de vegetação, com delineamento experimental inteiramente casualizado em fatorial 4x2. Os tratamentos constaram de quatro inoculantes de *A. brasilense* (Controle, Az1, Az2 e Az3) e duas condições hídricas, irrigado e déficit hídrico. No estágio vegetativo V6 foi imposto o estresse hídrico nas plantas de milho por 15 dias. Foram avaliadas, após os 15 dias de imposição do déficit hídrico, as características fitotécnicas, trocas gasosas, morfologia radicular, massa seca da raiz e análise de macronutrientes. O déficit hídrico causou redução no crescimento das plantas de milho e a presença de *A. brasilense* Az1 proporcionou maior fotossíntese, eficiência de carboxilação (A/Ci), eficiência no uso da água (WUE), e maior exploração do solo com aumento do comprimento, área superficial e volume radicular das plantas. A inoculação por *A. brasilense* aumentou o volume do sistema radicular no irrigado em média 40% e no estressado 47% quando comparado as plantas sem inoculação. A inoculação por *A. brasilense* melhora o desenvolvimento das plantas de milho em ambas as condições hídricas. O inoculante Az1 atenua os efeitos deletérios causados pela seca e promove o maior crescimento do sistema radicular, resultando na tolerância das plantas de milho ao déficit hídrico.

Palavras-chave: *Zea mays* L., Fotossíntese; Eficiência do uso da água; Déficit hídrico; WinRhizo.

### **1 INTRODUÇÃO**

O crescimento e desenvolvimento das plantas são constantemente influenciadas por estresses ambientais. Estes fatores reduzem a produtividade agrícola das áreas cultivadas em todo o mundo. O déficit hídrico é o estresse abiótico é o mais impactante na produção das culturas e vem aumentando a sua intensidade nas últimas décadas tanto no Brasil como no mundo (Lynch et al. 2014; Dar et al. 2018).

A tolerância do milho à seca precisa ser melhorada a fim de que satisfaçam as demandas de alimentos em áreas com disponibilidade limitada de recursos hídricos (Ngumbi e Kloepper 2016). Várias pesquisas vêm sendo realizadas visando a interação de plantas de milho com microrganismos (bioestimulantes/biofertilizantes) para amenização desses efeitos deletérios resultantes da seca (Kaushal 2019; Cassán et al. 2014; Vurukonda et al. 2014). O papel microbiano na adaptação das plantas aos estresses ambientais está ganhando atenção devido ser uma estratégia de fácil execução, com custos baixos e ecologicamente viável (Fukami et al. 2018).

Os microrganismos do solo como as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) têm a capacidade de suplantam os efeitos adversos da seca (Kaushal 2019). Essas bactérias habitam a rizosfera/sistema radicular formando um complexo ecológico que influencia o crescimento e a produtividade através das suas atividades metabólicas e dos múltiplos mecanismos que são gerados dessa interação com as plantas (Van Oosten et al. 2017). Os efeitos mais comumente observados pelas PGPR são a redução da taxa de crescimento da raiz primária e o aumento do número e comprimento das raízes laterais e dos tricomas radiculares (Vacheron et al. 2013).

O gênero *Azospirillum* é capaz de colonizar um grande número de espécies de plantas cultivadas melhorando o crescimento, desenvolvimento e a produtividade (Cassán et al. 2014; Dar et al. 2018). A promoção do crescimento das plantas por *Azospirillum brasilense* ocorre como consequência da combinação de vários mecanismos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos (Bashan e Bashan 2010), possivelmente agindo de forma aditiva ou como efeito cascata. *A. brasilense* pode produzir e metabolizar fitormônios, como ácido indol-3-acético (AIA), giberelinas e citocininas e outras moléculas reguladoras do crescimento de plantas (Fibach-Paldi et al. 2012; Bashan e Bashan 2010; Romero et al. 2014; Vurukonda et al. 2016). Ao mesmo tempo podendo realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Martins et al., 2016), melhorar o crescimento radicular e aumentar a absorção de água e íons (Vacheron et al. 2013).

O estudo dos mecanismos desencadeados por *A. brasilense* nas plantas de milho pode ajudar na busca de práticas agrícolas sustentáveis e, possivelmente, revelar o uso dessas bactérias como estratégia para mitigar os efeitos de estresses bióticos e abióticos na produtividade agrícola (Fukami et al. 2018). No entanto, as respostas da interação da bactéria com o estresse hídrico dependem da intensidade e duração do estresse, espécie e estágio de crescimento das plantas (Naseem et al. 2018). O conhecimento da interação entre a inoculação de estirpes de *A. brasilense* com genótipo de milho sensível a seca (BRS 1040) em diferentes condições ambientais ainda é pouco explorado. Além disso, as estirpes de *A. brasilense* podem diferir em suas propriedades de conferir tolerância à seca, o que justifica seleção de estirpes mais eficazes (García et al. 2017).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as trocas gasosas, nutrientes e a morfologia radicular em plantas de milho inoculadas por *A. brasilense* em duas condições hídricas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

## 2.1 Material vegetal e microbiológico, condições de crescimento e design experimental

O experimento foi realizado em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas - MG, Brasil, situada nas coordenadas geográficas: 19°28' S, 44°15'08'' W, e altitude média de 732 m. As médias de temperaturas registradas durante o período de avaliação foram máxima de 31,2°C e mínima de 12,91°C. A umidade relativa do ar oscilou entre 30% a 72%. Foi utilizado um híbrido simples BRS 1040 sensível à seca desenvolvido pelo programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo. O inoculante utilizado foi obtido a partir da mistura de duas estirpes de *Azospirillum brasilense* homólogas, na proporção 1:1, pertencentes à coleção de bactérias diazotróficas do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com um fatorial 4 x 2, constituído por quatro inoculantes de *A. brasilense*: controle (sem inoculação), Az1 (CMS 7+26), Az2 (CMS 11+26) e Az3 (CMS 26+42) e duas condições hídricas contrastantes (irrigado e déficit hídrico), com quatro repetições.

As estirpes selecionadas foram cultivadas em caldo de soja triplicaseína, durante 72h, a temperatura de 29°C sob agitação constante. Após esse período, as culturas de cada estirpe foram centrifugadas, ressuspendidas em solução salina (0,85% NaCl) e ajustadas para densidade ótica igual a 1,0 em absorbância a 500 nm, que equivale a aproximadamente 10<sup>8</sup> células viáveis por mL (Reis 2015). A inoculação nas sementes foi realizada, utilizando-se como veículo o carvão vegetal moído e goma de fécula de mandioca como aderente.

A semeadura foi realizada em vasos plásticos com capacidade de 20 kg, contendo Latossolo Vermelho Distrófico Típico. Foram plantadas cinco sementes por vaso, e após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando duas plantas por vaso. A adubação foi realizada de acordo com a recomendação da análise química do solo, aplicando-se no momento do plantio o formulado 08-28-16 (10 g) e FTE BR12 (2,5 g) para 20 kg de solo. A cobertura foi realizada aplicando-se 4 g de uréia por vaso aos 30 dias após o plantio.

O teor de água no solo foi monitorado diariamente entre 09h00 e 15h00, com auxílio de sensores de umidade modelo GB Reader N1535 (Measurement Engineering, Austrália) instalados no centro de cada vaso, com auxílio de um trado de rosca, a uma profundidade de 20 cm. Todos os tratamentos foram mantidos em capacidade de campo (CC) (tensão de água no solo de -18 kPa) durante o período que antecedeu a imposição do estresse. No estágio V6 foi imposto o déficit hídrico por um período de 15 dias nos tratamentos que sofreram a restrição hídrica. Neste tratamento, a tensão de água no solo foi reduzida para -138 KPa, que corresponde a aplicação de 50% da água disponível no solo. O tratamento irrigado não recebeu alteração na

condição hídrica, mantendo a capacidade de campo. Os cálculos de reposição de água foram realizados com o auxílio de uma planilha eletrônica, feita em função da curva de retenção de água do solo.

## 2.2 Características ecofisiológicas

Ao final da imposição dos quinze dias de estresse hídrico, foi avaliada a altura das plantas utilizando uma régua graduada e a área foliar total da planta (LA) medida por meio de um leitor de área foliar (LI-3100C, Licor, Nebraska, USA). A parte aérea das plantas foi acondicionada em sacolas de papel e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 65°C, durante 72 horas, para obter a massa seca.

As trocas gasosas foram avaliadas na última folha totalmente expandida, no período da manhã, entre 8 e 10 horas, no primeiro e no último dia (15 dias) de imposição ao déficit hídrico. Foram avaliadas a taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs) e carbono interno (Ci). A partir dos valores de A e Ci foi obtido a eficiência de carboxilação (A/Ci), e de A e E a eficiência do uso da água (WUE). Foi utilizado o analisador de gases infravermelho (IRGA – Infrared Gas Analyzer), modelo LI 6400 (LI-COR, Lincoln, NE, EUA, equipado com um fluorômetro (LI-6400-40, LI-COR Inc.). As medições foram realizadas em área de folha de 1 cm<sup>2</sup> e o fluxo de ar na câmara teve concentração de CO<sub>2</sub> de 380 mmol mol<sup>-1</sup>. Foi utilizada uma densidade de fluxo de fótons (PPFD) de 1500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, com fonte de luz LED azul-vermelho e a temperatura da câmara foi de 28°C.

O potencial hídrico foliar (midday,  $\Psi_{md}$ ) foi determinado às 12h através de câmara de pressão tipo Scholander (Soil Moisture Equipment Corp., Modelo 3005, Santa Barbara CA, USA) em uma folha totalmente expandida por repetição.

## 2.3 Morfologia radicular e macronutrientes nos tecidos

Para a análise da morfologia do sistema radicular, foi utilizado o sistema de análise de imagens WinRhizo Pro 2007a (Regent Instruments, Sainte-Foy, QC, Canadá) acoplado a um scanner profissional (Epson, Expression 10000 XL, Epson America, Inc., USA) equipado com unidade de luz adicional (TPU). Os procedimentos para a obtenção das imagens foram feitos de acordo com Souza et al. (2012) após os 15 dias das plantas submetidas ao estresse. Foram determinadas as seguintes características: comprimento de raiz (cm), área de superfície de raiz (cm<sup>2</sup>), diâmetro médio de raiz (mm) e volume de raiz (cm<sup>3</sup>). Em seguida as raízes foram

armazenadas em sacos de papel e transportadas para uma estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até obtenção de massa constante.

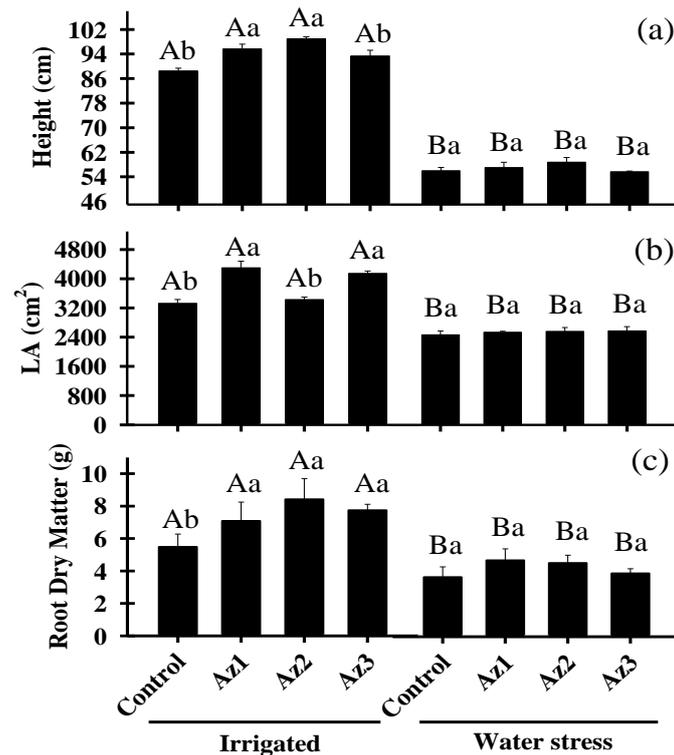
Após a realização do peso seco da parte aérea e raiz, as amostras foram moídas em moinho do tipo Willy. O material moído foi utilizado para determinação dos teores dos nutrientes N, P, K, Ca, Mg e S na massa seca de acordo com a metodologia proposta por Silva (2009).

#### 2.4 Análise dos dados

Para a análise estatística dos resultados, foi utilizada a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Scott Knott, a 0,05% de significância ( $p \leq 0.05$ ), no programa Sisvar versão 5.6 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

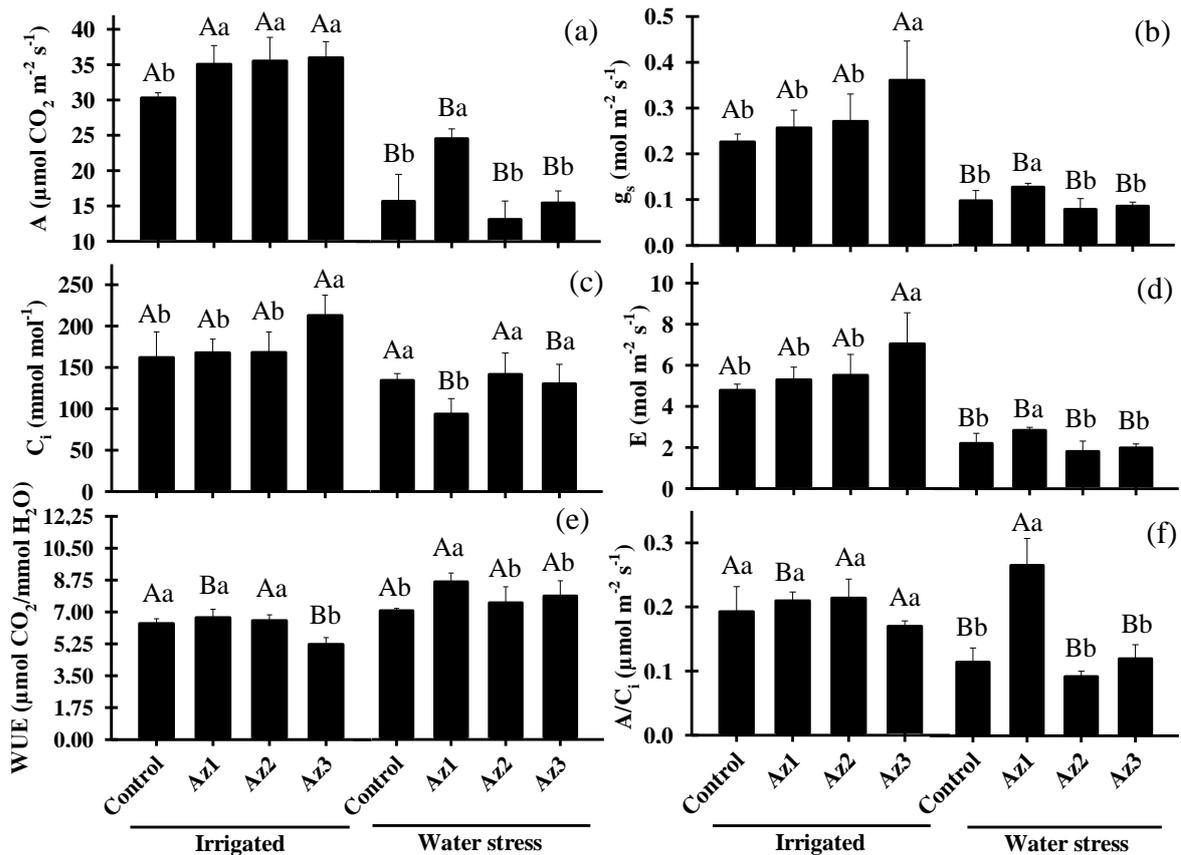
### 3 RESULTADOS

Na condição irrigada, as plantas de milho quando inoculadas com os inoculantes Az1 e Az2 aumentaram a altura em 7% e 11% respectivamente, quando comparada ao controle (Fig. 1a). A LA com os inoculantes Az1 e Az3 obteve aumento de 29% e 25%, respectivamente, quando comparado ao tratamento sem inoculação (Fig. 1b). A massa seca da raiz foi aumentada em 29% pelo inoculante Az1, 53% pelo Az2 e 41% pelo Az3 quando comparado ao controle nessa mesma condição (Fig. 1c). O déficit hídrico reduziu a altura, LA e massa seca das raízes das plantas de milho quando comparado as plantas na condição irrigada ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 1). Na condição de déficit hídrico não houve diferença entre os inoculantes para as mesmas variáveis ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 1abc) e nem para o  $\Psi_{md}$ . Entretanto, o  $\Psi_{md}$  foi maior nas plantas irrigadas em 66% ( $\Psi_{md} -1,09$ ) quando comparadas as plantas em déficit hídrico ( $\Psi_{md} -1,82$ ) (dados não mostrados).



**Figura 1** - Inoculação de *A. brasilense* em plantas de milho em condição irrigada e sob déficit hídrico. Altura das plantas (a); área foliar (LA) (b); massa seca da raiz (c). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Cada valor indica a média do tratamento  $\pm$  SE. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de uma mesma condição. Letras maiúsculas comparam os mesmos tratamentos nas duas condições hídricas.

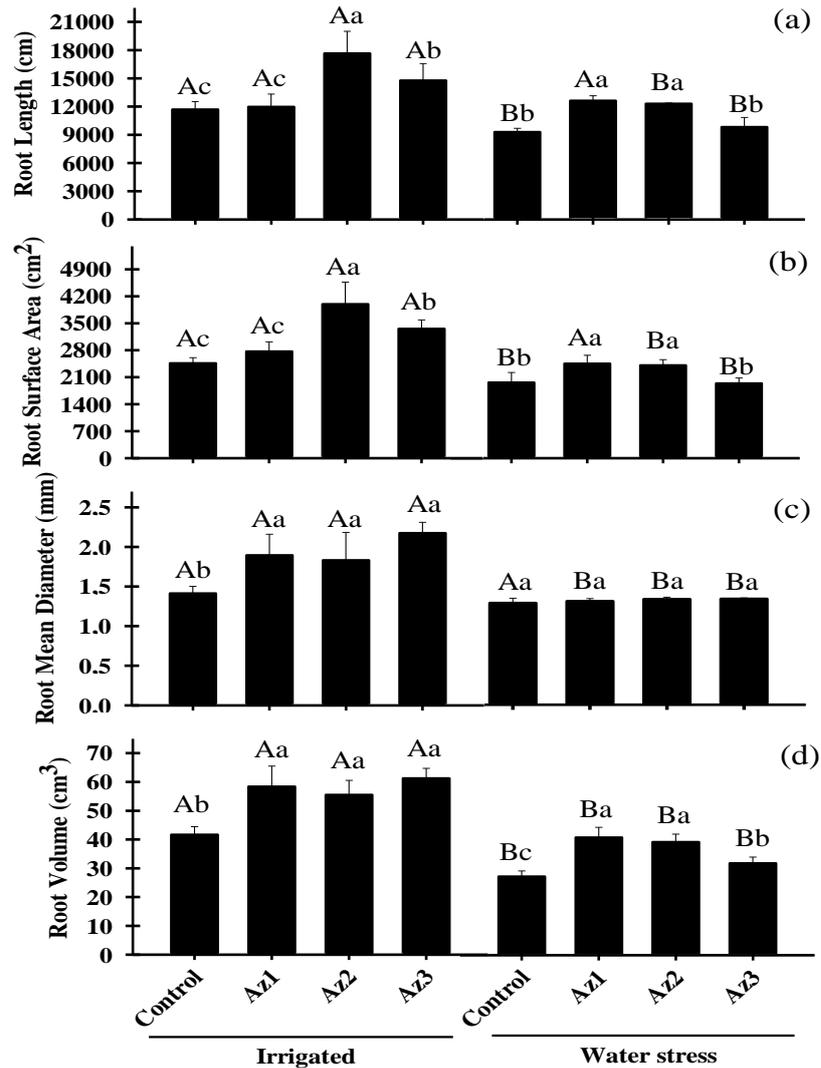
A inoculação por *A. brasilense* aumentou as trocas gasosas foliares no milho. No primeiro dia de imposição do estresse hídrico, todos os inoculantes na condição irrigada aumentaram a A quando comparado ao controle (Fig. 2a). A gs, Ci e E foram superiores com a presença do inoculante Az3 quando comparado aos demais tratamentos (Fig. 2bcd). O WUE foi menor com a inoculação por Az3 (Fig. 2e). A relação A/Ci não apresentou diferença estatística nos tratamentos para essa mesma condição hídrica ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 2ef).



**Figura 2** - Trocas gasosas foliares no primeiro dia da imposição do déficit hídrico no milho. (A) fotossíntese (a); ( $g_s$ ) condutância estomática (b); ( $C_i$ ) carbono interno (c); (E) transpiração (d); (WUE) eficiência no uso da água (e); (A/ $C_i$ ) eficiência de carboxilação (f). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Cada valor indica a média do tratamento  $\pm$  SE. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de uma mesma condição. Letras maiúsculas comparam os mesmos tratamentos nas duas condições hídricas.

No déficit hídrico o inoculante Az1 aumentou a A,  $g_s$ , E, a eficiência no uso da água (WUE) e relação A/ $C_i$  nas plantas do milho (Fig. 2abdef). As plantas com o Az1 apresentaram menor  $C_i$  em relação aos demais tratamentos (Fig. 2c).

De maneira geral, todos os inoculantes favoreceram o desenvolvimento radicular das plantas de milho no sistema irrigado (Fig. 3). Na condição irrigada, os inoculantes Az2 e Az3 proporcionaram maior comprimento, área superficial, diâmetro médio e volume do sistema radicular em comparação as plantas não inoculadas (Fig. 3a). Na presença de todos os inoculantes o diâmetro médio e o volume radicular foram superiores quando comparado ao controle (Fig. 3cd).



**Figura 3** - Morfologia radicular das plantas de milho inoculadas por *A. brasilense*. Comprimento (a); área superficial (b); diâmetro médio (c); volume radicular (d). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Cada valor indica a média do tratamento  $\pm$  SE. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de uma mesma condição. Letras maiúsculas comparam os mesmos tratamentos nas duas condições hídricas.

Na condição de déficit hídrico, os inoculantes Az1 e Az2 proporcionaram o melhor crescimento das raízes, área superficial e volume radicular comparado as plantas não inoculadas (Fig. 3abd). Não houve diferença no diâmetro médio das raízes entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 3c).

Na condição irrigada, a presença de *A. brasilense* alterou estatisticamente as concentrações dos elementos K, Ca e S ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 1). A inoculação não proporcionou alteração nos nutrientes (N, P, K, Ca, S e Mg) para a condição de déficit hídrico ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Concentração dos macronutrientes (g planta<sup>-1</sup>) na biomassa seca total das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* em condição irrigada e déficit hídrico. Sete Lagoas – MG.

Conc. (g plant <sup>-1</sup> )	Irrigation				Water stress				CV (%)
	Az0	Az1	Az2	Az3	Az0	Az1	Az2	Az3	
<b>N</b>	3.18 aA	3.81 aA	3.62 aA	3.82 aA	2.00 aB	2.28 aB	2.16 aB	2.13 aB	13.38
<b>P</b>	0.22 aA	0.26 aA	0.26 aA	0.38 aA	0.16 aB	0.19 aB	0.17 aB	0.17 aB	18.94
<b>K</b>	2.74 bA	3.45 aA	2.93 bA	3.48 aA	1.48 aB	1.67 aB	1.71 aB	1.65 aB	16.10
<b>Ca</b>	0.63 bA	0.82 aA	0.79 aA	0.88 aA	0.45 aA	0.56 aB	0.51 aB	0.49 aB	19.64
<b>S</b>	0.28 bA	0.28 bA	0.27 bA	0.35 aA	0.16 aB	0.18 aB	0.17 aB	0.16 aB	17.31
<b>Mg</b>	0.37 aA	0.45 aA	0.42 aA	0.44 aA	0.19 aB	0.24 aB	0.21 aB	0.21 aB	18.60

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de uma mesma condição. Letras maiúsculas comparam os mesmos tratamentos nas duas condições hídricas.

## 4 DISCUSSÃO

O déficit hídrico é responsável por causar modificações desde o nível molecular até os morfofisiológicos, limitando o crescimento e desenvolvimento das plantas. No presente estudo, foi demonstrado que tanto a morfologia radicular como as trocas gasosas das plantas de milho BRS 1040 foram fortemente afetados em poucos dias de seca. Também foi notório que a inoculação bacteriana por *A. brasilense* melhorou o crescimento do sistema radicular do milho e as trocas gasosas foliares em ambas as condições. Em consequência, conferiu às plantas melhor sobrevivência e aumento da exploração do solo pelas raízes para maior captação de água e nutrientes.

A inoculação por *A. brasilense* na condição irrigada proporcionou aumento na taxa fotossintética (A) o que pode ter resultado em maior altura e LA. Além disso, houve aumento em todas as variáveis do sistema radicular, com incremento na biomassa das raízes. Conseqüentemente, essas raízes puderam explorar o perfil do solo. Esses resultados podem confirmar os benefícios trazidos por *A. brasilense* e sugerir o uso desses inoculantes para otimizar o crescimento da cultura do milho. A presença de *A. brasilense* aumentou a concentração dos nutrientes K, Ca, e S na condição irrigada. Quadros et al. (2014) relataram resultados semelhantes com aumento na altura do milho (R1), massa seca e teor de N nos tratamentos com inoculação por *A. brasilense*. Ademais, Fukami et al. (2017) descreveram que *Azospirillum* promove o desenvolvimento das plantas auxiliando na aquisição de recursos importantes, como água, nitrogênio, fósforo e outros minerais ou ainda, moderando os níveis hormonais nas plantas. Além disso, para a produção de milho em alta tecnologia e com irrigação, o uso desses inoculantes a base de *A. brasilense* é indicado e pode melhorar o desenvolvimento desta cultura.

A exposição do milho ao déficit hídrico diminuiu o potencial hídrico foliar ( $\Psi_{md}$ ), mas não houve diferença entre os tratamentos com a presença de *A. brasilense*. Porém, resultados diferentes foram encontrados por Arzanesh et al. (2011), que descreveram que estirpes de *Azospirillum sp.* diminuíram o potencial hídrico e aumentou conteúdo relativo da água da folha em plantas de trigo sob seca.

Com relação às trocas gasosas, um menor  $\Psi_{md}$  decorrente do déficit hídrico refletiu em alterações nas variáveis analisadas. Uma das primeiras respostas das plantas ao déficit hídrico é a limitação estomática (Souza et al. 2013; Reis et al. 2018), reduzindo a  $g_s$  e E como um mecanismo evolutivo para diminuir a perda de água para a atmosfera (Ávila et al. 2017). O fechamento dos estômatos durante as condições de déficit hídrico reduz a absorção de  $CO_2$  pelas plantas, diminuindo o carbono no mesófilo das folhas e assim, reduzindo a taxa

fotossintética e o desenvolvimento das plantas (Mutava et al. 2015; Dar et al. 2018). É possível que em consequência desta diminuição nas trocas gasosas foliares durante o período de exposição das plantas a essa condição, principalmente na A (fixação de C), teve como efeito a redução da altura, LA e massa seca da raiz do milho quando comparado com as plantas da condição irrigada.

No entanto, a presença de *A. brasilense* nas plantas com o inoculante Az1 sob déficit hídrico proporcionou maior A, gs, E e eficiência de carboxilação e menores valores de carbono interno. Este resultado pode indicar que mesmo com quantidades semelhantes de carbono no mesófilo foliar a atividade de carboxilação (Rubisco) foi maior e, conseqüentemente, ocorria mais consumo de CO<sub>2</sub>. Este resultado sugere que a presença de Az1 reduziu a limitação não-estomática ou do metabolismo bioquímico e das reações fotoquímicas (eficiência de dissipação dos fotossistemas ou quenchings) que o déficit hídrico pode acarretar nas plantas (Demirevska et al. 2008; Souza et al. 2013; Souza et al. 2016). Além disso, Az1 conferiu aumento na abertura estomática (gs), auxiliando nos processos biofísicos foliares, que estão diretamente relacionados com as trocas gasosas das plantas com o ambiente (gs e E).

A inoculação por Az1, também, proporcionou maior eficiência no uso da água (WUE) na seca. Este aumento na WUE pelas plantas nesta condição adversa (seca) pode estar relacionado a *A. brasilense* poder condicionar os ajustes osmóticos no espaço apoplástico e/ou simplástico (Kasim et al. 2013). Desta maneira, este processo é uma resposta das plantas ao déficit hídrico na busca por mitigar a desidratação nos seus tecidos. Plantas com melhor status hídrico conseguem manter a taxa fotossintética (A e A/Ci), e proporcionar melhor resfriamento das folhas pela transpiração (Maurel et al. 2016). Assim, dentro do cenário do cultivo na safrinha e da perspectiva do aquecimento global, plantas com capacidade de maior WUE podem contribuir para diminuir os efeitos deletérios decorrentes da seca e aumentar a produtividade agrícola (Kørup et al. 2018).

Contudo, vale ressaltar que ao final da imposição do estresse hídrico (15 dias), as bactérias não proporcionaram alteração nas trocas gasosas foliares e o potencial hídrico em ambas as condições (material suplementar). Possivelmente o tempo de exposição e a quantidade de água (intensidade) no déficit hídrico pode ter inibido o crescimento e as respostas metabólicas da *A. brasilense* nas plantas de milho. Em condições desfavoráveis ou de estresse, *A. brasilense* apresenta vários mecanismos de proteção como, por exemplo, a formação de cistos (Marchal e Vanderleyden 2000). Em consequência, pode ocorrer inativação do metabolismo da bactéria.

Na condição irrigada, sugere-se que a não diferença entre os tratamentos para as trocas gasosas com os inoculantes seja devido as PGPR ter maior influência nos primeiros estádios

vegetativos. Lin et al. (2018) encontraram melhores respostas no crescimento inicial das plantas de milho entre os estádios V4 e V6 com o uso de PGPR quando comparado ao estágio VT. Os mesmos autores justificaram este fato devido aos fitormônios e os reguladores do crescimento das plantas secretados pelas PGPR (Fukami et al. 2018) estimularem o desenvolvimento das plântulas nos estádios iniciais quando a exigência de nutrientes ainda é baixa. Ademais, o uso recomendado de N pode mascarar a influência do PGPR sobre o crescimento do milho quando as plantas atingiram seus estádios posteriores de crescimento vegetativo (Lin et al. 2018).

Como discutido, a inoculação por *A. brasilense* modificou a morfologia radicular das plantas de milho em ambas as condições, com aumento no comprimento, área superficial e volume radicular. A presença de *A. brasilense* nas plantas na condição irrigada e com déficit hídrico proporcionou acréscimo médio de 40% e 47%, respectivamente, de volume radicular quando comparado as plantas sem inoculação. Para ambas condições, o destaque é principalmente para os inoculantes Az1 e Az2, que melhoraram o desenvolvimento do sistema radicular (irrigado e estressado), refletindo em maior massa seca das raízes (irrigado). Este investimento no desenvolvimento da arquitetura radicular das plantas com Az1 possivelmente esteja relacionado com maior taxa fotossintética. Estes resultados corroboram com os encontrados por Coelho et al. (2017) que encontraram aumento da massa seca da raiz em milho de 16% com a inoculação por *A. brasilense*.

Em Poaceae (milho), as raízes laterais e os tricomas radiculares são as regiões preferencialmente colonizadas pelas PGPR (*Azospirillum*) (Combes-Meynet et al. 2011). Estudos recentes mostraram que a inoculação por *A. brasilense* pode alterar a morfologia radicular através da produção de substâncias reguladoras do crescimento das plantas, como os fitormônios (Kaushal 2019), principalmente do AIA (ácido Indol-3-acético) (Bashan e Bashan 2010). Estes fitormônios estimulam a formação de novas raízes, proporcionando assim maior área de superfície de raiz (Bhardwaj et al. 2014; Cassán e Diaz-Zorita 2016; Calzavara et al. 2018; Dar et al. 2018). O desenvolvimento de maior área superficial das raízes está diretamente relacionado à eficiência da planta em adquirir nutrientes e água do solo. Para tanto, esta resposta na melhoria do desenvolvimento do sistema radicular pode estar relacionada também a *A. brasilense* ser capaz de realizar fixação biológica de N<sub>2</sub> (Fibach-Paldi et al. 2012; Döbereiner et al. 1987).

Cassán et al. (2014) enfatizaram o efeito de *A. brasilense* nas raízes, sendo considerado uma clara vantagem para as plantas por melhorar a nutrição vegetal, e assim proporcionar maior resistência e tolerância a estresses ambientais. Em déficit hídrico, o crescimento das raízes à medida que o solo vai secando, é preferencialmente em profundidade. Isto constitui uma estratégia de adaptação das plantas a procura de água, que pode refletir em uma maior

produtividade das culturas. Além disso, Souza et al. (2016) relataram que um sistema radicular bem desenvolvido e mais profundo contribui substancialmente para a tolerância das plantas sob o déficit hídrico.

No entanto, a presença dos inoculantes não alterou a biomassa do sistema radicular no déficit hídrico. Isto pode indicar que com a presença da *A. brasilense* houve uma maior exploração do solo para obtenção de água com um mesmo investimento de energia (fotoassimilados) para as raízes. Lynch et al. (2014) descreveram que uma planta que seja capaz de adquirir um recurso do solo limitante como água e nutrientes a um custo metabólico reduzido terá produtividade superior, porque terá mais energia (recursos metabólicos) disponíveis para o desenvolvimento e reprodução.

Na condição irrigada, a inoculação por *A. brasilense* (Az1, Az2 e Az3) proporcionou aumento nas concentrações de K, Ca e S. Este resultado corrobora com os encontrados por Teixeira Filho et al. (2017) que relataram que à inoculação com *A. brasilense* em trigo resultou em elevação nas concentrações de N e S na palha (maturidade fisiológica) quando comparado ao tratamento sem inoculação.

Na condição de déficit hídrico, é possível sugerir que o tempo de exposição a este estresse limitou a atividade da *A. brasilense*, e conseqüentemente a absorção de alguns nutrientes pelas plantas de milho. Vurukonda et al. (2016) mencionaram que o estresse hídrico, decorrente da seca, diminuí a disponibilidade e o transporte de nutrientes do solo para as plantas, uma vez que o transporte dos nutrientes até as raízes é limitado pela água.

Os resultados da interação de *A. brasilense* com as plantas e as condições ambientais são bastantes dinâmicos. No entanto, é possível verificar o efeito positivo no crescimento do milho com a inoculação em ambas as condições de estudo, justificando o uso destes inoculantes.

## **5 CONCLUSÃO**

Em genótipo de milho sensível a seca em alta tecnologia e com irrigação o uso de inoculantes a base de *A. brasilense* (Az1, Az2 e Az3) é indicado e pode intensificar o crescimento da cultura.

A inoculação por Az1 atenua os efeitos deletérios causados pela seca resultando em melhor crescimento do sistema radicular das plantas de milho.

A prática agrícola da inoculação com bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* contribui para a mitigação de déficit hídrico na cultura de milho em condições controladas.

## **AGRADECIMENTOS**

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, for the financial resources. Finance Code 001.

## REFERÊNCIAS

- Arzanesh MH, Alikhani HA, Khavazi K, Rahimian HA, Miransari M. 2011. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. *World J Microbiol Biotechnol.* 27(2):197-205.
- Ávila RG, Magalhaes PC, Alvarenga AA, Lavinsky ADO, Campos CN, Souza TC, Gomes Júnior CC. 2017. Drought-tolerant maize genotypes invest in root system and maintain high harvest index during water stress. *Rev Bras Milho Sorgo.* 15(3):450-460.
- Bashan Y, Bashan LE. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. *Adv Agron* 108(77):136.
- Bhardwaj D, Ansari MW, Sahoo RK, Tuteja N. 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb Cell Fact.* 13(1):66.
- Cassán F, Vanderleyden J, Spaepen S. 2014. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *J Plant Growth Regul.* 33(2):440-459.
- Cassán F, Diaz-Zorita M. 2016. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biol Biochem.* 103:117-130.
- Calzavara AK, Paiva PHG, Gabriel LC, Oliveira ALM, Milani K, Oliveira HC, et al. 2018. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. *Plant Biol.* 20(5):870-878.
- Coelho AE, Tochetto C, Turek TL, Michelon LH, Fioreze SL. 2017. Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* em plantas de milho submetidas à restrição hídrica. *Sci Agrar.* 16(2):186-192.
- Combes-Meynet E, Pothier JF, Moëne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C. 2011. The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24:271–284.
- Dar ZM, Masood A, Mughal AH, Asif M, Malik MA. 2018. Review on Drought Tolerance in Plants Induced by Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *J Pharmacogn Phytochem.* 7(3):2802-2804.
- Demirevska K, Simova-Stoilova L, Vassileva V, Feller U. 2008. Rubisco and some chaperone protein responses to water stress and rewatering at early seedling growth of drought sensitive and tolerant wheat varieties. *Plant Growth Regul.* 56(2): 97.

Döbereiner J, Pedrosa FO. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in non leguminous crop plants. Science Tech, Springer Verlag, Madison, USA. 1-155.

Ferreira AS, Pires RR, Rabelo PG, Oliveira RC, Luz JMQ, Brito CH. 2013. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. *Appl Soil Ecol.* 72:103-108.

Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y. 2012. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett.* 326(2):99-108.

Fukami J, Ollero FJ, Megías M, Hungria M. 2017. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express* 7(1):153.

Fukami J, Cerezini P, Hungria M. 2018. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express.* 8(1):73.

García JE, Maroniche G, Creus C, Suárez-Rodríguez R, Ramirez-Trujillo JA, Groppa MD. 2017 In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiol Res.* 202:21-29.

Kasim WA, Osman ME, Omar MN, El-Daim IAA, Bejai S, Meijer J. 2013. Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. *J Plant Growth Regul.* 32(1):122-130.

Kaushal M. 2019. Portraying Rhizobacterial Mechanisms in Drought Tolerance: A Way Forward Toward Sustainable Agriculture. In: *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture.* Woodhead Publishing, 2019. 195-216.

Kørup K, Lærke PE, Baadsgaard H, Andersen MN, Kristensen K, Münnich C, et al. (2018). Biomass production and water use efficiency in perennial grasses during and after drought stress. *Glob Change Biol Bioenergy.* 10(1):12-27.

Lin Y, Watts DB, Kloepper JW, Torbert HA. 2018. Influence of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Corn Growth Under Different Fertility Sources. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 49(10):1239-1255.

Lynch JP, Chimungu JG, Brown KM. 2014. Root anatomical phenes associated with water acquisition from drying soil: targets for crop improvement. *Environ Exp Bot.* 65(21):6155-6166.

Marchal K, Vanderleyden J. 2000. The "oxygen paradox" of dinitrogen-fixing bacteria. *Biol Fertil Soils.* 30(5-6):363-373.

Martins Dc, Borges ID, Cruz JC, Netto DAM. 2016. Produtividade de duas cultivares de milho submetidas ao tratamento de sementes com bioestimulantes fertilizantes líquidos e *Azospirillum sp.* *Rev Bras Milho Sorgo.* 15(2):217-228.

Maurel C, Verdoucq L, Rodrigues O. 2016. Aquaporins and plant transpiration. *Plant Cell Environ.* 39(11):2580-2587.

- Mutava RN, Prince SJK, Syed NH, Song L, Valliyodan B, Chen W, Nguyen HT. 2015. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: a comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. *Plant Physiol Biochem.* 86:109-120.
- Ngumbi E, Kloepper J. 2016. Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. *Appl Soil Eco.* 105:109-125.
- Naseem H, Ahsan M, Shahid MA, Khan N. 2018. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *J Basic Microbiol.* 1(14):1-14.
- Quadros PD, Roesch LFW, Silva PRF, Vieira VM, Roehrs DD, Camargo FAO. 2014. Desempenho agrônomo a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. *Ceres,* 61(2):209-218.
- Reis CO, Magalhães PC, Avila RG, Almeida LG, Rabelo VM, Carvalho DT. et al. 2018. Action of N-Succinyl and N, O-Dicarboxymethyl Chitosan Derivatives on Chlorophyll Photosynthesis and Fluorescence in Drought-Sensitive Maize. *J Plant Growth Regul.* 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9877-9>.
- Reis DP. 2015. Produtividade de milho e ecologia microbiana da rizosfera de plantas sob diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del Rei. São João Del Rei - MG, 1-61.
- Romero AM, Vega D, Correa OS. 2014. *Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. *Appl Soil Ecol.* 82:38-43.
- Silva FC. 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1-370.
- Souza TC, Castro EM, Magalhães PC, Alves ET, Pereira FJ. 2012. Early characterization of maize plants in selection cycles under soil flooding. *Plant Breed.* 131(4):493-501.
- Souza TC, Castro EM, Magalhães PC, Lino LO, Alves ET, Albuquerque PEP. 2013. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. *Acta Physiol Plant.* 35:3201-3211.
- Souza TC, Magalhães PC, Castro EM, Duarte VP, Lavinsky AO. 2016. Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. *Pesqui Agropecu Bras.* 51(4):330-339.
- Teixeira Filho MCM, Galindo FS, Buzetti S, Santini JMK. 2017. Inoculation with *Azospirillum brasilense* Improves Nutrition and Increases Wheat Yield in Association with Nitrogen Fertilization. In: *Wheat Improvement, Management and Utilization.* 2017. 99-114.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëgne-Loccozy Y, Muller D. et al. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci.* 4(356):1-19.

Van Oosten MJ, Pepe O, Pascale S, Silletti S, Maggio A. 2017. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chem Biol Technol Agric.* 4(1):1-12.

Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res.* 184:13-24.

### **CAPÍTULO III - *Azospirillum brasilense* favorece características morfofisiológicas e acúmulo de nutrientes em milho cultivado sob dois regimes hídricos**

**RESUMO:** O emprego de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) é uma ferramenta importante e promissora para a agricultura sustentável. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas morfofisiológicas e a absorção de nutrientes das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* em duas condições hídricas. O experimento foi realizado em casa de vegetação, com dez tratamentos: cinco inoculantes de *A. brasilense* (Controle, Az1, Az2, Az3 e Az4) aplicados na semente e duas condições hídricas - irrigado e em déficit hídrico. Os tratamentos com déficit hídrico foram impostos no estágio V6 por um período de 15 dias. Foram avaliadas, após a imposição do déficit hídrico, as características fitotécnicas, trocas gasosas, morfologia radicular, massa seca da parte aérea, raiz e total e análise de nutrientes. *Azospirillum brasilense* (Az1, Az2, Az3 e Az4) proporcionou maior crescimento, aumento nas trocas gasosas e absorção de nutrientes em condição de irrigação. A inoculação por Az1 e Az3 beneficiou a arquitetura radicular das plantas de milho, com maior exploração do perfil do solo por estas raízes. O déficit hídrico causou redução no desenvolvimento das plantas de milho. A inoculação por Az1, Az2 e Az3 pode melhorar o crescimento vegetal, absorção de nutrientes e mitigar os efeitos do déficit hídrico no desenvolvimento das plantas de milho.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Déficit hídrico; WinRhizo; Área foliar; Rizobactéria.

## **1 INTRODUÇÃO**

As plantas ao longo do seu desenvolvimento podem ser expostas a vários estresses ambientais. O déficit hídrico é o estresse abiótico que mais reduz a produtividade das áreas cultivadas no mundo, impactando negativamente a sustentabilidade agrícola (KERRY et al., 2018). A resposta das plantas ao estresse hídrico é a redução nas trocas gasosas, diminuição na área foliar e na taxa de crescimento (MUTAVA et al., 2015; DAR et al., 2018). Em condições de baixa disponibilidade hídrica as plantas absorvem menor quantidade de nutrientes por ocorrer diminuição no transporte por fluxo de massa (VURUKONDA et al., 2016).

O milho é uma das culturas mais sensíveis à condição hídrica (DJEMEL et al., 2019), e em geral vêm sendo mundialmente cultivada sob condições de déficit hídrico. Com redução de aproximadamente 40% de disponibilidade hídrica, o milho reduz em média a sua produtividade em trinta e nove por cento (DARYANTO et al., 2016). A tolerância das plantas de milho ao déficit hídrico proveniente de veranicos precisa ser melhorada afim de que satisfaçam as demandas de alimentos em áreas com disponibilidade limitada de recursos hídricos. Neste sentido, a busca por pesquisas tecnológicas que alinhem disponibilidade hídrica com manejo dos solos vem ganhando importância no cenário global atual.

O emprego de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) é uma ferramenta importante e promissora para a agricultura sustentável. PGPR oferece alternativa economicamente atraente e ecologicamente correta para aumentar a disponibilidade de água e nutrientes (PRASAD et al., 2019). Estes microrganismos, devido ao seu enorme pool genético, são fonte de reações bioquímicas que reciclam os nutrientes para o crescimento das plantas (TKACZ; POOLE, 2015). *Azospirillum* é um dos gêneros de bactéria mais bem estudados das PGPR. Esta bactéria é capaz de colonizar várias espécies de plantas monocotiledôneas, incluindo culturas importantes como trigo, milho e arroz (YADAV; SARKAR, 2019).

Os benefícios trazidos pela associação desta bactéria com as plantas são a síntese de várias substâncias reguladoras do crescimento, como os fitormônios (BARNAWAL et al., 2019); fixação biológica do N (REVOLTI et al., 2018); solubilização de fosfato e ferro (GALINDO et al., 2016; REVOLTI et al., 2018); biocontrole de fitopatógenos (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016) e proteção das plantas contra estresses abióticos (DAR et al., 2018; KAUSHAL, 2019). O uso de *Azospirillum* devido aos efeitos positivos apresentados no crescimento e na nutrição vegetal, pode ser considerado bioestimulante de plantas (VAN OOSTEN et al., 2017).

A inoculação por *Azospirillum brasilense* promove o crescimento vegetal devido à combinação de vários mecanismos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos (BASHAN; BASHAN, 2010). Nas raízes, *Azospirillum* provoca modificações na arquitetura radicular, as quais estão relacionadas ao aumento no número de radículas e no comprimento da raiz, podendo refletir em maior exploração de solo (VACHERON et al., 2013) e absorção de nutrientes (DAR et al., 2018). A inoculação pode ainda induzir a sinalização hormonal da raiz para a parte aérea, regulando o crescimento foliar e outros processos fisiológicos das plantas (BARNAWAL et al., 2019).

É importante considerar que a interação das estirpes de *A. brasilense* com as plantas é bastante dinâmica, considerando a genética da própria bactéria, estágio vegetativo da planta, tipo de solo, além da condição ambiental em estudo (COELHO et al., 2017). Desta forma, ampliar estes estudos com novos inoculantes em genótipos de milho tolerantes a seca (DKB 390) e tropicais, além de caracterizar morfologia concomitantemente com a fisiologia podem trazer grandes benefícios para agricultura mundial. Além disso, estudos de PGPR sob estresse abiótico como o déficit hídrico ainda é pouco explorado em milho. Aliado a estes fatores, a seleção de estirpes tolerantes e eficazes ao déficit hídrico é importante e torna as práticas agrícolas mais sustentáveis.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas morfofisiológicas e absorção de nutrientes das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* em duas condições hídricas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Design experimental, material vegetal e microbiológico e condições de crescimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas - MG, Brasil, situada nas coordenadas geográficas: 19°28' S, 44°15'08'' W, e altitude média de 732 m. As médias de temperaturas registradas durante o período de avaliação foram máxima de 31,2°C e mínima de 12,91°C. A umidade relativa do ar oscilou entre 30 a 72%. O híbrido de milho utilizado foi o DKB 390 que apresenta tolerância a baixa disponibilidade hídrica e adaptação a diferentes tipos de solo e manejos. De acordo com Souza et al. (2013) e Ávila et al. (2017), este híbrido vem sendo classificado como tolerante ao déficit hídrico devido as suas adaptações morfofisiológicas e bioquímicas. Para a formulação de cada inoculante foi utilizada a combinação de duas estirpes homólogas de *Azospirillum brasilense*, na proporção 1:1 (v/v), pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em fatorial 5 x 2, constituído por cinco inoculantes de *A. brasilense*: controle (sem inoculação), Az1 (CMS 7+26), Az2 (CMS 11+26), Az3 (CMS 26+42) e Az4 (CMS 7+11) e duas condições hídricas contrastantes (irrigado e déficit hídrico), com quatro repetições.

As estirpes selecionadas foram cultivadas em caldo de soja triplicaseína, durante 72h, a temperatura de 29°C sob agitação constante. Após esse período, as culturas de cada estirpe foram centrifugadas, ressuspendidas em solução salina (0,85% NaCl) e ajustadas para aproximadamente  $10^8$  células viáveis por mL (REIS, 2015). A inoculação foi realizada nas sementes, utilizando-se como veículo o carvão vegetal moído e goma de fécula de mandioca como aderente.

A semeadura foi realizada em vasos plásticos com capacidade de 20 dcm<sup>3</sup>, contendo Latossolo Vermelho Distrófico Típico. Foram plantadas cinco sementes por vaso, e após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando duas plantas por vaso. A adubação foi realizada de acordo com a recomendação da análise química do solo, aplicando-se no momento do plantio o formulado 08-28-16 (10 g) e FTE BR12 (2,5 g) para 20 dcm<sup>-3</sup> de solo. A cobertura foi realizada aplicando-se 4 g de uréia por vaso aos 30 dias após o plantio.

O teor de água no solo foi monitorado diariamente entre 09h00 e 15h00, com auxílio de sensores de umidade modelo GB Reader N1535 (Measurement Engineering, Austrália) instalados no centro de cada vaso a uma profundidade de 20 cm. Todos os tratamentos foram mantidos em capacidade de campo (CC) (tensão de água no solo de  $-18$  kPa) durante o período que antecedeu a imposição do estresse. No estádio V6 (seis folhas completamente expandidas) foi imposto o déficit hídrico por um período de 15 dias nos tratamentos que sofreram a restrição hídrica. Nestes tratamentos, a tensão de água no solo foi reduzida para  $-138$  KPa, que corresponde a aplicação de 50% da água disponível no solo. Esta restrição hídrica foi imposta por um período de quinze dias. O tratamento irrigado não recebeu alteração na condição hídrica, mantendo a capacidade de campo. Os cálculos de reposição de água foram realizados com o auxílio de uma planilha eletrônica, feita em função da curva de retenção de água do solo.

## 2.2 Variáveis biométricas e massa seca

Após quinze dias de déficit hídrico foram avaliadas as variáveis biométricas: altura das plantas utilizando uma régua graduada, o diâmetro do caule utilizando um paquímetro digital e mensurado ao nível do solo e a área foliar total da planta (LA) medida por meio de um leitor de área foliar (LI-3100C, Licor, Nebraska, USA). A parte aérea das plantas foram acondicionadas em sacolas de papel e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar ( $65^{\circ}\text{C}$ ) durante 72 horas, onde depois foi avaliado a massa seca.

## 2.3 Características ecofisiológicas

As trocas gasosas foram avaliadas na última folha totalmente expandida, no período da manhã, entre 8 e 10 horas, no primeiro e no último dia de imposição ao déficit hídrico (15 dias). Foram avaliadas a taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs) e carbono interno (Ci). A partir dos valores de A e Ci foi obtido a eficiência de carboxilação (A/Ci). Foi utilizado o analisador de gases infravermelho (IRGA – Infrared Gas Analyzer), modelo LI 6400 (LI-COR, Lincoln, NE, EUA, equipado com uma câmara (LI-6400-40, LI-COR Inc.). As medições foram realizadas em área de folha de  $1\text{ cm}^2$  e o fluxo de ar na câmara foi com uma concentração de  $\text{CO}_2$  de  $380\text{ mmol mol}^{-1}$ . Foi utilizado uma densidade de fluxo de fótons (PPFD) de  $1500\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ , com fonte de luz LED azul-vermelho e a temperatura da câmara foi de  $28^{\circ}\text{C}$ .

O potencial hídrico foliar (midday,  $\Psi_{\text{md}}$ ) foi determinado as 12h através de uma câmara de pressão tipo Scholander (Soil Moisture Equipment Corp., Modelo 3005, Santa Barbara CA, USA) em uma folha totalmente expandida por repetição.

## 2.4 Morfologia radicular e macronutrientes nos tecidos

Para a análise da morfologia do sistema radicular foi utilizado o sistema de análise de imagens WinRhizo Pro 2007a (Regent Instruments, Sainte-Foy, QC, Canadá) acoplado a scanner profissional (Epson, Expression 10000 XL, Epson America, Inc., USA) equipado com unidade de luz adicional (TPU). Os procedimentos para a obtenção das imagens foram feitos de acordo com Souza et al. (2012). Foram determinadas as seguintes características: comprimento de raiz (cm), área de superfície de raiz (cm<sup>2</sup>), diâmetro médio de raiz (mm) e volume de raiz (cm<sup>3</sup>). Em seguida as raízes foram armazenadas em sacos de papel e transportadas para uma estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até obtenção de massa constante.

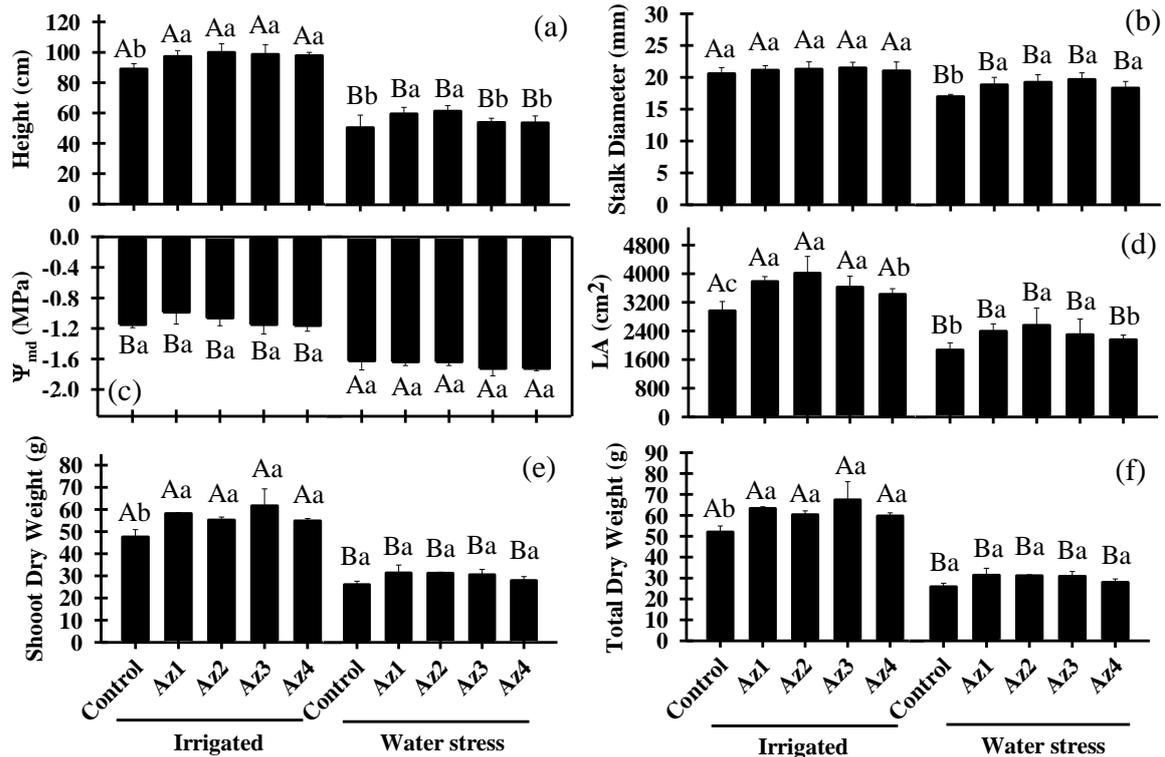
Após a avaliação da massa seca da parte aérea e da raiz, as amostras foram moídas em moinho do tipo Willy. O material moído foi utilizado para determinação do acúmulo dos nutrientes N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Mn e Zn na massa seca de acordo com a metodologia de Silva (2009).

## 2.5 Análise dos dados

Para todas as variáveis analisadas foram calculadas as médias e o  $\pm$  erro padrão (SE). Para análise estatística dos resultados utilizou-se a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Scott-Knott a 5 % de significância ( $p \leq 0.05$ ), com emprego do programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

## 3 RESULTADOS

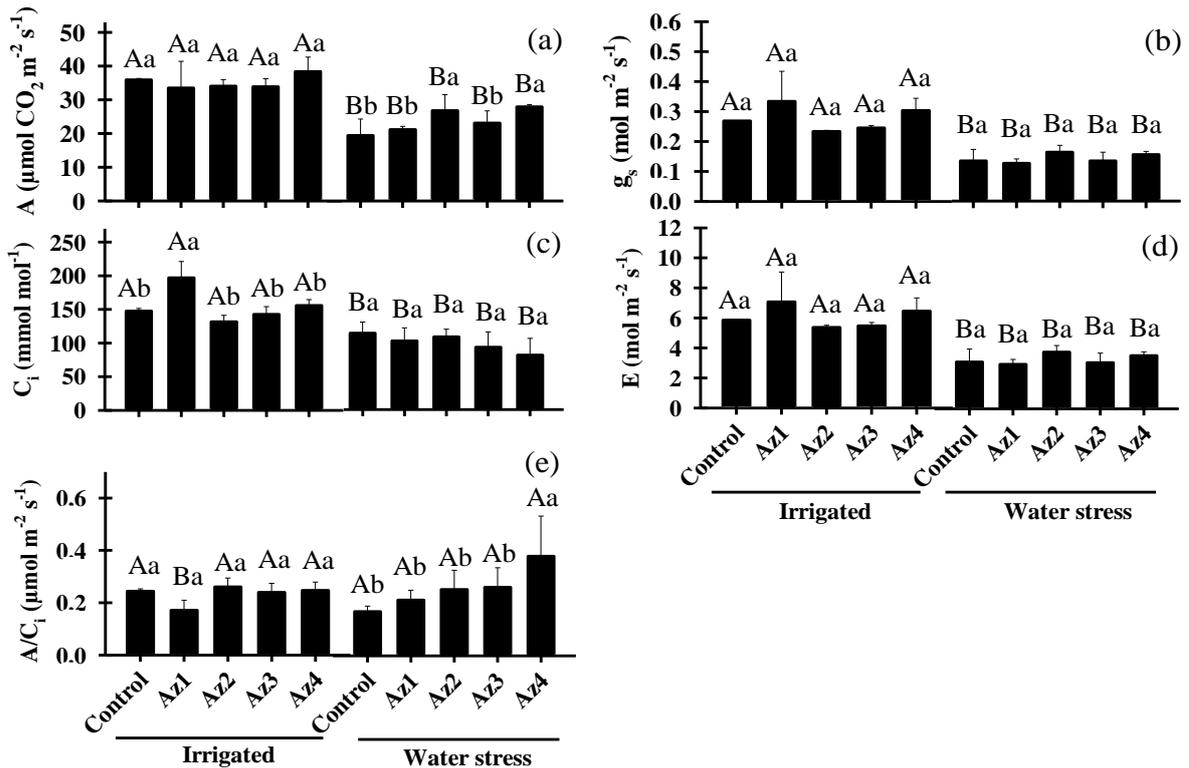
Na condição irrigada a presença de todos os inoculantes (Az1, Az2, Az3 e Az4) proporcionaram aumento na altura de 9 a 12% e LA de 15 a 35% em comparação ao controle (Fig. 1ad). O mesmo padrão foi observado para a massa seca da parte aérea, com os inoculantes aumentando em Az1 (22%), Az2 (16%), Az3 (29%) e Az4 (15%) e maior massa seca total (Az1-21%, Az2-16%, Az3-29% e Az4-15%) quando comparado as plantas controle não inoculadas (Fig. 1ef). A massa seca da raiz não diferiu entre os tratamentos (dados não mostrados). Não houve diferença no diâmetro médio do colmo e o  $\Psi_{md}$  entre os tratamentos para essa mesma condição ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 1bc).



**Figura 1** - Plantas de milho submetidas a condição irrigada e ao déficit hídrico inoculadas com *A. brasilense* (Az1, Az2, Az3 e Az4). Altura das plantas (a); diâmetro do colmo (b); potencial hídrico ( $\Psi_{md}$ ) (c); área foliar (LA) (d); massa seca da parte aérea (e) e massa seca total (f). Letras minúsculas comparam os tratamentos em uma mesma condição (irrigado/déficit hídrico). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro da condição irrigada e de déficit hídrico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Cada valor indica a média do tratamento  $\pm$  SE.

A condição de déficit hídrico reduziu todas as características fisiológicas quando comparado com os tratamentos irrigados (Fig. 1a-b-c-d-e-f). Ainda na condição de déficit hídrico, com relação à inoculação por *A. brasilense*, os inoculantes Az1 e Az2 aumentaram a altura das plantas de milho em 18% e 21,5% respectivamente, em relação as plantas sem inoculação (Fig. 1a). O diâmetro do colmo foi maior com a presença de todos os inoculantes quando comparado ao controle (Fig. 1b). A LA foi maior com os inoculantes Az1 (28%), Az2 (37%) e Az3 (23%) (Fig. 1d). O  $\Psi_{md}$ , massa seca da parte aérea e a massa seca total não diferiram estatisticamente entre os tratamentos nesta mesma condição ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 1 c e f).

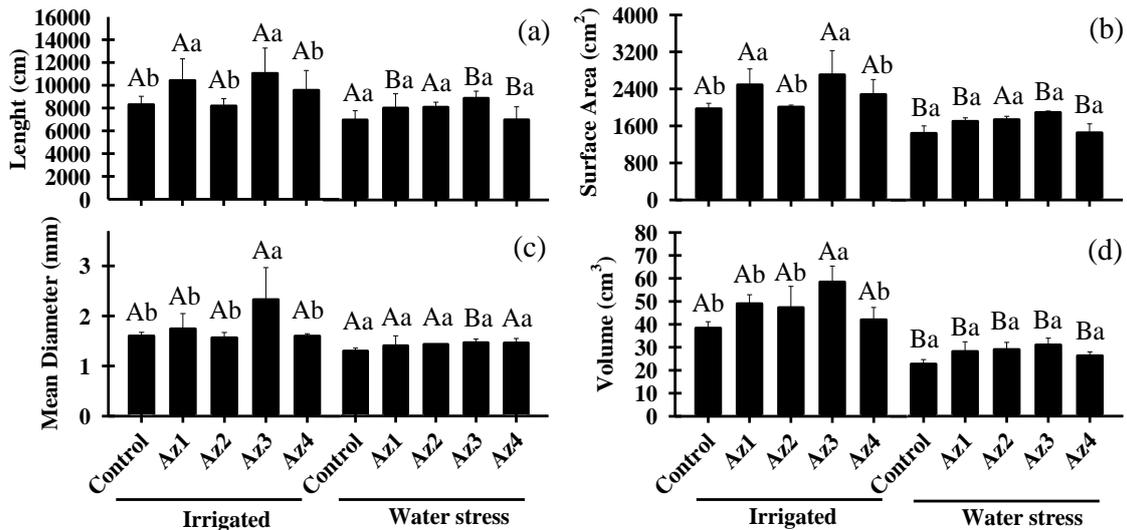
As trocas gasosas foliares (A, gs, Ci e E) foram maiores na condição irrigada quando comparada a condição estressada ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 2abcd). Para a condição irrigada, a A, gs e E não diferiram estatisticamente com a imposição dos tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 3abd). A presença do inoculante Az1 proporcionou aumento no Ci no mesofilo foliar do milho (Fig. 3c) e redução na eficiência de carboxilação (A/Ci) para essa mesma condição quando comparado aos demais tratamentos.



**Figura 2** - Trocas gasosas foliares das plantas de milho nas condições irrigada e sob déficit hídrico com *A. brasilense* (Az1, Az2, Az3 e Az4). (A) fotossíntese (a); ( $g_s$ ) condutância estomática (b); ( $C_i$ ) carbono interno (c); ( $E$ ) transpiração (d); ( $A/C_i$ ) eficiência de carboxilação (e). Letras minúsculas comparam os tratamentos em uma mesma condição (irrigado/déficit hídrico). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro da condição irrigada e de déficit hídrico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Cada valor indica a média do tratamento  $\pm$  SE.

Com relação a condição de déficit hídrico, a  $A$  foi maior com os inoculantes Az2 e Az4 (Fig. 3a). Não houve diferença estatística para as variáveis  $g_s$ ,  $C_i$  e  $E$  nessa mesma condição ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 2bcd). A eficiência de carboxilação foi maior com o inoculante Az4 (Fig. 2e).

De maneira geral, a inoculação por *A. brasilense* na condição irrigada proporcionou melhor desenvolvimento da arquitetura radicular no milho em relação ao déficit hídrico (Fig. 3abcd). Os inoculantes Az1 e Az3 apresentaram comprimento (Az1-33%, Az3-45%) área superficial radicular (Az1-26%, Az3-37%) maiores para as plantas de milho na condição irrigada quando comparado aos demais tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 3ab). O diâmetro médio e o volume radicular foram superiores em 45% e 52%, respectivamente, com o inoculante Az3 quando comparado aos demais tratamentos (Fig. 3cd).

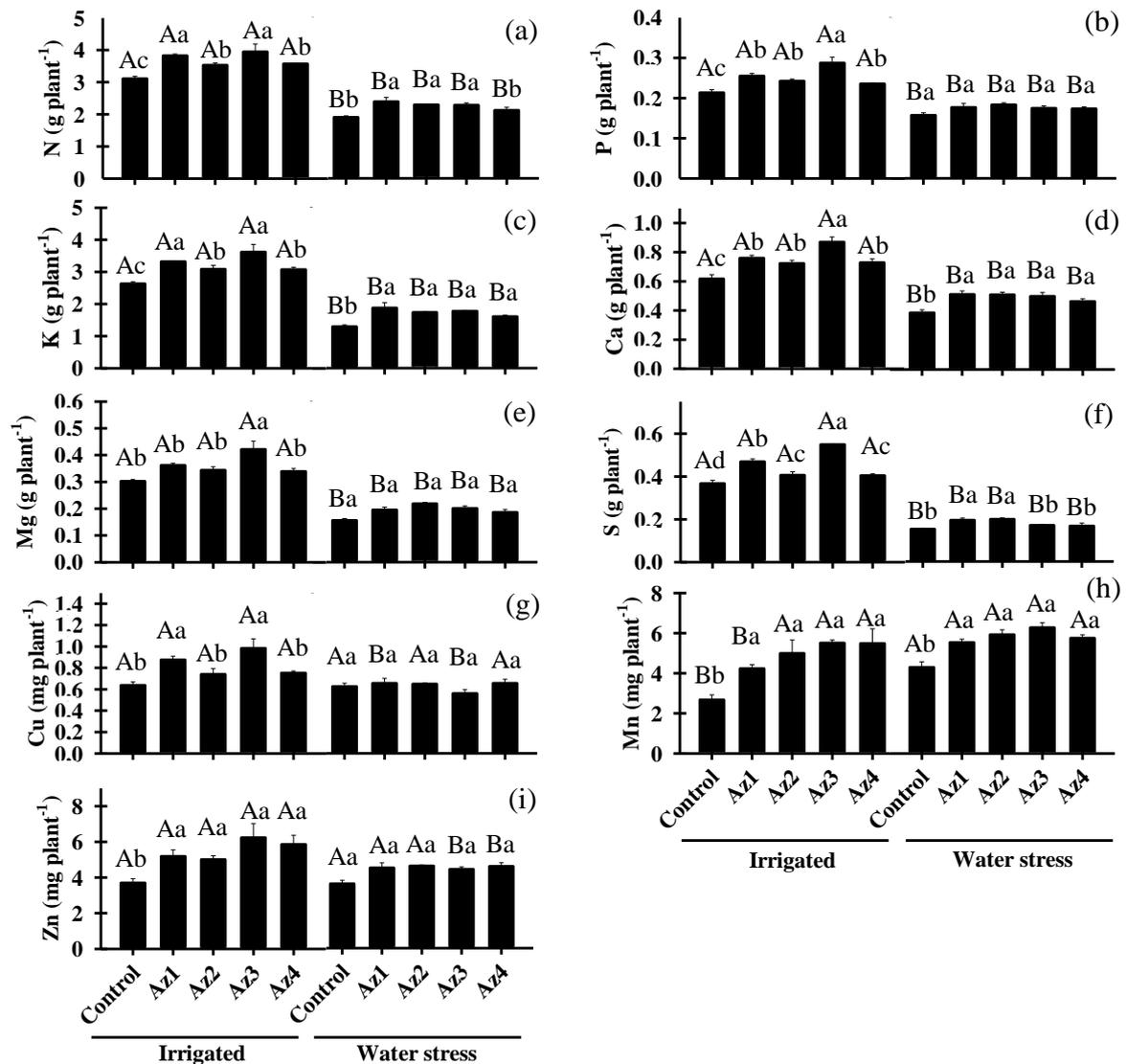


**Figura 3** - Morfologia radicular das plantas de milho inoculadas por *A. brasilense* (Az1, Az2, Az3 e Az4). Comprimento (a); área superficial (b); diâmetro médio (c); volume radicular (d). Letras minúsculas entre os tratamentos na mesma condição e letras maiúsculas entre os tratamentos em ambas condições seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Cada valor indica a média do tratamento  $\pm$  SE.

Em relação ao déficit hídrico, não houve diferença significativa entre os tratamentos com os inoculantes. E de modo geral, o déficit hídrico limitou o desenvolvimento radicular (Fig. 3abcd).

Na condição irrigada todos os inoculantes aumentaram o acúmulo dos nutrientes N, P, K, Ca, S, Mn e Zn na massa seca das plantas de milho, com destaque para os inoculantes Az1 e Az3 (Fig. 4abcdfhi). Az3 proporcionou maior concentração de Mg no milho quando comparado aos demais tratamentos (Fig. 4e). O acúmulo de Cu foi maior nas plantas com os inoculantes Az1 e Az3 (Fig. 4g).

De maneira geral, o déficit hídrico limitou a absorção dos nutrientes pelas plantas de milho (Fig. 4). O acúmulo dos nutrientes K, Ca e Mn foram maiores com a presença dos inoculantes (Fig. 4cdh). A concentração de N aumentou com Az1, Az2 e Az3 (Fig. 4a). Os inoculantes Az1 e Az2 proporcionaram aumento na concentração de S nas plantas de milho (Fig. 4f). Não houve diferença estatística nos tratamentos com *A. brasilense* para os elementos P, Mg, Cu e Zn nesta mesma condição (Fig. 4begi).



**Figura 4** - Concentração dos nutrientes nos tecidos das plantas de milho com inoculação por *A. brasilense* (Az1, Az2, Az3 e Az4). N (a); P (b); K (c); Ca(d); Mg (e); S (f); Cu (g); Mn (h) e Zn (i). Letras minúsculas comparam os tratamentos em uma mesma condição (irrigado/déficit hídrico). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro da condição irrigada e de déficit hídrico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Cada valor indica a média do tratamento  $\pm$  SE.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 *Azospirillum brasilense* em milho sob condição irrigada

De maneira geral, na condição irrigada a presença de *Azospirillum brasilense* (Az1, Az2, Az3 e Az4) proporcionou maior crescimento, LA, assim como aumento na absorção de nutrientes. Também, houve alteração na arquitetura radicular das plantas de milho com maior exploração do solo por estas raízes. Os benefícios proporcionados pela inoculação com

*Azospirillum* estão relacionados à melhoria na aquisição de recursos importantes para as plantas, como aumento na absorção de água, nitrogênio, fósforo e outros minerais (FUKAMI et al., 2017). Além disso, esta bactéria pode modular os níveis hormonais nas plantas, além de realizar a fixação biológica de N<sub>2</sub> (DAR et al., 2018).

A inoculação por *A. brasilense* não alterou estatisticamente a fotossíntese, gs e E das plantas em condição de irrigação. Possivelmente, o estado nutricional das plantas aliadas ao bom status hídrico ( $\Psi_{md}$ ) pode resultar na máxima atividade fotossintética. Ademais, a semelhança na taxa fotossintética em todos os tratamentos com as plantas controle provavelmente esteja relacionado à saturação da atividade da rubisco (KLUGE et al., 2015). Além disso, Inagaki et al. (2014) relataram que a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> foliar não foi afetada pela inoculação das sementes de milho com *A. brasilense* e com *H. seropedicae*.

A maior exploração do solo pelas raízes com *A. brasilense* conferiu aumento na absorção dos nutrientes N, P, K, Ca, S, Mn e Zn nos tecidos do milho na ausência de déficit hídrico. Provavelmente, este fato ocorreu como consequência indireta da produção dos fitormônios produzidos por esta bactéria (GALINDO et al., 2016; DAR et al., 2018). A produção principalmente do ácido indol-3-acético (AIA) por *A. brasilense* tem sido considerada como a característica mais importante na promoção do crescimento vegetal através das mudanças promovidas no aumento do comprimento e volume radicular (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016).

O maior comprimento, área superficial, diâmetro médio e volume das raízes no milho com *A. brasilense* encontrado neste trabalho pode estar relacionado, também, a *Azospirillum* estimular a formação dos tricomas e o crescimento das raízes, aumentando o volume de solo explorado pelo sistema radicular e na absorção de água e nutrientes (BULEGON et al., 2017).

Zemrany et al. (2007) discutiram que a espécie *Azospirillum lipoferum* resultou no acúmulo de biomassa das raízes, o que estaria relacionado ao maior número de pontas meristemáticas, significando mais ramificações e alterações na arquitetura radicular. Como consequência, as raízes inoculadas apresentaram maior área superficial de raiz, interagindo com as partículas do solo, água e microrganismos. Além disso, os mesmos autores enfatizaram que as plantas inoculadas com maior superfície radicular e número de pontas meristemáticas tendem a exsudar mais ácidos orgânicos na rizosfera, favorecendo a colonização das PGPR.

A presença de *Azospirillum* pode melhorar não apenas a absorção de vários macro e micronutrientes como aumentar o uso eficiente dos nutrientes pelas plantas, em consequência favorecer o desenvolvimento vegetal (GALINDO et al., 2016). Outra explicação para este fato foi a maior área superficial da raiz com a inoculação por *A. brasilense*. O aumento na área superficial radicular pode estar diretamente relacionado ao incremento dos nutrientes nos

tecidos (SOUZA et al., 2016). Conseqüentemente, as plantas do DKB 390 inoculadas apresentaram maior altura e LA, refletindo em maior acúmulo de biomassa (massa seca da parte aérea e massa seca total).

O maior crescimento da parte aérea do milho com *A. brasilense* corrobora com os resultados encontrados por Calzavara et al. (2017) que relataram que a inoculação da estirpe Ab-V5 (*A. brasilense*) aumentou o comprimento da parte aérea do milho diferindo das plantas controle quando cultivadas com suprimento total de N. Além disso, as rizobactérias, como *A. brasilense*, não apresentaram efeito apenas no alongamento e na arquitetura radicular, mas também induz à sinalização hormonal da raiz para a parte aérea, regulando o crescimento foliar e outros processos fisiológicos das plantas (BARNAWAL et al., 2019).

O aumento na concentração de N nos tecidos das plantas com a inoculação para a condição irrigada está de acordo com os resultados encontrados por Portugal et al. (2016), que relataram influência positiva de *A. brasilense*, resultando em maior N foliar nas plantas de milho. Ademais, Martins et al. (2018) encontraram que a inoculação por *A. brasilense* melhorou a eficiência na aquisição de N no milho, além de aumentar o rendimento de grãos quando comparado as plantas controles não inoculadas.

Assim, em produção de milho com alta tecnologia e irrigação, abordagens com o uso de inoculantes para melhorar a produtividade é uma tecnologia efetiva, devido aos efeitos benéficos em promover o desenvolvimento das plantas. Portanto, o uso de *A. brasilense* pode ser indicado por intensificar o crescimento e a nutrição vegetal.

#### 4.2 *Azospirillum brasilense* em milho sob déficit hídrico

A seca restringe o crescimento e desenvolvimento vegetal, diminui a difusão e o fluxo de massa dos nutrientes, além de reduzir a produtividade das culturas. As plantas de milho impostas ao déficit hídrico diminuíram o potencial hídrico foliar ( $\Psi_{md}$ ), não apresentando diferença entre os tratamentos com *A. brasilense*. Menor  $\Psi_{md}$  refletiu no fechamento estomático, diminuindo a  $g_s$  e  $E$ . Esta limitação na abertura estomática em condição de déficit hídrico reduz a entrada de  $CO_2$ , conseqüentemente redução da  $A$  independente dos tratamentos (MUTAVA et al., 2015).

A inoculação de *A. brasilense* por Az2 e Az4 proporcionaram maior  $A$ . Plantas com o inoculante Az4 apresentaram também maior eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ) o que mostra uma influência deste inoculante na atividade de carboxilação da rubisco o que mantém a atividade fotossintética mesmo em condição de déficit hídrico. Plantas de milho sob déficit hídrico apresentam danos nos fotossistemas (REIS et al., 2018), aparato este responsável por

coletar a energia radiante e converter em energia química (ATP). Assim, as plantas estressadas acabam canalizando a energia radiante para a produção de Espécie Reativa de Oxigênio (ERO) que contribui, por exemplo, para peroxidação lipídica.

A A maior em plantas sob déficit hídrico e inoculadas com *A. brasilense* poderia ser resultado de uma melhor condição ou alívio de estresse promovido por essas rizobactérias como, por exemplo, aumento dos mecanismos de defesa contra as EROs (KAUSHAL; WANI, 2016; NGUMBI; KLOEPPER, 2016). O que pode ter resultado no final da imposição do déficit hídrico melhores condições de crescimento como maior altura, LA e diâmetro das plantas com *A. brasilense*. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Bulegon et al. (2016), que ressaltaram que as plantas de *Urochloa ruziziensis* em condições de seca, inoculada via folha e sementes por *A. brasilense* aumentou a atividade da SOD e catalase no tratamento estressado, tornando as plantas mais eficientes na remoção das EROs e tolerantes ao déficit hídrico.

Entretanto, o emprego de inoculantes não resultou em maior acúmulo de massa seca (parte aérea e total). Apesar de não aumentar a biomassa das folhas, houve aumento da LA. Possivelmente, sob a indução da sinalização hormonal por esta rizobactéria da raiz para a parte aérea (BARNAWAL et al., 2019) proporcionou maior alongamento foliar no milho. Em consequência, com a mesma biomassa, as plantas puderam apresentar maior LA (ou seja, área fotossintética). Isto pode evidenciar custo metabólico reduzido, devido o déficit hídrico resultar em falta de energia e redução do crescimento. Ademais, a inoculação pode trazer benefícios no aumento do crescimento vegetativo, além de induzir as plantas a superar os estresses ambientais (CHIBEBA et al., 2015).

A interação de *A. brasilense* com as plantas pode ser bastante dinâmica, apresentando variações nos mecanismos utilizados por esta rizobactéria. O genótipo DKB 390 em condições de déficit hídrico apresenta mecanismos fisiológicos principalmente ao nível da parte aérea para minimizar a perda de água e para a manutenção da produtividade (LAVINSKY et al., 2015). Em consequência, reduz a dependência dos ajustes metabólicos no sistema radicular para aumentar a absorção de água (LAVINSKY et al., 2015). Aliado a este fator, é possível notar que a influência de *A. brasilense* sob seca foi principalmente na parte aérea (altura, diâmetro colmo, LA, A), com menores efeitos nas características radiculares. Podendo-se inferir que a interação de *A. brasilense* com esse genótipo (DKB 390) refletiu principalmente em efeitos nos órgãos produtores de energia (fotossíntese - folhas).

A presença de *A. brasilense* não alterou a morfologia radicular em déficit hídrico. Este fato pode ser justificado pela característica do próprio genótipo (tolerante) em condições de déficit hídrico (LAVINSKY et al., 2015; SOUZA et al., 2016). Além disso, é possível que a

maior produção de fotoassimilados pelas plantas podem ser translocados para as raízes, e assim proporcionar maior exsudação radicular, ou seja, fonte energética para o metabolismo dessa rizobactéria.

O estresse hídrico, decorrente da seca, diminuí a disponibilidade e o transporte de nutrientes do solo para as plantas, uma vez que o transporte dos nutrientes até as raízes é limitado pela água (VURUKONDA et al., 2016). Entretanto, apesar da não alteração na morfologia radicular e nem na massa seca das plantas de milho, a presença de *A. brasilense* proporcionou acréscimo no acúmulo dos nutrientes (N, K, Ca, S e Mn). Além do mais, pode-se sugerir que com o mesmo investimento em raízes, a presença desta rizobactéria proporcionou maior eficiência na absorção desses nutrientes. Teixeira Filho et al. (2017) relataram que a inoculação com *A. brasilense* em trigo resultou em elevações nas concentrações de N e S na palha quando comparado ao tratamento sem inoculação.

Curiosamente os inoculantes (Az1, Az2, Az3 e Az4) aumentaram a absorção dos nutrientes nas plantas de milho sob estresse, mas não ocorreu influência sobre gs e E. É importante ressaltar que o fluxo transpiratório é muito importante para a entrada dos nutrientes nas plantas. Entretanto, com o déficit hídrico pode ocorrer redução nesse fluxo transpiratório. Assim, a presença de *A. brasilense* (PGPR) poderia beneficiar as plantas de milho por mineralizar a matéria orgânica do solo liberando enzimas hidrolíticas e aumentando assim, a disponibilidade dos nutrientes (OLLIVER et al., 2011; PII et al., 2015) mesmo em condição de déficit hídrico.

Outra provável explicação é que a atividade da enzima H<sup>+</sup>-ATPase é importante no movimento de soluto nas células e no processo de aquisição dos nutrientes pelas plantas (PII et al., 2015). As PGPR, como *A. brasilense*, podem estimular a H<sup>+</sup>-ATPase nas membranas plasmáticas das células das raízes, podendo ser atribuída essa ação a produção de fitormônios (AIA) (PII et al., 2015).

A interação da bactéria com as plantas em diferentes condições ambientais pode resultar em respostas divergentes no desenvolvimento vegetal. Entretanto, a partir dos resultados encontrados neste trabalho é possível indicar a utilização dos inoculantes com *A. brasilense* por proporcionar práticas agrícolas mais sustentáveis e aumentar a nutrição das plantas de milho.

## 5 CONCLUSÃO

O uso de *A. brasilense* pelos inoculantes Az1, Az2, Az3 e Az4 em genótipo de milho tolerante ao déficit hídrico com irrigação pode ser indicado por intensificar o crescimento das plantas.

*Azospirillum brasilense* promove incremento no sistema radicular e absorção de nutrientes em plantas de milho, com destaque para o inoculante Az3 nas condições hídricas testadas.

Os inoculantes Az1, Az2 e Az3 podem atenuar os efeitos do déficit hídrico por melhorar o crescimento da parte aérea e a absorção de nutrientes.

## AGRADECIMENTOS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

## REFERÊNCIAS

- ÁVILA, R. G.; MAGALHÃES, P. C.; ALVARENGA, A. A.; LAVINSKY, A. D. O.; CAMPOS, C. N.; SOUZA, T. C.; GOMES JÚNIOR, C. C. Drought-tolerant maize genotypes invest in root system and maintain high harvest index during water stress. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 3, p. 450-460, 2017.
- BARNAWAL, D.; SINGH, R.; SINGH, R. P. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Drought Tolerance: Regulating Growth Hormones and Osmolytes. In: **PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture**. Woodhead Publishing, p. 107-128, 2019.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.
- BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; LAURETH, J. C. U. *Azospirillum brasilense* affects the antioxidant activity and leaf pigment content of *Urochloa ruziziensis* under water stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 3, p. 343-349, 2016.
- BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; KLEIN, J.; BATISTTUS, A. G.; INAGAKI, A. M.; OFFMANN, L. C.; SOUZA, A. K. P. Enzymatic activity, gas exchange and production of soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 7, p. 888-896, 2017.
- CALZAVARA, A. K.; PAIVA, P. H. G.; GABRIEL, L. C.; OLIVEIRA, A. L. M.; MILANI, K.; OLIVEIRA, H. C.; et al. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. **Plant Biology**, v. 20, n. 5, p. 870-878, 2018.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* ssp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117-130, 2016.
- CHIBEBA, A. M.; GUIMARÃES, M. F.; BRITO, O. R.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 1641-1649, 2015.
- COELHO, A. E.; TOCHETTO, C.; TUREK, T. L.; MICHELON, L. H.; FIOREZE, S. L. Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* em plantas de milho submetidas à restrição hídrica. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p.186-192, 2017.

- D'ANGIOLI, A. M.; VIANI, R. A. G.; LAMBERS, H.; SAWAYA, A. C. H. F.; OLIVEIRA, R. S. Inoculation with *Azospirillum brasilense* (Ab-V4, Ab-V5) increases *Zea mays* root carboxylate-exudation rates, dependent on soil phosphorus supply. **Plant Soil**, v. 410, n. 1-2, p. 499-507, 2017.
- DAR, Z. M.; MASOOD, A.; MUGHAL, A. H.; ASIF, M.; MALIK, M. A. Review on Drought Tolerance in Plants Induced by Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 7, n. 3, p. 2802-2804, 2018.
- DARYANTO, S.; WANG, L.; JACINTHE, P. A. Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. 1-15, 2016.
- DJEMEL, A.; ÁLVAREZ-IGLESIAS, L.; SANTIAGO, R.; MALVAR, R. A.; PEDROL, N.; REVILLA, P. Algerian maize populations from the Sahara desert as potential sources of drought tolerance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 1, p. 1-13, 2019.
- FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 153, 2017
- GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; SANTINI, J. M. K.; et al. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, p. 1-18, 2016.
- INAGAKI, A. M.; RODRIGUES, L. F. O. S.; RAMPIM, L. Phosphorus fertilization associated to inoculation of maize with diazotrophic bacteria. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 48, p. 3480-3487, 2014.
- KAUSHAL, M.; WANI, S. P. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 35-42, 2016.
- KAUSHAL, M. Portraying Rhizobacterial Mechanisms in Drought Tolerance: A Way Forward Toward Sustainable Agriculture. In: **PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture**. Woodhead Publishing, p. 195-216, 2019.
- KERRY, R. G.; PATRA, S.; GOUDA, S.; PATRA, J. K.; DAS, G. Microbes and Their Role in Drought Tolerance of Agricultural Food Crops. In: **Microbial Biotechnology**. Springer, Singapore, p. 253-273, 2018.
- KLUGE, R. A.; TEZOTTO-ULIANA, J. V.; SILVA, P. P. Aspectos fisiológicos e ambientais da fotossíntese. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 56-73, 2014.
- LAVINSKY, A. O.; MAGALHÃES, P. C.; ÁVILA, R. G.; DINIZ, M. M.; SOUZA, T. C. Partitioning between primary and secondary metabolism of carbon allocated to roots in four maize genotypes under water deficit and its effects on productivity. **The Crop Journal**, v. 3, n. 5, p. 379-386, 2015.
- MARINI, D.; GUIMARÃES, V. F.; DARTORA, J.; LANA, M. D. C.; PINTO JÚNIOR, A. S. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, v. 62, n. 1, p. 117-123, 2015.
- MARTINS, M. R.; JANTALIA, C. P.; REIS, V. M.; DÖWICH, I.; et al. Impact of plant growth-promoting bacteria on grain yield, protein content, and urea-15 N recovery by maize in a Cerrado Oxisol. **Plant and Soil**, v. 422, n. 1-2, p. 239-250, 2018.
- MUTAVA, R. N.; PRINCE, S. J. K.; SYED, N. H.; SONG, L.; VALLIYODAN, B.; CHEN, W.; NGUYEN, H. T. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: a comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, p. 109-120, 2015.

NGUMBI, E.; KLOPPER, J. Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. **Applied Soil Ecology**, v. 105, p. 109-125, 2016.

NGUYEN, M. L.; SPAEPEN, S.; JARDIN, P.; DELAPLACE, P. Biostimulant effects of rhizobacteria on wheat growth and nutrient uptake depend on nitrogen application and plant development. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 65, n. 1, p. 58-73, 2019.

OLLIVIER, J.; TÖWE, S.; BANNERT, A.; HAI, B.; et al. Nitrogen turnover in soil and global change. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 1, p. 3-16, 2011.

PII, Y.; MIMMO, T.; TOMASI, N.; TERZANO, R.; CESCO, S.; CRECCHIO, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 4, p. 403-415, 2015.

PRASAD, M.; SRINIVASAN, R.; CHAUDHARY, M.; CHOUDHARY, M.; JAT, L. K. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture: Perspectives and Challenges. In: **PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture**, p. 129-157, 2019.

PORTUGAL, J. E. R.; ARF, O.; PERES, A. R.; CASTILHO, G. D.; RODRIGUES, R. A. F.; et al. *Azospirillum brasilense* promotes increment in corn production. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 19, p. 1688-1698, 2016.

REIS, D. P. **Produtividade de milho e ecologia microbiana da rizosfera de plantas sob diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del Rei. São João Del Rei - MG, 1-61, 2015.

REIS, C. O.; MAGALHÃES, P. C.; AVILA, R. G.; ALMEIDA, L. G.; RABELO, V. M.; CARVALHO, D. T.; et al. Action of N-Succinyl and N, O-Dicarboxymethyl Chitosan Derivatives on Chlorophyll Photosynthesis and Fluorescence in Drought-Sensitive Maize. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-12, 2018.

REVOLTI, L. T. M.; CAPRIO, C. H.; MINGOTTE, F. L. C.; MÔRO, G. V. *Azospirillum spp.* potential for maize growth and yield. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 18, p. 574-585, 2018.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, p. 1-370, 2009.

SOUZA, T. C.; CASTRO, E. M.; MAGALHÃES, P. C.; ALVES, E. T.; PEREIRA, F. J. Early characterization of maize plants in selection cycles under soil flooding. **Plant Breeding**, v. 131, n. 4, p. 493-501, 2012.

SOUZA, T. C.; CASTRO, E. M.; MAGALHÃES, P. C.; LINO, L. O.; ALVES, E. T.; ALBUQUERQUE, P. E. P. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 11, p. 3201-3211, 2013.

SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C.; CASTRO, E. M.; DUARTE, V. P.; LAVINSKY, A. O. Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 4, p. 330-339, 2016.

TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; GALINDO, F. S.; BUZETTI, S.; SANTINI, J. M. K. **Inoculation with *Azospirillum brasilense* Improves Nutrition and Increases Wheat Yield in Association with Nitrogen Fertilization**. In: Wheat Improvement, Management and Utilization. P. 99-114, 2017.

TKACZ, A.; POOLE, P. Role of root microbiota in plant productivity. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 8, p. 2167-2175, 2015.

VACHERON, J.; DESBROSSES, G.; BOUFFAUD, M. L.; TOURAINE, B.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; MULLER, D.; et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 356, 2013.

VAN OOSTEN, M. J.; PEPE, O.; PASCALE, S.; SILLETTI, S.; MAGGIO, A. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2017.

VURUKONDA, S. S. K. P.; VARDHARAJULA, S.; SHRIVASTAVA, M.; SKZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 184, p. 13-24, 2016.

YADAV, K. K.; SARKAR, S. Biofertilizers, Impact on Soil Fertility and Crop Productivity under Sustainable Agriculture. **Environment and Ecology**, v. 37, n. 1, p. 89-93, 2019.

ZEMRANY, H. E.; CZARNES, S.; HALLETT, P. D.; ALAMERCERY, S.; BALLY, R.; MONROZIER, L. J. Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. **Plant and Soil**, v. 291, n. 1-2, p. 109-118, 2007.

## CAPÍTULO IV - *Azospirillum brasilense* na amenização dos efeitos da interação dos estresses hídrico e baixo nitrogênio em plantas de milho cultivadas em campo

**RESUMO:** A seca, o manejo inadequado dos solos e dos recursos hídricos podem resultar na baixa disponibilidade de água e nitrogênio para as plantas, limitando a produtividade do milho. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas morfofisiológicas e produtividade das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* em duas condições hídricas e aplicação de N no solo. Os experimentos foram realizados em campo – condição irrigada (IR) e déficit hídrico (WS), com delineamento em blocos casualizados com parcelas subdivididas. Os níveis de nitrogênio foram distribuídos nas parcelas enquanto os inoculantes nas subparcelas. Os tratamentos constaram de dois níveis de N aplicado no solo (20 e 120 Kg ha<sup>-1</sup>) e três condições de inoculação com *A. brasilense* (Az1, Az2 e controle), com quatro repetições. Foram avaliadas condutância estomática, fluorescência da clorofila *a* e teor das clorofilas, área foliar, componentes de produtividade, índice de colheita (HI) e as enzimas do solo arginase e urease. O déficit hídrico e a baixa disponibilidade de N nos solos limitaram as características morfofisiológicas e os componentes de produtividade no milho. A inoculação por Az1 e Az2 proporcionou incremento nas clorofilas, independente do N no solo e da condição hídrica, exceto em IR com 120 Kg ha<sup>-1</sup>. Com Az2 houve acréscimo de 10% no rendimento dos grãos independente da condição hídrica. HI foi superior com a inoculação em WS com 20 e IR com 120 Kg ha<sup>-1</sup> N. De maneira geral, Az2 aumentou a atividade das enzimas arginase e urease. A inoculação por *A. brasilense* pode ser uma estratégia importante para mitigar os efeitos deletérios do déficit hídrico e da baixa disponibilidade de N no solo no cultivo do milho.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Rizobactéria; Clorofilas; Urease; Produtividade.

### 1 INTRODUÇÃO

O déficit hídrico (WS) e deficiência de nitrogênio no solo constituem alguns dos principais estresses abióticos que reduzem a produtividade das culturas em geral, particularmente de milho (Parajuli et al., 2018; Zeffa et al., 2019). Além disso, estes estresses reduzem a fotossíntese, área foliar e aceleram a senescência das folhas das plantas, com redução de até 80% da produtividade do milho (Khan et al., 2018; Parajuli et al., 2019).

Neste sentido, a compreensão da interação dos estresses hídrico e deficiência de N faz-se necessário devido a grande problemática que estes fatores causam nas plantas a nível global. Assim, a utilização das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) podem atenuar os estresses causados pela WS e baixo N, e ainda ser uma opção de baixo custo e ser ecologicamente sustentável. A ação associativa das PGPR pode fixar N<sub>2</sub> e desempenhar um papel importante na absorção de nutrientes pelas plantas (Fukami et al., 2018). Pii et al. (2019) relataram que as PGPR podem representar uma ferramenta valiosa para melhorar a nutrição vegetal, uma vez que na agricultura o N tem sido fornecido as plantas via aplicação de fertilizantes. Além disso, as PGPR atuam como biofertilizantes, fitoestimuladores e atenuadoras de estresses bióticos e abióticos (Kaushal, 2019).

*Azospirillum brasilense* é uma PGPR que pode atuar na promoção do crescimento das plantas via diferentes mecanismos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos (Bashan e Bashan, 2010). Esta rizobactéria além de realizar a fixação de N<sub>2</sub>, produz vários fitormônios que melhora o crescimento do sistema radicular, refletindo na maior absorção de água e íons pelas plantas (Vacheron et al., 2013; Fukami et al., 2018; Kaushal, 2019).

A investigação da cooperação de rizobactérias atuando na redução dos danos causado nas plantas devido a estresses abióticos, como o déficit hídrico, está em evidência atualmente. O cultivo do milho no Brasil ocorre principalmente na safrinha. Neste período as plantas podem ser expostas a períodos de seca e a baixas temperaturas, que contribui para a redução na produção de grãos deste cereal. Aliado a este fator, o manejo inadequado dos solos e dos recursos hídricos podem resultar na baixa disponibilidade de nitrogênio para as plantas, contribuindo para possíveis consequências críticas na produção das culturas. Simultaneamente, também é crucial compreender os mecanismos que podem mitigar o efeito do déficit hídrico nas plantas cultivadas, como o milho, em direção à maior produtividade (Meena et al., 2017).

O conhecimento e a seleção de estipes de *A. brasilense* mais eficientes em diferentes condições ambientais é importante para o sucesso desta tecnologia. No mercado comercial, a associação de mais de uma estirpe potencializa os resultados da inoculação. Além disso, o resultado da associação e os mecanismos de *A. brasilense* com o genótipo sensível ao déficit hídrico (BRS 1040) pode proporcionar maiores rendimentos de grãos em condições de seca e de baixa disponibilidade de nitrogênio no solo.

Em condições de campo, compreender as respostas das plantas na interação do estresse hídrico e do baixo nitrogênio, aliado ao efeito da inoculação é geralmente muito mais complexo que condições ambientais controladas, porque outros fatores do ambiente podem influenciar a resposta da inoculação.

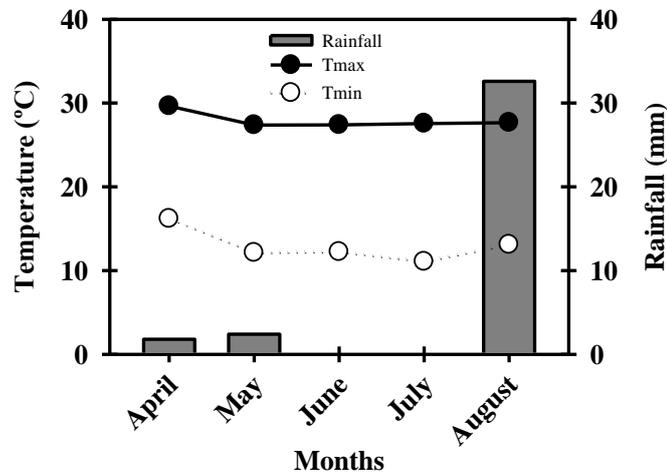
Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas morfofisiológicas e produtividade das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* em duas condições hídricas e de baixo N no solo.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Design experimental, material vegetal e microbiológico e condições de crescimento**

O experimento foi conduzido em condições de campo na estação experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil, situada nas coordenadas

geográficas: 19°28' S, 44°15'08'' W e altitude média de 732 m. A precipitação pluviométrica e a temperatura máxima e mínima foram monitoradas durante a realização do ensaio (Fig. 1).



**Figura 1** Temperatura máxima e mínima e precipitação durante o período experimental.

O experimento foi realizado em solo do tipo Latossolo Vermelho Distrófico Argiloso, de fertilidade média, as adubações de base e cobertura foram realizadas de acordo com a análise do solo (Tabela 1), seguindo recomendação para o milho no Estado de Minas Gerais (Ribeiro, 1999).

**Tabela 1** Caracterização química do solo nas profundidades 0-10 e 10-20 cm. Sete Lagoas - MG.

Solo (cm)	pH (H <sub>2</sub> O)	P (Mehlich) mg dm <sup>-3</sup>	K	Ca	Mg	Al	SB* mg dm <sup>-3</sup>	V* %	Zn	Fe	Mn	Cu
0-10	6,1	54,0	345,0	6,8	1,4	0,3	9,2	68,2	8,1	29,1	16,8	0,6
10-20	6,1	32,2	278,5	6,3	1,2	0,3	8,2	62,2	10,9	28,0	14,2	0,6

\* Soma de bases (SB); índice de saturação por bases (V).

Foram realizados dois experimentos, onde os tratamentos foram testados em duas condições hídricas, experimento com irrigação e com déficit hídrico (irrigado - IR e déficit hídrico - WS). Foram utilizados dois níveis de aplicação de nitrogênio no solo (baixo: 20 e alto: 120 Kg ha<sup>-1</sup>) e duas estirpes de *A. brasilense* inoculados (Az1 e Az2), mais o tratamento controle (sem inoculação). Os experimentos foram conduzidos no delineamento experimental em blocos casualizados com parcelas subdivididas com quatro repetições. Os níveis de nitrogênio 20 e 120 Kg ha<sup>-1</sup> foram distribuídos nas parcelas enquanto os inoculantes com *A. brasilense* Az1, Az2 e o controle nas subparcelas. Estas parcelas foram constituídas de 6 linhas de 6 m de comprimento, espaçadas de 0,7 m entre linhas e 0,2 m entre plantas, perfazendo uma área total de 25,2 m<sup>2</sup>. Para a área útil da parcela foram consideradas as duas linhas centrais.

No plantio foi aplicado 500 Kg ha<sup>-1</sup> da formulação 04-30-20 (NPK) no sulco. No tratamento com o alto N no solo aplicou-se mais 48 Kg ha<sup>-1</sup> de ureia na sementeira. Somente as plantas que compunham o tratamento com alto N receberam a adubação de cobertura com 178 Kg ha<sup>-1</sup> de ureia. O material vegetal foi o híbrido simples BRS 1040, sensível a seca e desenvolvido pelo programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo. O inoculante utilizado foi obtido a partir da mistura de duas estirpes homólogas de *Azospirillum brasilense*, na proporção 1:1 (v/v), Az1 (CMS 7+26), Az2 (CMS 11+26) pertencentes à coleção de bactérias diazotróficas do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo.

As estirpes selecionadas foram cultivadas em caldo de soja triplicaseína, durante 72h, a temperatura de 29°C sob agitação constante. Após esse período, as culturas de cada estirpe foram centrifugadas, ressuspensas em solução salina (0,85% NaCl) e ajustadas para densidade óptica igual a 1,0 em absorvância a 500 nm, que equivale a aproximadamente 10<sup>8</sup> células viáveis por mL. A inoculação nas sementes foi realizada, utilizando-se como veículo o carvão vegetal moído e goma de fécula de mandioca como aderente, e posteriormente realizada a sementeira.

O teor de água no solo foi monitorado diariamente entre 09h00 e 15h00, com auxílio de sensores de umidade modelo GB Reader N1535 (Measurement Engineering, Austrália) instalados no centro de cada parcela a uma profundidade de 20 cm. Os experimentos foram mantidos em capacidade de campo (CC) (tensão de água no solo de -18 kPa) durante o período que antecedeu a imposição do estresse. Para o experimento que compreenderia o WS ao atingirem o estágio de pré-florescimento, as plantas foram submetidas ao déficit hídrico no solo por um período de 30 dias. Nesta condição, a tensão de água no solo foi reduzida para -138 KPa, que corresponde a aplicação de 50% da água disponível no solo. Os tratamentos com IR não receberam alteração na condição hídrica, mantendo a capacidade de campo. Os cálculos de reposição de água foram realizados com o auxílio de uma planilha eletrônica, feita em função da curva de retenção de água do solo.

## 2.2 Características ecofisiológicas e teor de pigmentos

A condutância estomática (gs) foliar foi obtida através de um porômetro (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA). Uma leitura por folha em três plantas por bloco foi realizada entre 9 e 11 h da manhã, nas folhas totalmente expandidas acima da espiga após trinta dias sob a imposição do déficit hídrico.

Para a medição das variáveis da fluorescência da clorofila *a* foi utilizado um fluorômetro modulado Mini-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Após o período de trinta dias de imposição do WS, 3 plantas por parcelas foram adaptadas a 30 min no escuro onde foi medida a fluorescência mínima ( $F_o$ ) com uma luz suficientemente baixa evitando reações fotoquímicas e a fluorescência máxima ( $F_m$ ), aplicando-se por 0,8 segundos um pulso de luz saturante de  $7000 \mu\text{m}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nas amostras adaptadas no escuro, a máxima eficiência do fotossistema (PS II) foi estimada pela razão  $F_v/F_m$ . Em seguida as folhas foram iluminadas com luz actínica com intensidade de  $1500 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Então a fluorescência constante ( $F_s$ ) foi obtida e em seguida outro pulso de luz saturante foi aplicado por 1 s para obtenção da fluorescência máxima emitida pelas folhas ( $F_m'$ ). A luz actínica foi removida e as folhas foram irradiadas com luz vermelho-distante, para obtenção de  $F_o$  adaptado a luz ( $F_o'$ ). O quenching fotoquímico foi calculado como  $Q_p = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$ , e o quenching não fotoquímico foi calculado como  $Q_n = (F_m - F_m')/F_m'$ . Outras variáveis também foram avaliadas como: taxa de transporte de elétrons (ETR) =  $[(F_m' - F_s/F_m') \times \text{PPFD} \times 0,5 \times 0,84]$  e a produção quântica fotoquímica efetiva adaptada à luz (YII) =  $F_m' - F_s/F_m' = \Delta F/F_m'$  (van Kooten e Snel 1990; Genty et al., 1996).

Para determinação da clorofila *a*, *b* e total coletou-se o terço médio da primeira folha acima da espiga em 3 plantas por parcelas após os trinta dias de WS. Na sequência, 0,1 g de tecido foliar foi fragmentado em partes de aproximadamente 3 mm e imersos em 20 ml de acetona 80% (v/v) durante 24 horas, em ambiente protegido de luz. Após esse período foi feito a determinação de acordo com Linchtenthanler e Buschmann (2001).

### 2.3 Análise enzimática em amostras de solo rizosférico

Foi realizada a análise das enzimas arginase e uréase do solo que estão envolvidas na dinâmica de nitrogênio no solo no período final da imposição do WS em 3 plantas por parcela. A atividade da arginase (taxa de hidrólise da arginina) foi determinada através do método proposto por Alef e Kleiner (1986), enquanto a atividade da urease (taxa de hidrólise da ureia) foi verificada através do método proposto por Kandeler e Gerber (1988). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 660nm.

### 2.4 Área foliar, componentes da produção e eficiência no uso do nitrogênio

A área foliar total da planta (LA) foi medida por meio de um leitor de área foliar (LI-3100C, Licor, Nebraska, USA), após a imposição do WS em 3 plantas por parcela. A parte

aérea das plantas foram acondicionadas em sacolas de papel e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 65°C, durante 72 horas, onde depois foi avaliado a massa seca.

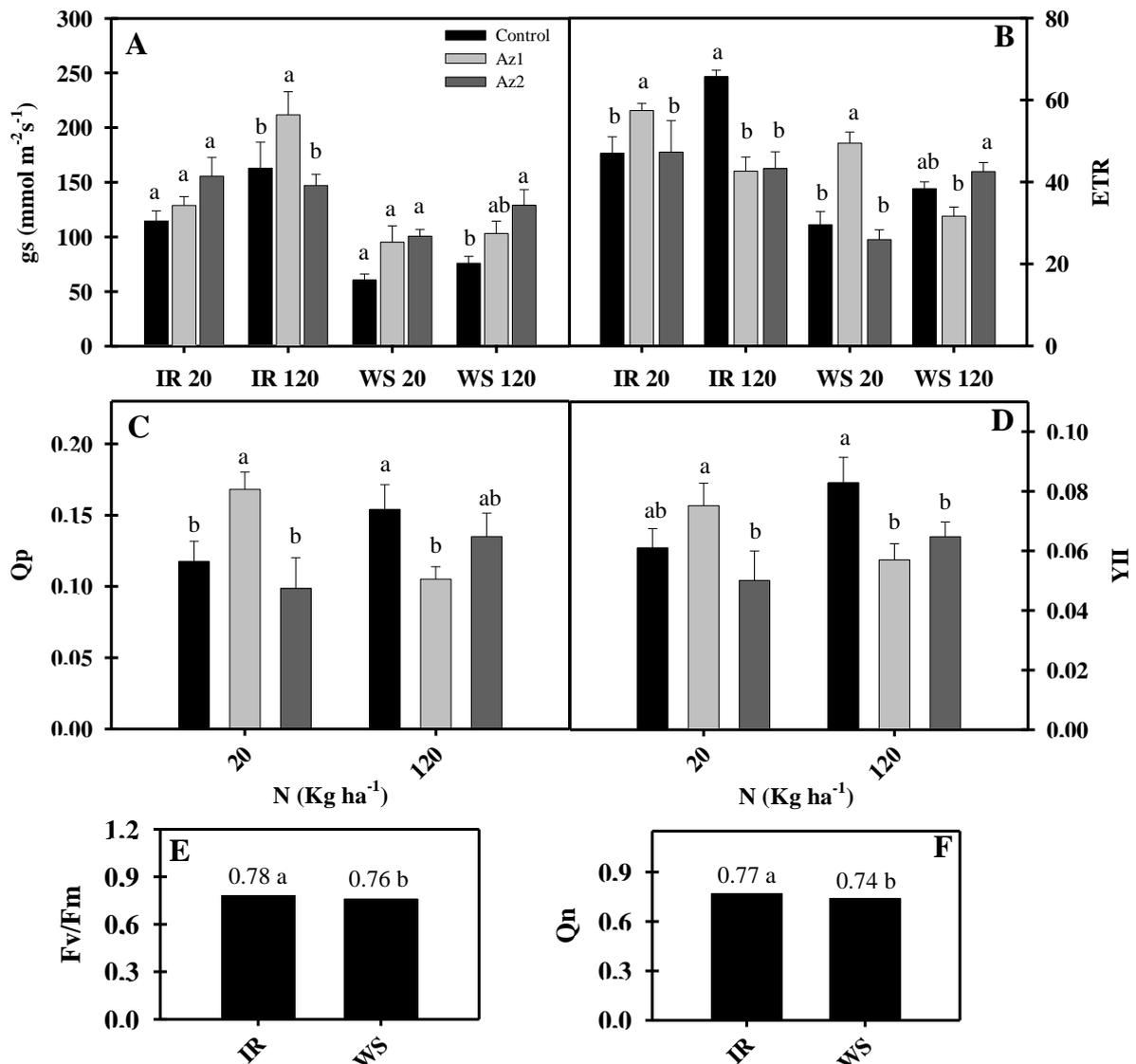
Na maturidade fisiológica, foram analisados: rendimento de grãos (RY), peso de espiga (EAW), diâmetro da espiga (ED), número de grãos por fileira (NGF), peso de 100 sementes (W100), peso de grãos por espiga (PGE) e índice de colheita (HI) [peso seco do grão/(peso seco da planta+peso seco do grão)\*100 (Durães et al., 2002).

## 2.5 Análise dos dados

Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância conjunta (ANAVA) e o teste de comparação de médias Tukey, a 0,05% de significância ( $p \leq 0.05$ ), no programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

## 3 RESULTADOS

Para a condição irrigada com 20 kg ha<sup>-1</sup> N não houve diferença entre os tratamentos para a condutância estomática (gs) ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 2A). Entretanto, em IR com 120 kg ha<sup>-1</sup> N a gs com o inoculante Az1 aumentou em média 30% em relação aos demais tratamentos ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 2A). Na condição de déficit hídrico, as plantas de milho em WS com 20 kg ha<sup>-1</sup> N não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos em gs ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 2A). Porém, o inoculante Az2 incrementou a gs em 70% em WS com 120 kg ha<sup>-1</sup> N quando comparado as plantas sem inoculação ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 2A).

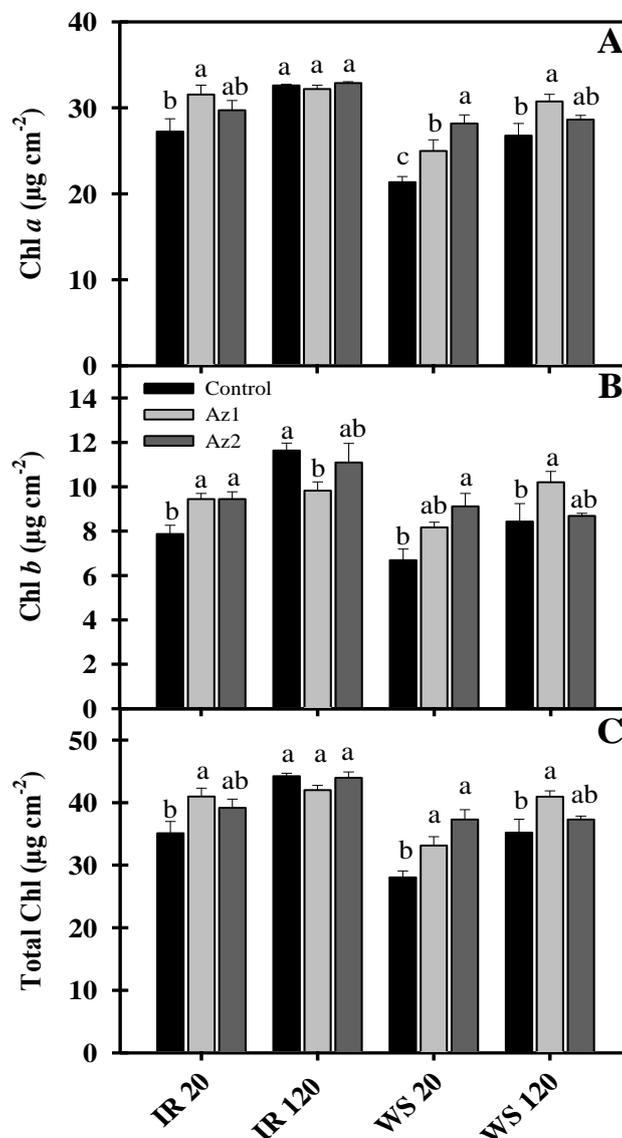


**Figura 2** Condutância estomática (gs) (A) e variáveis da fluorescência da clorofila: (B) Taxa de transporte de elétrons (ETR), (C) Quenching fotoquímico (Qp), (D) Rendimento quântico fotoquímico do PSII (YII), (E) Máxima eficiência quântica do PSII (Fv/Fm), (F) Quenching não fotoquímico (Qn) das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*. IR20 (irrigado 20 kg ha<sup>-1</sup> N), IR120 (irrigado 120 kg ha<sup>-1</sup> N), WS20 (estresse hídrico 20 kg ha<sup>-1</sup> N), WS120 (estresse hídrico 120 kg ha<sup>-1</sup> N). Médias seguidas pela mesma letra para cada tratamento não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (p≤0.05). Cada valor indica a média do tratamento ± SE.

O inoculante Az1 em IR com 20 kg ha<sup>-1</sup> N aumentou em média a ETR em 22% em comparação ao controle (p≤0.05) (Fig. 2B). Em IR com 120 kg ha<sup>-1</sup> N as plantas sem inoculação apresentaram maior ETR em relação aos demais tratamentos (p≤0.05) (Fig. 2B). Na condição de déficit hídrico em WS com 20 kg ha<sup>-1</sup> N, o inoculante Az1 seguiu o mesmo padrão que IR com 20 kg ha<sup>-1</sup> N, com aumento de 90% na ETR quando comparado ao controle (p≤0.05) (Fig. 2B). Já em WS com 20 kg ha<sup>-1</sup> N houve incremento de 34% na ETR com a presença de Az2 (p≤0.05) (Fig. 2B).

Na aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> N, Az1 proporcionou acréscimo de 71% no Qp (Fig. 2C) e 50% em YII (Fig. 2D) em relação aos demais tratamentos ( $p \leq 0.05$ ). As plantas sem inoculação apresentaram maior Qp e YII em comparação com as plantas inoculadas por *A. brasilense* na dose de 120 kg ha<sup>-1</sup> N ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 2CD). Na condição irrigada as variáveis Fv/Fm e Qn foi superior a condição de déficit hídrico ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 2EF).

Na condição irrigada com 20 kg ha<sup>-1</sup> N, as plantas de milho apresentaram maior clorofila *a*, *b* e total com a presença dos inoculantes Az1 e Az2 quando comparado as plantas controle ( $p \leq 0.05$ ) (Fig.3). Em IR com 120 kg ha<sup>-1</sup> N não houve diferença entre os tratamentos para clorofila *a* e total. Com relação esse mesmo tratamento (IR120), o controle e Az2 apresentaram maior teor de clorofila *b* nas plantas de milho ( $p \leq 0.05$ ) (Fig.3).



**Figura 3** Teor de clorofila *a* (A), *b* (B) e total (C) das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*. IR20 (irrigado 20 kg ha<sup>-1</sup> N), IR120 (irrigado 120 kg ha<sup>-1</sup> N), WS20 (estresse hídrico 20 kg ha<sup>-1</sup> N), WS120 (estresse hídrico 120 kg ha<sup>-1</sup> N). Médias seguidas pela mesma letra para cada tratamento não

diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Cada valor indica a média do tratamento  $\pm$  SE.

Na condição de déficit hídrico com 20 kg ha<sup>-1</sup> N todos os inoculantes foram superiores ao controle e proporcionaram incremento na clorofila *a* (WS20 Az1=17% e Az2=32%), *b* (WS20 Az1=22% e Az2=36%) e total em WS20 Az1=18% - Az2=33% ( $p \leq 0.05$ ) (Fig.3). Em relação ao WS120 foi observado o mesmo padrão com Az1 e Az2 aumentando a clorofila *a* em 15% e 7%, respectivamente, clorofila *b* Az1 21% e Az2 3%, e clorofila total Az1 21% e Az2 3% em comparação ao controle ( $p \leq 0.05$ ) (Fig.3). O efeito da condição hídrica, doses de N e os inoculantes influenciaram significativamente LA, o rendimento de grãos (GY), os componentes da produtividade e o NUE ( $p \leq 0.05$ ), mas não houve interação entre os fatores (Tabela 2). Na condição IR a LA foi superior ao WS ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 2). Entretanto, não houve diferença significativa nas concentrações de N para esta mesma variável ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 2). Os inoculantes proporcionaram maior LA (Az1 - 8% e Az2 - 10%) em relação as plantas sem inoculação ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 2).

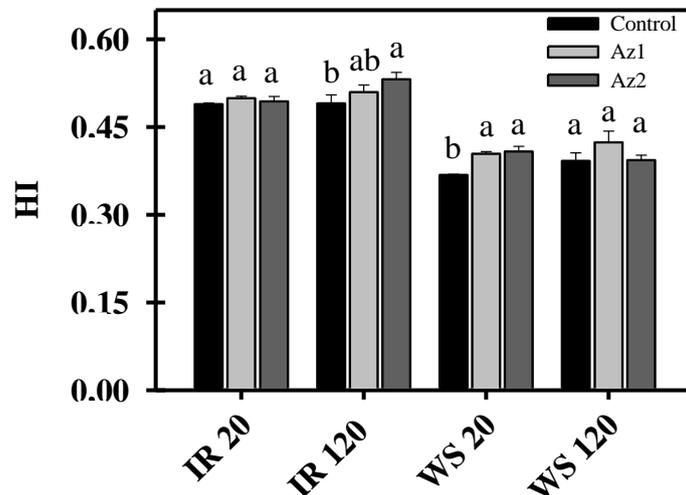
As plantas de milho na condição irrigada apresentaram acréscimo em todas as variáveis de produtividade analisadas (GY, EAW, ED, NGF, W100 e PGE) quando comparado a condição de déficit hídrico (Tabela 2). Em relação as doses de nitrogênio, na concentração de 120 kg ha<sup>-1</sup> N houve aumento em GY, EAW, NGF, W100 e PGE em comparação ao baixo nitrogênio (120 kg ha<sup>-1</sup> N) (Tabela 2). O inoculante Az3 aumentou o RY da cultura do milho em 10% em relação aos demais inoculantes ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 2). Não houve diferença significativa para a EAW, NGF, W100 e PGE entre os inoculantes ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2** Área foliar (LA), Rendimento de grãos (GY), peso de espigas (EAW), diâmetro de espiga (ED), número de grãos por fileira (NGF), peso de 100 sementes (W100), peso de grãos por espiga (PGE) das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*. Sete Lagoas - MG.

Variáveis	Condição		N (Kg ha <sup>-1</sup> )		Inoculantes			CV1 (%)	CV2 (%)
	IR	WS	20	120	Control	Az1	Az2		
LA (cm <sup>2</sup> )	6011 a	5128 b	5761 ns	5378 ns	5260 b	5664 a	5786 a	11,98	5,43
GY (Kg ha <sup>-1</sup> )	8270 a	5066 b	6339 b	6998 a	6392 b	6555 b	7057 a	13,44	7,79
EAW (g)	228,9 a	142,2 b	179,2 b	192,0 a	183,1 ns	186,7 ns	187,0 ns	5,11	5,27
ED (mm)	49,59 a	43,86 b	46,27 b	47,18 a	46,8 ns	46,7 ns	46,7 ns	1,74	2,09
NGF	33 a	28 b	31 b	32 a	31,1 ns	31,4 ns	31,2 ns	1,98	5,34
W100 (g)	46,37 a	33,04 b	38,61 b	40,79 a	39,7 ns	39,7 ns	39,7 ns	6,58	4,83
PGE (g)	188,9 a	120,6 b	149,1 b	160,4 a	150,0 ns	156,2 ns	157,9 ns	5,60	5,89

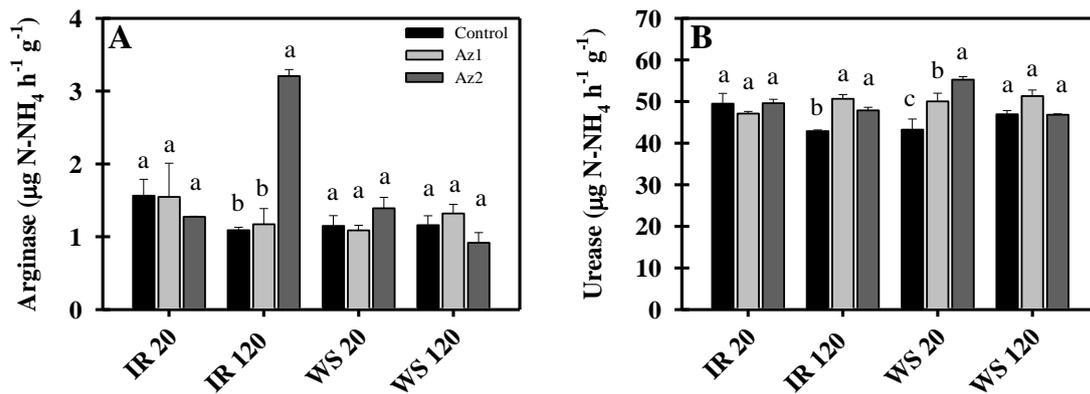
CV1: parcela; CV2: subparcela. Médias seguidas pela mesma letra na horizontal dentro de cada condição/tratamento não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ).

Para o índice de colheita (HI) os inoculantes nos tratamentos IR com 20 e WS com 120 kg ha<sup>-1</sup> N não apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 4). Contudo, Az1 e Az2 foram superiores, proporcionando aumento no HI em IR com 120 e WS com 20 kg ha<sup>-1</sup> N ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 4).



**Figura 4** Índice de Colheita (HI) das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*. IR20 (irrigado 20 kg ha<sup>-1</sup> N), IR120 (irrigado 120 kg ha<sup>-1</sup> N), WS20 (estresse hídrico 20 kg ha<sup>-1</sup> N), WS120 (estresse hídrico 120 kg ha<sup>-1</sup> N). Médias seguidas pela mesma letra para cada tratamento não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Cada valor indica a média do tratamento  $\pm$  SE.

A atividade enzimática da arginase não apresentou diferença significativa para os tratamentos IR20, WS20 e WS120 kg ha<sup>-1</sup> N ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 5A). Porém, Az2 incrementou em 191% a atividade da arginase no solo em IR com 120 kg ha<sup>-1</sup> N em comparação as plantas não inoculadas ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 5A). A atividade da urease nos tratamentos IR com 20 e WS com 120 kg ha<sup>-1</sup> N não foi significativamente diferente entre os inoculantes ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 5B). Entretanto, Az1 e Az2 aumentou em 18,5 e 12%, respectivamente, a atividade da urease em IR com 120 kg ha<sup>-1</sup> N ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 5B). O mesmo padrão foi observado em WS com 20 kg ha<sup>-1</sup> N, com Az1 (16%) e Az2 (28%) na atividade da urease ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 5B).



**Figura 5** Atividade das enzimas do solo arginase (A) e urease (B) nas plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*. IR20 (irrigado 20 kg ha<sup>-1</sup> N), IR120 (irrigado 120 kg ha<sup>-1</sup> N), WS20 (estresse hídrico 20 kg ha<sup>-1</sup> N), WS120 (estresse hídrico 120 kg ha<sup>-1</sup> N). Médias seguidas pela mesma letra para cada tratamento não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ( $p \leq 0.05$ ). Cada valor indica a média do tratamento  $\pm$  SE.

#### 4 DISCUSSÃO

O milho é uma das culturas mais responsivas a estresses abióticos (Djemel et al., 2019), causados tanto pelo déficit hídrico como pela baixa disponibilidade de N nos solos. Em decorrência destes fatores, foi possível observar alterações ecofisiológicas, morfológicas e nos componentes de produtividade do milho. Além disso, o WS pode afetar diretamente a associação das PGPR com as plantas. Contudo, de maneira geral os resultados mostraram que a inoculação por *A. brasilense* (Az1 e Az2) mitigou os efeitos adversos provenientes do WS e da baixa aplicação de N no solo.

No geral, as plantas inoculadas com Az1 e Az2 aumentaram o teor dos pigmentos fotossintéticos, que pode estar relacionado com maior absorção de N. O WS causa efeito negativo nas propriedades da clorofila (peroxidação) induzindo as plantas a senescência foliar. Li et al. (2019) e Zeffa et al. (2019) relataram que a clorofila, N foliar e a atividade fotossintética diminuíram nas plantas cultivadas sob déficit hídrico e na limitação de N. Assim, é possível verificar o efeito benéfico da inoculação por *A. brasilense* em condição de WS e IR. Provavelmente, independente do nitrogênio aplicado no solo, *A. brasilense* promoveu maior disponibilidade de N para aos tecidos do milho. Esse comportamento pode ser devido tanto a fixação biológica de nitrogênio como a produção de fitormônios, que desenvolve um papel essencial na promoção do crescimento das plantas e estimula o sistema radicular a maior absorção de nutrientes (Teixeira Filho et al., 2017; Fukami et al., 2018). Além disso, Dobbelaere et al. (2003) relataram que a inoculação com *A. brasilense* é eficiente nas culturas mesmo em

solos com alto teor de N disponível, o que indica que as respostas das plantas ocorrem não apenas devido a fixação de N<sub>2</sub>, mas devido a produção de substâncias reguladoras do crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas (Fukami et al., 2017).

Neste sentido, as plantas teriam mais nitrogênio disponível, o que poderia ser utilizado para a síntese de clorofila, justificando as diferenças dos pigmentos fotossintéticos no milho inoculado versus o controle. Este fato é importante para as plantas e pode corresponder a uma alta taxa fotossintética (Pereira et al., 2015) e, conseqüentemente, incremento na produção de fotoassimilados. Estes resultados corroboram com Cohen et al. (2015), onde plantas inoculadas com *Azospirillum* foram mais vigorosas e apresentaram pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores elevados em *Arabidopsis thaliana*.

Através da gs pode-se inferir sobre o status hídrico das plantas. Assim, com a inoculação por *A. brasilense* em IR e WS 120 kg ha<sup>-1</sup> as plantas de milho mantiveram uma maior abertura estomática, e conseqüentemente maior disponibilidade de CO<sub>2</sub> no mesofilo para a taxa fotossintética. Este resultado em WS pode evidenciar um menor nível de estresse nas plantas inoculadas. Para Reis et al. (2018) plantas quando impostas ao WS aumentam a síntese de ABA, fechando os estômatos e diminuindo a concentração de CO<sub>2</sub> intercelular com redução na fotossíntese. Além disso, PGPR em associação com as plantas podem produzir substâncias reguladoras do crescimento das plantas, como ácido salicílico e putrecina, que auxiliam na manutenção da turgidez celular em condições de estresses ambientais (Khan et al., 2018).

A inoculação (Az1 e Az2), de maneira geral, proporcionou maior ETR e LA (ETR exceto em IR 120 kg ha<sup>-1</sup>). Com aumento na ETR é possível sugerir incremento na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> devido a ampliação do fluxo de elétrons entre os PSII e PSI (Cunha et al., 2016). Assim, as plantas de milho inoculadas por *A. brasilense* obtiveram melhores respostas fisiológicas. Fukami et al. (2018) e Kaushal (2019) descreveram que *A. brasilense* melhora a capacidade antioxidante das folhas de milho, retarda a taxa de oxidação dos lipídios, eleva a taxa de utilização da energia luminosa nas plantas, além de otimizar a capacidade fotossintética desta cultura independente da condição hídrica.

Contudo, apenas na interação da inoculação com N aplicado houve incremento em Qp e YII por Az1 (20 Kg ha<sup>-1</sup> N). Este resultado pode evidenciar o papel de *A. brasilense* no sistema fotossintético e em tratamentos com doses de N. O rendimento quântico do PSII é uma variável efetiva da fluorescência na discriminação das respostas das plantas ao nitrogênio (Apostol et al., 2008; Cunha et al., 2016).

A inoculação e o N aplicado no solo não alteraram a eficiência do fotossistema II (Fv/Fm) bem como o quenching não fotoquímico (Qn), apenas a disponibilidade de água alterou esta variável. Cunha et al. (2016) descreveram que a relação Fv/Fm não alterou em híbridos de

milho inoculados com *A. brasilense* em diferentes doses de N. Contudo, resultados contrários foram encontrados por Ruiz-Sánchez et al. (2011) em plantas de arroz inoculadas com *A. brasilense* e fungos micorrízicos, onde as condições hídricas não alteraram a eficiência fotossintética. Os mesmos autores destacaram ainda que a eficiência do fotossistema II foi melhorada nas plantas de arroz com a inoculação quando comparada ao controle, indicando melhor desempenho do sistema fotossintético.

Os componentes de produção foram superiores na condição irrigada e com maior aplicação de N no solo. Este fato é justificado pelas plantas de milho estarem em condições ideais de crescimento/desenvolvimento. Entretanto, a inoculação não alterou os componentes da produção, o que difere dos resultados encontrados por Souza et al. (2019). Esses mesmos autores relataram que a inoculação com *Azospirillum brasilense* influenciou positivamente o número de grãos por fileira (NGF) e a massa de 100 grãos (W 100), o que refletiu no rendimento dos grãos. Possivelmente, a não alteração dos componentes de produção esteja relacionado ao número total de espigas, que aumentou a produtividade com a inoculação por Az2, mas não refletiu em diferenças nestes mesmos componentes.

Teixeira Filho et al. (2017) descreveram que a resposta à inoculação com *A. brasilense* realizada em conjunto com a adubação nitrogenada na cultura do trigo ocorre de maneira satisfatória. Entretanto, apenas *A. brasilense* não é eficaz o suficiente para substituir a adubação nitrogenada, porém a associação desta rizobactéria com a adubação nitrogenada pode possibilitar maiores rendimentos de grãos.

O WS durante a fase de antese e estilo-estigma diminuiu drasticamente o rendimento de grãos, com reduções no índice de colheita (HI) (Parajuli et al., 2018). Além disso, Hernández et al. (2015) relataram que a disponibilidade de N para as plantas não aumenta o rendimento de grãos em ambientes com limitação hídrica. Assim, estes fatos podem justificar os resultados encontrados neste trabalho, com a ausência da interação entre os fatores.

A inoculação por Az2 aumentou a produtividade em 10% tanto para o IR e WS. Este incremento no rendimento dos grãos pode ser justificado à grande variedade de mecanismos para a estimulação do crescimento das plantas e a tolerância a estresses abióticos, efeitos diretos ou indiretos desencadeados por *A. brasilense* (Bashan, Bashan 2010). Como discutido anteriormente, a fixação biológica do nitrogênio, produção dos fitormônios, exopolissacarídeos contribuiu para a maior absorção de água e minerais (Fukami et al., 2018). Além disso, como a inoculação o milho apresentou maior LA, pigmento fotossintético (clorofilas), maior resposta ecofisiológica (gs e fluorescência), o que pode ter contribuído para esse aumento em GY. Estes resultados foram superiores aos encontrados por Galindo et al. (2018), em que plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* apresentaram aumento na produtividade de 5 e 6%. Martins et al.

(2018) descreveram que o milho inoculado com *Azospirillum*, apresentou incremento na nutrição das plantas e maior rendimento dos grãos, evidenciando o benefício da inoculação para esta cultura.

Como já discutido, a seca e a baixa disponibilidade de N alteram as variáveis fisiológicas com impacto na produção e redução do HI (Parajuli et al., 2018; Zeffa et al., 2019). O HI que representa a eficiência do transporte de fotoassimilados produzidos nas folhas para o processo do enchimento dos grãos, é reduzido por estes estresses abióticos (Ran et al., 2019). Com o aumento no HI em WS 20 e IR120 kg ha<sup>-1</sup> na presença de *A. brasilense* pode-se inferir que esta rizobactéria proporcionou melhor eficiência no uso da água e nutrientes pelas plantas, refletindo em uma produção maior e mais sustentável (Hütsch e Schubert 2018). Ademais, em IR as plantas estavam em condições com disponibilidade hídrica e de nutrientes recomendados para esta cultura, favorecendo estes resultados.

A atividade enzimática da arginase e urease está diretamente ligada a conversão de compostos nitrogenados em amônio do solo para as plantas. A atividade destas enzimas na rizosfera pode ser afetada por vários fatores abióticos, como conteúdo de matéria orgânica, alterações do solo, déficit hídrico (Ali et al., 2019). Neste sentido, foi possível observar que Az2 proporcionou maior atividade da arginase em IR 120 kg ha<sup>-1</sup> de N. Já na atividade da urease em WS 20 e IR 120 kg ha<sup>-1</sup> de N, todos os inoculantes foram superiores ao controle favorecendo as plantas de milho. Este resultado na condição de WS e baixo N aplicado no solo (WS 20 kg ha<sup>-1</sup>) está de acordo com o encontrado nas clorofilas que pode sugerir o efeito em HI. Todos estes resultados podem estar relacionados com *A. brasilense* estimular o desenvolvimento do sistema radicular, melhorar a aquisição de nutrientes, incluindo o N (Fukami et al., 2018; Kaushal, 2019) e explorar com mais eficiência o perfil do solo.

Entretanto, os estresses ambientais, como a seca, provocam respostas nos tecidos vegetais que podem desencadear a produção de etileno, resultando na inibição do alongamento das células radiculares das plantas (Broekaert et al., 2006). Além disso, a seca limita a acessibilidade dos nutrientes do solo para as plantas, por reduzir a distribuição e o fluxo de massa dos nutrientes solúveis na água (Khan et al., 2018). Porém, a influência das rizobactérias, como *A. brasilense*, no crescimento radicular já está bem descrito na literatura, podendo sugerir que os resultados encontrados neste trabalho possam ser em decorrência na melhoria da arquitetura radicular.

Em áreas tropicais é possível ocorrer frequentemente períodos de seca (Martins et al., 2015), que são comumente associados ao uso ineficiente de N pelas plantas, representando um déficit na produção (Martins et al., 2018). Assim, o uso de técnicas biológicas, como a inoculação por *A. brasilense*, pode melhorar as respostas morfofisiológicas das plantas e a

eficiência no uso de fertilizantes, representando uma alternativa sustentável para o cultivo dos cereais. Além disso, deve-se se atentar para os benefícios econômicos e ambientais proporcionados por esta rizobactéria com a inoculação, seja em ambiente com déficit de água ou com disponibilidade hídrica.

## 5 CONCLUSÃO

A condição irrigada com a maior aplicação de nitrogênio aliado aos inoculantes aumenta o desenvolvimento das plantas de milho.

O déficit hídrico e a baixa disponibilidade de N nos solos limitaram as características morfofisiológicas e os componentes de produtividade no milho.

A inoculação por *A. brasilense* (Az1 e Az2) atenuou os efeitos adversos provenientes do WS e da baixa aplicação de N no solo, e pode ser uma estratégia para mitigar os efeitos desses estresses na cultura do milho.

## AGRADECIMENTOS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

## REFERÊNCIAS

Alef, K., Keiner, D. (1986). Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 18: 233-235.

Ali, J., Sharma, D. C., Bano, A., Gupta, A., Sharma, S., Bajpai, P., & Pathak, N. (2019). Exploiting Microbial Enzymes for Augmenting Crop Production. In: *Enzymes in Food Biotechnology*. Academic Press. 503-519.

Apostol, SL, Ion, RM, Tugulea, L. (2008). Spectral methods for nitrogen deficiency evaluation in maize plants. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*,. 10(6):1478-1481.

Bashan Y, de-Bashan LE. (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. *Adv Agron* 108:77–136.

Broekaert WFSL, Delaure, De Bolle MFC, Cammuel BPA: The role of ethylene in pathogen-host interactions. *Annu Rev Phytopathol*. 2006, 44: 393-416.

- Cohen, A. C., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F. J., Moreno, D., Boccanlandro, H., ... & Piccoli, P. N. (2015). *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiol Plant*. 153(1), 79-90.
- Cunha, F. N., da Silva, N. I. F., Rodrigues, C. R., Morais, W. A., Gomes, F. A. H. F., Lopes Filho, L. C. E., ... & Costa, C. T. S. (2016). Performance of different genotypes of maize subjected to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *African Journal of Agricultural Research*, 11(39), 3853-3862.
- Djemel, A., Álvarez-Iglesias, L., Santiago, R., Malvar, R. A., Pedrol, N., & Revilla, P. (2019). Algerian maize populations from the Sahara desert as potential sources of drought tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(1), 12.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22:107-149.
- Durães, FOM., Magalhães, PC., Oliveira, AC. (2002). Índice de colheita genético e as possibilidades da genética fisiológica para melhoramento do rendimento de milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 1(1), 33-40.
- Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2017). Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*, 7(1), 153.
- Fukami, J., Cerezini, P., & Hungria, M. (2018). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 8(1), 73.
- Galindo, F. S., Filho, M. C. T., Buzetti, S., Rodrigues, W. L., Boleta, E. H., Rosa, P. A., et al. (2018). Technical and Economic Viability of Corn with *Azospirillum brasilense* Associated with Acidity Correctives and Nitrogen. *Journal of Agricultural Science*, 10(3).
- Genty B, Harbinson J, Cailly AL, Rizza F. (1996). Fate of excitation at PS II in leaves: the non- photochemical side. Presented at: The Third BBSRC Robert Hill Symposium on Photosynthesis, March 31 to April 3, University of Sheffield, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Western Bank, Sheffield, UK, pp 28.
- Hernández, M., Echarte, L., Della Maggiora, A., Cambareri, M., Barbieri, P., & Cerrudo, D. (2015). Maize water use efficiency and evapotranspiration response to N supply under contrasting soil water availability. *Field Crops Research*, 178, 8-15.
- Hütsch, B. W., & Schubert, S. (2018). Maize harvest index and water use efficiency can be improved by inhibition of gibberellin biosynthesis. *Journal of agronomy and crop science*, 204(2), 209-218.
- Khan, N., Bano, A., Shahid, M. A., Nasim, W., & Babar, M. A. (2018). Interaction between PGPR and PGR for water conservation and plant growth attributes under drought condition. *Biologia*, 73(11), 1083-1098.
- Kandeler, E.; Gerber, H. (1988). Short term assay of soil urease activity using colorimetric determination ammonium. *Biology and Fertility of Soils*., 6: p. 68-72.

- Kaushal, M. (2019). Portraying Rhizobacterial Mechanisms in Drought Tolerance: A Way Forward Toward Sustainable Agriculture. In PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. Woodhead Publishing. 195-216.
- Li, Y., Song, H., Zhou, L., Xu, Z., & Zhou, G. (2019). Vertical distributions of chlorophyll and nitrogen and their associations with photosynthesis under drought and rewatering regimes in a maize field. *Agricultural and Forest Meteorology*, 272, 40-54.
- Lichtenthaler, H. K.; Buschmann, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley and Sons, 2001. p. F4.3.1–F4.3.8.
- Martins MR, Jantalia CP, Polidoro JC, Batista JN, Alves BJR, Boddey RM, Urquiaga S (2015) Nitrous oxide and ammonia emissions from N fertilization of maize crop under no-till in a Cerrado soil. *Soil Till Res* 151:75–81.
- Martins, M. R., Jantalia, C. P., Reis, V. M., Döwich, I., Polidoro, J. C., Alves, B. J. R., ... Urquiaga, S. (2018). Impact of plant growth-promoting bacteria on grain yield, protein content, and urea-15 N recovery by maize in a Cerrado Oxisol. *Plant and soil*, 422(1-2), 239-250.
- Meena KK, Sorty AM, Bitla UM et al (2017). Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies. *Front Plant Sci* 8:172.
- Parajuli, S., Ojha, BR., Ferrara, GO. (2018). Quantification of secondary traits for drought and low nitrogen stress tolerance in inbreds and hybrids of maize (*Zea mays* L.). *J. Plant Genet. Breed*, 2, 106.
- Pereira, L. D. M., Pereira, E. D. M., Revolti, L. T. M., Zingaretti, S. M., Môro, G. V. (2015). Seed quality, chlorophyll content index and leaf nitrogen levels in maize inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Revista Ciência Agronômica*, 46(3), 630-637.
- Pii, Y., Aldrighetti, A., Valentinuzzi, F., Mimmo, T., & Cesco, S. (2019). *Azospirillum brasilense* inoculation counteracts the induction of nitrate uptake in maize plants. *Journal of experimental botany*, 70(4), 1313-1324.
- Ran, H., Kang, S., Hu, X., Li, F., Du, T., Tong, L., Parsons, D. (2019). Newly developed water productivity and harvest index models for maize in an arid region. *Field Crops Research*, 234:73-86.
- Reis, C. O., Magalhães, P. C., Avila, R. G., Almeida, L. G., Rabelo, V. M., Carvalho, D. T., Souza, T. C. (2018). Action of N-Succinyl and N, O-Dicarboxymethyl Chitosan Derivatives on Chlorophyll Photosynthesis and Fluorescence in Drought-Sensitive Maize. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-12.
- Ribeiro, AC. (1999). Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5. aproximação. Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais.
- Ruíz-Sánchez, M., Armada, E., Muñoz, Y., de Salamone, I. E. G., Aroca, R., Ruíz-Lozano, J. M., & Azcón, R. (2011). *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology*, 168(10), 1031-1037.

Souza, E. M. D., Galindo, F. S., Teixeira Filho, M., da Silva, P. R., Santos, A. C. D., & Fernandes, G. C. (2019). Does the nitrogen application associated with *Azospirillum brasilense* inoculation influence corn nutrition and yield?. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 23(1), 53-59.

Teixeira Filho MCM, Galindo FS, Buzetti S, Santini JMK. (2017). Inoculation with *Azospirillum brasilense* Improves Nutrition and Increases Wheat Yield in Association with Nitrogen Fertilization. In: *Wheat Improvement, Management and Utilization*. 2017. 99-114.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4(356), 1-19.

van Kooten O, Snel J (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res*. 25:147–150.

Zeffa, D. M., Perini, L. J., Silva, M. B., de Sousa, N. V., Scapim, C. A., de Oliveira, A. L. M., ... & Gonçalves, L. S. A. (2019). *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. *PloS one*, 14(4), 1-19.