

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

ANDRE GUSTAVO BATTISTUS

**MODULAÇÕES ANATÔMICAS, BIOQUÍMICAS E FOTOSSINTÉTICAS
MEDIADAS POR *Azospirillum brasilense* INOCULADO VIA SEMENTE E
PULVERIZAÇÃO FOLIAR EM MILHO**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ

2019

ANDRE GUSTAVO BATTISTUS

**MODULAÇÕES ANATÔMICAS, BIOQUÍMICAS E FOTOSSINTÉTICAS
MEDIADAS POR *Azospirillum brasilense* INOCULADO VIA SEMENTE E
PULVERIZAÇÃO FOLIAR EM MILHO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Dr. Vandeir Francisco Guimarães

Coorientador: Dr. João Domingos Rodrigues

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Battistus, Andre Gustavo

Modulações anatômicas, bioquímicas e fotossintéticas mediadas por *Azospirillum brasilense* inoculado via semente e pulverização foliar em milho / Andre Gustavo Battistus; orientador(a), Vandeir Francisco Guimarães; coorientador(a), João Domingos Rodrigues, 2019.

170 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.

1. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. 2. Fluorescência da clorofila a. 3. Hormônios vegetais. 4. Estresse hídrico. I. Guimarães, Vandeir Francisco . II. Rodrigues, João Domingos. III. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



ANDRE GUSTAVO BATTISTUS

Modulações anatômicas, bioquímicas e fotossintéticas mediadas por *Azospirillum brasilense* inoculado via semente e pulverização foliar em milho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Manejo de Culturas, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Vandeir Francisco Guimarães

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

Odair José Kuhn

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

José Renato Stangarlin

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

Samuel Luiz Fioreze

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Alessandro Lucca Braccini

Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Marechal Cândido Rondon, 22 de fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade de buscar mais este título profissional. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de pesquisa, e demais órgãos de fomento envolvidos nesta pesquisa. À Fundação Araucária de suporte ao desenvolvimento científico e tecnológico do Paraná, afiliada a Secretária Estadual de Ciência, Tecnologia e Educação Superior – SETI, à CAPES/PNPD, ao INCT-FBN pelo suporte financeiro e ao CNPq pela bolsa produtividade concedida ao pesquisador Dr. Vandeir Francisco Guimarães.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, sobretudo à oportunidade de participar como membro de seu colegiado durante dois anos.

Em especial ao professor e orientador Vandeir Francisco Guimarães, não por uma, mas por todas as orientações, sejam de caráter técnico, profissional e/ou pessoal. Pela liberdade, credibilidade e confiança a mim depositados durante seis anos. Muito obrigado.

Ao professor Odair José Kuhn por me apresentar, a oito anos atrás, ao mundo da pesquisa científica, e aos professores José Renato Stangarlin e Edmar Vasconcelos por breves conversas que originaram importantes conselhos, reflexões e tomadas de decisão neste período.

Aos amigos e colegas do Grupo de Estudos em Fixação Biológica de Nitrogênio, pelo engrandecimento pessoal e profissional. Em especial a Lucas Guilherme Bulegon, Thalles Luan Ferronato e Anderson Süss pela colaboração na condução dos ensaios, bem como aos colegas do Cobalfi Anderson Luis Heling e Eloisa Lorenzetti.

A todos os amigos, os quais construí relações de amizade ao longo da vida, os quais me lembro com carinho de cada. À todos os momentos compartilhados, uma homenagem a todas às discussões de natureza engrandecedora e aos momentos dedicados e compartilhados com quem se escolhe, e principalmente ao respeito pelo livre pensamento do próximo.

Para o fim guarda-se o mais precioso, aos meus familiares, principalmente aos meus pais, pela liberdade de escolha, apoio e incentivo dos passos que trilho e que um dia trilharei. Pelos ensinamentos, os quais por sorte, nunca tive necessidade de buscar longinquamente.

Ao maior presente que este caminho me concedeu, à “*peer-review*” e “*improver*” desta obra e de meus três últimos anos, Dr^a Danielle Mattei. Gostaria de todo dia ter a oportunidade de lhe agradecer por sonhar os meus sonhos e partilhar os seus comigo, por possuímos planos tão semelhantes, por ser tão cuidadosa e paciente. Agradecer por todo apoio e incentivo, por cada sorriso, cada gargalhada, cada alegria que foi e será compartilhada.

*It is far better to grasp the Universe as it
really is than to persist in delusion, however
satisfying and reassuring.*

*Carl Sagan,
The Demon-haunted world: Science as a
candle in the dark.*

RESUMO

BATTISTUS, Andre Gustavo. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro de 2019. **Modulações anatômicas, bioquímicas e fotossintéticas mediadas por *Azospirillum brasilense* inoculado via semente e pulverização foliar em milho.** Orientador: Dr. Vandeir Francisco Guimarães. Coorientador: Dr. João Domingos Rodrigues.

A utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal tem ganhado destaque devido à procura por tecnologias sustentáveis que incrementem a produção agrícola mundial, podendo-se destacar o gênero *Azospirillum* como o mais difundido. Bactéria de hábito rizosférico, apresenta também capacidade para colonizar tecidos de parte aérea, abrindo portas à possibilidade para distribuição via pulverizações na parte aérea, proporcionando efeitos semelhantes aos desencadeados por inoculações via semente. Deste modo, objetivou-se elucidar efeitos bioquímicos, fotossintéticos, anatômicos, morfofisiológicos e produção da cultura do milho inoculada por *Azospirillum brasilense* via semente e/ou pulverização foliar. Cinco ensaios foram conduzidos, quatro em nível de campo e outro em condições de vaso visando avaliar os tratamentos: controle; inoculação de *A. brasilense* via semente; pulverização foliar de *A. brasilense*; e inoculação via semente aliado à pulverização foliar de *A. brasilense*. Em ensaio em vasos, ao estágio V₁₂, induzindo restrição hídrica, e ao estágio R₃, com adequada disponibilidade hídrica, efetuaram-se avaliações de trocas gasosas ao longo do dia, aliadas a coletas foliares para análises bioquímicas da atividade de enzimas antioxidantes, e análise de turgor celular e estabilidade de membranas ao estágio V₁₂. Determinou-se, também, teor de pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas em função da luminosidade (V₁₂ e R₃) e concentração de CO₂(R₃). Ao V₁₂ foram coletadas amostras para determinações anatômicas inerentes a vasos condutores, estômatos e lignina, e avaliado a fluorescência da clorofila *a*. Ao final do ciclo determinou-se índice SPAD. Os ensaios em nível de campo foram instalados em duas safras e locais, visando avaliar componentes da produção e produtividade da cultura. Volume, massa de raiz e massa total foram incrementados pela inoculação + pulverização. A utilização de *A. brasilense* elevou o número e diâmetro interno de vasos do metaxilema radicular. Os vasos do protoxilema tiveram área de transporte aumentada, e o floema teve número, diâmetro e área elevados. O número de vasos do floema foi elevado pela bactéria na folha. A epiderme adaxial e limbo foliar espessaram-se, assim como o número de estômatos aumentou. A lignina radicular foi reduzida pelas inoculações, porém, estimulada nas folhas pela combinação das aplicações. A pulverização elevou a eficiência do fotossistema II em aproveitar elétrons e repassá-los mais eficientemente para a assimilação líquida de CO₂. A falta de água reduziu fotossíntese, porém

A. brasilense sustentou maiores teores foliares de água e maior transpiração, facilitando aporte de CO₂, evitando maiores reduções na fotossíntese. A atividade antioxidante foi impulsionada por ambas aplicações, principalmente nos momentos de alta luminosidade, prosseguindo até o entardecer. A inoculação e pulverização possibilitaram maior fotossíntese em elevadas luminosidades. A atividade das enzimas carboxilativas elevaram-se sob elevadas concentrações de CO₂ intercelular. Fotossíntese e transpiração foram maiores nas folhas próximas à espiga, quando pulverizado *A. brasilense*. O teor de pigmentos fotossintéticos foliares não variou durante o ciclo, porém, todos os tratamentos proporcionaram efeito *stay-green* ao final do mesmo. Não houve efeitos na produtividade. Os resultados reafirmam o papel de *A. brasilense* na maior exploração solo, e indicam seu estímulo no aproveitamento dos recursos ambientais, incremento da fotossíntese e efeito *stay-green*, promovidos pela inoculação via semente, porém com melhor desempenho para a pulverização foliar de *A. brasilense*.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento vegetal; Fluorescência da clorofila *a*; Hormônios vegetais; Estresse hídrico.

ABSTRACT

BATTISTUS, Andre Gustavo. Western Paraná State University, february 2019. **Anatomic, biochemical and photosynthetic modulations mediated by *Azospirillum brasilense* inoculated via seed and leaf spraying in corn.** Advisor: Dr. Vandeir Francisco Guimarães. Co-advisor: Dr. João Domingos Rodrigues.

The use of plant growth promoting bacteria has been highlighted due to the search for sustainable technologies that could increase the world agricultural production, being able to emphasize the genus *Azospirillum* as the most widespread. Rhizospheric bacteria habit also presents ability to colonize shoot tissues, opening doors for distribution through sprays in foliar tissues, providing effects similar to those triggered by inoculations via seed. The objective of this study was to elucidate the biochemical, photosynthetic, anatomical, morphophysiological and yield effects in corn inoculated with *Azospirillum brasilense* applied by seed and/or foliar spraying. Five trials were conducted, four at field level and another under controlled substrate conditions to evaluate the treatments: control; *A. brasilense* seed inoculation; *A. brasilense* foliar spraying; and seed inoculation allied to foliar spraying of *A. brasilense*. In a controlled substrate experiment, at V₁₂ stage, with inducing water restriction, and at the R₃ stage, with adequate water availability, gas exchange evaluations were carried out throughout the day, together with collect of leaf samples for biochemical analysis of the activity of antioxidant enzymes, and analysis of cell turgor and stability of membranes in V₁₂ stage. It was also determined the content of photosynthetic pigments, gas exchange as a function of luminosity(V₁₂ and R₃) and concentration of CO₂(R₃). In the V₁₂stage, collected samples for anatomical determinations inherent to conducting vessels, stomata and lignin, and evaluated the of Chlorophyll *a* fluorescence. At the end of the cycle, SPAD index was determined. The field-level trials were carried out in two harvests and sites, aiming to evaluate production components and crop productivity. Volume, root mass and total mass were increased by inoculation + spraying. The use of *A. brasilense* increased the number and internal diameter of vessels of the root metaxylem. The protoxylem vessels had increased transport area, and the phloem had elevated number, diameter and area. Number of phloem vessels was raised by the spraying bacteria. The adaxial epidermis and leaf limbus thickened, just as the number of stomata as increased. The root lignin was reduced by the inoculations but stimulated in the leaves by the combination of the applications. Spraying increased the efficiency of photosystem II in harnessing electrons and passing them more efficiently to the net assimilation of CO₂. The lack of water reduces photosynthesis, but *A. brasilense* sustains high levels of leaf water contents,

greater transpiration facilitating the contribution of CO₂ and avoiding greater reductions in photosynthesis. The antioxidant activity is driven by both applications, especially in the high light moments, continuing until dusk. The inoculation and spraying made possible greater photosynthesis in high luminosities. Activity of the carboxylic enzymes improved under high concentrations of intercellular CO₂. Photosynthesis and transpiration were higher in leaves near the spike when sprayed *A. brasilense*. The pigment content did not change during the cycle, but all the treatments provided a stay-green effect at his end. There were no effects on productivity. The results reaffirm the role of *A. brasilense* in the greater soil exploration and indicate its stimulation in the use of environmental resources, increase of photosynthesis and stay-green effect, promoted by inoculation, and with a better performance by *A. brasilense* foliar spraying.

Keywords: Plant growth promoting bacteria; Chlorophyll *a* fluorescence; Plant hormones; Drought.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	CAPÍTULO 1: BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL NA MITIGAÇÃO DE ESTRESSE HÍDRICO – ALTERNATIVAS DE APLICAÇÃO NA CULTURA DO MILHO	16
2.1	FOTOSSÍNTESE E CONDIÇÕES AMBIENTAIS.....	16
2.2	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL	18
2.2.1	Regulação de Crescimento Vegetal	19
2.2.1.1	Hormônios promotores de crescimento e indutores de resistência a déficit hídrico	19
2.2.1.2	Atividade da enzima ACC-deaminase	20
2.2.1.1	Ácido salicílico	20
2.2.1.2	Poliaminas	20
2.2.1.3	Óxido nítrico	21
2.2.2	Solubilização de Fosfatos	21
2.2.3	Produção de Sideróforos.....	22
2.2.4	Tolerância a Estresses Bióticos e Condições Ambientais Adversas.....	22
2.2.5	Mecanismos de Ação Complementares	23
2.3	PULVERIZAÇÃO FOLIAR DE <i>Azospirillum</i> EM PLANTAS.....	24
2.4	REFERÊNCIAS.....	25
3	CAPÍTULO 2: MODULAÇÕES NA ANATOMIA VASCULAR E ESTRUTURAL DE RAÍZES E FOLHAS DE MILHO MEDIADAS POR <i>Azospirillum brasilense</i>: RECURSO EM CONDIÇÕES ADVERSAS	33
3.1	INTRODUÇÃO	34
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.2.1	Tratamentos e Delineamento Experimental.....	35
3.2.2	Material Vegetal e Condução Experimental.....	36
3.2.3	Preparação e Fixação das Amostras	36
3.2.4	Cortes Histológicos	36
3.2.4.1	Número de estômatos	37
3.2.4.2	Obtenção das imagens e mensurações	37
3.2.5	Teor de Lignina.....	38
3.2.6	Atividade Fenilalanina Amônia-liase (FAL; EC 4. 3. 1. 5).....	39
3.2.7	Análise Estatística	40
3.3	RESULTADOS.....	40
3.3.1	Anatomia Radicular.....	40
3.3.2	Anatomia Foliar	45
3.3.3	Número de Estômatos	49
3.3.4	Teor de Lignina e Atividade de Fenilalanina Amônia-liase.....	50
3.4	DISCUSSÃO	51
3.5	CONCLUSÃO	55
3.6	REFERÊNCIAS.....	56

4	CAPÍTULO 3: PULVERIZAÇÃO FOLIAR DE <i>Azospirillum brasilense</i> INCREMENTA REAÇÕES FOTOSSINTÉTICAS LUMINOSAS E CARBOXILATIVAS EM MILHO	61
4.1	INTRODUÇÃO	62
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	64
4.2.1	Tratamentos e Delineamento Experimental.....	64
4.2.2	Material Vegetal e Condução Experimental.....	64
4.2.3	Trocas Gasosas e Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	65
4.2.4	Quantificação de Pigmentos Foliares e Índice SPAD.....	66
4.2.5	Análise Estatística	67
4.3	RESULTADOS.....	68
4.3.1	Trocas Gasosas.....	68
4.3.2	Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	69
4.3.3	Análise de Componentes Principais.....	73
4.4	DISCUSSÃO	74
4.5	CONCLUSÃO	78
4.6	REFERÊNCIAS.....	78
5	CAPÍTULO 4: ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA IMPULSIONADA POR <i>Azospirillum brasilense</i> EM MILHO	84
5.1	INTRODUÇÃO	85
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	87
5.2.1	Tratamentos e Delineamento Experimental.....	87
5.2.2	Material Vegetal e Condução Experimental.....	87
5.2.3	Curvas de Resposta a Luminosidade.....	87
5.2.4	Curvas de Resposta à Concentração Intercelular de CO ₂	88
5.2.5	Análise Estatística	89
5.3	RESULTADOS.....	89
5.3.1	Respostas ao Fluxo de Fótons Fotossinteticamente Ativos.....	89
5.3.2	Respostas à Concentração Intercelular de CO ₂	95
5.4	DISCUSSÃO	98
5.5	CONCLUSÃO	101
5.6	REFERÊNCIAS.....	101
6	CAPÍTULO 5: RESTRIÇÃO HÍDRICA AMENIZADA POR <i>Azospirillum brasilense</i> EM MILHO: STATUS HÍDRICO, TROCAS GASOSAS E PROTEÇÃO OXIDATIVA	106
6.1	INTRODUÇÃO	107
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	108
6.2.1	Tratamentos e Delineamento Experimental.....	108
6.2.2	Material Vegetal e Condução Experimental.....	109
6.2.3	Umidade Gravimétrica do Solo	109
6.2.4	Conteúdo Relativo de Água do Limbo Foliar.....	109
6.2.5	Tolerância Protoplasmática	110
6.2.6	Trocas Gasosas.....	110
6.2.7	Análises Bioquímicas	111
6.2.7.1	Coleta das amostras.....	111

6.2.7.2	Obtenção dos extratos	111
6.2.7.3	Quantificação de proteínas solúveis totais	111
6.2.7.4	Atividade de peroxidase (POD; EC 1. 11. 1. 7).....	112
6.2.7.5	Atividade de catalase (CAT; EC 1. 11. 1. 6).....	112
6.2.7.6	Atividade de polifenoloxidase (PPO; E. C. 1. 10. 3. 1).....	113
6.2.7.7	Atividade de Superóxido dismutase (SOD; EC 1. 15. 1. 1).....	113
6.2.8	Análise Estatística	113
6.3	RESULTADOS.....	114
6.3.1	Status Hídrico do Solo e Vegetal	114
6.3.2	Trocas Gasosas.....	116
6.3.3	Atividade Bioquímica Antioxidante.....	118
6.4	DISCUSSÃO	118
6.5	CONCLUSÃO	122
6.6	REFERÊNCIAS.....	122
7	CAPÍTULO 6: APROVEITAMENTO DA RADIAÇÃO SOLAR E PROTEÇÃO ANTIOXIDATIVA EM MILHO IMPULSIONADOS POR <i>Azospirillum brasilense</i> ..	126
7.1	INTRODUÇÃO	127
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	129
7.2.1	Tratamentos e Delineamento Experimental:	129
7.2.2	Material Vegetal e Condução Experimental.....	129
7.2.3	Trocas Gasosas.....	129
7.2.4	Análises Bioquímicas	130
7.2.4.1	Coleta das amostras.....	130
7.2.4.2	Obtenção dos extratos	130
7.2.4.3	Quantificação de proteínas solúveis totais	130
7.2.4.4	Atividade de peroxidase (POD; EC 1. 11. 1. 7).....	131
7.2.4.5	Atividade de catalase (CAT; EC 1. 11. 1. 6).....	131
7.2.4.6	Atividade de polifenoloxidase (PPO; E. C. 1. 10. 3. 1).....	132
7.2.4.7	Atividade de Superóxido dismutase (SOD; EC 1. 15. 1. 1).....	132
7.2.5	Análise Estatística	132
7.3	RESULTADOS.....	133
7.3.1	Trocas Gasosas.....	133
7.3.2	Atividade Bioquímica Antioxidante.....	136
7.4	DISCUSSÃO	138
7.5	CONCLUSÃO	141
7.6	REFERÊNCIAS.....	141
8	CAPÍTULO 7: DINÂMICA FOTOSSINTÉTICA E EFEITO <i>STAY-GREEN</i> EM MILHO: MODIFICAÇÕES MEDIADAS POR <i>Azospirillum brasilense</i>	146
8.1	INTRODUÇÃO	147
8.2	MATERIAL E MÉTODOS	149
8.2.1	Tratamentos e Delineamento Experimental.....	149
8.2.2	Material Vegetal e Condução Experimental.....	149
8.2.3	Morfometria.....	149
8.2.4	Dinâmica de Trocas Gasosas e Índice SPAD	150

8.2.5	Ensaio de Eficiência Agronômica	151
8.2.6	Análise Estatística	154
8.3	RESULTADOS.....	154
8.3.1	Morfometria.....	154
8.3.2	Dinâmica de Trocas Gasosas e Índice SPAD.....	155
8.3.3	Ensaio de Eficiência Agronômica	160
8.4	DISCUSSÃO.....	161
8.5	CONCLUSÃO	165
8.6	REFERÊNCIAS.....	165
9	CONCLUSÕES GERAIS	171

1 INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) apresenta elevada importância econômica mundial, sendo cultivado em todos os continentes e empregado em várias cadeias do agronegócio. Neste cenário, o Brasil desponta como terceiro maior produtor e segundo maior exportador do grão.

Devido ao elevado potencial produtivo do cereal, o desenvolvimento de tecnologias para incorporação ao sistema de produção é intenso, dentre as quais destaca-se produtos que visam otimizar o aproveitamento dos recursos ambientais para incremento da produtividade, ou abrandar efeitos derivados de estresses, mitigando reduções na produtividade.

Produtos com característica biofertilizante e bioestimulante destacam-se em culturas de alta liquidez, onde sua aplicação pode ser efetuada ao longo de todo o ciclo vegetativo, visando estimular a atividade fotossintética e potencializar produtividade. Ao mesmo passo, o mercado consumidor vem demandando maior sustentabilidade na produção do cereal, aumentando a participação de produtos de origem biológica em sua produção.

Liderando a utilização de microrganismos promotores de crescimento ao redor do mundo, o gênero *Azospirillum* tem se destacado pela amplitude de culturas onde apresenta efeitos de promoção de crescimento, sendo mais aplicado a cultivos de gramíneas. O mesmo atua como modulador do metabolismo vegetal por meio de estímulos hormonais e bioquímicos, culminando em mecanismos bioquímicos e morfológicos que facilitam a captação de água e aproveitamento de recursos ambientais. Isso possibilita maior exploração do solo devido ao crescimento radicular, e acionando mecanismos de defesa que, em conjunto, possibilitam ao vegetal melhores condições para enfrentar adversidades bióticas e abióticas.

Bactéria de hábito rizosférico, o gênero *Azospirillum* apresenta também capacidade para colonizar tecidos de parte aérea, possibilitando alternativa para sua distribuição via pulverizações foliares. Usualmente estas aplicações têm proporcionando efeitos semelhantes aos desencadeados por inoculações via semente, possuindo a vantagem de evitar contato direto e exposição prolongada da bactéria à diversos defensivos agrícolas aplicados via tratamento de semente, os quais afetam sua eficiência agrícola.

Deste modo, a presente obra teve por objetivo elucidar efeitos bioquímicos, fotossintéticos, anatômicos, morfofisiológicos e produtivos promovidos por *Azospirillum brasilense* – estirpes AbV5 + AbV6 – aplicado via semente e/ou pulverização foliar na cultura do milho, buscando compreender melhor seus mecanismos de ação e modulações fisiológicas ao longo do ciclo da cultura.

2 CAPÍTULO 1: BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL NA MITIGAÇÃO DE ESTRESSE HÍDRICO – ALTERNATIVAS DE APLICAÇÃO NA CULTURA DO MILHO

A redução da amplitude entre o potencial produtivo das culturas e os níveis de produção agrícola atingidos atualmente é ponto importante a ser explorado pela pesquisa (FISCHER, 2015). Aliado a isto está a busca por alternativas sustentáveis para otimizar a exploração ambiental por parte das plantas. A correta compreensão e impacto na fisiologia das plantas que estas tecnologias ocasionam é de crucial importância para seu correto posicionamento nos campos de produção (GODFRAY et al., 2010).

Entre os principais empecilhos que distanciam o potencial produtivo da produtividade atual estão os períodos de restrição ou alta demanda hídrica, sendo a homogênea oferta de água durante o ciclo das culturas o fator abiótico mais importante, que quando não atendido, limita a produção, ocasionando significativas perdas na agricultura mundial (AHMAD et al., 2016; SHAO et al., 2009). Aliado a esta informação, ressalta-se que nos próximos anos espera-se aumento da heterogeneidade na distribuição hídrica ao redor do globo terrestre (KASIM et al., 2013).

Vegetais sofrem prejuízos com a falta de água quando há baixa oferta da mesma no solo ou quando a taxa transpiratória excede a capacidade de absorção deste recurso por parte das raízes, mesmo em adequada disponibilidade hídrica no solo (ANJUM; XIE; WANG, 2011), de comum ocorrência ao longo do dia em períodos de alta temperatura e elevada radiação solar. Estes períodos resultam em redução ou até inibição da atividade fotossintética devido à redução do teor de água nos tecidos foliares (CURÁ et al., 2017), impactando fisiológica e bioquimicamente os vegetais, culminando em redução da produtividade (ALI et al., 2011).

Deste modo, torna-se importante a busca por alternativas e tecnologias sustentáveis que possibilitem a manutenção da produção em momentos adversos (TAKEDA; MATSUOKA, 2008) e/ou aumento da produtividade em condições favoráveis a mesma.

2.1 FOTOSSÍNTESE E CONDIÇÕES AMBIENTAIS

A taxa fotossintética de um vegetal é resultado do aporte de água aos tecidos fotossintetizantes (GHANNOUM, 2009), teor de pigmentos fotossintéticos e seus protetores

(BHATTACHARYYA; JHA, 2012), nível de luminosidade incidente (BULEGON et al., 2017b), e no caso de plantas de metabolismo fotossintético C₄, facilidade de fornecimento de CO₂ ao sítio carboxilativo (LAWLOR; TEZARA, 2009; UBIERNA; SUN; COUSINS, 2011). Tendo em destaque, a luminosidade ambiental é ofertada aos vegetais diariamente, a água ganha importância na fotossíntese, visto que é recurso abundante, mas também o mais limitante a assimilação de carbono.

Em situações de déficit hídrico, usualmente relacionadas a momentos de elevada temperatura e incidência luminosa, há rápida perda de água pela transpiração e redução de turgor intracelular, conduzindo ao fechamento dos estômatos (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). Segundo os mesmos autores, esta resposta estomática é uma ação vegetal necessária para impedir maiores perdas de água, evitando grandes danos na atividade enzimática, respiração, permeabilidade de membranas, metabolismo lipídico e síntese de elementos (FILIPPOU et al., 2014). O fechamento estomático é a principal causa de redução na atividade fotossintética em situações de déficit hídrico devido à limitação estomática para a fotossíntese (MUMM et al., 2011) que conduz a baixos níveis de CO₂ na câmara subestomática e conseqüentemente no mesófilo.

Efeitos negativos nos vegetais oriundos de breves momentos de déficit hídrico podem ser prolongados além dos efeitos visuais, pois com a falta de turgor celular rapidamente há fechamento estomático (ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013). Porém com a recuperação da hidratação celular, não necessariamente a reabertura estomática se dará na mesma velocidade, visto que há efeito residual do acúmulo de ácido abscísico nas células guarda (SLAMA et al., 2015).

Quando o déficit hídrico é prolongado, há mais problemas que acometem a taxa fotossintética do vegetal. Quando há alta luminosidade, há elevada produção de energia (ATP) e poder redutor (NAD(P)H). Contudo, não há gasto energético e de elétrons para assimilação de CO₂ (devido à baixa disponibilidade do gás pelos estômatos fechados), o que significa que os carreadores ADP e NAD(P) estarão indisponíveis a receber energia e elétrons. A este evento nomeia-se como limitação não-estomática da fotossíntese (FOYER; NOCTOR, 2009).

Como na limitação não-estomática da fotossíntese a energia recebida pela luminosidade solar não tem para onde ser dissipada, visto que há pouco CO₂ para ser assimilado na câmara subestomática devido ao fechamento dos mesmos (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; MUMM et al., 2011; ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013), há sobrecarga energética sob o fotossistema II nas membranas dos tilacóides. Esses elétrons excedentes são então dissipados aos carotenóides ou capturados pelo oxigênio devido sua forte afinidade aos

elétrons, induzindo formação de espécies reativas de oxigênio (BARBOSA et al., 2014; DAS et al., 2011), danosas à proteína D1 do centro de reação do fotossistema II (ponto central do transporte eletrônico fotossintético), bem como outras estruturas, como membranas celulares (VASS; CSER, 2009).

Quando o vegetal chega ao ponto de gerar níveis elevados de espécies reativas de oxigênio pelo desequilíbrio dos recursos fotossintéticos, aumenta-se consideravelmente o risco de danos bioquímicos ao aparato celular (SANDHYA et al., 2010). Para contrapor o potencial de danos destes compostos, as plantas modulam suas rotas bioquímicas de enzimas antioxidantes, dentre elas as peroxidases (POX), catalase (CAT), polifenoloxidasas (PPO) e superóxido dismutase (SOD) (BARBOSA et al., 2014), essenciais à proteção vegetal (FUKAMI et al., 2017) visando atenuar a capacidade de dano a atividades do metabolismo primário, ou até extinguir as espécies reativas de oxigênio (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; VASS; CSER, 2009).

Por outro lado, para aliviar essas situações que comprometem a fotossíntese e outras atividades, os vegetais são forçados a otimizar o aproveitamento dos recursos ambientais, sendo fator decisivo de seleção para as plantas visto que irá compor sua produtividade. Para tanto, plantas que apresentam maior capacidade de transporte hidráulico e sistema vascular robusto estão mais propensas a atingirem altas produtividades (BOGHDADY; ALI, 2013; PEREYRA et al., 2012; ROMERO; VEGA; CORREA, 2014). Ainda como fonte de mitigação de estresses, as plantas interagem com vasta gama de microrganismos (NAVEED et al., 2014) visando manutenção e incremento de atividades metabólicas durante condições adversas (KAVAMURA et al., 2013) por variados mecanismos de ação.

2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

A definição de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), ou bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), engloba grupos de microrganismos de vida livre ou epifíticos com capacidade de estabelecimento de relações simbióticas, associativas ou não, com plantas (GLICK, 2012). Usualmente de colonização rizosférica, estes microrganismos promovem desenvolvimento vegetal através do sinergismo entre a produção e estímulo à síntese de hormônios vegetais (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014), solubilização de fosfatos inorgânicos (RODRIGUEZ; GONZALEZ; GOIRE, 2004), modulação de enzimas antioxidantes (BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016), anatomia vascular

(LARRABURU; LLORENTE, 2015) e atividade do óxido nítrico (DI PALMA et al., 2013), culminando em maior desenvolvimento radicular e melhor exploração de água e nutrientes (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; HUNGRIA et al., 2010).

Dentre a vasta gama de bactérias utilizadas mundialmente para promoção de crescimento vegetal, o gênero *Azospirillum* tem se destacado como o mais utilizado, principalmente na interação com gramíneas (FUKAMI et al., 2016; HOSSAIN et al., 2015; PEREYRA et al., 2012; SARANRAJ; SIVASAKTHIVELAN, 2013), e mais recentemente com fabáceas (ASKARY et al., 2009; BULEGON et al., 2017a).

2.2.1 Regulação de crescimento vegetal

2.2.1.1 Hormônios promotores de crescimento e indutores de resistência a déficit hídrico

Usualmente, a produção de fitohormônios por bactérias promotoras de crescimento vegetal é liderada pelas auxinas (MASCIARELLI et al., 2013). Contudo, também há contribuições pela produção de giberelinas (GLICK, 2012; PERRIG et al., 2007) e citocininas (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014). Em balanço adequado, estes três hormônios promovem o desenvolvimento vegetal (CATO et al., 2013) otimizando a divisão celular por meio das citocininas (WERNER; SCHMÜLLING, 2009), maior diferenciação celular (SORCE et al., 2013) e afrouxamento de paredes celulares (ROBERT; FRIML, 2009) pelas auxinas. Estas ações são complementadas pela atuação das giberelinas na redução do potencial osmótico e entrada de água para expansão celular, assim como atuam otimizando a expressão floral dos vegetais (DAVIERE; ACHARD, 2013).

Em relação a hormônios inibidores de crescimento, a literatura apresenta resultados contraditórios para modulação dos níveis de ácido abscísico por *Azospirillum*, com alguns trabalhos indicando aumentos em seus níveis endógenos (COHEN et al., 2009; COHEN; BOTTINI; PICCOLI, 2008; PERRIG et al., 2007), e outros indicando seu decréscimo nas plantas devido à utilização no metabolismo bacteriano (BELIMOV et al., 2014; CASSÁN et al., 2009a). Possivelmente estas inconsistências relacionam-se as condições ambientais que as plantas foram submetidas durante os ensaios.

2.2.1.2 Atividade da Enzima ACC-deaminase

Muito se aborda sobre a redução da atividade e teor de etileno nos tecidos vegetais promovida pela atividade da enzima ACC-deaminase. O aumento da concentração de auxinas desencadeado pelas bactérias estimulam a atividade da ACC-sintase, transformando S-adenosil-L-metionina (SAM) em ACC, que por sua vez é precursor do hormônio gasoso etileno, que acarreta inibição do crescimento (GLICK, 2014). Por sua vez, o *Azospirillum* estimula a atividade da ACC-deaminase para degradar o ACC e utilizar em seu próprio metabolismo como amônia, aminoácidos e α -cetobutirato, reduzindo os níveis de etileno na planta em que estiver associado (ESQUIVEL-COTE et al., 2010). Este evento bioquímico culmina com redução de processos relacionados à senescências dos tecidos vegetais que são efeitos fisiológicos atribuídos ao etileno (IQBAL et al., 2017).

2.2.1.1 Ácido salicílico

A capacidade de produção e excreção de ácido salicílico por bactérias do gênero *Azospirillum* (ALEN'KINA et al., 2014; ALEN'KINA; TRUTNEVA; NIKITINA, 2013) possivelmente baseia-se em mecanismo competitivo da bactéria, buscando estimular a planta para que evite o estabelecimento de demais bactérias ao sistema radicular, sejam elas benéficas ou fitopatogênicas (LEBEIS et al., 2015).

Este mecanismo, previamente citado, promovido por *Azospirillum* apresenta efeito colateral positivo, visto que o ácido salicílico é um composto hormonal sintetizado endogenamente (DEMPSEY et al., 2011) e que colabora na modulação do crescimento vegetal (RIVAS-SAN VICENTE; PLASENCIA, 2011), e principalmente, é estudado pela elevada capacidade de mediar indução de defesas naturais das plantas a patógenos (AN; MOU, 2011) e estresses abióticos (KHAN et al., 2015).

2.2.1.2 Poliaminas

A atividade de Poliaminas, estimulada por *Azospirillum*, mais especificamente na atividade da putrescina (ZAWOZNIK et al., 2011), espermidina, espermina (CASSÁN;

VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014; PERRIG et al., 2007) e cadaverina (CASSÁN et al., 2009b). Estes compostos são considerados reguladores de vegetais relacionados a respostas a estresses (LIU et al., 2015), desenvolvimento de pelos radiculares e captação de nutrientes (NAHAR et al., 2016; SAINI et al., 2013).

2.2.1.3 Óxido nítrico

Não obstante, *Azospirillum* ainda possui habilidade de excretar óxido nítrico. Primariamente, esta substância é produzida pela bactéria e destinada à atividade e expansão de biofilme bacteriano, necessário para colonização epifítica do sistema radicular dos vegetais (DI PALMA et al., 2013). Contudo, as plantas se beneficiam da excreção desta substância devido à atuação do óxido nítrico no estímulo às rotas bioquímicas produtoras de auxinas, estimulando a formação de raízes laterais (AMENTA et al., 2015) e pelos radiculares (CREUS et al., 2005; MOLINA-FAVERO et al., 2008). Ao mesmo tempo, o óxido nítrico apresenta atuação nos vegetais mediando respostas a estresses e aumentando a velocidade de reação vegetal a situações adversas (ALEN'KINA; NIKITINA, 2012).

2.2.2 Solubilização de fosfatos

Após o nitrogênio, o fósforo é o elemento que mais limita o desenvolvimento vegetal, devido à sua atuação junto ao metabolismo energético e sua importância no mecanismo genético das células. Deste modo, a capacidade de solubilização de fosfatos do gênero *Azospirillum* colabora para o desenvolvimento vegetal devido à maior disponibilização de fósforo (LIRA-CADETE et al., 2012; PEDRINHO et al., 2010), elemento com primordial importância no desenvolvimento do sistema radicular (POSTMA; DATHE; LYNCH, 2014).

Visto que grande gama de solos podem apresentar problemas de disponibilidade de fósforo, devido à sua ligação com íons de ferro e alumínio em solos ácidos, e com íons de cálcio em solos alcalinos (MOREIRA et al., 2010), e que usualmente a microbiota natural apresenta atividade baixa ou agronomicamente insatisfatória, a adição de microrganismos que incrementem a solubilização do fósforo imobilizado é ponto importante para estimular a promoção do crescimento vegetal (KHAN et al., 2009).

2.2.3 Produção de sideróforos

Dentre os micronutrientes, o ferro é forte limitante do desenvolvimento vegetal devido a sua atividade essencial no transporte de elétrons, principalmente no processo luminoso de geração de energia e poder redutor da fotossíntese, trabalhando como carreador de elétrons, e também na atividade da enzima nitrato redutase (KONISHI; YANAGISAWA, 2011). Em pH neutro, o ferro fica facilmente insolúvel, e a presença de sideróforos (agentes químicos quelantes de ferro) produzidos por bactérias promotoras de crescimento auxilia fortemente a absorção deste nutriente pelas plantas (SAHA et al., 2013).

A produção de ácido salicílico por *Azospirillum* (FUKAMI et al., 2017) também conduz à produção de sideróforos, controlando o acúmulo, mobilização e transporte de ferro (SAHA et al., 2013). Além de suas atividades quelantes junto ao ferro, os sideróforos produzidos pelo *Azospirillum* colaboram para a promoção de crescimento vegetal (PEDRAZA et al., 2010) e também apresentam atividade de biocontrole contra fungos fitopatogênicos (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011, 2012).

2.2.4 Tolerância a estresses bióticos e condições ambientais adversas

Períodos de restrição hídrica são considerados o principal fator de estresse abiótico aos vegetais, responsável por significativas perdas de produtividade (SHAO et al., 2009), inclusive na cultura do milho (AHMAD et al., 2016). Nestas condições, a excreção e aumento dos níveis endógenos de ácido abscísico nos vegetais mediados por *Azospirillum* (COHEN et al., 2009; COHEN; BOTTINI; PICCOLI, 2008; PERRIG et al., 2007) acelera respostas de controle de transpiração via movimento estomático (TARDIEU; PARENT; SIMONNEAU, 2010), reduzindo as perdas de água.

Além do controle transpiratório promovido pelo ácido abscísico, o mesmo composto hormonal promove a redução do crescimento da parte aérea pela inativação de ATPases (TARDIEU; PARENT; SIMONNEAU, 2010). Aliado a este evento e na presença de *Azospirillum*, a atividade de auxinas, citocininas e cadaverina são incrementadas além dos níveis naturalmente endógenos (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014) nas raízes, estimulando o crescimento do sistema radicular (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; WERNER; SCHMÜLLING, 2009) e desenvolvimento de pêlos absorventes (CASSÁN et al., 2009b;

FERREIRA; KNUPP; MARTIN-DIDONET, 2014; OVERVOORDE; FUKAKI; BEECKMAN, 2010; SAINI et al., 2013), possibilitando maior exploração do solo para captação de recursos hídricos e minerais (HUNGRIA et al., 2010).

A maior absorção e controle transpiratório de água promovida pelo complexo de atividades de promoção de crescimento do *Azospirillum* é complementada pelas modificações anatômicas mediadas pela bactéria (LARRABURU; LLORENTE, 2015). Este gênero de bactérias promove aumento do número e diâmetro de vasos condutores (LARRABURU; APÓSTOLO; LLORENTE, 2010; LARRABURU; BUSUSCOVICH; LLORENTE, 2016; LARRABURU; LLORENTE, 2015), sendo importante fator para maior condutividade hidráulica no vegetal e suporte em condições hídricas desfavoráveis (PEREYRA et al., 2012; ROMERO; VEGA; CORREA, 2014).

Ainda assim, situações de estresse usualmente aceleram processos de senescência vegetal, onde em condições mais extremas ou em final de ciclo das culturas, o *Azospirillum* atua através do mecanismo da enzima ACC-deaminase (ESQUIVEL-COTE et al., 2010) e aumento de pigmentos fotossintetizantes e protetores (BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016; CURÁ et al., 2017; DEL AMOR; PORRAS, 2009; FASCIGLIONE et al., 2015), possibilitando prolongamento da atividade fotossintética e maior tempo para redistribuição das reservas em degradação (GLICK, 2014) para outros órgãos em desenvolvimento.

2.2.5 Mecanismos de ação complementares

A interação de bactérias promotoras de crescimento vegetal com fitopatógenos varia de acordo com o patossistema. A maior proteção dos vegetais pode ocorrer de forma direta – área com forte crescimento de interesse pela pesquisa (GLICK, 2014) – pela ação de sideróforos, quitinases, amônia e cianidas (MAZHAR et al., 2016) produzidos por *Azospirillum* em vários patossistemas (SANKARI; DINAKAR; SEKAR, 2011; TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2012), ou de forma indireta via excreção de ácido salicílico (ALEN’KINA et al., 2014; ALEN’KINA; TRUTNEVA; NIKITINA, 2013) para mediar respostas visando facilitar a colonização e estabelecimento de *Azospirillum* no sistema radicular dos vegetais e reduzir a competição com outros microrganismos (LEBEIS et al., 2015).

2.3 PULVERIZAÇÃO FOLIAR DE *Azospirillum* EM PLANTAS

Bactérias promotoras de crescimento vegetal são inoculadas usualmente via semente ou no sistema radicular. Mas recentemente, principalmente as BPCV que apresentam resultados promissores nas produtividades agrícolas, vem sendo submetidas a testes visando nova forma de aplicação via pulverizações foliares (ESITKEN et al., 2010; OLIVARES et al., 2015; XU et al., 2016).

Visto o volume de produtos adicionados atualmente via semente em grandes culturas, como fungicidas, inseticidas e bioestimulantes, bactérias inoculadas conjuntamente a estes compostos sofrem com a exposição aos mesmos, sendo estes, nocivos à sua sobrevivência e estabelecimento junto à semente ou radículas (BATTISTUS et al., 2014; FERNANDES et al., 2012), variando a toxicidade conforme a interação bactéria/composto químico (LUDWIG et al., 2018). Ao mesmo tempo, a adição de inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento vegetal ao tratamento de sementes pode extrapolar o volume de calda adequado por quilo de sementes, afetando o desempenho germinativo e estabelecimento da cultura a campo (SANTOS et al., 2018).

O gênero *Azospirillum*, mais especificamente representado por *A. brasilense*, apresenta capacidade de colonização de tecidos foliares de grandes culturas, como o milho (FUKAMI et al., 2016), quando aplicado via pulverização foliar em estádios vegetativos da cultura. Mesmo considerada uma bactéria de rizosfera, e não adicionado diretamente ao sistema radicular, a pulverização de *A. brasilense* é relatada na literatura atuando em várias culturas, promovendo efeitos no aumento do teor de pigmentos relacionados à fotossíntese (BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016), incrementos na taxa fotossintéticas (BULEGON et al., 2017b), crescimento de plantas (FUKAMI et al., 2017), componentes da produção (ZUFFO et al., 2017), produtividade (CLEMENTE et al., 2016; COSTA et al., 2015) e aumento de qualidade nutricional (AHMADI-RAD et al., 2016).

Exposto os principais empecilhos à adição de bactérias promotoras de crescimento vegetal via tratamento de sementes nas grandes culturas, é importante que se busque e elucide formas alternativas, como a pulverização foliar, para manter e ampliar o posicionamento de tecnologias sustentáveis que possam ser adicionadas aos sistemas produtivos (SARANRAJ; SIVASAKTHIVELAN, 2013), almejando atingir os patamares de produtividades superiores demandados para os próximos anos à agricultura mundial.

2.4 REFERÊNCIAS

- AHMAD, N. et al. Drought stress in maize causes differential acclimation responses of glutathione and sulfur metabolism in leaves and roots. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 247, 2016.
- AHMADI-RAD, S. et al. Foliar application of nitrogen fixing bacteria increases growth and yield of canola grown under different nitrogen regimes. **Rhizosphere**, v. 2, p. 34–37, 2016.
- ALEN'KINA, S. A. et al. Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial–plant root interactions. **Plant and Soil**, v. 381, n. 1–2, p. 337–349, 10 2014.
- ALEN'KINA, S. A. ; NIKITINA, V. E. *Azospirillum* lectin-induced changes in nitric oxide content in wheat seedling roots. **Russian Agricultural Sciences**, v. 37, n. 6, p. 462–464, 2012.
- ALEN'KINA, S. A. ; TRUTNEVA, K. A. ; NIKITINA, V. E. Change in the content of salicylic acid and activities of phenylalanine ammonia-lyase and catalase in wheat seedling roots under the influence of *Azospirillum* lectins. **Biology Bulletin**, v. 40, n. 6, p. 567–570, 2013.
- ALI, Z. et al. Mitigation of drought stress in maize by natural and synthetic growth promoters. **Journal of Agriculture and Social Sciences**, v. 7, n. 2, p. 56–62, 2011.
- AMENTA, M. et al. Nitric Oxide in *Azospirillum* and Related Bacteria: Production and Effects. In: CASSÁN, F. D.; OKON, Y.; CREUS, C. M. (Eds.). **Handbook for *Azospirillum***. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 155–180
- AN, C. ; MOU, Z. Salicylic acid and its function in plant immunity F. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, n. 6, p. 412–428, 2011.
- ANJUM, S. ; XIE, X. ; WANG, L. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 9, p. 2026–2032, 2011.
- ASKARY, M. et al. Influence of the co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2, 4-D on grain yield and N, P, K content of *Triticum aestivum* (Cv . Baccros and Mahdavi). **American-Eurasian Journal Agricultural & Environmental Science**, v. 5, n. 3, p. 296–307, 2009.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.
- BATTISTUS, A. G. et al. Synergistic action of *Azospirillum brasilense* combined with thiamethoxam on the physiological quality of maize seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 49, p. 4501–4507, 2014.
- BELIMOV, A. A. et al. Abscisic acid metabolizing rhizobacteria decrease ABA concentrations in planta and alter plant growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, p. 84–91, 2014.

- BHATTACHARYYA, P. N. ; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.
- BOGHDADY, M. S. ; ALI, A. S. Comparison between effect of *Azospirillum brasilense* and *Anabaena oryzae* on growth, yield and anatomical characters of wheat plants. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 1, p. 627–637, 2013.
- BULEGON, L. G. et al. 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, 2017a.
- BULEGON, L. G. et al. Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and rehydration conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1283–1289, 2017b.
- 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.
- CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28–35, 2009a.
- CASSÁN, F. et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 12–19, 2009b.
- CASSÁN, F. ; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.
- CASSÁN, F. ; VANDERLEYDEN, J. ; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPB) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440–459, 2014.
- CATO, S. C. et al. Sinergism among auxins, gibberellins and cytokinins in tomato cv. Micro-Tom. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 549–553, 2013.
- CHAVES, M. M. ; FLEXAS, J. ; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009.
- CLEMENTE, J. M. et al. *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization affecting wheat productivity. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 24, p. 2179–2184, 2016.
- COHEN, A. C. et al. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. **Botany**, v. 87, n. 5, p. 455–462, 2009.

- COHEN, A. C. ; BOTTINI, R. ; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, v. 54, n. 2, p. 97–103, 2008.
- COSTA, R. R. G. F. et al. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 3, p. 304–311, 2015.
- CREUS, C. M. et al. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, v. 221, n. 2, p. 297–303, 2005.
- CURÁ, A. et al. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 41, 2017.
- DAS, P. K. et al. Photosynthesis-dependent anthocyanin pigmentation in Arabidopsis. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 1, p. 23–25, 2011.
- DAVIERE, J. -M. ; ACHARD, P. Gibberellin signaling in plants. **Development**, v. 140, n. 6, p. 1147–1151, 2013.
- DEL AMOR, F. M. ; PORRAS, I. Effects of plant-growth-promoting bacteria on growth and yield of pepper under limited nitrogen supply. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 89, n. 2, p. 349–358, 2009.
- DEMPSEY, D. A. et al. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. **The Arabidopsis Book**, v. 9, p. e0156, 2011.
- DI PALMA, A. A. et al. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 338, n. 1, p. 77–85, 2013.
- ESITKEN, A. et al. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 1, p. 62–66, 2010.
- ESQUIVEL-COTE, R. et al. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1–2, p. 65–75, 2010.
- FASCIGLIONE, G. et al. *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 154–162, 2015.
- FERNANDES, M. F. et al. Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. **Revista de Ciências Agrárias - Amazon Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 55, n. 4, p. 318–326, 2012.
- FERREIRA, E. P. DE B. ; KNUPP, A. M. ; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 655–665, 2014.

FILIPPOU, P. et al. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 1–10, 2014.

FISCHER, R. A. Definitions and determination of crop yield, yield gaps, and of rates of change. **Field Crops Research**, v. 182, p. 9–18, 2015.

FOYER, C. H. ; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 861–905, 2009.

FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016.

FUKAMI, J. et al. 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.

GHANNOUM, O. C₄ photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 635–644, 2009.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963401, 2012.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.

GODFRAY, H. C. J. et al. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, n. 2, p. 812–818, 2010.

HOSSAIN, M. et al. Effects of *Azospirillum* isolates from paddy fields on the growth of rice plants. **Research in Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 15–22, 2015.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1–2, p. 413–425, 2010.

IQBAL, N. et al. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. **Frontiers in plant science**, v. 8, n. April, p. 475, 2017.

KASIM, W. A. et al. Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 1, p. 122–130, 2013.

KAVAMURA, V. N. et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183–191, 2013.

KHAN, A. A. et al. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 48–58, 2009.

KHAN, M. I. R. et al. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. June, p. 1–17, 2015.

- KONISHI, M. ; YANAGISAWA, S. The regulatory region controlling the nitrate-responsive expression of a nitrate reductase gene, *nia1*, in *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 5, p. 824–836, 2011.
- LARRABURU, E. E. ; APÓSTOLO, N. M. ; LLORENTE, B. E. Anatomy and morphology of photinia (*Photinia fraseri* Dress) in vitro plants inoculated with rhizobacteria. **Trees**, v. 24, n. 4, p. 635–642, 2010.
- LARRABURU, E. E. ; BUSUSCOVICH, A. C. ; LLORENTE, B. E. *Azospirillum brasilense* improves in vitro and ex vitro rooting-acclimatization of jojoba. **Scientia Horticulturae**, v. 209, p. 139–147, 2016.
- LARRABURU, E. E. ; LLORENTE, B. E. Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in in vitro rooting of pink lapacho. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, n. 1, p. 175–184, 2015.
- LAWLOR, D. W. ; TEZARA, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 561–579, 2009.
- LEBEIS, S. L. et al. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. **Science**, v. 349, n. 6250, p. 860–864, 2015.
- LIRA-CADETE, L. et al. Genetic variability of sugarcane-associated diazotrophic bacteria capable of inorganic phosphate solubilizing. **Bioscience Journal**, v. 28, n. Supplement, p. 122–129, 2012.
- LIU, J. -H. et al. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. October, p. 1–10, 2015.
- LUDWIG, R. L. et al. Action specificity of chemical treatment and inoculation with *Azospirillum brasilense* in wheat seed on the crop initial growth. **Revista Ceres**, v. 65, n. 5, p. 407–414, 2018.
- MASCIARELLI, O. et al. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590–597, 2013.
- MAZHAR, R. et al. Biocontrol and salinity tolerance potential of *Azospirillum lipoferum* and its inoculation effect in wheat crop. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 18, n. 03, p. 494–500, 2016.
- MOLINA-FAVERO, C. et al. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* sp245 and its influence on root architecture in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 7, p. 1001–1009, 2008.
- MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientias**, v. 1, n. 2, p. 74–99, 2010.
- MUMM, P. et al. Cell type-specific regulation of ion channels within the maize stomatal complex. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 8, p. 1365–1375, 2011.

NAHAR, K. et al. Polyamines confer salt tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) by reducing sodium uptake, improving nutrient homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification systems. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. July, p. 1–14, 2016.

NAVEED, M. et al. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 30–39, 2014.

OLIVARES, F. L. et al. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. **Scientia Horticulturae**, v. 183, n. 1, p. 100–108, 2015.

OVERVOORDE, P. ; FUKAKI, H. ; BEECKMAN, T. Auxin control of root development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 6, p. 1–16, 2010.

PEDRAZA, R. O. et al. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 265–272, 2010.

PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 905–911, 2010.

PEREYRA, M. A. et al. A better water status in wheat seedlings induced by *Azospirillum* under osmotic stress is related to morphological changes in xylem vessels of the coleoptile. **Applied Soil Ecology**, v. 53, n. 1, p. 94–97, 2012.

PERRIG, D. et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143–1150, 2007.

POSTMA, J. A.; DATHE, A.; LYNCH, J. P. The optimal lateral root branching density for maize depends on nitrogen and phosphorus availability. **Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 590–602, 2014.

RIVAS-SAN VICENTE, M. ; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3321–3338, 2011.

ROBERT, H. S. ; FRIML, J. Auxin and other signals on the move in plants. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 325–332, 2009.

RODRIGUEZ, H. ; GONZALEZ, T. ; GOIRE, I. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552–555, 2004.

ROMERO, A. M. ; VEGA, D. ; CORREA, O. S. *Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 82, n. June, p. 38–43, 2014.

SAHA, R. et al. Microbial siderophores: a mini review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303–317, 2013.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 6, p. 741–757, 2013.

- SANDHYA, V. et al. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. **Plant Growth Regulation**, v. 62, n. 1, p. 21–30, 2010.
- SANKARI, J. U. ; DINAKAR, S. ; SEKAR, C. Dual effect of *Azospirillum* exopolysaccharides (EPS) on the enhancement of plant growth and biocontrol of blast (*Pyricularia oryzae*) disease in upland rice (var . ASD-19). **Journal of Phytology**, v. 3, n. 10, p. 16–19, 2011.
- SANTOS, S. F. DOS et al. Composition and volumes of slurry in soybean seeds treatment in the industry and physiological quality during storage. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 1, p. 67–74, 2018.
- SARANRAJ, P. ; SIVASAKTHIVELAN, P. *Azospirillum* and its formulations: a review. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 3, p. 275–287, 2013.
- SHAO, H. -B. et al. Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants – biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment in arid regions of the globe. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 131–151, 2009.
- SLAMA, I. et al. Water deficit stress applied only or combined with salinity affects physiological parameters and antioxidant capacity in *Sesuvium portulacastrum*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 213, p. 69–76, 2015.
- SORCE, C. et al. Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 6, p. 885–898, 2013.
- TAKEDA, S. ; MATSUOKA, M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 444–457, 2008.
- TARDIEU, F. ; PARENT, B. ; SIMONNEAU, T. Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non-hydraulic processes? **Plant, Cell & Environment**, v. 33, n. 4, p. 636–47, 2010.
- TORTORA, M. L. ; DÍAZ-RICCI, J. C. ; PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275–286, 2011.
- TORTORA, M. L. ; DÍAZ-RICCI, J. C. ; PEDRAZA, R. O. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 279–290, 2012.
- UBIERNA, N. ; SUN, W. ; COUSINS, A. B. The efficiency of C₄ photosynthesis under low light conditions: assumptions and calculations with CO₂ isotope discrimination. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 9, p. 3119–3134, 2011.
- VASS, I. ; CSER, K. Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 4, p. 200–205, 2009.
- WERNER, T. ; SCHMÜLLING, T. Cytokinin action in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 5, p. 527–538, 2009.

XU, J. et al. The foliar spray of *Rhodopseudomonas palustris* grown under Stevia residue extract promotes plant growth via changing soil microbial community. **Journal of Soils and Sediments**, v. 16, n. 3, p. 916–923, 2016.

ZAWOZNIK, M. S. et al. Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1389–1397, 2011.

ZHOU, Y. ; LAMBRIDES, C. J. ; FUKAI, S. Drought resistance of bermudagrass (*Cynodon* spp.) ecotypes collected from different climatic zones. **Environmental and Experimental Botany**, v. 85, n. 1, p. 22–29, 2013.

ZUFFO, A. M. et al. Path analysis in soybean cultivars grown under foliar spraying and furrow inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 10, p. 137, 2017.

3 CAPÍTULO 2: MODULAÇÕES NA ANATOMIA VASCULAR E ESTRUTURAL DE RAÍZES E FOLHAS DE MILHO MEDIADAS POR *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*: RECURSO EM CONDIÇÕES ADVERSAS

Resumo: Adaptações vegetais, estruturais e bioquímicas, são necessárias para que as plantas enfrentem condições ambientais adversas. Deste modo, buscou-se avaliar alterações anatômicas e estruturais, em raízes e folhas de milho, induzidas pela utilização de *Azospirillum brasilense* inoculado via semente e/ou pulverização foliar. Amostras de raízes e folhas foram coletadas para fixação e confecção de micrografias, determinando características inerentes aos tecidos condutores e estômatos, deposição de lignina e atividade da fenilalanina amônia liase. A utilização de *A. brasilense* reduziu espessura da parede, elevou o número e diâmetro interno de vasos do metaxilema radicular. Os vasos do protoxilema tiveram capacidade de transporte impulsionada pelo aumento de área, ao passo que o floema apresentou número, diâmetro e área de vasos aumentada. Na nervura foliar secundária, o número de vasos do metaxilema foi reduzido pelas inoculações via semente, e os vasos do protoxilema elevados pela combinação de *A. brasilense* via semente + pulverização foliar. O número de vasos do floema elevou-se assim como na raiz, favorecendo transporte de fotoassimilados, forçando o aumento da bainha clorofilada. Na nervura terciária, a área ocupada pelos vasos condutores ampliou em relação à bainha clorofilada. A espessura da epiderme adaxial, limbo foliar e número de estômatos na face abaxial e totais elevaram-se. O teor de lignina radicular foi reduzido pelas inoculações via semente, porém estimulado nas folhas pela combinação das aplicações. Alterações anatômicas promovidas por *A. brasilense* apontam maior capacidade de translocação de solutos no vegetal, em detrimento da lignificação radicular e aumento de deposição de lignina nas folhas, confirmando o potencial do *A. brasilense* na indução de importantes respostas vegetais por diversos mecanismos para aclimatação a condições ambientais adversas à produção.

Palavras-chave: Condutividade hidráulica; Lignificação; Bactérias promotoras de crescimento vegetal.

3.1 INTRODUÇÃO

A agricultura tem pela frente o desafio de otimizar a capacidade produtiva para continuar provendo alimentos à crescente população mundial. Esta população que cada vez mais busca por produtos advindos de sistemas de produção que apresentam maior sustentabilidade. Neste sentido, a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) tem-se destacado no cenário agrícola mundial, principalmente no caso do gênero *Azospirillum* em gramíneas (EL-LATTIEF, 2016; SARANRAJ; SIVASAKTHIVELAN, 2013).

A interação com o gênero *Azospirillum* possibilita as plantas maior aporte de água e nutrientes (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; PEDRAZA, 2008) devido aos seus amplos e diversificados mecanismos de ação, como a produção e excreção de hormônios (ESQUIVEL-COTE et al., 2010; MASCIARELLI et al., 2013) e poliaminas (CASSÁN et al., 2009b), regulação de rotas bioquímicas, afetando a atividade de ACC-deaminase (ESQUIVEL-COTE et al., 2010) e óxido nítrico (ALEN'KINA; NIKITINA, 2012), solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ; GONZALEZ; GOIRE, 2004) e fixação de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2010). Este complexo de estímulos induz o desenvolvimento vegetal (BATTISTUS et al., 2014; BULEGON et al., 2017b; GUIMARÃES et al., 2014) e promove incrementos na produtividade (ASKARY et al., 2009; HOSSAIN et al., 2015; QUADROS et al., 2014).

Além da habilidade de habitar o sistema radicular, há relatos de que o *Azospirillum* spp. possui capacidade de colonizar o filoplano (FUKAMI et al., 2017), abrindo possibilidade de evitar que estas bactérias sejam aplicadas junto a demais pesticidas nas sementes que ocasionam mortalidade (FUKAMI et al., 2016), e promovendo maior estruturação de mecanismos de resistência contra estresses bióticos e abióticos (CASSÁN et al., 2009b; FUKAMI et al., 2017; TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2012).

Com relação a estresses abióticos, em condições de intenso déficit de pressão de vapor atmosférico, as plantas tendem a apresentar sintomas de murcha devido à capacidade de absorção radicular de água ser superada pela taxa transpiratória da parte aérea (LEITNER et al., 2014), principalmente nos horários mais quentes e de maior radiação incidente ao longo do dia. Nestes momentos se torna imprescindível à planta apresentar características que estimulem maior condutividade hidráulica, acelerando o transporte de água no vegetal, reportado como

um dos efeitos induzidos por *A. brasilense* (BOGHDADY; ALI, 2013; PEREYRA et al., 2012; ROMERO; VEGA; CORREA, 2014).

Deste modo, além de modificações bioquímicas (BULEGON et al., 2017a) e fisiológicas (BULEGON et al., 2017a), a suplementação auxínica promovida por *Azospirillum* spp. apresenta potencial sistêmico de modular alterações anatômicas nos vegetais (CASSÁN et al., 2009a), seja no sistema radicular (LARRABURU; BUSUSCOVICH; LLORENTE, 2016; LARRABURU; LLORENTE, 2015) ou na parte aérea (BOGHDADY; ALI, 2013; EL-AFRY et al., 2012), independente se utilizado via semente ou pulverização foliar (EL-AFRY et al., 2012). Ao mesmo tempo, respostas estomáticas mais rápidas são demandadas para reduzir a perda de água (DRAKE; FROEND; FRANKS, 2013).

Por outro lado, sabe-se que induções eliciadas por agentes externos, com as descritas anteriormente por *Azospirillum* spp., demandam reorganização metabólica por parte das plantas em detrimento de outras atividades bioquímicas, principalmente as de alto valor energético, como a deposição de lignina (SABIR et al., 2012), importante mecanismo relacionado à sustentação vegetal, defesa antimicrobiana e atividade de enzimas envolvidas em sua rota de produção (THOMAS et al., 2010).

Hipotetiza-se, portanto, que a utilização de *Azospirillum* spp. gera alterações anatômicas que podem aumentar a eficiência produtiva de culturas, como o milho, devido ao aumento da capacidade de condutividade hidráulica e controle de perda de água, com ou sem custos em outros tecidos e estruturas do vegetal.

Visto o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense*, estirpes AbV5+AbV6, via semente ou pulverização foliar, quanto a alterações anatômicas e deposição de lignina no sistema radicular e folhas da cultura.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Tratamentos e delineamento experimental

Estudou-se o comportamento de plantas de milho submetidas a três formas de aplicação de *A. brasilense* (corrig. Tarrand et al.) em relação a características anatômicas e deposição de lignina na raiz e folhas de milho, compreendendo os tratamentos: 1. controle; 2. inoculação via semente de *A. brasilense* (100 mL/60.000 sementes); 3. pulverização foliar de

A. brasilense (300 mL ha⁻¹) ao estágio V₄; e 4. inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense* nas dosagens e estádios anteriormente citados. O ensaio foi conduzido em blocos casualizados composto por cinco repetições, com duas plantas por repetição.

3.2.2 Material vegetal e condução experimental

Plantas de milho do híbrido Pioneer 30F53 Leptra[®] RR2[™] foram conduzidas a pleno sol em vasos de 25 litros (29 cm x 37 cm x 29 cm; AxDxd) preenchidos com substrato a base de horizonte A+B de LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef) (SANTOS, 2018).

Previamente à semeadura o substrato foi homogeneizado com 50 mg dm⁻³ de N (ureia), 300 mg dm⁻³ de P₂O₅ (superfosfato triplo) e 150 mg dm⁻³ de K₂O (cloreto de potássio) (NOVAIS; NEVES; BARROS, 1991). Ainda segundo a mesma recomendação, foi realizado aporte de 50 mg dm⁻³ de N (ureia) no estágio V₃ da cultura. Baseado na saturação de bases apresentada (V% de 62,68), não foi necessário calagem.

3.2.3 Preparação e fixação das amostras

As amostras foram coletadas no estágio V₁₂, sendo a amostra da folha provinda do terço médio da folha indicativa do estágio V₁₀, e das raízes nodais das plantas de milho.

Inicialmente as amostras foram lavadas em água destilada e acondicionadas durante 72 horas em solução fixadora FAA (proporção 1:1:18 de formol/ácido acético glacial/álcool etílico 50%). Após este período, as amostras foram transferidas para solução de álcool etílico 70% para armazenamento em geladeira a ±4 °C.

3.2.4 Cortes histológicos

As amostras foram retiradas do álcool etílico 70% e transferidas para água destilada e deionizada. Os cortes foram realizados manualmente com lâmina de bisturi e auxílio de microscópio estereoscópio. Após, os mesmos foram imersos em solução corante de azul de toluidina (0,05 %) + água destilada durante um minuto, transferidos para álcool etílico 50% por

mais um minuto para retirada do excesso de corante aderido à amostra, e por fim, imerso em água destilada por mais um minuto para retirada de resíduos de álcool.

As amostras foram transferidas para lâminas de microscopia, onde foram depositadas sobre solução de glicerina a 50%, cobertas por lamínula e vedadas nas laterais por esmalte transparente.

3.2.4.1 Número de estômatos

Em região próxima a amostra coletada para a análise histológica, secções foliares do terço médio da folha indicativa do estágio V₁₀ foram destacadas, e suas partes abaxial e adaxial levemente pressionadas em lâminas de microscopia contendo gotas de adesivo instantâneo transparente. Após alguns segundos, as amostras foliares foram retiradas, deixando marcado a superfície de seus estômatos.

3.2.4.2 Obtenção das imagens e mensurações

O laminário foi analisado em microscópio trilocular de luz, e as fotomicrografias obtidas com câmera fotográfica Tucsen ISH500, utilizando software ISCapture versão 4. 1. 3. Foram obtidas 5 micrografias distintas para cada parcela, e cada variável foi mensurada em 5 locais distintos em cada micrografia, gerando um valor médio para cada micrografia.

As amostras de raiz foram quantificadas quanto ao diâmetro da raiz, espessura da estria de caspary, diâmetro do cilindro central, espessura da parede do metaxilema, número de vasos do metaxilema, diâmetro de vasos do metaxilema, número de vasos do protoxilema, diâmetro de vasos do protoxilema, número de vasos do floema e diâmetro de vasos do floema.

Baseado nestas mensurações estimou-se a área da seção transversal da raiz, área da seção transversal do cilindro central, área da seção transversal do metaxilema, área da seção transversal do protoxilema e área da seção transversal do floema, assim como as relações área do cilindro central/área da raiz, área do metaxilema/área da raiz, área do metaxilema/área do cilindro central, área do protoxilema/área da raiz, área do protoxilema/área do cilindro central, área do floema/área da raiz, área do floema/área do cilindro central, área do floema/área do metaxilema, área do floema/área do protoxilema, área do floema/xilema.

Nas amostras foliares foram mensuradas na nervura secundária o diâmetro da bainha clorofilada, número de vasos do metaxilema, número de vasos do protoxilema, número de vasos do floema, diâmetro de vasos do metaxilema, diâmetro do feixe de vasos do floema e espessura das fibras da bainha. Na nervura terciária quantificou-se o diâmetro da bainha clorofilada, diâmetro do feixe de vasos condutores e relação área da seção transversal do feixe de vasos condutores/área da bainha clorofilada. A espessura da epiderme abaxial e adaxial, assim como a espessura média do limbo foliar também foram quantificadas.

Os estômatos foram quantificados quanto ao número na face abaxial e adaxial da folha, estimando o número total de estômatos por mm^2 e a relação de estômatos face abaxial/estômatos face adaxial.

3.2.5 Teor de lignina

Parte das amostras excedentes coletadas para as análises anatômicas foram pesadas em balança analítica de precisão em porções de aproximadamente 0,3 g e previamente trituradas em nitrogênio líquido. Seguindo protocolo de extração de lignina (BARBER; RIDE, 1988), posteriormente à trituração, homogeneizou-se a amostra em 1,5 mL de metanol 80%, sendo acondicionado em tubo para centrífuga de 2 mL para agitação em agitador rotativo durante 15 horas em *overnight*. Este extrato metanólico foi centrifugado a 12.000g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1,5 mL de água ao resíduo para ressuspensão, e submetido a nova centrifugação a 12.000g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente e o resíduo submetido a secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C durante 24 horas.

Após a secagem, 20 mg foram pesadas em balança analítica de precisão e adicionado ao resíduo 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico + HCl 2M (proporção 1:10). Posteriormente agitados para homogeneização e submetidos a banho maria a 100 °C durante 4 horas. Após aquecimento, os tubos foram colocados em gelo para rápido resfriamento e centrifugados a 12.000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado em 1,5 mL de água destilada e centrifugado a 10.000g durante 10 minutos.

Descartado o sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL em NaOH 0,5 M para agitação durante 15 horas em agitador rotativo. Nova centrifugação a 10.000g durante 10 minutos, sendo o sobrenadante transferido para novo tubo de centrífuga e adicionado 200 μL e HCl concentrado, mantendo em geladeira (± 4 °C) por 4 horas para precipitação da lignina ligada

ao ácido tioglicólico. Em seguida, centrifugou-se novamente a 10.000g durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 2 mL de NaOH 0,5 M. Desta solução, 100 µL foram adicionado a 2,9 mL de NaOH 0,5 M para leitura em espectrofotômetro a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina construída com base em lignina alcalina, 2-hidroxiopropil éter, (RODRIGUES et al., 2005) sendo expresso em mg de lignina por grama de tecido seco.

3.2.6 Atividade fenilalanina amônia-liase (FAL; EC 4. 3. 1. 5)

Em região próxima a amostra coletada para a análise histológica, amostras de tecido do limbo foliar sem presença de lesões foram coletadas, excluindo-se a nervura central e pesadas em massa fresca aproximada de 0,5 gramas. Imediatamente acondicionou-se em gelo para transporte até ultrafreezer (-80 °C), onde ficaram armazenadas até o momento da obtenção do extrato proteico.

As amostras dos tecidos foram trituradas em nitrogênio líquido, e posteriormente homogeneizadas em 5mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo 0,1 mM EDTA e 1% (p/p) de PVP (polivinilpirrolidona). Este macerado foi submetido a centrifugação a 4.000g durante 20 minutos em temperatura constante de 4 °C. O sobrenadante referente ao extrato enzimático foi recolhido com pipeta e transferido para microtubos, sendo armazenados em ultrafreezer a -80 °C, para ser utilizado posteriormente na determinação do conteúdo protéico e atividade enzimática de fenilalanina amonia liase (BRADFORD, 1976; UMESHA, 2006).

A quantificação de proteínas totais foi realizada em triplicata utilizando 30 µL de extrato enzimático, 2.250 µL de tampão fosfato 0, 01 M (pH 6, 0) e 600 µL do reagente de Bradford, homogeneizados em agitador de tubos, e submetido a leitura após cinco minutos de reação à 595 nm de absorbância em espectrofotômetro (BRADFORD, 1976). Os valores de absorbância foram plotados em curva padrão de concentrações de albumina de soro bovino (ASB) e a concentração de proteínas expressa em mg de proteína g⁻¹ matéria fresca.

Atividade de fenilalanina amônia-liase foi quantificada segundo colorimetria do ácido trans-cinâmico liberado do substrato da enzima (UMESHA, 2006). Para a reação foram adicionados à tubos de ensaio 100 µL de extrato proteico, 450 µL de tampão Tris-HCl (pH 8,8) e 450 µL de L-fenilalanina diluída sob tampão Tris-HCl até concentração de 0,05 M da mesma, mantidos à 40 °C (2h). A reação foi paralisada pela adição de 60µL de HCl (5M). O branco

utilizando para zerar o espectro constituiu de uma mistura de 450 μL de tampão enriquecido com L-fenilalanina e 450 μL de tampão puro. Para cada amostra foi preparado um controle utilizando 100 μL de extrato proteico e 900 μL de tampão Tris-HCl. A leitura das amostras foi realizada a 290 nm de absorvância em espectrofotômetro. A atividade da FAL foi determinada segundo diferença de leitura entre a amostra e o controle. Os valores resultantes foram aplicados a curva padrão de ácido *trans*-cinâmico (RODRIGUES et al., 2005) e os resultados expressos em μg de ácido *trans*-cinâmico $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína.

3.2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-wilk a 5% de probabilidade de erro. Na presença de normalidade dos erros, os dados passaram por análise de variância a 5% de probabilidade de erro pelo teste F de Fisher, e em caso positivo, submetidos a teste de médias de Dunnett a 5% de probabilidade de erro visando comparar os tratamentos com *A. brasilense* ao tratamento controle.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Anatomia radicular

Não foram verificadas diferenças entre tratamentos para as variáveis diâmetro da raiz (p -valor 0,8670), área da raiz (p -valor 0,8593), diâmetro do cilindro central (p -valor 0,3041), área do cilindro central (p -valor 0,1816), relação área do cilindro/área da raiz (p -valor 0,6238) e espessura média da estria de caspary (p -valor 0,9857). Devido ao elevado p -valor da variável diâmetro de raiz e aceitável coeficiente de variação (10,64%), procedeu-se as demais mensurações assumindo adequado padrão de coleta das amostras radiculares, sendo as mesmas de tamanho estatisticamente semelhante (média diâmetro radicular de 849,1378 μm e erro padrão de 8,8816 μm).

Os tratamentos com *A. brasilense*, de formar geral, resultaram em aumento da espessura da parede dos vasos do metaxilema radicular (Figura 1A), ao passo que somente as aplicações via semente (inoculação via semente e inoculação via semente + pulverização foliar)

elevaram o número de vasos do metaxilema da raiz (Figura 1B, Figura 4). Contudo, apesar da pulverização foliar de *A. brasilense* não ter modificado o número de vasos do metaxilema, promoveu o aumento de seu diâmetro interno (Figura 1C), o que também proporcionou maior área de seção do metaxilema (Figura 1D) quando multiplicado o diâmetro médio pelo número de vasos.

Elucidando mais claramente as modulações promovidas pelo *A. brasilense* na anatomia radicular do milho, verificou-se que a pulverização foliar aumentou a área ocupada pelo metaxilema em relação a área total da seção da raiz (Figura 1E) e a área do metaxilema em relação a área total do cilindro central (Figura 1F), evidenciando os efeitos sistêmicos da pulverização foliar de *A. brasilense*, que mesmo após a diferenciação dos tecidos, possui atividade em seu crescimento.

Quando se considera o protoxilema da raiz, a inoculação de *A. brasilense* de forma isolada na semente incrementou o número de vasos (Figura 2A, Figura 4), e todos os tratamentos resultaram em aumento do diâmetro destes vasos (Figura 2B), refletindo-se também no aumento da área da seção ocupada pelos vasos do protoxilema radicular (Figura 2C) para todos os tratamentos com aplicação de *A. brasilense*.

Contraopondo as tendências encontradas para o metaxilema (Figura 1E e 1F), a utilização de *A. brasilense*, seja na forma de inoculação via semente, pulverização foliar ou combinada, reduziu a área da seção da raiz e do cilindro central ocupada pelo protoxilema radicular (Figura 2D e 2E), priorizando o transporte de água e sais minerais pelo metaxilema.

Considerando o transporte de fotoassimilados para o sistema radicular, a inoculação de *A. brasilense* via semente foi responsável pelo aumento do número de vasos do floema (Figura 3A), ao passo que, independente da forma de aplicação de *A. brasilense*, o aumento do diâmetro dos vasos foi estimulado (Figura 3B). Contudo, quando efetuada duplamente a aplicação da bactéria, houve aumento da área total do floema na raiz, sendo que aplicações isoladas seja via semente ou pulverização promoveram o aumento da área total do floema em relação ao controle (Figura 3C). Este resultado ratifica os indicativos de efeitos hormonais no crescimento, que quando em excesso devido a inoculação via semente + pulverização foliar, inibem os efeitos positivos e podem ocasionar redução no desenvolvimento.

Com relação a representação do sistema floemático na raiz, a inoculação via semente assim como a pulverização foliar de *A. brasilense*, proporcionaram aumento da área do floema em relação a raiz como um todo (Figura 3D). Confrontando a área do floema em relação ao cilindro central, todas as formas e combinações de aplicação de *A. brasilense* elevam a participação da área do floema no cilindro central (Figura 3E).

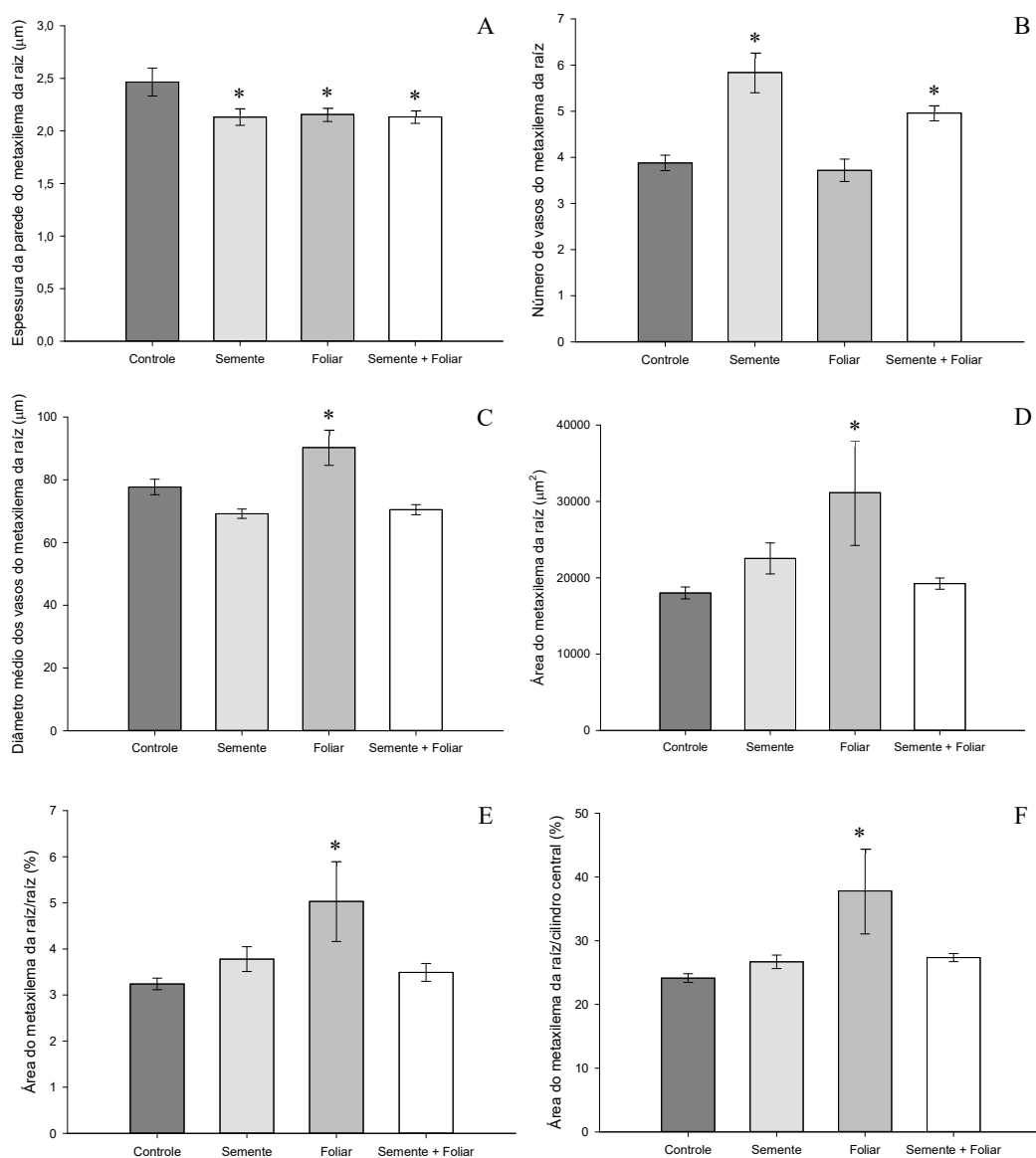


Figura 1 - Espessura da parede do metaxilema (A), número de vasos do metaxilema (B), diâmetro médio dos vasos do metaxilema (C), área do metaxilema (D), relação área do metaxilema/área da raiz (E) e relação área do metaxilema/área do cilindro central (F) de raízes de milho ao estágio V₁₂ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

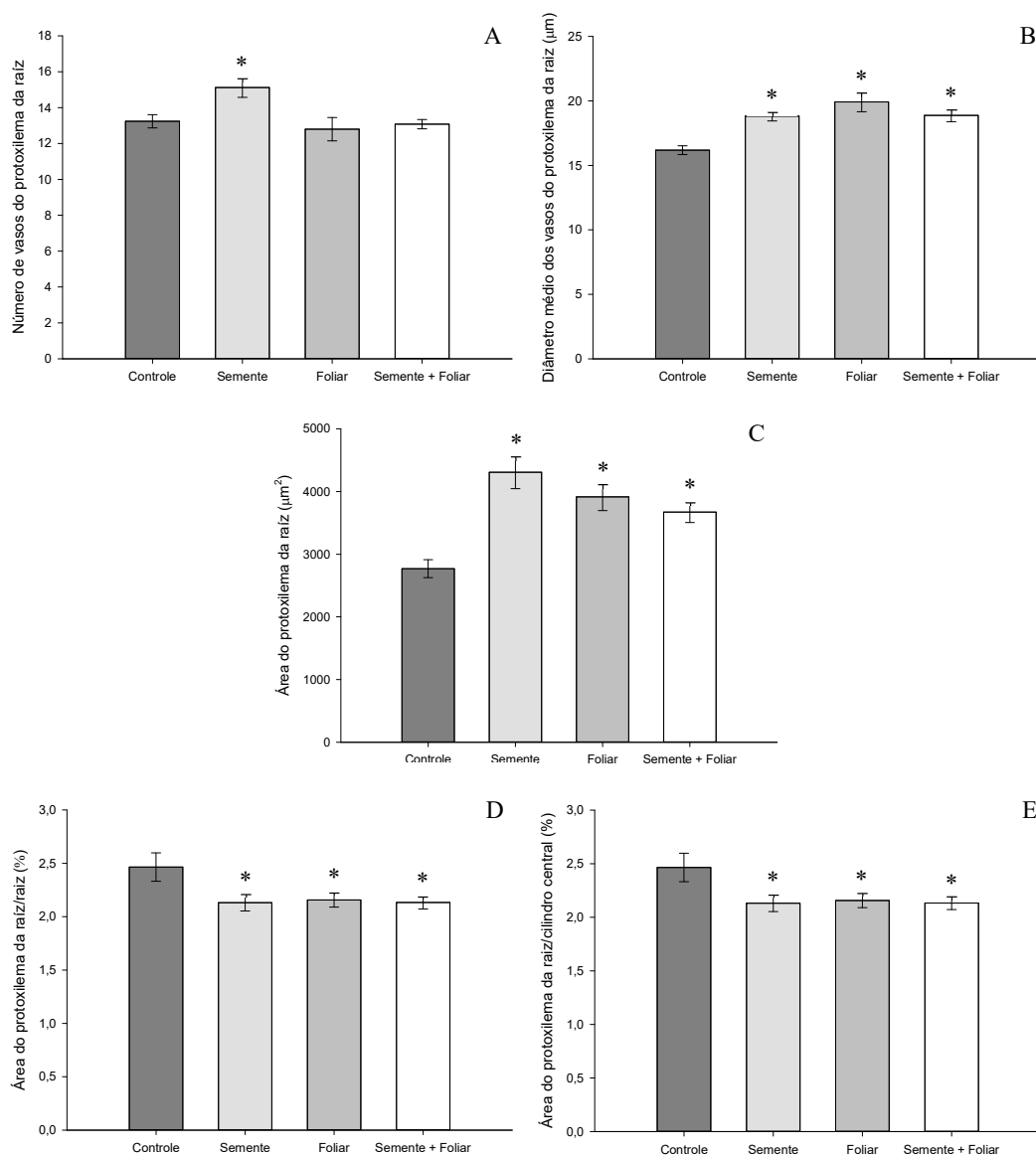


Figura 2 - Número de vasos do protoxilema (A), diâmetro médio dos vasos do protoxilema (B) área do protoxilema (C), relação área do protoxilema/área da raiz (D) e relação área do protoxilema/área do cilindro central (E) de raízes de milho ao estágio V₁₂ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

Ao se levar em consideração a capacidade de transporte de água + sais minerais (tecidos do xilema) com o transporte de fotoassimilados (floema) na raiz, a inoculação via semente, assim como a pulverização foliar ao estágio V₄ proporcionaram maior área de transporte floemática em relação a área de transporte do metaxilema (Figura 5A) e área do xilema como um todo (Figura 5B), possibilitando maior aporte de fotoassimilados para as raízes

e, conseqüentemente, seu crescimento para exploração de área do solo. Com relação ao protoxilema não foram detectadas diferenças significativas.

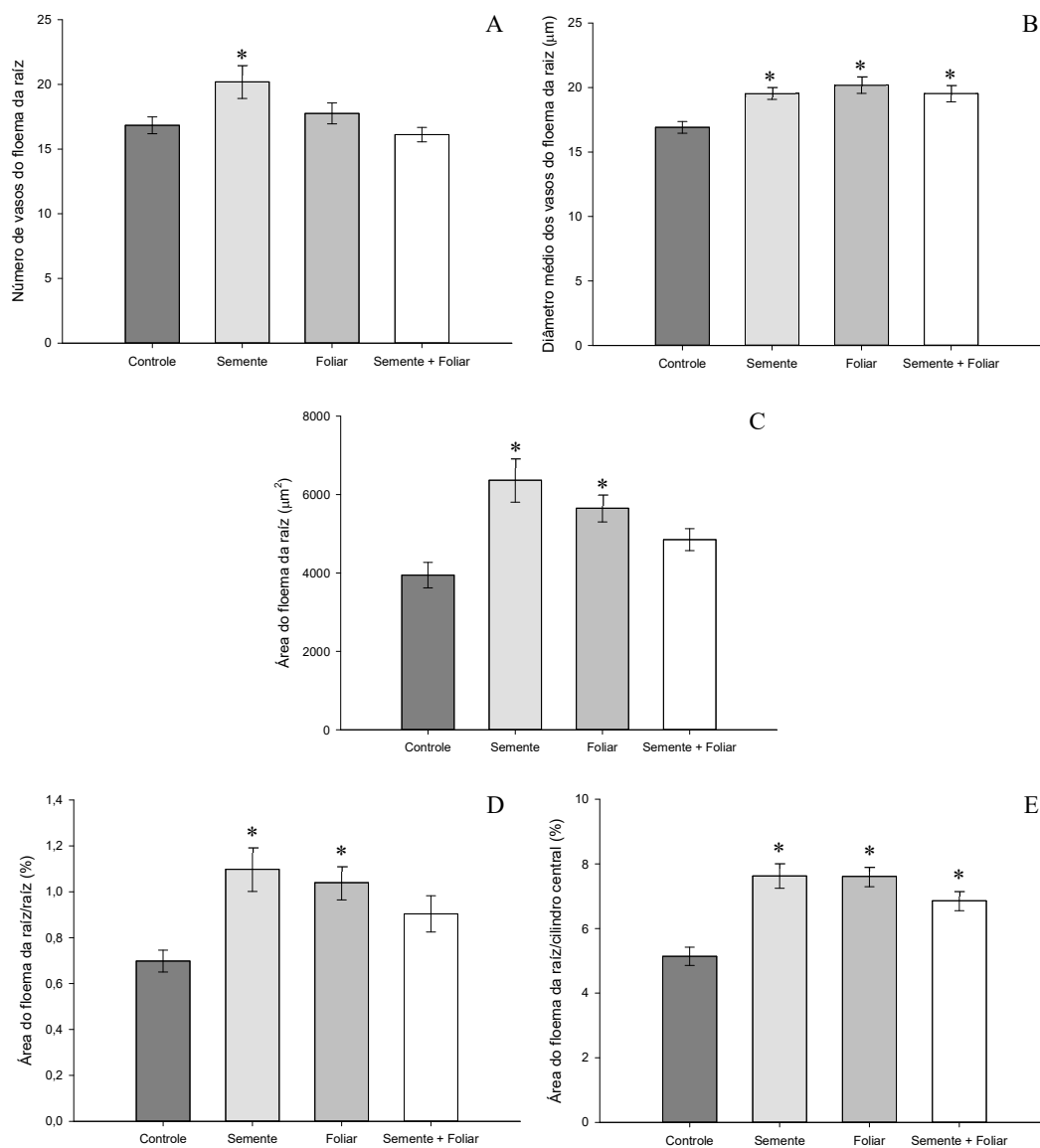


Figura 3 - Número de vasos do floema (A), diâmetro médio dos vasos do floema (B) área do floema (C), relação área do floema/área da raiz (D) e relação área do floema/área do cilindro central (E) de raízes de milho ao estágio V₁₂ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

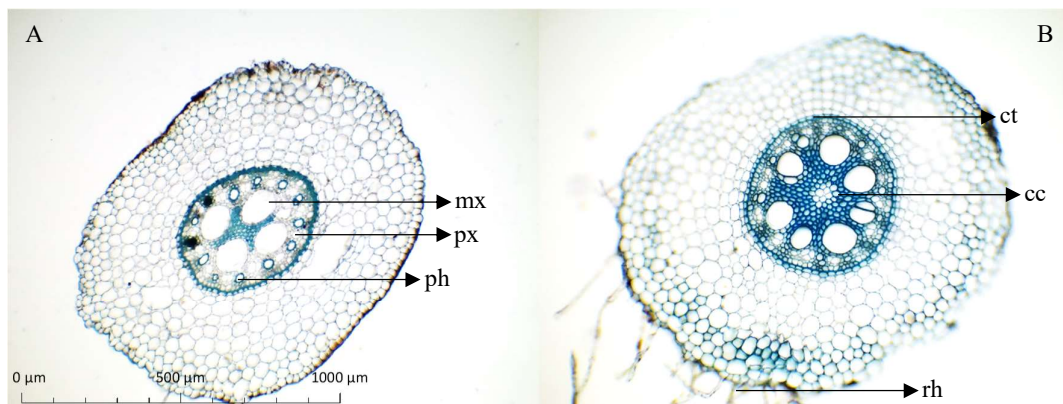


Figura 4 - Cortes transversais de raízes de milho sob os tratamentos controle (A) e inoculação via semente (B). mx: vasos do metaxilema; px: vasos do protoxilema; ph: vasos do floema; ct: estrias de caspary; cc: cilindro central; rh: pelos radiculares.

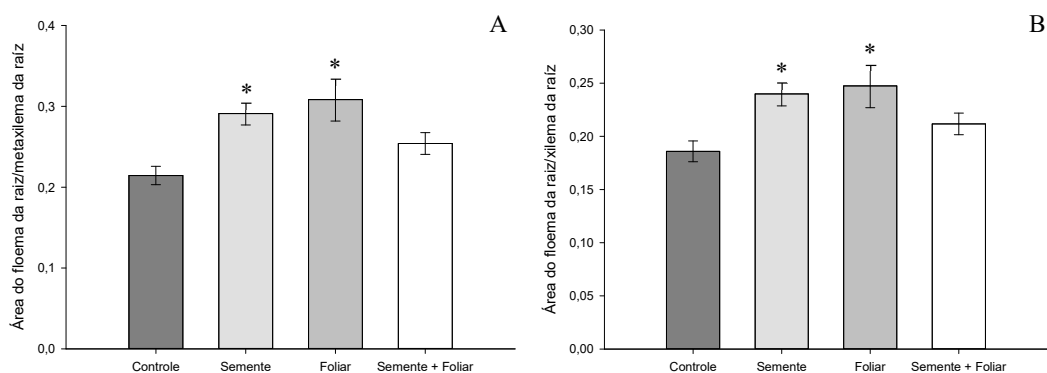


Figura 5 -Relação área do floema da seção raiz/área do metaxilema da seção da raiz (A) e relação área do floema da seção raiz/área do xilema da seção da raiz (B) de raízes de milho ao estágio V₁₂ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnnett a 5% de probabilidade de erro.

3.3.2 Anatomia foliar

Os efeitos da inoculação de *A. brasilense* na anatomia do milho não foram evidentes apenas ao sistema radicular. O sistema de transporte de solutos nas folhas também sofreu modulações mediadas pelo *A. brasilense*.

O número de vasos do metaxilema na nervura secundária foi reduzido quando aplicado *A. brasilense* via semente, seja de forma isolada ou combinada com a pulverização foliar (Figura 6A). O número de vasos do metaxilema foi aumentado pela combinação da inoculação

+ pulverização de *A. brasilense* (Figura 6B, Figura 7). Contudo, apesar das alterações no número de vasos, o diâmetro dos vasos do xilema não foi afetado significativamente.

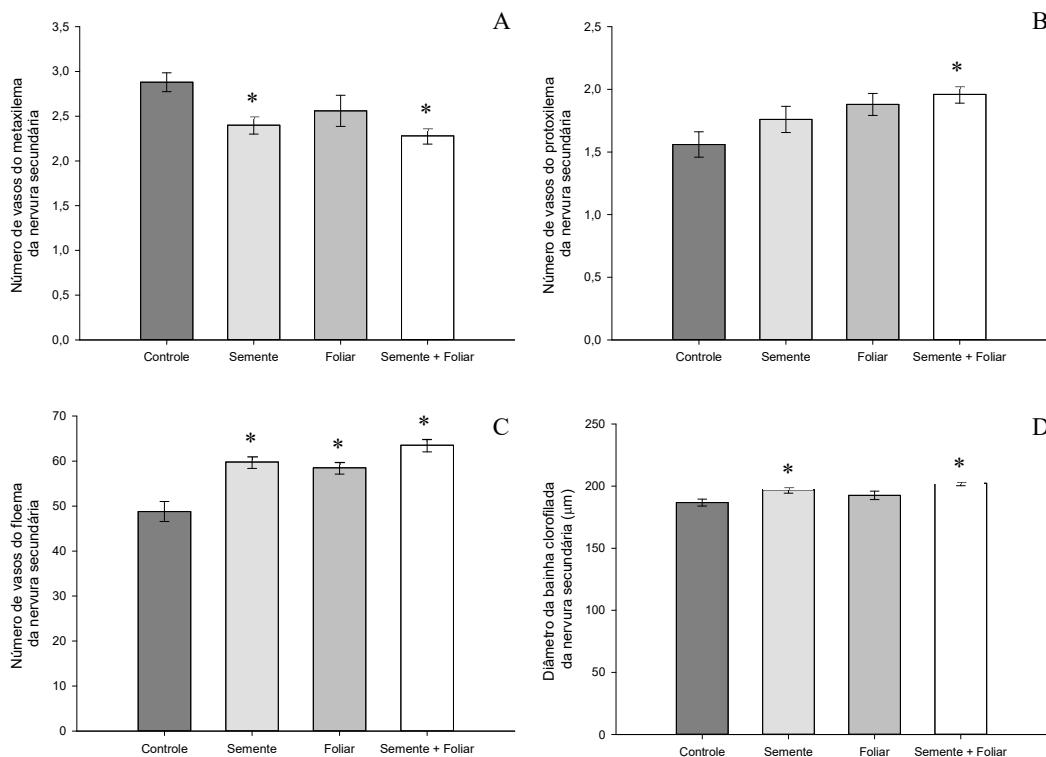


Figura 6 - Número de vasos do metaxilema (A), número de vasos do protoxilema (B), número de vasos do floema (C) e diâmetro da bainha clorofilada (D) da nervura secundária de folhas de milho ao estágio V₁₂ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

Por outro lado, em relação à translocação de fotoassimilados, todos os tratamentos com *A. brasilense* promoveram aumento no número de vasos do floema em relação ao controle (Figura 6C, Figura 7). Apesar deste aumento do número de vasos, o diâmetro do feixe de vasos do floema, assim como a espessura das fibras da bainha, não apresentaram diferenças significativas. O diâmetro da bainha clorofilada também foi incrementado, porém somente pelos tratamentos que continham *A. brasilense* inoculado via semente, seja de forma isolada ou combinada com pulverização foliar (Figura 6D, Figura 7). A pulverização de forma isolada não afetou significativamente o diâmetro da bainha clorofilada.

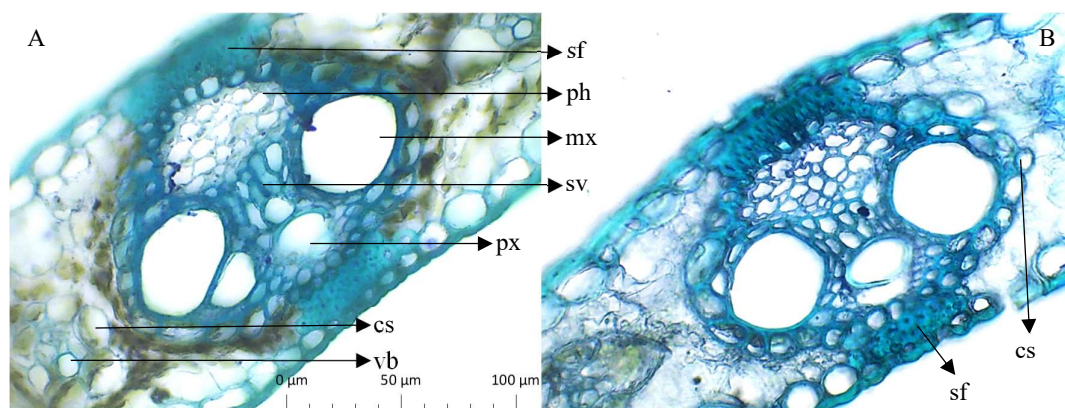


Figura 7 - Cortes transversais do limbo foliar de folhas de milho sob os tratamentos controle (A) e inoculação via semente associado a pulverização foliar (B). sf: fibras da bainha; ph: vasos do floema; mx: vasos do metaxilema; sv: nervura secundária; px: vasos do protoxilema; cs: bainha clorofilada; vb: vasos condutores.

Na nervura terciária das folhas de milho ocorreu aumento do diâmetro do feixe dos vasos condutores proporcionado pela combinação da inoculação via semente + pulverização foliar de *A. brasilense* (Figura 8A, Figura 9). Testando a área ocupada pelos feixes condutores na área da bainha clorofilada da nervura terciária, os tratamentos com pulverização de *A. brasilense* elevaram a área da seção dos feixes condutores (Figura 8B), indicando aumento na capacidade logística de transporte da folha dos sítios carboxilativos para os drenos, porém sem incrementos na capacidade produtiva, visto que o diâmetro da bainha clorofilada da nervura terciária não foi afetado.

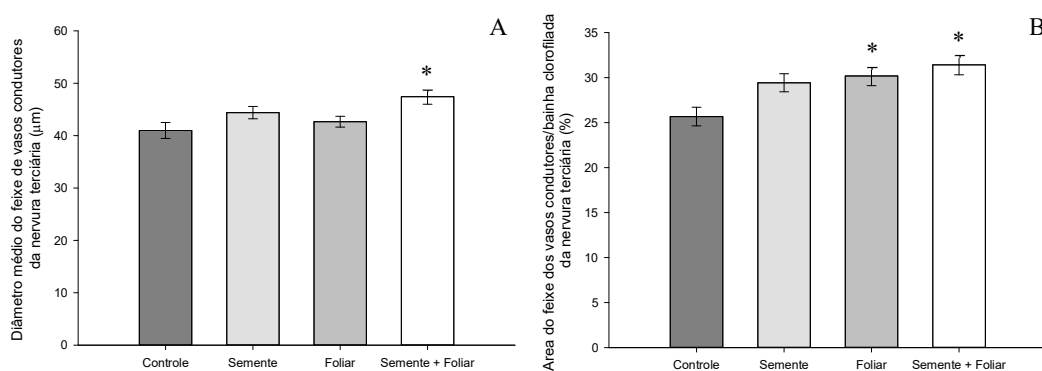


Figura 8 - Diâmetro do feixe de vasos condutores (A) e relação área do feixe de vasos condutores/área da bainha clorofilada (B) da nervura terciária de folhas de milho ao estágio V₁₂ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

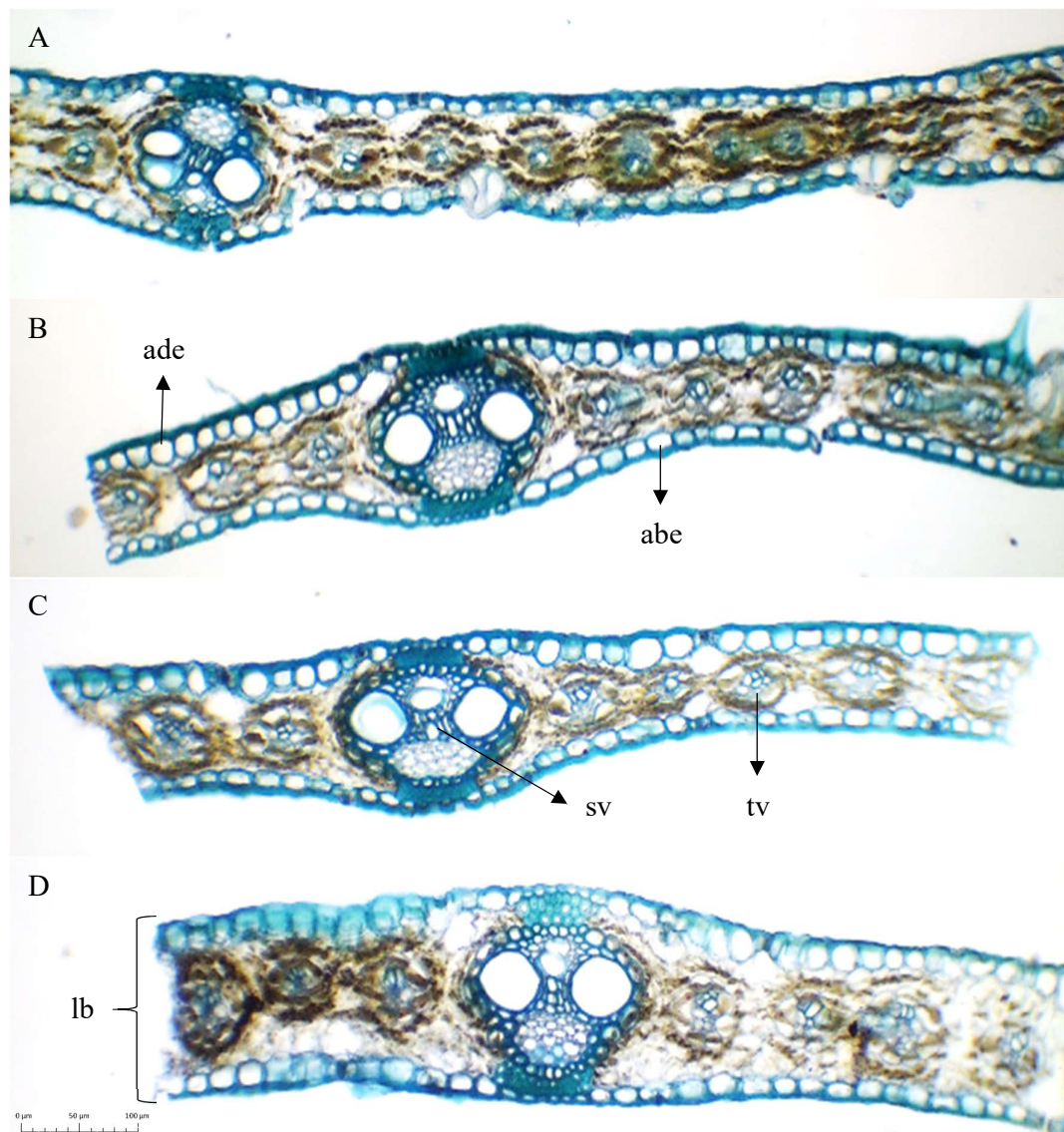


Figura 9 - Cortes transversais do limbo foliar de folhas de milho sob os tratamentos controle (A), inoculação via semente (B), pulverização foliar (C) e inoculação via semente associado a pulverização foliar (D). sv: nervura secundária; tv: nervura terciária; ade: epiderme adaxial; abe: epiderme abaxial; lb: limbo foliar.

Além dos aumentos promovidos no sistema vascular das folhas, a espessura das células da epiderme adaxial foi elevada pela utilização combinada de *A. brasilense* via semente + pulverização foliar (Figura 9 e Figura 10A). Este aumento resultou em maior espessura média do limbo foliar promovido pelos tratamentos que continham inoculação via semente (Figura 9 e Figura 10B). A epiderme abaxial não sofreu alterações significativas dos tratamentos com *A. brasilense*.

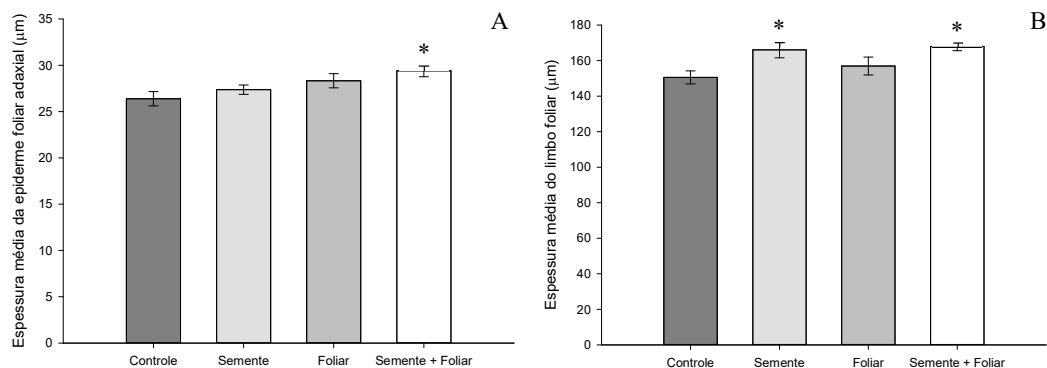


Figura 10 - Espessura média da epiderme foliar adaxial (A) e espessura média do limbo foliar (B) de folhas de milho ao estágio V₁₂ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

3.3.3 Número de estômatos

A face abaxial das folhas de milho não teve sua espessura alterada, contudo o número de estômatos elevou-se quando inoculado *A. brasilense* via semente ou pulverização foliar, porém sem resposta significativa para a combinação de aplicações (Figura 11A). Esta alteração possibilita aumento das trocas gasosas evitando perdas excessivas de água, visto que a parte inferior da folha tende a aquecer menos que a parte superior em função da proteção contra a radiação direta, necessitando menos arrefecimento. O número de total estômatos também foi incrementado, porém somente pela inoculação isolada via semente (Figura 11B).

O número de estômatos na face adaxial das folhas, assim como a relação do número de estômatos na face adaxial/número de estômatos na face abaxial não evidenciaram modulações significativas pela utilização de *A. brasilense*.

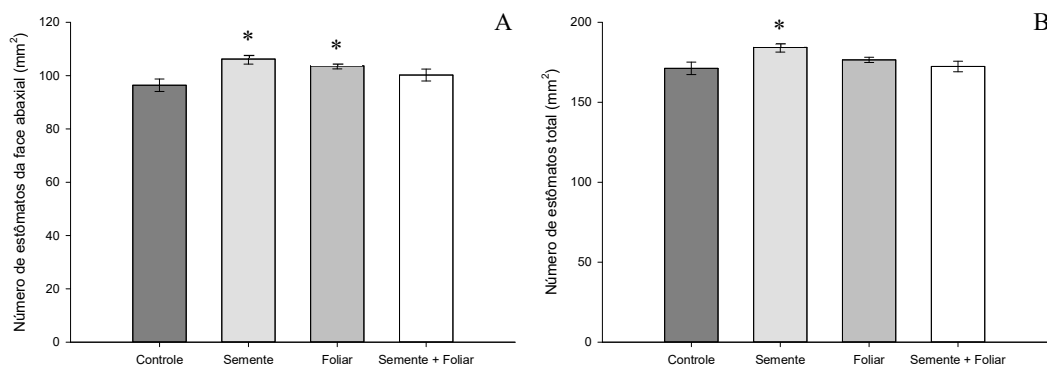


Figura 11 - Número de estômatos da face abaxial (A) e número de estômatos total (B) de folhas de milho ao estágio V₁₂ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

3.3.4 Teor de lignina e atividade de fenilalanina amônia-liase

O teor de lignina nos tecidos foliares foi incrementado pela combinação de utilização de *A. brasilense* via semente + pulverização foliar (Figura 12A) em relação ao controle. O teor de lignina nos tecidos radiculares também foi afetado, contudo, quando utilizado a inoculação via semente, isolado ou combinado com pulverização via foliar (Figura 12B), reduziu-se o teor de lignina. Deste modo, o *A. brasilense* modula o metabolismo do milho, focalizando maior poder de dreno nos ápices do sistema radicular, forçando sua expansão em área e reduzindo a deposição de lignina por grama de tecido fresco.

Enzima participante da rota dos fenilpropanóides e relacionada à lignificação, a fenilalanina amônia-liase no tecido foliar sofreu redução de atividade quando o *A. brasilense* foi utilizado isoladamente em pulverização (Figura 12C), corroborando com o fato do aumento da área foliar, reduzindo a lignificação por grama de massa fresca foliar.

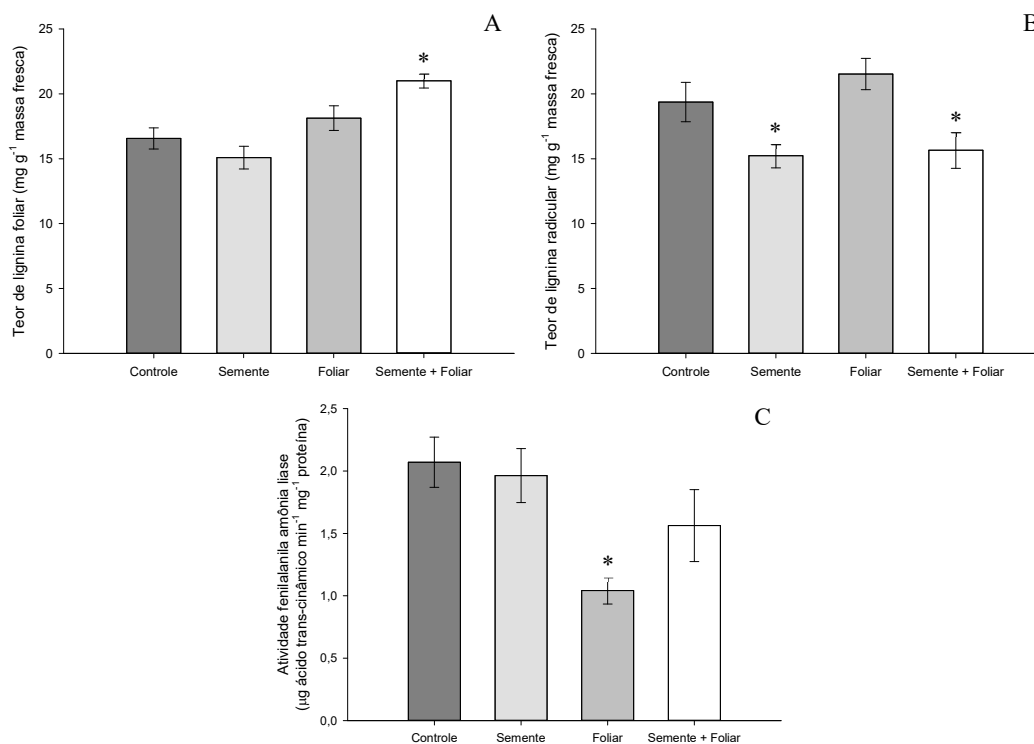


Figura 12 - Teor de lignina foliar (A), teor de lignina radicular (B) e atividade da fenilalanina amônia-liase em folhas (C) de milho ao estágio V₁₂ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

3.4 DISCUSSÃO

São abundantes os relatos na literatura sobre os efeitos benéficos de *A. brasilense* no desenvolvimento radicular de poáceas (CASSÁN et al., 2009a; DARTORA et al., 2013; FUKAMI et al., 2016; MOUTIA et al., 2010), assim como em suas características morfológicas, principalmente pela maior formação de pelos radiculares (CASSÁN et al., 2009b; ILYAS; BANO, 2010; KANNAN; PONMURUGAN, 2010; LARRABURU; LLORENTE, 2015; MASCIARELLI et al., 2013). Por outro lado, a elucidação do papel das modificações anatômicas das raízes induzidas por *A. brasilense* é bem menos explorada pela comunidade científica.

A diferenciação e desenvolvimento dos vasos condutores, sejam xilemáticos ou floemáticos, é um processo complexo mediado por compostos hormonais. Este processo é eliciado por giberelinas, e conduzido em todas as suas etapas por auxinas e citocininas, onde há

aporte de etileno ao final do ciclo de formação dos vasos condutores (SORCE et al., 2013). Ainda segundo os mesmos autores, para induzir a formação do xilema é necessário repressão nos processos de transcrição, o que demanda redução dos níveis de citocininas e auxinas aliado a elevação dos teores de etileno, levando as células ao colapso (morte celular programada) para estruturar os vasos xilemáticos (tecido morto) para transporte passivo.

Baseado nestas informações e atrelado às características de associação do *A. brasilense* com vegetais, os menores valores de espessura da parede do metaxilema da raiz (Figura 1A) justificam-se pela atividade metabólica modulada pelas auxinas, giberelinas e citocininas visando o desenvolvimento radicular (ESQUIVEL-COTE et al., 2010; MASCIARELLI et al., 2013), com menor atividade do etileno pela ação da enzimas ACC-deaminase (ESQUIVEL-COTE et al., 2010), forçando a planta a investir energia metabólica no crescimento primário radicular e emissão de pelos radiculares (Figura 4), em detrimento da menor deposição de lignina nas paredes dos vasos do xilema (Figura 12B).

A maior atividade das auxinas na formação inicial do vegetal (BASHAN; DE-BASHAN, 2010) incrementa a taxa de formação de vasos condutores, possibilitando aumento do número dos vasos do xilema e floema radicular pela utilização de *A. brasilense* via inoculação na semente (Figura 1B, 2A e 3A). Estes hormônios também se envolvem no aumento do diâmetro (Figura 1C, 2B, 3B) e elevação da área da seção total dos vasos do xilema (Figura 1D, 2D, 3C).

Ressalta-se o comportamento apresentado entre a formação dos vasos e seu diâmetro. Quando inoculado *A. brasilense* via semente, seja de forma isolada ou combinada com pulverização foliar, houve tendência de aumento do número de vasos (Figura 1B e 2A), e quando pulverizado *A. brasilense* via foliar os vasos já estavam definidos, restando apenas a possibilidade de intervenção no seu processo de crescimento, evidenciado no aumento de diâmetro e área dos mesmos (Figura 1C e 1D). Deste modo, a área ocupada pelo metaxilema radicular foi maior em relação a área total da raiz (Figura 1E) e a área do cilindro central da raiz (Figura 1F). Em detrimento do crescimento do metaxilema, houve redução da área do protoxilema (Figura 2D e 2E).

Há evidências que estes efeitos promovidos pelo *A. brasilense* no sistema vascular xilemático das plantas é catalisado em situações de maior demanda por um sistema vascular robusto, seja sob estresse hídrico ou ataque de patógenos que afetam a translocação no vegetal, impulsionando a condutividade hidráulica que torna-se fator determinante em situações de relações hídricas desfavoráveis (PEREYRA et al., 2012; ROMERO; VEGA; CORREA, 2014). Neste ponto vale ressaltar que mesmo sob adequado balanço hídrico do solo, nos horários de

maior radiação as plantas de milho apresentam dificuldade de manter taxa de absorção de água semelhante a taxa de transpiração (LEITNER et al., 2014), o que leva a períodos pontuais de murcha durante o dia.

A elevação no número de vasos do floema da raiz promovida pela inoculação via semente (Figura 3A), e aumento do diâmetro médio destes vasos promovidas por todas as formas de utilização e combinação de *A. brasilense* (Figura 3B), culminou em aumento de área do floema apenas para as utilizações isoladas via semente ou pulverização foliar (Figura 3C), evidenciando a sensibilidade radicular a estímulos hormonais (OVERVOORDE; FUKAKI; BEECKMAN, 2010; SAINI et al., 2013) (inoculação via semente + pulverização foliar).

Devido ao aumento do desenvolvimento radicular promovido pelo *A. brasilense* evidenciado largamente na literatura científica (CASSÁN et al., 2009a, 2009b; DARTORA et al., 2013; FUKAMI et al., 2016; ILYAS; BANO, 2010; KANNAN; PONMURUGAN, 2010; LARRABURU; LLORENTE, 2015; MASCIARELLI et al., 2013; MOUTIA et al., 2010), é necessário maior aporte de fotoassimilados para manutenção deste sistema, visto que há aumento da taxa respiratória das raízes pelo seu maior volume, mesmo que a taxa respiratória específica seja menor (SAIKIA et al., 2012), justificando os aumentos nos dados referentes ao floema radicular (Figura 3 e 4).

A cultura do trigo apresenta efeitos semelhantes sob influência de *Azospirillum* sp. e outras espécies de bactérias promotoras de crescimento vegetal, onde se descreve aumento nos diâmetros do xilema e floema presentes no colmo próximo a região da inserção dos perfilhos, assim como acréscimo no número de feixes condutores (BOGHDADY; ALI, 2013; EL-AFRY et al., 2012). Estes efeitos são notados independentemente se as bactérias são aplicadas diretamente na semente via inoculação ou em pulverização foliar na parte aérea (EL-AFRY et al., 2012)

Nas folhas de milho, a redução do número de vasos do metaxilema (Figura 6A) culminou em maior número de vasos de protoxilema (Figura 6B) para a combinação de aplicações de *A. brasilense*. Porém, todas as formas e combinações elevaram o número de vasos do floema nas nervuras secundárias (Figura 6C, Figura 7) com aumento da área ocupada pela bainha clorofilada (Figura 6D, Figura 7). Deste modo, a ação de auxinas e citocininas (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; ROBERT; FRIML, 2009; WERNER; SCHMÜLLING, 2009) possibilita maior atividade fotossintética (BULEGON et al., 2017b), demandando maior capacidade logística do sistema vascular das folhas de milho. Nota-se também o aumento do papel das nervuras terciárias neste trabalho de transporte xilemático e floemático (Figura 8).

Alterações na espessura de ambas as faces da epiderme foliar também são relatadas, citando aumento promovido por *A. brasilense* em trigo (EL-AFRY et al., 2012), assim como encontrado no presente ensaio (Figura 10A). A espessura média do limbo também foi elevada pela utilização isolada ou combinada da inoculação via semente (Figura 10B), permitindo maior interceptação da radiação luminosa.

A utilização de *A. brasilense* em ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*) também eleva a espessura das epidermes abaxial e adaxial, e dos parênquimas paliçádico e lacunoso (LARRABURU; LLORENTE, 2015), assim como aumento da espessura do limbo foliar em fotínia, espécie utilizada em paisagismo (LARRABURU; APÓSTOLO; LLORENTE, 2010). Ambos trabalhos atribuem estas alterações ao complexo de efeitos promovidos pelo gênero *Azospirillum* (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014).

Aumento no número de estômatos pode ser interessante ao vegetal, principalmente quando concentrado na face adaxial, evitando radiações luminosas diretas que levam a aquecimento do limbo foliar (Figura 11A). Todavia, apesar da inoculação via semente e pulverização foliar terem elevado o número de estômatos na face inferior das folhas, apenas a inoculação via semente apresentou aumento de forma geral do número destes orifícios para trocas gasosas. Isto pode significar diretamente menor controle de perda de água por haverem mais pontos de troca gasosa, no entanto, o aumento no número de estômatos usualmente acarreta em redução de seu tamanho, o que os deixa mais rápidos e eficientes em relação a movimentos de abertura e fechamento (DRAKE; FROEND; FRANKS, 2013), possibilitando rápida reação a momentos de déficit hídrico temporário.

Por outro lado, a utilização de *A. brasilense* em diversas culturas tem proporcionado maiores taxas de transpiração foliar (BULEGON et al., 2016, 2017a), e devido a manutenção de maiores níveis de água nos tecidos foliares (BULEGON et al., 2017b) indica maior taxa de absorção hídrica por parte das plantas.

O aumento no processo de lignificação do limbo foliar (Figura 12A) promovida pela combinação de aplicações de *A. brasilense* é necessária para sustentar os incrementos de parte aérea promovidos pela bactéria (LARRABURU; LLORENTE, 2015; SABIR et al., 2012), além de ser importante estrutura de defesa contra patógenos (SHARMA; KAUR; GARG, 2012). Por outro lado, *A. brasilense* inoculado via semente, isolado ou combinado, reduz o teor de lignina nos tecidos radiculares (Figura 12B) pela produção de ligninases, como lignina peroxidases, manganês peroxidases e lacases (KUPRYASHINA et al., 2015; NIKITINA et al., 2010; PONOMAREVA et al., 2018), reduzindo o desenvolvimento secundário da parede celular em

prol do alongamento radicular. Aliado a este fato, e sendo o cálcio elemento pouco móvel no solo, o maior desenvolvimento radicular permite maior captação deste nutriente, alterando importante relação entre auxinas e Ca^{2+} , prevenindo lignificações prematuras (MASCIARELLI et al., 2013).

A atividade enzimática envolvida no processo de lignificação (Figura 12C) é dependente de momentos de indução, mesmo sob efeito de bactérias promotoras de crescimento vegetal (HEMISSI et al., 2013). Estes momentos de indução da atividade da fenilalanina amônia-liase induzirá a deposição de lignina nos tecidos do vegetal (THOMAS et al., 2010), logo, a partir do aumento que o vegetal alcança os níveis apropriados de deposição de lignina, haverá redução da atividade desta rota metabólica e da fenilalanina amônia-liase.

Há um consenso literário de que as auxinas excretadas por *Azospirillum* (MASCIARELLI et al., 2013) apresentam papel de destaque na mediação das modificações anatômicas (LARRABURU; LLORENTE, 2015), auxiliadas pelos demais mecanismos de ação (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; BHATTACHARYYA; JHA, 2012; CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014). O peso de cada mecanismo e os diversos mecanismos das bactérias promotoras de crescimento vegetal atuantes na regulação anatômica dos vegetais ainda não é totalmente claro (DIMKPA; WEINARD; ASCH, 2009), porém, estas modulações anatômicas que são promovidas por este grupo de bactérias são de crucial importância para que as plantas enfrentem condições adversas.

3.5 CONCLUSÃO

A utilização de *A. brasilense* eleva a capacidade de transporte xilemático e floemático do milho, com a inoculação via semente atuando na formação inicial dos vasos, e a pulverização foliar no desenvolvimento dos mesmos. Há ganhos na espessura da epiderme adaxial, limbo foliar e número de estômatos pelas pulverizações, favorecendo o aproveitamento luminoso e atividade carboxilativa. Por outro lado, o estímulo ao desenvolvimento radicular promovido pelas inoculações reduz a capacidade de deposição de lignina neste tecido, contudo, estimula maior deposição deste composto nas folhas pela combinação da inoculação + pulverização. Este complexo de modulações mediadas por *A. brasilense* em milho reforça seu papel na indução de importantes respostas vegetais para aclimatação a condições ambientais adversas.

3.6 REFERÊNCIAS

- ALEN'KINA, S. A. ; NIKITINA, V. E. *Azospirillum* lectin-induced changes in nitric oxide content in wheat seedling roots. **Russian Agricultural Sciences**, v. 37, n. 6, p. 462–464, 2012.
- ASKARY, M. et al. Influence of the co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on grain yield and N, P, K content of *Triticum aestivum* (Cv . Baccros and Mahdavi). **American-Eurasian Journal Agricultural & Environmental Science**, v. 5, n. 3, p. 296–307, 2009.
- BARBER, M. S. ; RIDE, J. P. A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 32, n. 2, p. 185–197, 1988.
- BASHAN, Y. ; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. In: **Advances in Agronomy**. 1. ed. [s. l.] Elsevier Inc., 2010. v. 108p. 77–136.
- BATTISTUS, A. G. et al. Synergistic action of *Azospirillum brasilense* combined with thiamethoxam on the physiological quality of maize seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 49, p. 4501–4507, 2014.
- BHATTACHARYYA, P. N. ; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.
- BOGHADADY, M. S. ; ALI, A. S. Comparison between effect of *Azospirillum brasilense* and *Anabaena oryzae* on growth, yield and anatomical characters of wheat plants. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 1, p. 627–637, 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BULEGON, L. G. et al. Componentes de produção e produtividade da cultura da soja submetida à inoculação de *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*. **Terra Latinoamericana**, v. 34, n. 2, p. 169–176, 2016.
- BULEGON, L. G. et al. 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, 2017a.
- BULEGON, L. G. et al. Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and rehydration conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1283–1289, 2017b.
- CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28–35, 2009a.

CASSÁN, F. et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 12–19, 2009b.

CASSÁN, F. ; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.

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.

DARTORA, J. et al. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plantas de milho e trigo inoculadas com estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. **Global Science and Technology**, v. 6, n. 3, p. 190–201, 2013.

DIMKPA, C. ; WEINARD, T. ; ASCH, F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 12, p. 1682–1694, 2009.

DRAKE, P. L. ; FROEND, R. H. ; FRANKS, P. J. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 495–505, 2013.

EL-AFRY, M. M. et al. Anatomical studies on drought-stressed wheat plants (*Triticum aestivum* L.) treated with some bacterial strains. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 56, n. 2, p. 165–174, 2012.

EL-LATTIEF, E. A. A. Use of *Azospirillum* and *Azobacter* bacteria as biofertilizers in cereal crops: a review. **International Journal of Research in Engineering and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 36–44, 2016.

ESQUIVEL-COTE, R. et al. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1–2, p. 65–75, 2010.

FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016.

FUKAMI, J. et al. 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.

GUIMARÃES, V. F. et al. Morphophysiological characteristics of maize inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* as seed treatment, cultivated in different types of soil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 39, p. 2919–2924, 2014.

HEMISSI, I. et al. Enhanced defence responses of chickpea plants against *Rhizoctonia solani* by pre-inoculation with rhizobia. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 6, p. 412–418, 2013.

HOSSAIN, M. et al. Effects of *Azospirillum* isolates from paddy fields on the growth of rice plants. **Research in Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 15–22, 2015.

- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1–2, p. 413–425, 2010.
- ILYAS, N. ; BANO, A. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 4, p. 393–406, 2010.
- KANNAN, T. ; PONMURUGAN, P. Response of paddy (*Oryza sativa* L.) varieties to *Azospirillum brasiliense* inoculation. **Journal of Phytology**, v. 2, n. 6, p. 8–13, 2010.
- KUPRYASHINA, M. A. et al. Ligninolytic activity of bacteria of the genera *Azospirillum* and *Niveispirillum*. **Microbiology**, v. 84, n. 6, p. 791–795, 2015.
- LARRABURU, E. E. ; APÓSTOLO, N. M. ; LLORENTE, B. E. Anatomy and morphology of photinia (*Photinia* × *fraseri* Dress) in vitro plants inoculated with rhizobacteria. **Trees**, v. 24, n. 4, p. 635–642, 2010.
- LARRABURU, E. E. ; BUSUSCOVICH, A. C. ; LLORENTE, B. E. *Azospirillum brasilense* improves in vitro and ex vitro rooting-acclimatization of jojoba. **Scientia Horticulturae**, v. 209, p. 139–147, 2016.
- LARRABURU, E. E. ; LLORENTE, B. E. Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in in vitro rooting of pink lapacho. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, n. 1, p. 175–184, 2015.
- LEITNER, D. et al. Impact of contrasted maize root traits at flowering on water stress tolerance – a simulation study. **Field Crops Research**, v. 165, p. 125–137, 2014.
- MASCIARELLI, O. et al. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590–597, 2013.
- MOUTIA, J. -F. Y. et al. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1–2, p. 233–242, 2010.
- NIKITINA, V. E. et al. Phenol oxidase activity in bacteria of the genus *Azospirillum*. **Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 327–333, 2010.
- NOVAIS, R. F. ; NEVES, J. C. L. ; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In: **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA, 1991. p. 189–198.
- OVERVOORDE, P. ; FUKAKI, H. ; BEECKMAN, T. Auxin control of root development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 6, p. 1–16, 2010.
- PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 25–35, 2008.
- PEREYRA, M. A. et al. A better water status in wheat seedlings induced by *Azospirillum* under osmotic stress is related to morphological changes in xylem vessels of the coleoptile. **Applied Soil Ecology**, v. 53, n. 1, p. 94–97, 2012.

- PONOMAREVA, E. G. et al. Phenol oxidase activity of *Azospirillum brasilense* Sp245 mutants with modified motility and *Azospirillum brasilense* Sp7 phase variants with different plasmid composition. **Microbiology**, v. 87, n. 2, p. 222–228, 2018.
- QUADROS, P. D. DE et al. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014.
- ROBERT, H. S. ; FRIML, J. Auxin and other signals on the move in plants. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 325–332, 2009.
- RODRIGUES, F. Á. et al. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 66, n. 4, p. 144–159, 2005.
- RODRIGUEZ, H. ; GONZALEZ, T. ; GOIRE, I. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552–555, 2004.
- ROMERO, A. M. ; VEGA, D. ; CORREA, O. S. *Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 82, n. June, p. 38–43, 2014.
- SABIR, A. et al. Growth and mineral acquisition response of grapevine rootstocks (*Vitis* spp.) to inoculation with different strains of plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 10, p. 2148–2153, 2012.
- SAIKIA, S. P. et al. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 6, p. 1085–1102, 2012.
- SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 6, p. 741–757, 2013.
- SANTOS, H. G. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília: Embrapa Solos, 2018. 356 p.
- SARANRAJ, P. ; SIVASAKTHIVELAN, P. *Azospirillum* and its formulations: areview. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 3, p. 275–287, 2013.
- SHARMA, P. ; KAUR, N. ; GARG, K. Revitalizing soil health with bio-fertilizers. **Biofertiliser news letter**, v. 20, n. 2, p. 5–11, 2012.
- SORCE, C. et al. Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 6, p. 885–898, 2013.
- THOMAS, J. et al. Influence of beneficial microorganisms during in vivo acclimatization of in vitro-derived tea (*Camellia sinensis*) plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 101, n. 3, p. 365–370, 2010.
- TORTORA, M. L. ; DÍAZ-RICCI, J. C. ; PEDRAZA, R. O. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 279–290, 2012.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 1, p. 68–71, 2006.

WERNER, T. ; SCHMÜLLING, T. Cytokinin action in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 5, p. 527–538, 2009.

4 CAPÍTULO 3: PULVERIZAÇÃO FOLIAR DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* INCREMENTA REAÇÕES FOTOSSINTÉTICAS LUMINOSAS E CARBOXILATIVAS EM MILHO

Resumo: O aproveitamento da radiação disponível e sua conversão em assimilação líquida de CO₂ é fator chave para otimização da produtividade das culturas, sendo altamente dependente da capacidade de transporte eletrônico nas membranas dos cloroplastos. Visando aprimorar este aproveitamento de recursos ambientais, bactérias promotoras de crescimento vegetal vêm sendo adicionadas aos sistemas de produção. Visto o exposto, objetivou-se avaliar a eficiência das reações luminosas, carboxilativas e produção de pigmentos fotossintéticos em milho inoculado com *Azospirillum brasilense*, via semente ou pulverização foliar. Plantas de milho foram conduzidas sob os tratamentos controle; inoculação de *A. brasilense* via semente; pulverização foliar de *A. brasilense*; e inoculação via semente associado à pulverização foliar de *A. brasilense*. No estágio V₁₂ mensurou-se trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e produção de pigmentos foliares relacionados à fotossíntese. A pulverização de *A. brasilense* elevou a taxa fotossintética, condutância estomática e taxa transpiratória, assim como incrementou a eficiência quântica do fotossistema II e de assimilação líquida de CO₂, taxa aparente de transporte de elétrons utilizados na produção de energia fotoquímica e assimilação de CO₂. O teor de pigmentos nas folhas não foi afetado significativamente. Em suma, a pulverização de *A. brasilense* proporciona melhor atividade do fotossistema II e maior atividade carboxilativa em milho.

Palavras-chave: Fluorescência da clorofila; Trocas gasosas; Bactérias promotoras de crescimento vegetal.

4.1 INTRODUÇÃO

O desafio de incrementar a produção de alimentos a nível mundial, a partir do desenvolvimento de práticas agrícolas sustentáveis, tem levado a pesquisa a buscar alternativas tecnológicas que se mostrem promissoras, como a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Neste sentido, a adoção de biofertilizantes e/ou bioinoculantes vem ganhando espaço no sistema de cultivo de gramíneas, como milho, arroz e trigo, alavancada principalmente pelo gênero *Azospirillum* (SARANRAJ; SIVASAKTHIVELAN, 2013).

O gênero *Azospirillum* compõe-se de bactérias gram negativas que apresentam capacidade associativa simbiótica com diversos cereais de interesse econômico, sendo o bioinoculante mais comercializado no mundo (EL-LATTIEF, 2016). De modo geral, a interação *Azospirillum*-planta resulta no aumento da capacidade de exploração de água e nutrientes por parte do vegetal devido ao complexo de estímulos bioreguladores (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; PEDRAZA, 2008), mantendo o status hídrico da planta elevado.

A atividade reguladora do gênero *Azospirillum* é função da produção e excreção hormonal, destacando-se auxinas (MASCIARELLI et al., 2013), giberelinas (ESQUIVEL-COTE et al., 2010) e citocininas (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014), redução dos níveis de etileno nos vegetais pela ação da enzima ACC-deaminase (ESQUIVEL-COTE et al., 2010) e produção de outros compostos reguladores, como poliaminas (CASSÁN et al., 2009b). Conjuntamente, mecanismos como a fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2010), solubilização de fosfatos inorgânicos (RODRIGUEZ; GONZALEZ; GOIRE, 2004), e incrementos na atividade do óxido nítrico (ALEN'KINA; NIKITINA, 2010) podem contribuir para o desenvolvimento vegetal (BATTISTUS et al., 2014; KLEIN et al., 2012) e aumento da produtividade (ASKARY et al., 2009; HOSSAIN et al., 2015; QUADROS et al., 2014).

Sendo o *Azospirillum* um gênero capaz de alojar-se na rizosfera e gerar resultados inclusive na parte aérea (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2012), cogita-se que uma forma de inoculação *in loco* poderia impulsionar esses efeitos e evitar contato das bactérias com pesticidas utilizados na semente que são tóxicos a seu desenvolvimento (FUKAMI et al., 2016). Relatos bibliográficos indicam que o gênero *Azospirillum*, além da rizosfera, também possui capacidade de colonizar o filoplano (FUKAMI et al., 2017), incrementando o desenvolvimento e a produtividade de diferentes culturas (AHMADI-RAD et al., 2016; ZUFFO et al., 2017) pela

ação hormonal e eliciação de mecanismos de resistência vegetal contra estresses bióticos e abióticos (FUKAMI et al., 2017). Alguns trabalhos chegam a abordar uma nova e importante função do gênero *Azospirillum*, que além de promotor de crescimento vegetal pelos diversos mecanismos citados anteriormente, possui atividade reguladora e/ou indutora de resistência contra situações de estresse (CASSÁN et al., 2009b; FUKAMI et al., 2017; KAUSHAL; WANI, 2015; TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2012).

Sob condições de estresse hídrico, de comum ocorrência diária devido ao déficit de pressão de vapor atmosférico nas horas mais quentes do dia, uma das primeiras atividades metabólicas do vegetal a ser afetada é a fotossíntese, seja pelo aumento da resistência estomática ou resistência mesofílica na difusão de CO₂, ou em suas reações luminosas devido à ação de agentes oxidativos que afetam drasticamente a maquinaria fotossintética nos tilacóides (BARBOSA et al., 2014; CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). Estas reações luminosas compreendem o processo de absorção de energia luminosa para conversão em energia química, que quando em excesso não é aproveitada ou dissipada corretamente, formando agentes oxidativos, como o oxigênio singlete (O[•]) (BARBOSA et al., 2014; DAS et al., 2011).

O fotossistema II presente na membrana dos tilacóides, responsável pela excitação das clorofilas pela luz, apresenta grande vulnerabilidade a agentes oxidantes (O[•]), que oxidam a proteína D1 de forma irreversível no centro de reação da clorofila 680 (VASS; CSER, 2009), prejudicando o transporte eletrônico em sua estrutura inicial. Neste ponto, investigações a partir da fluorescência da clorofila *a* permitem monitorar a performance fotossintética de plantas, mensurando alterações na eficiência fotoquímica do fotossistema II, fluxo de elétrons e assimilação de CO₂ (BAKER, 2008).

Deste modo, o *Azospirillum* sp. pode atuar como estimulante à produção de pigmentos relacionados à fotossíntese (BATTISTUS et al., 2014; BULEGON et al., 2017a; ZAREA et al., 2012), induzindo, por mecanismos de proteção ou produção de estruturas bioquímicas, maior eficiência do aparato fotossintético de plantas de milho.

Visto o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense*, estirpes AbV5+AbV6, via semente e/ou pulverização foliar, quanto à produção de pigmentos relacionados à fotossíntese e eficiência das reações luminosas e carboxilativas na assimilação de CO₂.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Tratamentos e delineamento experimental

Estudou-se o comportamento de plantas de milho submetidas a três formas de aplicação de *Azospirillum brasilense* (corrig. Tarrand et al.) em relação à performance fotossintética de milho, compreendendo os tratamentos: 1. Controle; 2. Inoculação via semente de *A. brasilense* (100 mL/60.000 sementes); 3. Pulverização foliar de *A. brasilense* (300 mL ha⁻¹) o estágio V₄; 4. Inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense* nas dosagens e estádios citados. O ensaio foi conduzido em blocos casualizados com cinco repetições.

4.2.2 Material vegetal e condução experimental

Plantas de milho híbrido Pionner 30F53 Leptra® RR2™ foram conduzidas a pleno sol em vasos de 25 litros (29 cm x 37 cm x 29 cm; AxDxd) preenchidos com substrato a base de horizonte A+B de LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef) (SANTOS, 2018).

Previamente à semeadura o substrato foi homogeneizado com 50 mg dm⁻³ de N (ureia), 300 mg dm⁻³ de P₂O₅ (superfosfato triplo) e 150 mg dm⁻³ de K₂O (cloreto de potássio) (NOVAIS; NEVES; BARROS, 1991). Ainda segundo a mesma recomendação, foi realizado aporte de 50 mg dm⁻³ de N (ureia) no estágio V₃ da cultura. Baseado na saturação de bases (V% de 62, 68), não foi necessária calagem.

As avaliações de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, teor de clorofilas *a*, clorofilas *b*, carotenoides e antocianinas foram realizadas aos 50 dias após a semeadura, quando a cultura encontrava-se no estágio V₁₂. No dia anterior às análises, às 21h00min, os vasos foram irrigados até capacidade de campo.

4.2.3 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

Leituras de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram determinadas simultaneamente por intermédio do leitor de trocas gasosas LI-6400XT (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA), com câmara de fluorescência integrada (LI-6400-40, LI-COR Inc.).

Folhas indicativas do estágio V₁₀ da cultura do milho, totalmente expandidas e sem presença de lesões, foram previamente marcadas para que as mensurações pudessem ser efetuadas na mesma amostra e local da folha, adaptadas ao escuro (mensuração às 05h00min) e adaptadas à luz (mensuração às 09h00min).

Em folhas adaptadas ao escuro mensurou-se a taxa assimilatória líquida ou respiração (A_{Dark}), fluorescência mínima (F_o), fluorescência quântica máxima (F_m) com aplicação de luz saturante ($>7500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), possibilitando a estimativa da fluorescência variável máxima ($F_v = \frac{F_m}{F_o}$), e a eficiência quântica fotoquímica máxima do fotossistema II ($\Phi_{\text{PSII Dark}} = \frac{F_v}{F_m}$).

Em folhas adaptadas ao claro, a fotossíntese foi induzida por luz fotossinteticamente ativa de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com 10 % de proporção de luz azul incitando a abertura estomática, teor de CO₂ ambiental fixado em $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fluxo de ar de $500 \mu\text{mol s}^{-1}$. Quantificou-se a taxa assimilatória líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO₂ na câmara subestomática (C_i), taxa de transpiração foliar (E), além das seguintes relações: $WUE = A/E$, $iWUE = A/g_s$ e $F_c = A/C_i$ (ZHANG et al., 2001a), em que WUE corresponde à eficiência do uso de água, $iWUE$ é a eficiência intrínseca do uso de água e F_c é a eficiência de carboxilação.

Conjuntamente, mensurou-se a fluorescência estacionária (F') a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fluorescência efetiva (F_m') com aplicação de luz saturante ($>7500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fluorescência mínima (F_o') a $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989). Deste modo, possibilitou-se a determinação da fluorescência variável efetiva sob luz ($F_v' = \frac{F_m'}{F'}$) como sendo a capacidade disponível dos centros de reação P680 a serem reduzidos, e a eficiência quântica efetiva do fotossistema II ($\Phi_{\text{PSII}} = \frac{F_v'}{F_m'}$).

Baseado nas coletas de dados de folhas adaptadas as situações de escuro e claro, estimou-se o *quenching* de redução fotoquímica ($q_P = \left[\frac{F_m' - F'}{F_m' - F_o'} \right]$) como sendo a energia dissipada por potencial eletroquímico para os carotenoides, e o *quenching* de redução não

fotoquímica ($q_{NQP} = \left[\frac{Fm - Fm'}{Fm - Fo'} \right]$) que é a energia dissipada em forma de calor efetivo e fluorescência.

Mensurou-se também a eficiência quântica efetiva de assimilação de CO₂, representado por $\Phi_{CO_2} = \frac{A - A_{Escuro}}{I \alpha_{folha}}$, onde I é o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ($\approx 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e α_{folha} é a taxa de absorção foliar de luz, assumida como 0,895 para folhas de milho (EARL; TOLLENAAR, 1997), possibilitando a quantificação da eficiência quântica efetiva do PS II para fixação de CO₂ pela relação $\Phi_{PSII} / \Phi_{CO_2}$.

A taxa aparente de transporte eletrônico consumido fotoquimicamente e a taxa aparente de transporte eletrônico consumido para fixação de CO₂, representado respectivamente por $J_{\Phi_{PSII}} = \Phi_{PSII} \text{Light} f I \alpha_{folh}$ e $J_{\Phi_{CO_2}} = \Phi_{CO_2} f I \alpha_{folha}$, foram calculadas visando estimar a quantidade de elétrons utilizados no processo em relação à quantidade fótons recebida pela folha. Em ambas as equações f representa a fração de luz utilizada pelo fotossistema II, assumida como 0,4 para plantas C₄ (EARL; TOLLENAAR, 1998), I é o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ($\approx 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e α_{folha} é a taxa de absorção foliar de luz.

Visando uma melhor visualização dos resultados, foram estimadas as frações da irradiância absorvida aproveitada fotoquimicamente ($F \Phi_{PSII} = 1 - \left[\frac{F'}{Fm'} \right]$), dissipadas por regulação termal via potencial químico e carotenoides ($F \Phi_{NQP} = \left[\frac{F'}{Fm'} \right] - \left[\frac{F'}{Fm} \right]$), e fluorescência + dissipação termal constitutiva ($F \Phi_{f,D} = \frac{F'}{Fm}$) (HENDRICKSON; FURBANK; CHOW, 2004).

4.2.4 Quantificação de pigmentos foliares e índice SPAD

Os teores de pigmentos foliares foram determinados, após a mensuração de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a , a partir da coleta da porção do limbo foliar analisado nas avaliações anteriormente descritas. Para tanto, amostras de segmentos foliares foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer ($-80^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$). Previamente a esta coleta, utilizando a mesma área amostral, foram mensurados 10 pontos na folha com o medidor portátil de clorofila SPAD-502 Plus (Konica Minolta Sensing Americas, Inc.).

Para determinação do teor de clorofilas *a* e *b* e carotenoides, $\pm 0,25$ gramas de amostra foram pré-processadas em nitrogênio líquido, com posterior maceração em acetona 80% com auxílio de almofariz e pistilo. O macerado homogeneizado foi acondicionado em *eppendorf* e completado para volume de 2 mL. Imediatamente após este processo, prosseguiu-se a centrifugação durante cinco minutos a 4000g, sendo mantido este procedimento a 4 °C. A leitura do sobrenadante foi efetuada em espectrofotômetro UV-visível a 665 nm (clorofila *a*), 649 nm (clorofila *b*) e 480 nm (carotenoides) (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001).

Os teores de antocianina foram quantificados por intermédio do pré-processamento de $\pm 0,25$ gramas de tecido foliar em nitrogênio líquido, com posterior maceração em metanol:HCl (99:1 v/v) com auxílio de almofariz e pistilo. A amostra homogeneizada foi mantida por 24 horas no escuro a 4 °C e posteriormente centrifugada a 4000g durante seis minutos na mesma temperatura. O sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro UV-visível a 535 nm (STRACK; WRAY, 1989).

Os teores de clorofilas *a*, clorofilas *b* e carotenoides foram expressos em mg g^{-1} matéria fresca, sendo estimado o teor total de clorofilas, relação clorofilas *a/b* e relação clorofilas totais/carotenoides. O teor de antocianina foi expresso em $\mu\text{g g}^{-1}$ de matéria fresca foliar.

4.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade de erro. Na presença de normalidade dos erros, os dados passaram por análise de variância a 5% de probabilidade de erro pelo teste F de Fisher, e em caso positivo, submetidos a teste de médias de Dunnett a 5% de probabilidade de erro. O conjunto de dados foi submetido à análise de componentes principais baseado na estimativa da matriz de coeficientes de correlação linear de Pearson, com posterior rotação da matriz por Varimax. As análises estatísticas foram executadas com auxílio do software XLSTAT-Base® (ADDINSOFT, 2017).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Trocas gasosas

A pulverização foliar de *A. brasilense* incrementou a taxa assimilatória líquida de CO₂ em 30,50% (Figura 1A), sendo o único tratamento que diferiu do controle. Conjuntamente, a condutância estomática e transpiração da planta foram incrementadas (Figuras 1B e 1C) pelo mesmo tratamento, indicando adequado status hídrico interno das plantas que receberam a pulverização de *A. brasilense*.

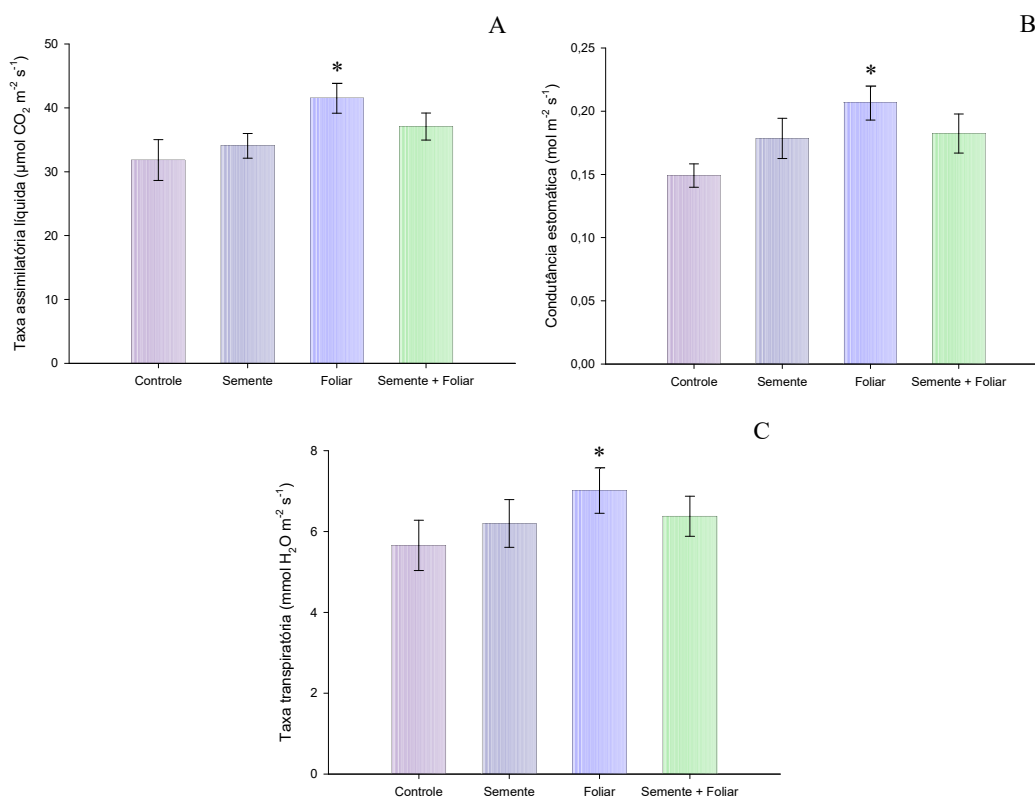


Figura 1 - Taxa assimilatória líquida de CO₂ (A), condutância estomática (B), e taxa transpiratória (C) de folhas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

A pulverização foliar de *A. brasilense* possibilitou, portanto, que as plantas de milho apresentassem melhor status hídrico, sem afetar a eficiência da fixação de moléculas de carbono

em relação à quantidade de moléculas de água transpiradas, visto que a variável WUE não foi significativa. Isto indica que a pulverização de *A. brasilense* possibilita melhores taxas fotossintéticas em boas condições de disponibilidade hídrica quando comparado ao controle.

4.3.2 Fluorescência da clorofila *a*

As medidas de fluorescência da clorofila *a* afetadas pelos tratamentos avaliados foram, em sua maioria, superiores quando na presença de pulverização foliar de *A. brasilense*. De forma geral, medidas efetuadas em folhas adaptadas ao escuro não apresentaram significância, sendo apenas variáveis mensuradas em folhas adaptadas à luz distintas do controle. Ressalta-se que folhas adaptadas à luz representam variáveis classificadas como efetivas, ou seja, representam a capacidade real das plantas sob determinada condição ambiental, como neste caso, a luminosidade de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A fluorescência variável efetiva sofreu incremento de 40,41% em relação ao controle quando aplicado *A. brasilense* via pulverização foliar (Figura 2). Este resultado representa que, no regime de luminosidade de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a pulverização foliar de *A. brasilense* incrementa a capacidade efetiva do centro de reação P680 em receber elétrons. Visto que os fótons estão chegando na mesma intensidade luminosa, o efeito proporcionado pela pulverização de *A. brasilense* permite às folhas de milho aproveitarem maiores quantidades de elétrons.

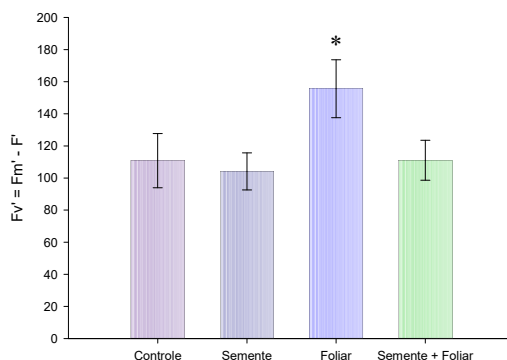


Figura 2 - Fluorescência variável efetiva de folhas adaptadas à luz de plantas de milho submetidas à inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

A eficiência quântica do fotossistema II (Figura 3A), assim como a eficiência quântica de assimilação de CO₂ (Figura 3B) reforçam os benefícios da pulverização de *A. brasilense* para a capacidade fotossintética do milho. Respectivamente, as elevações de 23,99% e 28,10% nos valores de eficiência quântica correspondem a incrementos no aproveitamento da energia luminosa para geração de energia fotoquímica via redução do NADPH₂ e formação de ATP.

O aumento desta energia convertida em poder redutor e ATP na fase fotoquímica, proporcionado pela pulverização de *A. brasilense*, é também melhor aproveitada de forma direta no ciclo de Calvin, perfazendo com que 17,13% dos 23,99% a mais de energia que passa pelo fotossistema II (Figura 3A) sejam efetivamente aproveitados na assimilação líquida de CO₂ (Figura 3B).

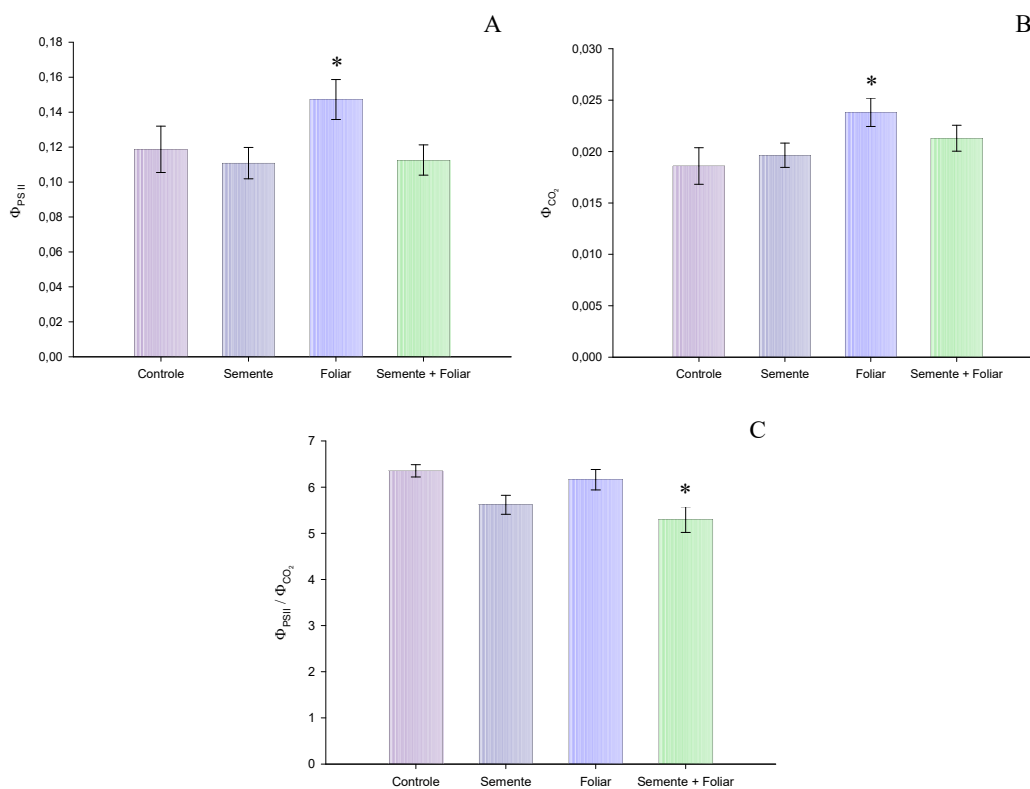


Figura 3 -Eficiência quântica efetiva do fotossistema II (A), eficiência quântica efetiva de assimilação de CO₂ (B), e eficiência quântica efetiva do PS II para fixação de CO₂ (C) de folhas de milho submetido inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

Quando se trata de conversão da energia luminosa em efetiva assimilação de CO₂, aplicações combinadas de *A. brasilense*, evidenciado pela inoculação via semente associada à

pulverização foliar (Figura 3C), também apresentam vantagens em relação ao controle, visto que alavanca o processo interno de utilização desta energia na assimilação de CO₂, remanejando 16, 63% a mais de energia absorvida fotoquimicamente para utilização específica no ciclo de Calvin. Em outras palavras, para cada elétron que é utilizado efetivamente para fixação de CO₂, é necessário que o tratamento controle aproveite 6,38 elétrons pelo fotossistema II, contra apenas 5,28 elétrons aproveitados pelo fotossistema II para plantas que receberam inoculação via semente associada à aplicação foliar de *A. brasilense*.

A taxa aparente de transporte eletrônico consumido fotoquimicamente e a taxa aparente de transporte eletrônico consumido para fixação de CO₂ (Figura 4A e 4B) demonstram o incremento na eficiência da utilização energética da luminosidade nos eventos metabólicos, proporcionados pela pulverização foliar de *A. brasilense* no milho. Sabendo-se que um μmol de fótons possui potencial teórico de excitar um μmol de elétrons, dos $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que incidiram no filoplano, a pulverização de *A. brasilense* permite que o sistema antena utilize $20,40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a mais na atividade fotoquímica da fotossíntese, e $3,74 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ deste incremento é diretamente aproveitado no processo de assimilação de CO₂ quando comparado ao controle.

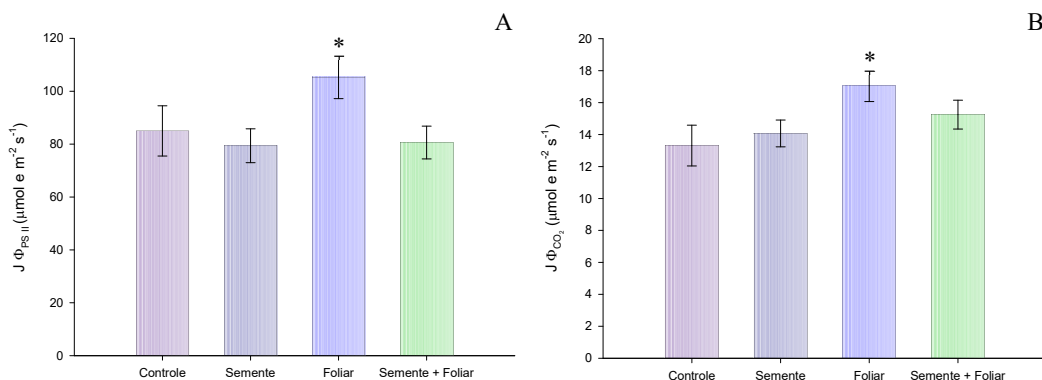


Figura 4 -Taxa aparente de transporte eletrônico consumido fotoquimicamente (A) e taxa aparente de transporte eletrônico consumido para fixação de CO₂ (B) de folhas de milho submetido inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

Apesar da não significância dos *quenchings* de redução fotoquímica e não fotoquímica com relação as utilizações de *A. brasilense*, a Figura 5 evidencia as alterações no balanço de aproveitamento energético por parte dos tratamentos adotados.

Sabe-se que a fotossíntese não é um evento físico completamente eficiente quanto ao aproveitamento da energia luminosa disponível, tendo grandes perdas entre a captação desta energia até a excitação eletrônica do centro de reação P680. Após esta excitação, o aproveitamento energético se torna elevado até a finalização dos eventos carboxilativos. Contudo, do ponto de vista de aproveitamento de energia luminosa incidente, os dados anteriores evidenciaram a superioridade da pulverização de *A. brasilense* quando comparado ao controle. Apesar das perdas existentes, a pulverização de *A. brasilense* permitiu que as folhas de milho aproveitassem 14,75% da energia luminosa incidente, contra uma média de 11,40% dos demais tratamentos.

Em relação à fração das perdas que inferem ao *quenching* de redução fotoquímica ($F\Phi_{f,D}$), compreendido pelas perdas por fluorescência (f) e por dissipação de calor de forma constitutiva (D), poucas alterações são evidenciadas, com ligeira tendência de aumento de perdas para a pulverização foliar de *A. brasilense*.

Contudo, quando se explora o *quenching* de redução não fotoquímica (Φ_{NQP}), nota-se redução mais acentuada de perdas energéticas para o tratamento de pulverização foliar. O *quenching* de redução não fotoquímico representa a energia que é dissipada via gradiente eletroquímico (ΔpH) pelos carotenoides, sendo que plantas de milho pulverizadas com *A. brasilense* dissipam 35,33% dessa energia como Φ_{NQP} , e os demais tratamentos dissipam em média 40,86% da energia por esta via.

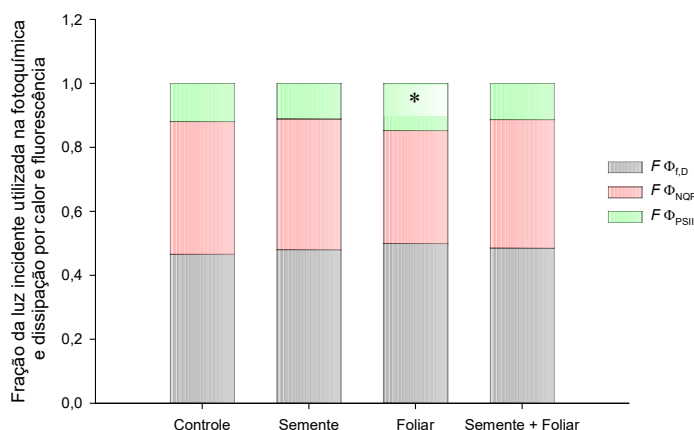


Figura 5 - Fração estimada da irradiância absorvida consumida fotoquimicamente ($F\Phi_{PSII}$), dissipada por regulação térmica via gradiente eletroquímico (ΔpH) e carotenoides ($F\Phi_{NQP}$), e dissipada constitutivamente por calor e fluorescência ($F\Phi_{f,D}$) de folhas de milho submetido inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

Quando pulverizado com *A. brasilense*, o milho consegue redirecionar 59, 90% desta redução de perdas do *quenching* não fotoquímico diretamente para ser aproveitado pelo fotossistema II, tornando o processo mais eficiente e reduzindo os impactos que altas luminosidades têm sobre os pigmentos acessórios, como clorofilas *b* e carotenoides.

4.3.3 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (Figura 6), formada pelos dois componentes principais absorvendo 86,85% da variância total, indicou forte correlação da fotossíntese líquida com as diversas medidas de condutância estomática, eficiência de uso da água, eficiência de carboxilação, fluorescência máxima (escuro e claro), fluorescência variável (escuro e claro), teores de antocianinas, eficiência quântica máxima do fotossistema II e eficiência quântica efetiva do fotossistema II. Também é possível constatar correlação da fotossíntese com o *quenching* de redução fotoquímico. O incremento destas variáveis citadas relacionou-se ao tratamento de pulverização foliar de *A. brasilense*.

Por outro lado, a taxa de fotossíntese líquida foi inversamente proporcional às concentrações de CO₂ na câmara subestomática. Decréscimos nas perdas de energia pelo *quenching* de redução não fotoquímico, teor de carotenoides e relação clorofila *a/b* foram antagônicas a fotossíntese líquida, visto que a mesma foi estimulada quando verificou-se decréscimo nas variáveis anteriormente citadas.

De forma geral, a diferenciação dos tratamentos estudados foi bem evidente, com o componente principal 1, responsável por 67,04% da variação, distinguindo fortemente o tratamento controle da pulverização foliar de *A. brasilense*, confirmando os resultados univariados encontrados pelos testes F de Fisher e de Dunnett anteriormente descritos.

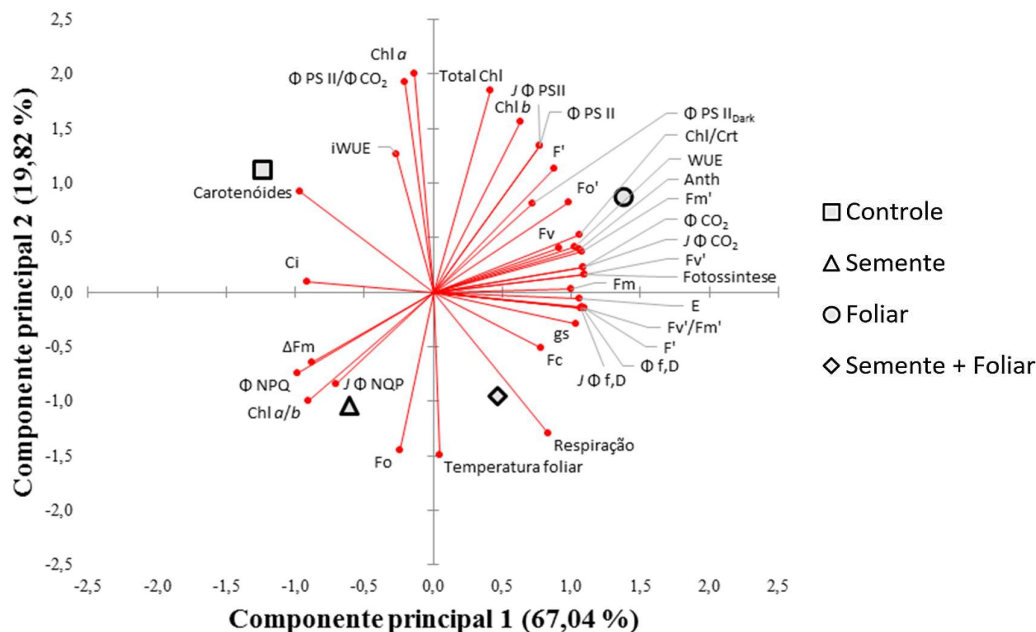


Figura 6 - Análise de componentes principais de plantas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense*. Ci: concentração interna de CO₂ na câmara subestomática; gs: condutância estomática; E: taxa de transpiração foliar; WUE: eficiência do uso da água; iWUE: eficiência intrínseca do uso da água; Fc: eficiência de carboxilação; Fo: fluorescência mínima de folhas adaptadas ao escuro; Fm: fluorescência máxima de folhas adaptadas ao escuro; Fv: fluorescência variável de folhas adaptadas ao escuro; Fo': fluorescência mínima de folhas adaptadas a luz; Fm': fluorescência efetiva de folhas adaptadas a luz; Fv': fluorescência variável efetiva de folhas adaptadas a luz; F': fluorescência estacionária de folhas adaptadas a luz; ΦPSII_{Dark}: eficiência quântica máxima do fotossistema II; ΦPSII: eficiência quântica efetiva do fotossistema II; ΦCO₂: eficiência quântica efetiva de fixação de CO₂; ΦPSII / ΦCO₂: eficiência quântica efetiva do fotossistema para fixação de CO₂; ΦNPQ: *queching* de redução não fotoquímica; Φf, D: *queching* de redução fotoquímica; II *J* ΦPSII: taxa aparente de transporte eletrônico consumido fotoquimicamente; *J* ΦCO₂: taxa aparente de transporte eletrônico consumido para fixação de CO₂; *J* ΦNPQ: taxa aparente de transporte eletrônico consumido via *queching* de redução não fotoquímica; *J* Φf, D: taxa aparente de transporte eletrônico consumido via *queching* de redução fotoquímica; Chl *a*: teor relativo de clorofila *a*; Chl *b*: teor relativo de clorofila *b*; Chl *a/b*: relação teor relativo clorofila *a/b*; Total Chl: Teor total de clorofilas; Chl/Crt: relação teor relativo clorofila/carotenoides; Anth: teor relativo de antocianinas.

4.4 DISCUSSÃO

O incremento na taxa assimilatória líquida de CO₂ em plantas C₄ usualmente é resultado da luminosidade incidente no vegetal, que realiza controle por *feedback* da abertura estomática, facilitando a permuta de gases CO₂/O₂ na câmara subestomática. Deste modo, a resistência à difusão destes gases é reduzida, permitindo maior acessibilidade do CO₂ à câmara subestomática para estar prontamente disponível ao processo de assimilação fotossintética na bainha clorofilada. Já a modulação da abertura estomática é diretamente dependente do status hídrico interno do vegetal. Ou seja, se a taxa de absorção deste recurso pelas raízes for baixa, a

planta buscará controlar a perda de água por transpiração via fechamento estomático (DRAKE; FROEND; FRANKS, 2013) (Figura 1).

Nota-se, portanto, que a taxa fotossintética respondeu semelhantemente à transpiração foliar (R^2 96,09%) e a condutância estomática (R^2 90,23%) (Figura 1), indicando que a reposição hídrica pelas raízes do tratamento com pulverização foliar é superior ao controle. Durante a atividade da pulverização, parte da calda atinge o vegetal como alvo, contudo, a maior porção deste volume chega ao solo, visto que no estágio V₄ o índice de área foliar do milho ainda é baixo. Na presença de água e umidade, o *A. brasilense* aplicado encontra a rizosfera do milho em momento que oferece condições adequadas para associação (QUADROS et al., 2014), multiplicando-se e desencadeando seus efeitos benéficos (PEDRAZA, 2008).

Neste sentido, a produção hormonal pelo *A. brasilense* ganha destaque na elevação do contato raiz/solo do milho (OLIVEIRA; ARRUDA; BACH, 2004), sendo comandado pela produção de ácido indol-acético (MASCIARELLI et al., 2013), seguido da secreção de cadaverina (CASSÁN et al., 2009b) e estímulo nos níveis de óxido nítrico (ALEN'KINA; NIKITINA, 2012). Estes três fatores em conjunto atuam impulsionando a produção de pêlos radiculares, principais responsáveis pelo aumento da superfície de contato radicular, corroborando o aumento da taxa fotossintética encontrada neste ensaio com os efeitos desencadeados pelo *A. brasilense* reportados na literatura (DEL AMOR; CUADRA-CRESPO, 2012; KANNAN; PONMURUGAN, 2010).

A pulverização de *A. brasilense* também incrementou a fluorescência variável efetiva (Figura 2), que representa a capacidade de reserva dos centros de reação P680 disponível para redução, e que está relacionado diretamente à eficiência de interceptação energética para formação de poder redutor (NADPH) e energia (ATP) (BAKER, 2008; VIEIRA et al., 2010). Vale ressaltar que o aumento da fluorescência variável efetiva permite ao fotossistema II transportar mais elétrons no mesmo intervalo de tempo (MURCHIE; LAWSON, 2013). Em outras palavras, o aumento na capacidade da fluorescência variável efetiva relaciona-se à competência do centro de reação P680 em aproveitar picos de radiação e consequentemente se auto proteger de danos por excesso de luz (MÜH et al., 2012), aumentando a taxa fotossintética (Figura 1A) e reduzindo o risco de formação de espécies reativas de oxigênio.

Diversos trabalhos têm evidenciado na última década os efeitos de bactérias do gênero *Azospirillum* no aumento da taxa fotossintética em várias espécies cultivadas, como arroz (KANNAN; PONMURUGAN, 2010), tomate (ESQUIVEL-COTE et al., 2010), pimentão (DEL AMOR; CUADRA-CRESPO, 2012) e alface (FASCIGLIONE et al., 2015). Contudo, poucos estudos aprofundam-se em especificar onde ocorrem estes incrementos, sejam nas

reações luminosas ou nas reações carboxilativas da fotossíntese. Dentre os que buscam maiores evidências, os mesmos não indicam efeitos quanto à eficiência do fotossistema II e fluorescência da clorofila *a* (DEL AMOR; CUADRA-CRESPO, 2012; DEL AMOR; PORRAS, 2009) promovidos por *Azospirillum* sp. em condições adequadas de cultivo, contrapondo as tendências encontradas no presente ensaio. Estes resultados positivos induzidos por *Azospirillum* na eficiência quântica do fotossistema II são relatados somente em condições de estresse abiótico elevado (GAJDOS et al., 2012; RUÍZ-SÁNCHEZ et al., 2011), sendo os dados pouco discutidos pelos autores a respeito de seus fatores elicitores.

A eficiência quântica do fotossistema II é dependente de diversos fatores, incluindo o número de cloroplastos e teor de clorofila foliar (BHATTACHARYYA; JHA, 2012), sendo que alterações nestes fatores podem modular a eficiência do fotossistema II na excitação da clorofila e transporte eletrônico, como relatado em arroz inoculado com outras espécies de microrganismos promotores de crescimento vegetal (NUNKAEW et al., 2014). Em relação ao *Azospirillum*, diversos trabalhos evidenciam seu poder em incrementar teores de clorofila *a* e outros pigmentos fotossintetizantes (BASHAN et al., 2006; BATTISTUS et al., 2014; CURÁ et al., 2017; DATTA et al., 2009; FASCIGLIONE et al., 2015; ZAREA et al., 2012). Mesmo na ausência de resultados significativos no presente estudo para estes pigmentos, o incremento na eficiência quântica do fotossistema II foi modulado pela pulverização de *A. brasilense* (Figura 3A), permitindo que mais elétrons sejam aproveitados por unidade de tempo pelo fotossistema II (Figura 4A).

A eficiência quântica de fixação de CO₂, incrementada pela pulverização de *A. brasilense* (Figura 3B), exibiu fortes correlações positivas ($p < 0,05$) com a relação clorofilas totais/carotenoides (R^2 97,68%), teor de antocianinas (R^2 92,66%), taxa aparente de transporte de elétrons dissipados fotoquimicamente (R^2 94,74%), e forte correlação negativa com a taxa aparente de transporte de elétrons dissipados não fotoquimicamente (R^2 99,58%) (Figura 6). Deste modo, o *A. brasilense* pulverizado tornou as folhas de milho mais eficientes no aproveitamento de elétrons captados pela folha para fixação de CO₂ (Figura 4B), dissipando menos energia excedente para os carotenoides, e investindo metabólitos no aumento do poder antioxidante das antocianinas (COHEN et al., 2015) para evitar danos à proteína D1 do centro de reação P680 (BARBOSA et al., 2014; DAS et al., 2011) e manter a fotossíntese em níveis elevados (Figura 1A).

Vale ressaltar, também, que o teor de clorofila *a* apresentou forte correlação positiva ($p < 0,05$ e R^2 96,49%) (Figura 6) com a eficiência quântica do fotossistema II para fixação de CO₂ (relação Φ_{PSII}/Φ_{CO_2}), indicando que as pequenas modulações nos valores deste pigmento,

não detectadas pelo teste F, colaboram para o menor aproveitamento de elétrons na fixação efetiva de CO₂. Em outras palavras, a elevação dos teores de clorofila *a* demandam que mais elétrons passem pelo fotossistema II para que uma unidade eletrônica dessas seja aproveitada efetivamente na fixação de CO₂, onde o *A. brasilense* inoculado via semente aliado à pulverização foliar aprimorou este aproveitamento eletrônico nas reações carboxilativas (Figura 4C), reduzindo excedentes que poderiam gerar espécies reativas de oxigênio via reação de Mehler (SHI et al., 2008; ZHU et al., 2012)

Apesar de não encontradas diferenças via teste F, a análise de componentes principais indicou que o aumento na relação teor de clorofilas/carotenoides e no teor de antocianinas teve peso decisivo para a pulverização foliar de *A. brasilense* (Figura 6), apresentando correlação significativa ($p < 0,05$) com a fotossíntese líquida (R^2 de 96,57% e 91,81%, respectivamente). Deste modo, maiores valores de relação entre estes pigmentos elevam a taxa de fotossíntese líquida e a eficiência quântica do fotossistema II, devido aos incrementos no teor de clorofila disponível para excitação luminosa (ZAREA et al., 2012), eliciados pelo *A. brasilense* pulverizado. No caso da redução nos teores de carotenoides, reduz-se consequentemente o *quenching* de redução não fotoquímico, repassando a energia que não é aproveitada pela eficiência quântica do fotossistema II para ser dissipada por calor constitutivo e fluorescência ou *quenching* de redução fotoquímico (Figura 5).

Ensaio avaliando o status hídrico e fluorescência da clorofila *a* modulados pela aplicação de ácido abscísico em milho (SOUZA et al., 2013) descrevem resultados semelhantes aos verificados no presente estudo, que corroboram às discussões apresentadas. De acordo com estes autores, plantas com adequado status hídrico apresentam maior condutância estomática, e consequentemente maior taxa fotossintética líquida (Figura 1). Estas plantas que exibiram maior fotossíntese também expuseram maiores taxas aparentes de transporte eletrônico consumido fotoquimicamente (Figura 4A), sendo que a energia excedente preferencialmente é dissipada por *quenching* de redução fotoquímico em decréscimo ao *quenching* de redução não fotoquímico (Figura 5), impulsionando a eficiência quântica do fotossistema II (Figura 3A) (SOUZA et al., 2013). Ressalta-se que estes autores inter-relacionam estas variáveis com o status hídrico do vegetal, comprovado neste estudo pela maior condutância estomática e transpiração (Figura 1B e 1C).

Confrontando estas informações com a realidade do presente estudo, a pulverização com *Azospirillum* tende a induzir a produção de auxinas (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014; MASCIARELLI et al., 2013) e ácido abscísico (COHEN et al., 2009, 2015; COHEN; BOTTINI; PICCOLI, 2008), gerando mecanismos de resistência para reposição e

manutenção de turgescência (KUDOYAROVA et al., 2011; ZHAO et al., 2012), indicando que modulações no status hídrico do vegetal tem forte influência sobre a atividade do fotossistema II (SOUZA et al., 2013).

A análise de componentes principais também evidenciou que pequenas variações em pigmentos fotossintéticos e auxiliares não devem ser desprezadas quando não significativos univariadamente, visto que estão intrinsicamente ligadas a procedimentos fotossintéticos posteriores, podendo apresentar efeitos cumulativos nos resultados ao longo do metabolismo vegetal de assimilação de CO₂.

4.5 CONCLUSÃO

Plantas de milho pulverizadas no estágio V₄ com *A. brasilense* possuem maiores taxas fotossintéticas impulsionadas desde a atividade de excitação eletrônica e transporte de elétrons no centro de reação P680 do fotossistema II, assim como apresentam maior eficiência ao longo da cadeia transportadora de elétrons até a assimilação efetiva do CO₂, mesmo que estas plantas não exibam alterações estatisticamente significativas nos teores de pigmentos foliares relacionados à fotossíntese.

4.6 REFERÊNCIAS

AHMADI-RAD, S. et al. Foliar application of nitrogen fixing bacteria increases growth and yield of canola grown under different nitrogen regimes. **Rhizosphere**, v. 2, p. 34–37, 2016.

ALEN'KINA, S. A. ; NIKITINA, V. E. Effect of lectins from *Azospirillum brasilense* to peroxidase and oxalate oxidase activity regulation in wheat roots. **Biology Bulletin**, v. 37, n. 1, p. 105–108, 2010.

ALEN'KINA, S. A. ; NIKITINA, V. E. *Azospirillum* lectin-induced changes in nitric oxide content in wheat seedling roots. **Russian Agricultural Sciences**, v. 37, n. 6, p. 462–464, 2012.

ASKARY, M. et al. Influence of the co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2, 4-D on grain yield and N, P, K content of *Triticum aestivum* (Cv . Baccros and Mahdavi). **American-Eurasian Journal Agricultural & Environmental Science**, v. 5, n. 3, p. 296–307, 2009.

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 89–113, 2008.

- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.
- BASHAN, Y. et al. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 4, p. 279–285, 2006.
- BATTISTUS, A. G. et al. Synergistic action of *Azospirillum brasilense* combined with thiamethoxam on the physiological quality of maize seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 49, p. 4501–4507, 2014.
- BHATTACHARYYA, P. N. ; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.
- BULEGON, L. G. et al. 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.
- CASSÁN, F. et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 12–19, 2009.
- CASSÁN, F. ; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.
- 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.
- CHAVES, M. M. ; FLEXAS, J. ; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009.
- COHEN, A. C. et al. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. **Botany**, v. 87, n. 5, p. 455–462, 2009.
- COHEN, A. C. et al. *Azospirillumbrasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Physiologia Plantarum**, v. 153, n. 1, p. 79–90, 2015.
- COHEN, A. C. ; BOTTINI, R. ; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, v. 54, n. 2, p. 97–103, 2008.
- CURÁ, A. et al. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 41, 2017.
- DAS, P. K. et al. Photosynthesis-dependent anthocyanin pigmentation in *Arabidopsis*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 1, p. 23–25, 2011.

- DATTA, J. K. et al. Impact of combined exposure of chemical, fertilizer, bio-fertilizer and compost on growth, physiology and productivity of *Brassica campestris* in old alluvial soil. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 5 Suppl, p. 797–800, 2009.
- DEL AMOR, F. M. ; CUADRA-CRESPO, P. Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 1, p. 82, 2012.
- DEL AMOR, F. M. ; PORRAS, I. Effects of plant-growth-promoting bacteria on growth and yield of pepper under limited nitrogen supply. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 89, n. 2, p. 349–358, 2009.
- DRAKE, P. L. ; FROEND, R. H. ; FRANKS, P. J. Smaller, faster stomata: Scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 495–505, 2013.
- EARL, H. J. ; TOLLENAAR, M. Maize leaf absorptance of photosynthetically active radiation and its estimation using a chlorophyll meter. **Crop Science**, v. 37, n. 2, p. 436, 1997.
- EARL, H. J. ; TOLLENAAR, M. Relationship between thylakoid electron transport and photosynthetic CO₂ uptake in leaves of three maize (*Zea mays* L.) hybrids. **Photosynthesis Research**, v. 58, n. 3, p. 245–257, 1998.
- EL-LATTIEF, E. A. A. Use of *Azospirillum* and *Azobacter* bacteria as biofertilizers in cereal crops: a review. **International Journal of Research in Engineering and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 36–44, 2016.
- ESQUIVEL-COTE, R. et al. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1–2, p. 65–75, 2010.
- FASCIGLIONE, G. et al. *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 154–162, 2015.
- FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016.
- FUKAMI, J. et al. 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.
- GAJDOS, É. et al. Effects of biofertilizers on maize and sunflower seedlings under cadmium stress. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 43, n. 1–2, p. 272–279, 2012.
- GENTY, B. ; BRIANTAIS, J. -M. ; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 990, n. 1, p. 87–92, 1989.
- HENDRICKSON, L. ; FURBANK, R. T. ; CHOW, W. S. A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. **Photosynthesis Research**, v. 82, n. 1, p. 73–81, 2004.

- HOSSAIN, M. et al. Effects of *Azospirillum* isolates from paddy fields on the growth of rice plants. **Research in Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 15–22, 2015.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1–2, p. 413–425, 2010.
- KANNAN, T. ; PONMURUGAN, P. Response of paddy (*Oryza sativa* L.) varieties to *Azospirillum brasiliense* inoculation. **Journal of Phytology**, v. 2, n. 6, p. 8–13, 2010.
- KAUSHAL, M. ; WANI, S. P. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. **Annals of Microbiology**, 2015.
- KLEIN, J. et al. Qualidade nutricional de plântulas de cultivares de trigo submetidas à inoculação com *Azospirillum*, bioestimulante e triadimenol. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. Suplemento, p. 59–69, 2012.
- KUDOYAROVA, G. et al. Involvement of root ABA and hydraulic conductivity in the control of water relations in wheat plants exposed to increased evaporative demand. **Planta**, v. 233, n. 1, p. 87–94, 2011.
- LICHTENTHALER, H. K. ; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001. v. 2–2p. 153–199.
- MASCIARELLI, O. et al. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590–597, 2013.
- MÜH, F. et al. Light-induced quinone reduction in photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1817, n. 1, p. 44–65, 2012.
- MURCHIE, E. H. ; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 13, p. 3983–3998, 2013.
- NOVAIS, R. F. ; NEVES, J. C. L. ; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In: **Métodos de esquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA, 1991. p. 189–198.
- NUNKAEW, T. et al. Effects of 5-aminolevulinic acid (ALA)-containing supernatants from selected *Rhodospseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCl stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 19–26, 2014.
- OLIVEIRA, A. A. S. ; ARRUDA, T. F. ; BACH, E. E. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **ConScientiae Saúde**, v. 3, p. 29–35, 2004.
- PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 25–35, 2008.

QUADROS, P. D. DE et al. Desempenho agrônomo a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014.

RODRIGUEZ, H. ; GONZALEZ, T. ; GOIRE, I. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp . **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552–555, 2004.

RUIZ-SÁNCHEZ, M. et al. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1031–1037, 2011.

SANTOS, H. G. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília: Embrapa Solos, 2018. 356 p.

SARANRAJ, P. ; SIVASAKTHIVELAN, P. *Azospirillum* and its formulations: A Review. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 3, p. 275–287, 2013.

SHI, K. et al. Root restriction-induced limitation to photosynthesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 117, n. 3, p. 197–202, 2008.

SOUZA, T. C. et al. The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 2, p. 515–527, 2013.

STRACK, D. ; WRAY, V. Anthocyanins. In: [s. l: s. n.]. v. 1p. 325–356.

TORTORA, M. L. ; DÍAZ-RICCI, J. C. ; PEDRAZA, R. O. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 279–290, 2012.

VASS, I. ; CSER, K. Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 4, p. 200–205, 2009.

VIEIRA, D. A. DE P. et al. Fluorescência e teores de clorofilas em abacaxizeiro cv. pérola submetido a diferentes concentrações de sulfato de amônio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 360–368, 2010.

ZAREA, M. J. et al. Effect of *Piriformosporaindica* and *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 45, p. 139–146, 2012.

ZHANG, S. et al. Temperature-dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO₂ assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday high irradiance. **Photosynthetica**, v. 39, n. 3, p. 383–388, 2001.

ZHAO, M. et al. Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 4, p. 671–685, 2012.

ZHU, J. et al. The interactive effects of water and fertilizer on photosynthetic capacity and yield in tomato plants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 2, p. 200–209, 2012.

ZUFFO, A. M. et al. Path analysis in soybean cultivars grown under foliar spraying and furrow inoculation with *Azospirillumbrasilense*. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 10, p. 137, 2017.

5 CAPÍTULO 4: ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA IMPULSIONADA POR *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* EM MILHO

Resumo: A otimização do aproveitamento dos recursos ambientais é ponto crucial a ser explorado pela agricultura mundial para atingir patamares mais altos de produtividade. Microrganismos promotores de crescimento vegetal vem sendo adicionados ao sistema produtivo buscando melhor aproveitamento do ambiente. Deste modo, objetivou-se avaliar os efeitos de *Azospirillum brasilense* sob a atividade do sistema carboxilativo de plantas de milho a crescentes taxas luminosas e concentração de CO₂ intercelular. Definiu-se como tratamentos, inoculação via semente; pulverização foliar ao estágio V4; e inoculação via semente + pulverização foliar de *A. brasilense*, adicionados de controle. Curvas de resposta de trocas gasosas em função da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos foram construídas em intervalo variando do escuro até 2500 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao estágio V₁₂ e R₃. Também no estágio R₃ construiu-se curvas em resposta a concentrações intercelulares de CO₂ crescentes. A adição de *A. brasilense* via semente ou pulverização foliar possibilitou maiores taxas fotossintéticas acima de 500 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luminosidade facilmente superada na maior parte do dia. Estes maiores níveis fotossintéticos são baseados em maiores taxas transpiratórias devido à oferta de água nos tecidos foliares, mantendo a condutância estomática para permuta de gases, mais proeminentes no estágio V₁₂. A atividade das enzimas carboxilativas do metabolismo C₄ também foram incrementadas sob elevadas concentrações de CO₂ intercelular. Em suma, a adição de *A. brasilense* via semente ou pulverização foliar promove melhor aproveitamento luminoso e atividade de enzimas carboxilativas.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento vegetal; RUBPcase; PEPcase.

5.1 INTRODUÇÃO

A otimização do aproveitamento dos recursos ambientais por parte das plantas é ponto crucial a ser explorado pela agricultura mundial, visando reduzir a diferença entre o potencial produtivo e a produtividade atual das culturas (FISCHER, 2015). Para tanto, a adoção e compreensão de inovações tecnológicas e seus efeitos na fisiologia vegetal que possibilitem melhor aproveitamento da água, luminosidade e tolerância a temperaturas desfavoráveis são ferramentas importantes a serem incorporadas nos sistemas agrícolas atuais (GODFRAY et al., 2010), inclusive em culturas que já apresentam elevada eficiência da exploração de recursos, como o milho (CHEN et al., 2011).

A obtenção de taxas fotossintéticas mais elevadas em uma mesma condição luminosa é resultado de maior acúmulo de pigmentos fotossintéticos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016) e aporte de água aos tecidos fotossintetizantes (GHANNOUM, 2009), proporcionando maior abertura estomática (DRAKE; FROEND; FRANKS, 2013) e facilidade de fornecimento de CO₂ para elevada atividade carboxilativa (LAWLOR; TEZARA, 2009) dos mecanismos fotossintéticos C₄ (UBIERNA; SUN; COUSINS, 2011).

Em seguimento ao melhor aproveitamento luminoso pela planta, é essencial também dar atenção à capacidade da conversão desta energia luminosa em energia a ser aplicada efetivamente nos processos carboxilativos, tratado também como eficiência quântica de fixação de CO₂, sendo mais um ponto importante a ser explorado (ZHU; LONG; ORT, 2010), aumentando a assimilação de CO₂ por ATP sintetizado pela planta. Neste sentido, a exploração do ambiente subterrâneo para captação de água e nutrientes é de primordial importância para o melhor aproveitamento dos recursos ambientais disponíveis na parte aérea das plantas (luminosidade e trocas gasosas).

Efeitos positivos no desenvolvimento vegetal vêm sendo vinculados em ampla escala pela literatura mundial à adoção de bactérias promotoras de crescimento vegetal (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; EL-LATTIEF, 2016; KAVAMURA et al., 2013; SARANRAJ; SIVASAKTHIVELAN, 2013). Estas bactérias estimulam o desenvolvimento devido a maiores taxas carboxilativas pelo melhor aproveitamento dos recursos ambientais, principalmente água e luz (BULEGON et al., 2017b; HUSSAIN et al., 2016; KANNAN; PONMURUGAN, 2010; RUÍZ-SÁNCHEZ et al., 2011).

Dentre vasta gama de bactérias promotoras de crescimento vegetal, destaca-se o gênero *Azospirillum* (EL-LATTIEF, 2016), utilizado principalmente em associação a gramíneas (SARANRAJ; SIVASAKTHIVELAN, 2013), provendo complexo de estímulos bioreguladores quando associado aos vegetais (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014).

O complexo de estímulos mediados pelas bactérias é liderado pela produção e excreção de hormônios promotores de crescimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citocininas (DIMKPA; WEINARD; ASCH, 2009; ESQUIVEL-COTE et al., 2010; MASCIARELLI et al., 2013), atividade da enzima ACC-deaminase e redução dos níveis endógenos de etileno (ESQUIVEL-COTE et al., 2010), poliaminas para resistência ao déficit hídrico (CASSÁN et al., 2009b) aliado à atividade do óxido nítrico para formação de pelos radiculares (ALEN'KINA; NIKITINA, 2012; DI PALMA et al., 2013), solubilização de fosfatos (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014), dentre outros efeitos indiretos (LARRABURU; BUSUSCOVICH; LLORENTE, 2016; LARRABURU; LLORENTE, 2015).

O conjunto de mecanismos descrito promove maior desenvolvimento do sistema radicular (LLORENTE; ALASIA; LARRABURU, 2016; MOUTIA et al., 2010), permitindo ao mesmo maior busca por água e nitrogênio (HUNGRIA et al., 2010; MARQUES et al., 2017; NOVAKOWISKI et al., 2011), refletindo-se em desenvolvimento de parte aérea (BATTISTUS et al., 2014; BULEGON et al., 2017b; GUIMARÃES et al., 2014) e ganhos em produtividade (ASKARY et al., 2009; HOSSAIN et al., 2015; QUADROS et al., 2014).

A inserção do *Azospirillum* ao sistema agrícola em grandes culturas não se limita apenas a aplicação via sementes, visto que encontram-se informações a respeito de sua utilização via pulverizações durante estádios vegetativos de diferentes culturas (BULEGON et al., 2017b; FUKAMI et al., 2016, 2017), estimulando sistemas de defesa, pigmentos fotossintéticos e a produtividade (AHMADI-RAD et al., 2016; BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016; ZUFFO et al., 2017).

Portanto, o complexo de estímulos promovido pelo *Azospirillum* permite maior aporte de recursos às plantas, proporcionando condições para que as mesmas atinjam maiores taxas carboxilativas. Visto o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade do sistema carboxilativo de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense*, via semente e/ou pulverização foliar, em crescentes taxas luminosas e de CO₂ intercelular.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Tratamentos e delineamento experimental

Estudou-se o comportamento de plantas de milho submetidas a três formas de aplicação de *A. brasilense* (corrig. Tarrand et al.) compreendendo os tratamentos: 1. Controle; 2. Inoculação via semente de *A. brasilense* (100 mL/60.000 sementes); 3. Pulverização foliar de *A. brasilense* (300 mL ha⁻¹) ao estágio V₄; 4. Inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense* nas dosagens e estádios anteriormente citados. O ensaio foi conduzido em blocos casualizados com cinco repetições, com duas plantas por repetição.

5.2.2 Material vegetal e condução experimental

Plantas de milho híbrido Pioneer 30F53 Lepra[®] RR2[™] foram conduzidas a pleno sol em vasos de 25 litros (29 cm x 37 cm x 29 cm; AxDxd) preenchidos com substrato a base de horizonte A+B de LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef) (SANTOS, 2018).

Previamente a semeadura o substrato foi homogeneizado com 50 mg dm⁻³ de N (ureia), 300 mg dm⁻³ de P₂O₅ (superfosfato triplo) e 150 mg dm⁻³ de K₂O (cloreto de potássio) (NOVAIS; NEVES; BARROS, 1991). Ainda segundo a mesma recomendação, foi realizado aporte de 50 mg dm⁻³ de N (ureia) no estágio V₃ da cultura. Baseado na saturação de bases apresentada (V% de 62,68), não foi necessária calagem.

5.2.3 Curvas de resposta a luminosidade

Curvas de resposta de trocas gasosas em função da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (*Photosynthetically Photon Flux Density* - PPF) foram construídas pela redução da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 2500 μmol m⁻² s⁻¹ até 0 μmol m⁻² s⁻¹ (2500; 2000; 1500; 1000; 750; 500; 250; 120; 60; 30; 15; 0 μmol m⁻² s⁻¹). As leituras foram realizadas no período matutino ao estágio V₁₂, entre 09h00min e 11h00min, com teor de CO₂ atmosférico fixado a 400 μmol mol⁻¹, no terço médio de folhas sem lesões representativas do estágio V₁₀, e folhas da espiga ao estágio R₃.

Determinou-se em função da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos a taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (gs), concentração intercelular de CO₂ (C_i), taxa de transpiração da folha (E), além das seguintes relações: $WUE = A/E$, $iWUE = A/gs$ e $Fc = A/C_i$ (ZHANG et al., 2001b), em que WUE corresponde à eficiência do uso de água, $iWUE$ é a eficiência intrínseca do uso de água e Fc é a eficiência de carboxilação. As mensurações de trocas gasosas foram realizadas com o auxílio do equipamento IRGA (*Infra Red Gas Analyser*) modelo LI-6400XT (Licor Inc. Lincoln, Nebraska, USA).

Os dados de resposta de assimilação líquida de CO₂ a densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos abaixo de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram utilizados para cálculo da eficiência quântica aparente (Φ), ajustando equação linear de 0 a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos. Determinou-se também o ponto de compensação luminosa (Γ), verificado no ponto de intersecção da reta com o eixo X.

5.2.4 Curvas de resposta à concentração intercelular de CO₂

Curvas de resposta de trocas gasosas em função da concentração intercelular de CO₂ (C_i) foram construídas pela redução da concentração ambiental de CO₂ (C_a) de 1000 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ até 0 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ (1000; 800; 600; 400; 300; 200; 150; 100; 50; 25; 0 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$). As leituras foram realizadas no período matutino, entre 09h00min e 11h00min, com densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos fixado a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no terço médio de folhas sem lesões da espiga ao estágio R₃.

Determinou-se em função da concentração intercelular de CO₂ a taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (gs), relação concentração ambiental de CO₂/concentração intercelular de CO₂ (C_a/C_i) taxa de transpiração da folha (E), além das seguintes relações: $WUE = A/E$ e $iWUE = A/gs$ (ZHANG et al., 2001b), em que WUE corresponde à eficiência do uso de água e $iWUE$ é a eficiência intrínseca do uso de água. As mensurações foram realizadas com o auxílio do equipamento IRGA (*Infra Red Gas Analyser*) modelo LI-6400XT (Licor Inc. Lincoln, Nebraska, USA).

Os dados de resposta de assimilação líquida de CO₂ concentração ambiental de CO₂ abaixo de 200 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ foram utilizados para cálculo da eficiência quântica aparente (Φ), ajustando equação linear. Determinou-se também o ponto de compensação de CO₂ (Γ), verificado no ponto de intersecção da reta com o eixo X.

5.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade de erro. Na presença de normalidade dos erros, os dados passaram por análise de variância a 5% de probabilidade de erro pelo teste F de Fisher visando comparar o comportamento dos tratamentos com *A. brasilense* ao tratamento controle, e em caso positivo, submetidos a análise de regressão, definindo-se o ajuste mais adequado baseado em modelos significativos, com lógica biológica e elevado valor de coeficiente de determinação (R^2).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Respostas ao fluxo de fótons fotossinteticamente ativos

A assimilação líquida de CO_2 , ou fotossíntese líquida, apresentou comportamentos semelhantes quanto à assimilação máxima de CO_2 , seja no estádio V_{12} (Figura 1A) ou estádio R_3 (Figura 1B). No estádio V_{12} todas as formas e combinações de utilização de *A. brasilense* elevaram a assimilação máxima de CO_2 . O ponto máximo de assimilação foi verificado aos $2500 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, atingindo 28,42; 33,02; 33,91 e 30,28 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para os tratamentos controle, inoculação via semente, pulverização foliar e inoculação via semente + pulverização foliar, respectivamente.

Destaca-se a utilização isolada de *A. brasilense*, seja pela inoculação via semente ou pulverização foliar, como fator estimulante da fotossíntese máxima em 16,18% e 19,30% respectivamente, sendo o valor mais elevado que o incremento de 6,55% promovido pela utilização combinada (inoculação + pulverização) de *A. brasilense*.

O mesmo comportamento manteve-se no estádio R_3 , onde os pontos máximos de fotossíntese foram 27,27; 31,44; 31,89 e 29,55 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para os tratamentos controle, inoculação via semente, pulverização foliar e inoculação via semente + pulverização foliar, respectivamente. A atividade fotossintética em relação ao controle manteve-se semelhante, onde inoculação via semente, pulverização foliar e inoculação via semente + pulverização foliar apresentaram desempenho 15,28%, 16,91% e 8,34% superior ao controle, respectivamente.

Ressalta-se que valores de luminosidade acima de $500 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ iniciam a diferenciação da eficiência fotossintética da inoculação via semente e pulverização foliar

(Figura 1A), sendo esta luminosidade superada facilmente entre às 07:00 e 18:00 horas do dia. O mesmo é verificado para o estágio R₃ sob mesma intensidade luminosa, permitindo melhor desempenho durante 13 horas de iluminação natural diária.

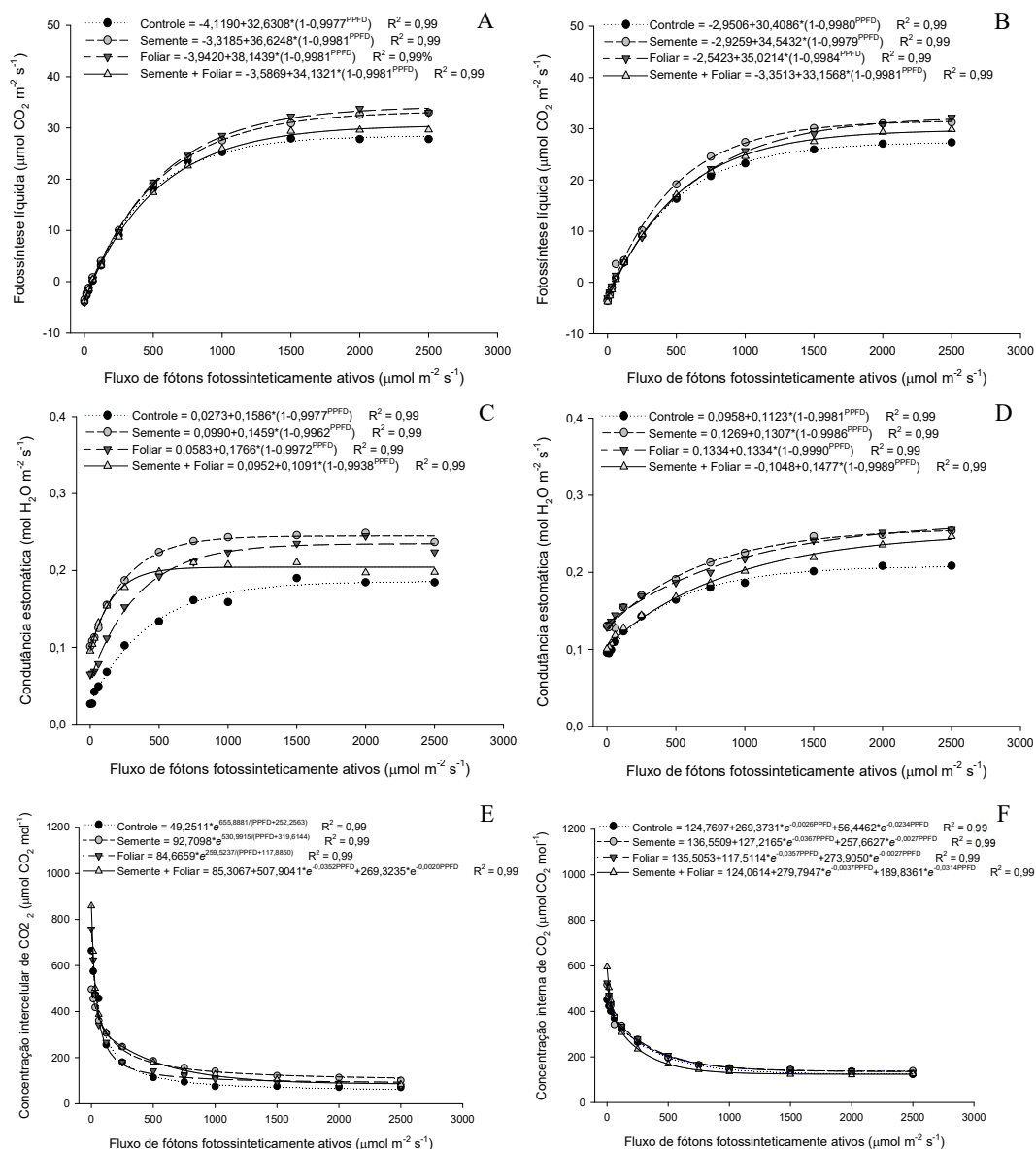


Figura 1 -Fotossíntese líquida (A e B), condutância estomática (C e D) e concentração intercelular de CO₂ (E e F) ao estágio V₁₂ (A, C e E) e estágio R₃ (B, D e F) de folhas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* em resposta a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PPFD) de 0 a 2500 μmol fótons m⁻² s⁻¹.

Em especial, ao estágio R₃, a inoculação via semente de forma isolada demonstrou melhor aproveitamento de luminosidades intermediárias, entre 100 e 1500 μmol fótons m⁻² s⁻¹,

verificados usualmente até as 09:00 horas e após as 15:00 horas, contudo a pulverização apresentou maior pico fotossintético como citado previamente.

A condutância estomática foi elevada em todas as intensidades luminosas pelo *A. brasilense* ao estádio V₁₂ (Figura 1C), destacando-se novamente a inoculação via semente e pulverização foliar utilizados de forma isolada. A combinação das inoculações aproximou-se da abertura máxima aos 500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mantendo-se praticamente estável até os 2500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ao passo que as formas isoladas se aproximaram da estabilização aos 1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apenas.

No estádio R₃ os patameres de estabilização da condutância estomática ocorreram em luminosidades mais elevadas, sendo o controle o primeiro a ser limitado, em 1500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 1D). Inoculação via semente e pulverização foliar apresentaram destaque em todas as luminosidades induzidas, com a combinação demonstrando comportamento intermediário, porém com pico de abertura semelhante aos demais tratamentos com *A. brasilense*.

Induzido pela maior condutância estomática, em luminosidades entre 100 e 1500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no estádio V₁₂, *A. brasilense* em aplicações isoladas, na inoculação via semente e na pulverização foliar, conseguiram manter o aporte de CO₂ do ambiente para a câmara subestomática mais elevado. Acima dos 500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o controle não foi capaz de equiparar a concentração intercelular de CO₂ em relação as utilizações de *A. brasilense*.

A concentração intercelular de CO₂ no estádio R₃ (Figura 1F) destacou a combinação de aplicações de *A. brasilense* inoculado via semente + pulverização foliar entre 100 e 1500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, visto que a fotossíntese sofreu leve incremento nesta faixa (Figura 1B), elevando o consumo de CO₂, e a condutância estomática semelhante ao controle (Figura 1D) reduzindo a entrada de CO₂. Após 1500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a condutância sofreu rápido incremento, que a reaproximou da utilização combinada de *A. brasilense* via semente + pulverização foliar (Figura 1F).

A transpiração foliar foi fortemente afetada pela inoculação via semente e pela pulverização foliar de *A. brasilense* no estádio V₁₂ (Figura 2A), posicionando-se frente aos demais tratamentos. O destaque fica por conta da combinação das formas de utilização da bactéria, pois reduziu drasticamente a transpiração após 250 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, assemelhando-se ao controle. Já ao estádio R₃ todas as aplicações de *A. brasilense* reduziram a taxa transpiratória frente ao controle (Figura 2B), mesmo que em baixa escala.

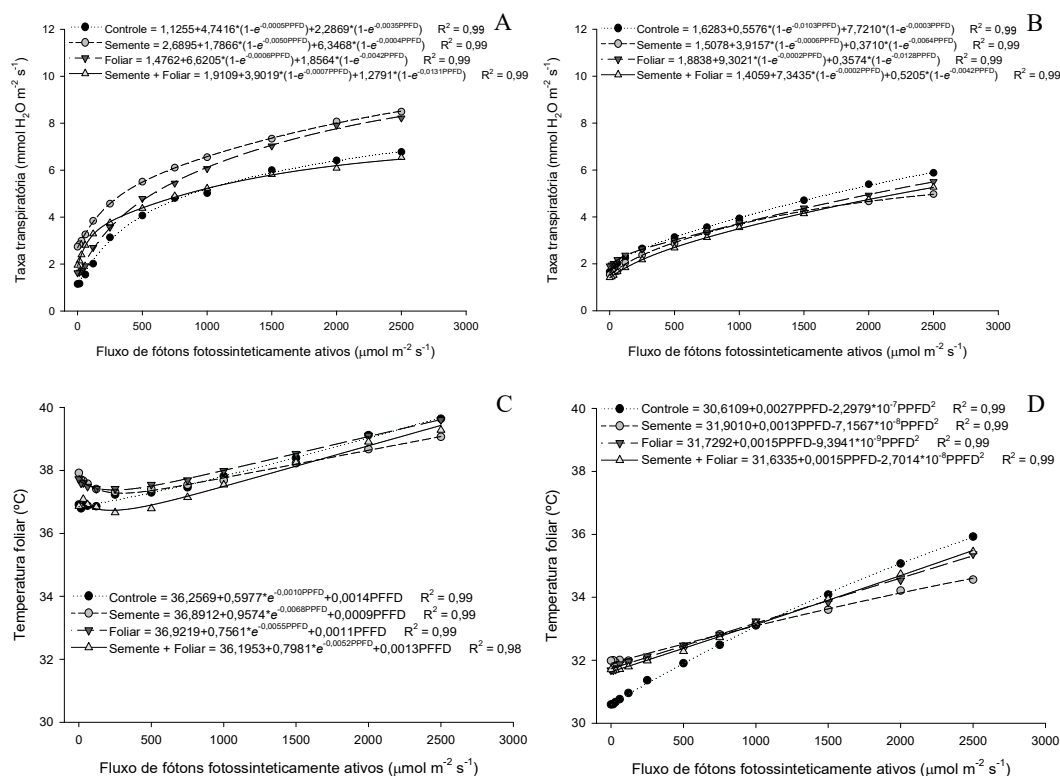


Figura 2 - Taxa transpiratória (A e B) e temperatura (C e D) ao estádio V₁₂ (A e C) e estádio R₃ (B e D) de folhas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* em resposta a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PPFD) de 0 a 2500 μmol fótons m⁻² s⁻¹.

O controle sofreu maior acentuação da temperatura de acordo com o incremento da luminosidade quando comparado as utilizações de *A. brasilense*, seja no estádio V₁₂ (Figura 2C) ou estádio R₃ (Figura 2D), sendo mais proeminente ao estádio R₃. Em baixas intensidades luminosas, para ambos os estádios avaliados, é possível verificar que os tratamentos com *A. brasilense* mantêm a folha de milho levemente mais aquecida, contudo, com a elevação gradativa da luminosidade nota-se que a inoculação, seja via semente, pulverização foliar ou de forma combinada tende a manter a superfície foliar mais arrefecida.

Devido ao elevado aumento da taxa transpiratória, a inoculação via semente e pulverização foliar apresentaram menor eficiência do uso da água no estádio V₁₂ (Figura 3A). Entre 250 e 750 μmol fótons m⁻² s⁻¹ todos os tratamentos com *A. brasilense* reduziram a eficiência do uso da água.

Já ao estágio R₃, devido a maior taxa transpiratória do controle, a utilização de *A. brasilense* elevou a eficiência do uso da água, com destaque a inoculação via semente (Figura 3B), período fenológico em que o aproveitamento de água ganha importância.

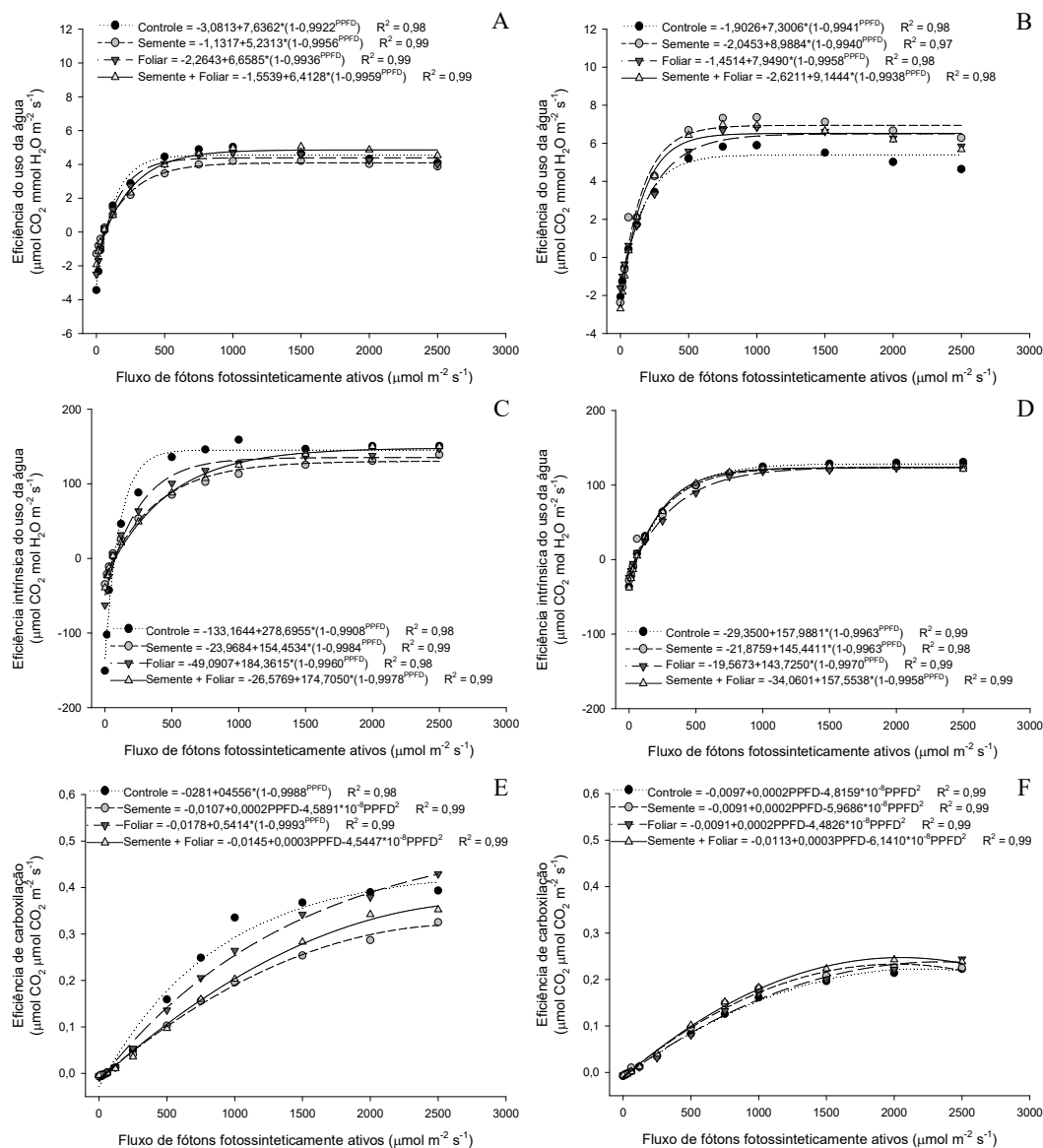


Figura 3 - Eficiência do uso da água (A e B), eficiência intrínseca do uso da água (C e D) e eficiência de carboxilação (E e F) ao estágio V₁₂ (A, C e E) e estágio R₃ (B, D e F) de folhas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* em resposta a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PPFD) de 0 a 2500 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

A eficiência intrínseca do uso da água foi reduzida ao estágio V₁₂ por todas as formas de aplicação de *A. brasilense* (Figura 3C), demandando maior abertura estomática para realizar

a mesma atividade fotossintética do controle em luminosidade determinada. Porém, no estágio R₃ o comportamento foi semelhante entre os tratamentos (Figura 3D).

Eficiência de carboxilação também foi reduzida ao estágio V₁₂ pela adoção de *A. brasilense* (Figura 3E) devido a maior disponibilidade de CO₂ nos espaços intercelulares (Figura 1E) promovido pela maior condutância estomática (Figura 1C). Contudo, ao estágio R₃ a eficiência de carboxilação foi mais elevada para os tratamentos com *A. brasilense*.

Apesar de não apresentar diferenças significativas, a análise da eficiência quântica apresentou pontos de compensação luminosos de 69,40; 53,57; 61,57 e 62,06 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao estágio V₁₂ para os tratamentos controle, inoculação via semente, pulverização foliar e inoculação via semente + pulverização foliar de *A. brasilense*, respectivamente (Figura 4A), onde a menor compensação luminosa para os tratamentos com *A. brasilense* indica redução da respiração no escuro. A eficiência quântica aparente pode ser verificada no coeficiente angular (*a*) da equação, que indica a inclinação da mesma. Pelo inverso deste quociente é possível determinar que os tratamentos citados logo acima demandam 19,61; 18,76; 18,52 e 20,61 μmol fótons para fixar 1 μmol CO₂, respectivamente, demonstrando melhor aproveitamento luminoso do milho proporcionado pela utilização de *A. brasilense* via semente ou pulverização foliar de forma isolada.

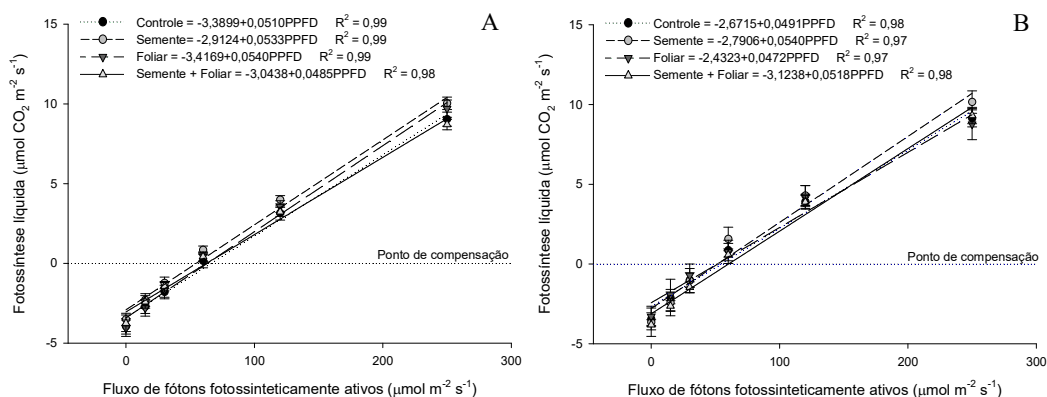


Figura 4 - Eficiência quântica ao estágio V₁₂ (A) e eficiência quântica ao estágio R₃ (B) de folhas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* em resposta a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PPFD) de 0 a 250 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

No estágio R₃, a eficiência quântica luminosa também não apresentou distinções estatísticas (Figura 4B), com ponto de compensação de 54,02; 50,35; 49,75 e 59,49 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para os tratamentos controle, inoculação via semente, pulverização foliar e inoculação

via semente + pulverização foliar de *A. brasilense*, respectivamente. Para a mesma sequência de tratamentos, o inverso da eficiência quântica aparente foi de 20,37; 18,52; 21,19 e 19,31 μmol fótons para fixar 1 μmol CO_2 , destacando melhor aproveitamento luminoso aos tratamentos que continham inoculação via semente, seja de forma isolada ou combinada com a pulverização foliar de *A. brasilense*.

5.3.2 Respostas à concentração intercelular de CO_2

Resultados significativos referentes a atividade da enzima Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (RUBPcase) e concentração de CO_2 na a bainha clorofilada manifestaram-se quando as plantas foram submetidas a crescentes níveis de CO_2 atmosférico.

A fotossíntese líquida atingiu estabilidade entre 200 e 300 μmol CO_2 mol^{-1} para todos os tratamentos, contudo a fotossíntese máxima foi mais elevada quando utilizado *A. brasilense* via pulverização foliar, seja de forma isolada ou combinado com inoculação via semente frente ao controle (Figura 5A). Já a inoculação via semente atingiu fotossíntese máxima semelhante ao tratamento controle.

Devido as maiores taxas fotossintéticas, os tratamentos com *A. brasilense* demandaram aumento da concentração interna de CO_2 em altas concentrações atmosféricas de CO_2 (Figura 5B), mediado pela maior abertura estomática (Figura 5C). Nota-se, comparando as Figuras 5A e 5C, que após a estabilização da fotossíntese em elevadas concentrações internas de CO_2 , os estômatos não apresentaram tendência ao fechamento, se mantendo estáveis.

Maiores valores de condutância estomática devido a altas concentrações internas de CO_2 também ocasionaram maiores valores de transpiração foliar dos tratamentos com *A. brasilense*, com destaque a pulverização foliar utilizada isoladamente (Figura 5D).

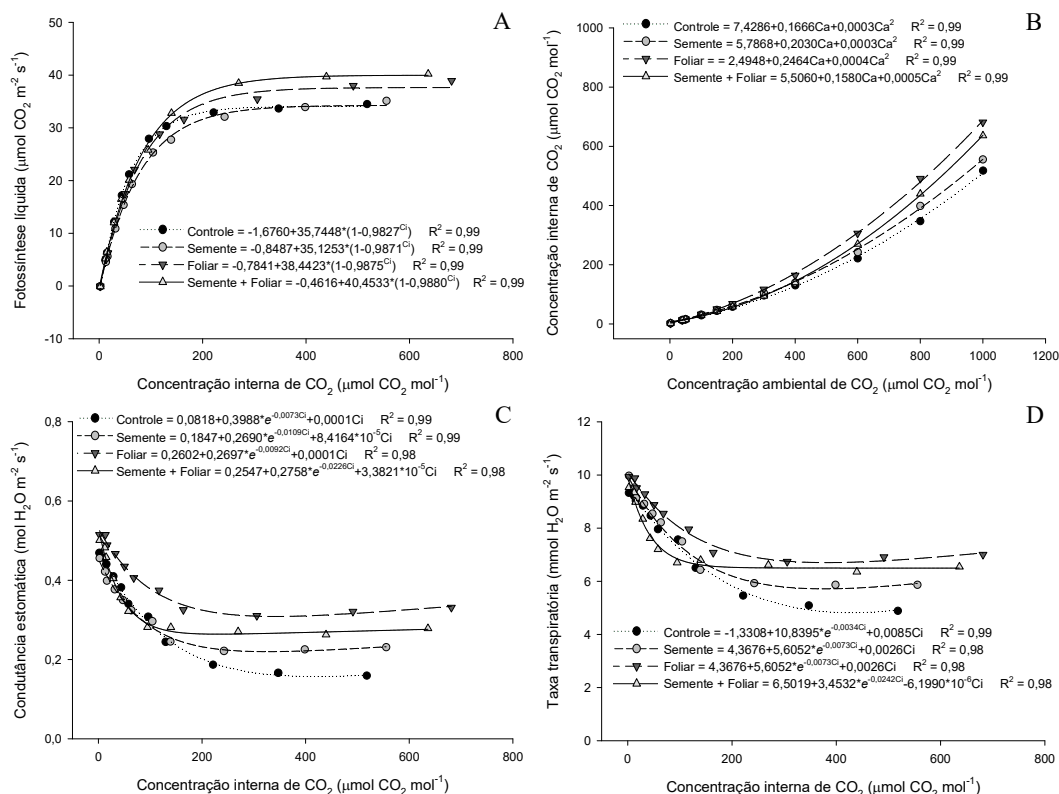


Figura 5 - Fotossíntese líquida (A), relação concentração ambiental de CO_2 /concentração intercelular de CO_2 (B), condutância estomática (C) e taxa transpiratória (D) de folhas de milho ao estágio R₃ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* em resposta a variação de disponibilidade ambiental de CO_2 .

O aumento da transpiração em elevadas concentrações internas de CO_2 , fez com que a eficiência do uso da água fosse reduzida (Figura 6A), indicando que com o aumento da disponibilidade atmosférica de CO_2 , a utilização de *A. brasilense* em milho demandará maiores quantidade de água para manutenção da produção, sendo que o excesso da abertura estomática sob elevadas concentrações de CO_2 , atmosférico ou intercelular, gera grande peso neste fator, pois reduz a eficiência intrínseca do uso da água (Figura 6B).

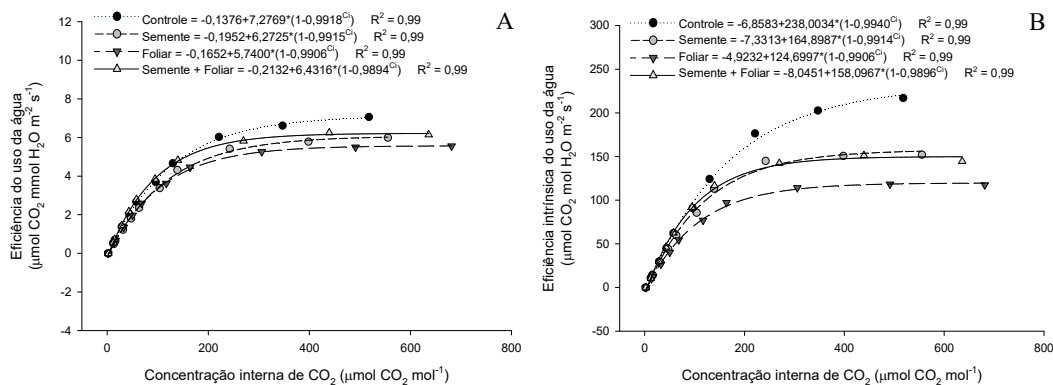


Figura 6 - Eficiência do uso da água (A) e eficiência intrínseca do uso da água (B) de folhas de milho ao estágio R₃ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* em resposta a variação de disponibilidade ambiental de CO₂.

Apesar de apresentar maior aproveitamento da concentração intercelular de CO₂, convertida em atividade fotossintética (Figura 5A), a análise da eficiência quântica de carboxilação da RUBPcase e PEPcase (fosfoenolpiruvato carboxilase) evidenciou menor aproveitamento da concentração intercelular de CO₂ induzido pelos tratamentos com inoculação via semente ou pulverização foliar de *A. brasilense* (Figura 7). Quando combinadas as formas de utilização, a eficiência quântica foi semelhante ao controle.

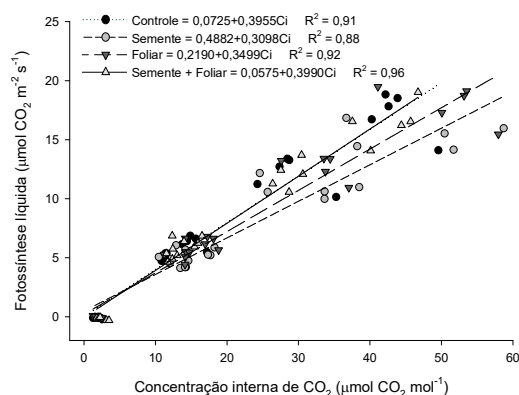


Figura 7 - Eficiência quântica de carboxilação de folhas de milho ao estágio R₃ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* em resposta a variação de disponibilidade ambiental de CO₂.

Com relação ao inverso do quociente da eficiência quântica de carboxilação da RUBPcase, os tratamentos apresentaram 2,52; 3,22; 2,85 e 2,50 µmol CO₂ mol⁻¹ para se fixar

1 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sendo estes dados respectivos para controle, inoculação via semente, pulverização foliar e inoculação via semente + pulverização foliar combinados.

Vale ressaltar que devido ao metabolismo C_4 , forçando o aporte de CO_2 pela PEPcase até o sítio carboxilativo onde se encontra o ciclo de Calvin, dificilmente a elevação deste recurso na atmosfera gerará prejuízos a incorporação de CO_2 da cultura do milho. Inicialmente, a eficiência quântica indica menor efetividade da RUBPcase e outros intermediários em assimilar CO_2 (Figura 7) quando sob influência de *A. brasilense*, contudo, sob altas ofertas de gás carbônico, a adição da bactéria ao sistema produtivo do milho via pulverização possibilita maior eficiência carboxilativa (Figura 5A).

5.4 DISCUSSÃO

Em plantas de metabolismo C_4 que apresentam concentração de CO_2 pela enzima NADP-málica, como o milho, o aumento da luminosidade proporciona maior acúmulo energético, forçando o transporte de CO_2 até o sítio secundário de carboxilação (RUBPi), reduzindo a atividade oxigenase da RUBISCO, minimizando a fotorrespiração e elevando a fotossíntese líquida (ZHU; LONG; ORT, 2010).

O melhor aproveitamento da luminosidade ambiental é convertido em capacidade carboxilativa pela adição do *A. brasilense* ao sistema produtivo (Figura 1A e 1B). Fisiologicamente estes efeitos atrelam-se ao aumento da atividade de citocininas e ácido salicílico desencadeados pela inoculação da bactéria (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014), promovendo aumento da síntese e regeneração de enzimas carboxilativas (ALI et al., 2011), aliado à proteção do aparato fotossintético pelo ácido salicílico (RAO et al., 2012). Por outro lado, a redução da atividade do etileno promovida por *A. brasilense* (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; GLICK, 2014) retarda a degradação da clorofila (CORTLEVEN; VALCKE, 2012), possibilitando melhor aproveitamento e eficiência fotossintética.

Estes resultados de taxas fotossintéticas mais elevadas proporcionadas por *A. brasilense* corroboram com evidências literárias reportadas de outras espécies gramíneas, como arroz (KANNAN; PONMURUGAN, 2010) e com metabolismo C_4 , como braquiária (BULEGON et al., 2017b). Vale ressaltar que o *A. brasilense* promove efeitos sob elevadas luminosidades (Figura 1A e 1B), sem manifestar efeitos proeminentes em baixas luminosidades (Figura 4A e 4B).

Mesmo com o mecanismo de bombeamento de CO₂ de alta eficiência das plantas C₄, é imprescindível que as plantas apresentem elevada abertura estomática (Figura 1C e 1D) para manutenção das trocas gasosas, o que relaciona-se à capacidade de aporte de água das raízes para a parte aérea para sustentação de turgor celular e transpiração (Figura 2A) (DRAKE; FROEND; FRANKS, 2013).

Nesta perspectiva, as modulações provocadas por *A. brasilense* no sistema radicular (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; HUNGRIA et al., 2010) e no sistema de vasos condutores (EL-AFRY et al., 2012), devido à alta atividade de auxinas (ESQUIVEL-COTE et al., 2010; MASCIARELLI et al., 2013), possibilitam ao milho maior captação e transporte de água, mantendo a hidratação e atividade bioquímica dos tecidos mais elevada (FILIPPOU et al., 2014). Estas informações são confirmadas no presente estudo pela maior condutância estomática (Figura 1C e 1D) e transpiração (Figura 2A e 2B) e, proporcionando maiores taxas fotossintéticas (Figura 1A e 1B) (HUSSAIN et al., 2016; MCADAM et al., 2017).

Menores diferenças de condutância estomática entre os tratamentos no estágio R₃ (Figura 1D), quando comparadas ao estágio V₁₂ (Figura 1C), possibilitaram aporte de CO₂ semelhante à câmara subestomática no estágio R₃ (Figura 1F), ao passo que os tratamentos com *A. brasilense* apresentaram maiores níveis de CO₂ nos espaços intercelulares (Figura 1E). Este CO₂ está prontamente disponível para ser consumido pela fotossíntese (LAWLOR; TEZARA, 2009), reduzindo as chances de queda da assimilação de carbono por baixo fornecimento de CO₂ (MUMM et al., 2011).

Por outro lado, a redução da transpiração promovida por *A. brasilense* no estágio R₃ (Figura 2B) não acarretou em maior aquecimento do limbo foliar (Figura 2D), e as taxas fotossintéticas em alta luminosidade foram mais elevadas (Figura 1B), indicando melhor aproveitamento de luz e menor perda de eficiência do fotossistema II por calor constitutivo (SOUZA et al., 2013).

Devido às taxas fotossintéticas mais elevadas em alta luminosidade no estágio R₃, pela inoculação do *A. brasilense* (Figura 1B), sem gastos excessivos de água na transpiração (Figura 2B), a eficiência de uso da água foi maior para os respectivos tratamentos (Figura 3B), resposta de importante interesse, visto que no estágio R₃ o milho apresenta alto consumo de água (GRASSINI et al., 2011), e a otimização deste recurso é de elevada relevância em regiões/períodos de oferta hídrica restrita. Ao mesmo passo, houve redução promovida pelo *A. brasilense* da fixação de carbono pela redução da condutância estomática no estágio V₁₂ em luminosidades intermediárias (Figura 3C), e devido ao menor aporte de CO₂ a câmara

subestomática (Figura 1E), a eficiência de carboxilação foi reduzida (Figura 3A), contudo, sem ocasionar efeitos negativos à fotossíntese (Figura 1A).

A luminosidade ambiental disponível foi a base da limitação fotossintética (VON CAEMMERER; FURBANK, 2016) quando as plantas de milho foram submetidas a elevadas concentrações intercelulares de CO₂ (Figura 5A). Contudo, ressalta-se a eficiência do *A. brasilense* em otimizar a utilização dessa energia disponível (2.000 μmol fótons m⁻² s⁻¹), convertendo-a em maior poder de assimilação de CO₂ (HOGEWONING et al., 2012) devido ao incremento da eficiência quântica do fotossistema II (GAJDOS et al., 2012; RUÍZ-SÁNCHEZ et al., 2011). Este incremento também pode estar atrelado à capacidade do *A. brasilense* em estimular a produção e minimizar a degradação de pigmentos fotossintéticos (CURÁ et al., 2017; FASCIGLIONE et al., 2015; ZAREA et al., 2012), aumentando a atividade da RUBPcase (SOUNDARARAJAN, 2012) e PEPcase (KALAJI et al., 2016).

É possível verificar que mesmo no metabolismo C₄, com predominância a enzima málica-NADP favorecendo o aporte de CO₂ até a localização da Rubisco (ZHU; LONG; ORT, 2010), a limitação estomática da fotossíntese também merece destaque, visto que a maior condutância estomática (Figura 5C) confirmada pela alta taxa transpiratória promovida por *A. brasilense* (Figura 5D) anteriormente explanada (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; EL-AFRY et al., 2012; ESQUIVEL-COTE et al., 2010; HUNGRIA et al., 2010; MASCIARELLI et al., 2013), independente da forma de aplicação, possibilitaram maior entrada de CO₂ nos espaços intercelulares (Figura 5B), facilitando o processo fotossintético (Figura 5A).

Os aumentos de fotossíntese (Figura 5A) e transpiração (Figura 5D) culminaram em menor aproveitamento da água (Figura 6A) e menor quantidade de carbono fixado por exposição transpiratória da câmara subestomática (Figura 6B). Esta é uma resposta indesejada em estádios reprodutivos da cultura, apesar do aumento na taxa fotossintética, visto que há maior condutância estomática e possibilidade de perda de água, cenário que pode se tornar comum em futuro próximo devido ao aumento da concentração de CO₂ atmosférico mundial (BORUM et al., 2016). Vale ressaltar que o acúmulo da massa de grãos é extremamente dependente da disponibilidade hídrica, e desperdícios podem comprometer este fator de produtividade (GRASSINI et al., 2011).

A possibilidade de aumento dos teores de pigmentos fotossintéticos promovidos pelo *A. brasilense* (BATTISTUS et al., 2014; BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016; CURÁ et al., 2017; DATTA et al., 2009; FASCIGLIONE et al., 2015; ZAREA et al., 2012), com consequente aumento da concentração da RUBPcase nos tecidos (SOUNDARARAJAN, 2012) culminou em perdas iniciais da eficiência quântica de fixação de CO₂ (Figura 7) devido

a maior relação O_2/CO_2 , forçando a RUBISCO à sua atividade oxigenase pela baixa oferta de CO_2 (BRÄUTIGAM; GOWIK, 2016; ZHU; LONG; ORT, 2010), mesmo em um metabolismo C_4 como o do milho.

5.5 CONCLUSÃO

Tendo em vista os aspectos discutidos, o *A. brasilense* inoculado via semente ou pulverização foliar promove maiores taxas fotossintéticas, baseado em melhor aproveitamento luminoso, maior condutância estomática devido a melhor status hídrico interno confirmado pela transpiração, facilitando a permuta de gases e maior atividade de enzimas carboxilativas, essenciais para obtenção de ganhos em fitomassa e produtividade.

5.6 REFERÊNCIAS

- AHMADI-RAD, S. et al. Foliar application of nitrogen fixing bacteria increases growth and yield of canola grown under different nitrogen regimes. **Rhizosphere**, v. 2, p. 34–37, 2016.
- ALEN'KINA, S. A. ; NIKITINA, V. E. *Azospirillum* lectin-induced changes in nitric oxide content in wheat seedling roots. **Russian Agricultural Sciences**, v. 37, n. 6, p. 462–464, 2012.
- ALI, Z. et al. Mitigation of drought stress in maize by natural and synthetic growth promoters. **Journal of Agriculture and Social Sciences**, v. 7, n. 2, p. 56–62, 2011.
- ASKARY, M. et al. Influence of the co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2, 4-D on grain yield and N, P, K content of *Triticum aestivum* (Cv. Baccros and Mahdavi). **American-Eurasian Journal Agricultural & Environmental Science**, v. 5, n. 3, p. 296–307, 2009.
- BATTISTUS, A. G. et al. Synergistic action of *Azospirillum brasilense* combined with thiamethoxam on the physiological quality of maize seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 49, p. 4501–4507, 2014.
- BHATTACHARYYA, P. N. ; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.
- BORUM, J. et al. Photosynthetic response to globally increasing CO_2 of co-occurring temperate seagrass species. **Plant, Cell & Environment**, v. 39, n. 6, p. 1240–1250, 2016.
- BRÄUTIGAM, A. ; GOWIK, U. Photorespiration connects C_3 and C_4 photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 10, p. 2953–2962, 2016.

BULEGON, L. G. et al. Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and rehydration conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1283–1289, 2017.

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.

CASSÁN, F. et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 12–19, 2009.

CASSÁN, F. ; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.

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.

CHEN, X. -P. et al. Integrated soil-crop system management for food security. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 16, p. 6399–6404, 2011.

CORTLEVEN, A. ; VALCKE, R. Evaluation of the photosynthetic activity in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: lessons from cytokinin. **Physiologia Plantarum**, v. 144, n. 4, p. 394–408, 2012.

CURÁ, A. et al. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 41, 2017.

DATTA, J. K. et al. Impact of combined exposure of chemical, fertilizer, bio-fertilizer and compost on growth, physiology and productivity of *Brassica campestris* in old alluvial soil. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 5 Suppl, p. 797–800, 2009.

DI PALMA, A. A. et al. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 338, n. 1, p. 77–85, 2013.

DIMKPA, C. ; WEINARD, T. ; ASCH, F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 12, p. 1682–1694, 2009.

DRAKE, P. L. ; FROEND, R. H. ; FRANKS, P. J. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 495–505, 2013.

EL-AFRY, M. M. et al. Anatomical studies on drought-stressed wheat plants (*Triticum aestivum* L.) treated with some bacterial strains. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 56, n. 2, p. 165–174, 2012.

EL-LATTIEF, E. A. A. Use of *Azospirillum* and *Azobacter* bacteria as biofertilizers in cereal crops: a review. **International Journal of Research in Engineering and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 36–44, 2016.

- ESQUIVEL-COTE, R. et al. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1–2, p. 65–75, 2010.
- FASCIGLIONE, G. et al. *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 154–162, 2015.
- FILIPPOU, P. et al. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 1–10, 2014.
- FISCHER, R. A. Definitions and determination of crop yield, yield gaps, and of rates of change. **Field Crops Research**, v. 182, p. 9–18, 2015.
- FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016.
- FUKAMI, J. et al. 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.
- GAJDOS, É. et al. Effects of biofertilizers on maize and sunflower seedlings under cadmium stress. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 43, n. 1–2, p. 272–279, 2012.
- GHANNOUM, O. C₄ photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 635–644, 2009.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.
- GODFRAY, H. C. J. et al. Food security : the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, n. February, p. 812–818, 2010.
- GRASSINI, P. et al. High-yield irrigated maize in the Western U. S. Corn Belt: II. Irrigation management and crop water productivity. **Field Crops Research**, v. 120, n. 1, p. 133–141, 2011.
- GUIMARÃES, V. F. et al. Morphophysiological characteristics of maize inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* as seed treatment, cultivated in different types of soil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 39, p. 2919–2924, 2014.
- HOGEWONING, S. W. et al. Photosynthetic quantum yield dynamics: from photosystems to leaves. **The Plant Cell**, v. 24, n. 5, p. 1921–1935, 2012.
- HOSSAIN, M. et al. Effects of *Azospirillum* isolates from paddy fields on the growth of rice plants. **Research in Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 15–22, 2015.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1–2, p. 413–425, 2010.

- HUSSAIN, M. B. et al. Efficacy of rhizobia for improving photosynthesis, productivity, and mineral nutrition of Maize. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 44, n. 11, p. 1564–1571, 2016.
- KALAJI, H. M. et al. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 4, p. 102, 2016.
- KANNAN, T. ; PONMURUGAN, P. Response of paddy (*Oryza sativa* L.) varieties to *Azospirillum brasilense* inoculation. **Journal of Phytology**, v. 2, n. 6, p. 8–13, 2010.
- KAVAMURA, V. N. et al. Screening of brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183–191, 2013.
- LARRABURU, E. E. ; BUSUSCOVICH, A. C. ; LLORENTE, B. E. *Azospirillum brasilense* improves in vitro and ex vitro rooting-acclimatization of jojoba. **Scientia Horticulturae**, v. 209, p. 139–147, 2016.
- LARRABURU, E. E. ; LLORENTE, B. E. Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in in vitro rooting of pink lapacho. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, n. 1, p. 175–184, 2015.
- LAWLOR, D. W. ; TEZARA, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 561–579, 2009.
- LLORENTE, B. E. ; ALASIA, M. A. ; LARRABURU, E. E. Biofertilization with *Azospirillum brasilense* improves in vitro culture of *Handroanthus ochraceus*, a forestry, ornamental and medicinal plant. **New Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 32–40, 2016.
- MARQUES, A. C. R. et al. Biological nitrogen fixation in C₄ grasses of different growth strategies of South America natural grasslands. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 54–62, 2017.
- MASCIARELLI, O. et al. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590–597, 2013.
- MCADAM, S. A. M. et al. Linking auxin with photosynthetic rate via leaf venation. **Plant Physiology**, v. 175, n. 1, p. 351–360, 2017.
- MOUTIA, J. -F. Y. et al. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1–2, p. 233–242, 2010.
- MUMM, P. et al. Cell type-specific regulation of ion channels within the maize stomatal complex. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 8, p. 1365–1375, 2011.
- NOVAIS, R. F. ; NEVES, J. C. L. ; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In: **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA, 1991. p. 189–198.
- NOVAKOWISKI, J. H. et al. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. Suplp, p. 1687–1698, 2011.

QUADROS, P. D. DE et al. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014.

RAO, S. R. et al. Role of foliar application of salicylic acid and L-Tryptophan in drought tolerance of maize. **The Journal Animal of Plant Science**, v. 22, n. 3, p. 768–772, 2012.

RUIZ-SÁNCHEZ, M. et al. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1031–1037, 2011.

SANTOS, H. G. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília: Embrapa Solos, 2018. 356 p.

SARANRAJ, P. ; SIVASAKTHIVELAN, P. *Azospirillum* and its formulations: A Review. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 3, p. 275–287, 2013.

SOUNDARARAJAN, M. Leaf chlorophyll levels influence carbon isotope discrimination in soybean and maize. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, p. 207–211, 2012.

SOUZA, T. C. et al. The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 2, p. 515–527, 2013.

UBIERNA, N. ; SUN, W. ; COUSINS, A. B. The efficiency of C₄ photosynthesis under low light conditions: assumptions and calculations with CO₂ isotope discrimination. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 9, p. 3119–3134, 2011.

VON CAEMMERER, S. ; FURBANK, R. T. Strategies for improving C₄ photosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 31, p. 125–134, 2016.

ZAREA, M. J. et al. Effect of *Piriformospora indica* and *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 45, p. 139–146, 2012.

ZHANG, S. et al. Temperature-Dependent Gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO₂ assimilation of *Quercus liao tungensis* under midday high irradiance. **Photosynthetica**, v. 39, n. 3, p. 383–388, 2001.

ZHU, X. -G. ; LONG, S. P. ; ORT, D. R. Improving photosynthetic efficiency for greater yield. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 235–261, 2010.

ZUFFO, A. M. et al. Path analysis in soybean cultivars grown under foliar spraying and furrow inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 10, p. 137, 2017.

6 CAPÍTULO 5: RESTRIÇÃO HÍDRICA AMENIZADA POR *Azospirillum brasilense* EM MILHO: STATUS HÍDRICO, TROCAS GASOSAS E PROTEÇÃO OXIDATIVA

Resumo: Períodos de déficit hídrico, que ocorrem diariamente em momentos de elevada temperatura e radiação solar, são o principal fator de estresse abiótico limitante a produção vegetal. Alguns microrganismos são importantes aliados na redução destes impactos, atuando como indutores de tolerância ao déficit hídrico. Visto o exposto, objetivou-se avaliar teor de água nos tecidos foliares, trocas gasosas e reações antioxidantes de milho inoculado via semente ou pulverização foliar com *A. brasilense*. O ensaio compreendeu os tratamentos controle, inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente + pulverização foliar de *A. brasilense*. Avaliou-se, a cada duas horas ao longo do dia, o teor relativo de água nos tecidos foliares, integridade das membranas celulares e trocas gasosas. A cada quatro horas monitorou-se a umidade do solo, e amostras foliares foram coletadas para quantificação da atividade antioxidante. Pulverizações foliares mantiveram maior teor relativo de água nos momentos críticos do dia. A falta de água afeta as trocas gasosas, contudo inoculação com *A. brasilense* possibilitou sustentação da transpiração, mantendo os estômatos mais abertos, facilitando aporte de CO₂ aos espaços intercelulares, evitando maiores reduções na taxa fotossintética. A atividade da enzima superóxido dismutase foi incrementada pela pulverização de *A. brasilense* em momentos de baixo turgor foliar, porém, ao final do dia, tratamentos com pulverizações foliares reduziram a atividade de catalases. Em suma, o *A. brasilense* ameniza as drásticas reduções nas trocas gasosas ocasionada pela falta de água, sendo que pulverizações foliares mantêm maior turgor dos tecidos foliares e implica em modulações da atividade antioxidante no milho.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento vegetal; Fotossíntese; Turgescência foliar; Enzimas antioxidantes.

6.1 INTRODUÇÃO

Períodos de restrição hídrica são considerados o mais importante fator de estresse abiótico as plantas, sendo responsável por significativas perdas na agricultura mundial (AHMAD et al., 2016; SHAO et al., 2009). Vegetais são expostos aos prejuízos da falta de água sempre que o suprimento da mesma pelas raízes não acompanha a taxa de transpiração foliar (ANJUM; XIE; WANG, 2011), o qual frequentemente ocorre ao longo do dia em períodos de temperatura elevada e alta radiação solar.

O estresse hídrico impacta em redução da produtividade das culturas por combinação de fatores fisiológicos e bioquímicos, com consequências morfométricas e de aproveitamento de recursos por parte dos vegetais (ALI et al., 2011). Vale ressaltar que é esperado aumento de problemas com seca nas próximas décadas devido às mudanças climáticas (KASIM et al., 2013), sendo prioritário o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem a manutenção da produção vegetal sob condições adversas (TAKEDA; MATSUOKA, 2008).

A redução ou inibição da taxa fotossintética é um dos primeiros efeitos da falta de água no vegetal, mediado pela redução do teor de água nos tecidos foliares (CURÁ et al., 2017) que induz o fechamento estomático, impedindo o fornecimento de CO₂ para o processo de carboxilação (ANJUM; XIE; WANG, 2011; ZLATEV; LIDON, 2012), retardando consequentemente o desenvolvimento vegetal. Por outro lado, grande parte dos danos bioquímicos a nível celular ocasionados em condições de estresse hídrico são devidos à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SANDHYA et al., 2010).

Para combater estas ROS, as plantas modulam suas rotas bioquímicas de produção de enzimas antioxidantes, como peroxidases (POX), catalases (CAT), polifenoloxidasas (PPO) e superóxido dismutase (SOD) (BARBOSA et al., 2014), visando atenuar o dano das ROS principalmente em atividades do metabolismo primário vegetal, como a fotossíntese (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; VASS; CSER, 2009).

Para aliviar estes períodos de estresse, as plantas possuem características de proteção naturais, e também interagem com uma vasta variedade de microrganismos do solo (NAVEED et al., 2014). As comunidades microbianas presentes no solo são importantes para manutenção do balanço de atividades biológicas e metabólicas das plantas durante condições de estresse (KAVAMURA et al., 2013), sendo estes microrganismos reportados inclusive como indutores

de tolerância em períodos de baixa disponibilidade hídrica (CASSÁN et al., 2009b; COHEN et al., 2015; KASIM et al., 2013).

Dentre estes microrganismos, o gênero bacteriano *Azospirillum* tem sido descrito como associativo simbiótico, principalmente com gramíneas, e é apontado como o bioinoculante mais comercializado ao redor do mundo (EL-LATTIEF, 2016). A associação destas bactérias com as plantas permite aumento da capacidade exploratória de água e nutrientes no solo por parte das raízes, baseado em um complexo de estímulos bioreguladores (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016), que permitem aumento da tolerância ao déficit hídrico (COHEN et al., 2015; CURÁ et al., 2017; FUKAMI et al., 2017).

Além de colonizar a rizosfera, o gênero *Azospirillum* apresenta capacidade de colonizar a parte aérea das plantas, mais especificamente o filoplano (FUKAMI et al., 2017), gerando incrementos no desenvolvimento e produtividade de diversas culturas (AHMADI-RAD et al., 2016; ZUFFO et al., 2017) pela ação hormonal e elicitação de mecanismos de resistência vegetal contra estresses bióticos e abióticos (FUKAMI et al., 2017).

Visto o exposto, hipotetizou-se que a utilização de *A. brasilense* induz a tolerância em milho contra situações de estresse, mitigando reduções na atividade fotossintética e incrementando a atividade antioxidante, para proteger as células de danos ocasionados pela deficiência hídrica nos horários mais quentes e de maior radiação incidente durante o dia.

Para tanto, objetivou-se avaliar ao longo do dia, sob condições de restrição hídrica, trocas gasosas, teor relativo de água nos tecidos foliares e reação antioxidante de milho inoculado via semente e/ou pulverização foliar com *A. brasilense*.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Tratamentos e delineamento experimental

Estudou-se o comportamento de três formas de utilização de *A. brasilense* (corríg. Tarrand et al.) Estirpes AbV5+AbV6, compreendendo os tratamentos: 1. Controle; 2. Inoculação via semente de *A. brasilense* (100 mL/60.000 sementes); 3. Pulverização foliar de *A. brasilense* (300 mL ha⁻¹) ao estágio V₄; 4. Inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense* nas dosagens e estádios anteriormente citados. O ensaio foi conduzido em blocos casualizados com cinco repetições, com duas plantas por repetição.

6.2.2 Material vegetal e condução experimental

Plantas de milho híbrido Pioneer 30F53 Leptra® RR2™ foram conduzidas a pleno sol em vasos de 25 litros (29 cm x 37 cm x 29 cm; AxDxd) preenchidos com substrato a base de horizonte A+B de LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef) (SANTOS, 2018).

Previamente a semeadura o substrato foi homogeneizado com 50 mg dm⁻³ de N (ureia), 300 mg dm⁻³ de P₂O₅ (superfosfato triplo) e 150 mg dm⁻³ de K₂O (cloreto de potássio) (NOVAIS; NEVES; BARROS, 1991). Segundo a mesma recomendação, foi realizado aporte de 50 mg dm⁻³ de N (ureia) no estágio V₃ da cultura. Baseado na saturação de bases apresentada (V% de 62, 68), não foi necessária calagem.

Diariamente as plantas eram irrigadas, reestabelecendo a capacidade de campo do substrato. As análises foram executadas no estágio V₁₂ da cultura do milho, induzindo situação de restrição hídrica com aplicação de 50% da lâmina d'água regular um dia antes da avaliação.

No dia de avaliação, as 12:00 horas algumas parcelas apresentaram taxa assimilatória líquida zero devido a intensa dessecação dos tecidos, sendo repostos 25% da lâmina de água.

6.2.3 Umidade gravimétrica do solo

Amostras de solo nos vasos, a 15 cm de profundidade, foram coletadas em intervalo de quatro horas, iniciando-se as 04h00min e finalizando às 20h00min. Imediatamente após a coleta, as amostras foram pesadas em balança de precisão para determinação de sua massa úmida e conduzidas a estufa de circulação forçada de ar a 105 °C durante 24 horas. Após esse período foram pesadas novamente, sendo obtido a massa do solo seco. Os resultados foram expressos em g H₂O g⁻¹ solo em base seca.

6.2.4 Conteúdo relativo de água do limbo foliar

Amostras circulares de 1,5 cm² do limbo foliar foram coletadas em intervalo de duas horas, iniciando-se as 04h00min até 20h00min. Imediatamente após a coleta, as amostras foram pesadas em balança de precisão para determinação de sua massa fresca, e acondicionadas em placa de petri contendo água destilada e deionizada a 25 °C durante 6 horas para saturação

hídrica. Após esse período as amostras foram secas superficialmente por contato com papel absorvente, e pesadas novamente para a obtenção da massa túrgida (capacidade máxima de absorção de água pelo tecido). Em seguida foram acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C durante 48 horas, e novamente mensuradas quanto a sua massa seca. Os resultados foram expressos em % de H₂O no tecido do limbo foliar.

6.2.5 Tolerância protoplasmática

Amostras circulares de 1,5 cm² do limbo foliar foram coletadas em intervalo de duas horas, iniciando-se as 04h00min e finalizando às 20h00min. Imediatamente após a coleta, os segmentos foliares foram lavados em água destilada e deionizada com auxílio de pissete e acondicionados em tubos tipo *falcon* contendo 40 mL de água destilada e deionizada. Os tubos foram mantidos em temperatura de 25 °C durante 24 horas, e a solução teve sua condutividade elétrica mensurada em condutivímetro de bancada modelo Tecnal Tec-4MP.

Posteriormente, as amostras foram submetidas a banho maria a 100 °C durante uma hora para lise das membranas e extravasamento do conteúdo protoplasmático. Após, estabilizou-se a temperatura novamente em 25 °C para realização de nova medida de condutividade elétrica. A partir dos valores obtidos determinou-se a integridade absoluta de membrana (BLUM; EBERCON, 1981), baseado na quantidade de eletrólitos perdidos pelo tecido foliar em relação ao total de eletrólitos contidos no protoplasma.

6.2.6 Trocas gasosas

Folhas representativas do estágio V₁₀, com ausência de lesões, foram avaliadas com auxílio do equipamento IRGA LI-6400XT (Licor Inc. Lincoln, NE) em condições de luminosidade similares às ambientais, em intervalos de duas horas, iniciando as 04h00min e finalizando às 20h00min.

Quantificou-se a taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração da folha (E); condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), temperatura de folhas (°C), além das relações $WUE = A/E$, $iWUE = A/g_s$ e $F_c = A/C_i$ (ZHANG et al., 2001b), onde

WUE representa a eficiência do uso de água, *iWUE* a eficiência intrínseca do uso de água, e *Fc* a eficiência instantânea de carboxilação.

6.2.7 Análises bioquímicas

6.2.7.1 Coleta das amostras

Amostras dos tecidos do limbo foliar, de folha representativa do estágio V₁₀, foram coletadas em intervalo de quatro horas, iniciando-se as 04h00min e finalizando às 20h00min, excluindo-se a nervura central e pesadas em massa fresca aproximada de 0,5 gramas, imediatamente acondicionadas em gelo para transporte até ultrafreezer (-80 °C), onde ficaram armazenadas até o momento da obtenção do extrato proteico.

6.2.7.2 Obtenção dos extratos

As amostras dos tecidos foliares foram trituradas em nitrogênio líquido, e posteriormente, homogeneizadas em 5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo 0,1 mM EDTA e 1% (p/p) de PVP (polivinilpirrolidona). Este macerado foi submetido à centrifugação a 4.000g durante 20 minutos em temperatura constante de 4 °C. O sobrenadante referente ao extrato enzimático foi recolhido com pipeta e transferido para microtubos, sendo armazenados em ultra freezer a -80 °C, para ser utilizado posteriormente na determinação de proteínas solúveis totais e atividade enzimática de peroxidase, catalase, polifenoloxidase e superóxido dismutase (BROETTO, 2014).

6.2.7.3 Quantificação de proteínas solúveis totais

A quantificação de proteínas solúveis totais foi realizada em triplicata, utilizando 30 µL de extrato enzimático, 2.250 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 600 µL do reagente de Bradford, homogeneizados em agitador de tubos, e submetido a leitura à 595 nm de absorbância em espectrofotômetro após cinco minutos de reação (BRADFORD, 1976). Os

valores de absorvância foram plotados em curva padrão de concentração de albumina de soro bovino (ASB) e a concentração de proteínas solúveis totais expressa em mg de proteína g⁻¹ matéria fresca.

6.2.7.4 Atividade de peroxidase (POD; EC 1. 11. 1. 7)

A atividade da peroxidase do guaiacol foi determinada através da conversão do guaiacol em tetraguaiacol, via determinação da atividade de peroxidase à 30 °C, pelo método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT; NUCKLES; KUĆ, 1982). Para a reação foi preparado substrato utilizando 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), suplementado com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio. Por sua vez a mistura da solução consistiu de 200 µL do extrato enzimático e 1.400 µL de substrato. A reação foi realizada em espectrofotômetro à 470 nm durante 2 min. A diferença entre o momento final e inicial foi utilizado para a determinação da atividade considerando coeficiente de extinção molar (ϵ) de 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹. Os resultados de atividade específica da peroxidase foram expressos em µmol H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹.

6.2.7.5 Atividade de catalase (CAT; EC 1. 11. 1. 6)

Para análise da atividade da catalase foi preparado tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), suplementado com peróxido de hidrogênio para obtenção de tampão à 12,5 mM de H₂O₂, substrato para reação da enzima. O tampão foi mantido a 30 °C em banho maria visando reação direta nessa temperatura. A mistura de reação consistiu na utilização de 90 µL de extrato enzimático da amostra com 2.910 µL do referido tampão, agitado previamente em agitador de tubos durante 15 segundos. A leitura direta da variação da absorção de peróxido de hidrogênio foi realizada à 240 nm de absorvância em espectrofotômetro durante dois minutos (BROETTO, 2014; PEIXOTO et al., 1999). Os resultados de atividade específica da catalase consideraram coeficiente de extinção molar (ϵ) de 36 mM⁻¹ cm⁻¹ e foram expressos em µmol H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹.

6.2.7.6 Atividade de polifenoloxidase (PPO; E. C. 1. 10. 3. 1)

A atividade da polifenoloxidase foi determinada realizando mistura de leitura utilizando 100 μL de extrato enzimático e 1.800 μL de substrato para enzima, preparado utilizando tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,8) suplementado com catecol à 0,02 M (DUANGMAL; OWUSU APENTEN, 1999). A leitura direta da variação da absorção de catecol foi realizada à 420 nm de absorbância em espectrofotômetro durante dois minutos. Os resultados de atividade específica da polifenoloxidase consideraram coeficiente de extinção molar (ϵ) de 26,9 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e foram expressos em $\mu\text{mol catecol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

6.2.7.7 Atividade de Superóxido dismutase (SOD; EC 1. 15. 1. 1)

A atividade da SOD foi determinada segundo capacidade de inibição da fotorredução de 50% do NBT (Cloreto de azul de nitrotetrazólio) e formação de formazana (coloração azul). Para tanto, foi elaborado tampão de reação contendo metionina (13 mM), NBT (75 μM), EDTA (100 nM), riboflavina (2 μM) e tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8). Foram adicionados a tubos de ensaio de vidro branco 100 μL de extrato enzimático e 1.900 μL do tampão de reação. O controle consistiu do uso do tampão de reação puro. Tanto as amostras quanto os controles foram submetidos a reação de oxidação, conduzida sob 25 °C por 5 min, em tubos de ensaio acondicionados em grades de suporte metálicas brancas colocadas em caixa de madeira sob lâmpada fluorescente (45 W) a 15 centímetros de distância. A reação foi concluída pela interrupção da luz (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A leitura foi realizada à 560 nm em espectrofotômetro. O branco constituiu do uso do tampão de reação mantido ao abrigo da luz. A atividade enzimática foi expressa em unidades de superóxido dismutase necessária para a inibição de 50 % da fotorredução do NBT, U SOD mg^{-1} proteína.

6.2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-wilk a 5% de probabilidade de erro. Na presença de normalidade dos erros, os dados passaram por análise de variância a 5% de probabilidade de erro pelo teste F de Fisher, e em caso positivo,

submetidos a teste de médias de Dunnett a 5% de probabilidade de erro visando comparar os tratamentos com *A. brasilense* ao tratamento controle, ou análise de regressão, definindo-se o ajuste mais adequado baseado em modelos significativos, com lógica biológica e elevado valor de coeficiente de determinação (R^2).

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Status hídrico do solo e vegetal

Os dados referentes às condições meteorológicas no dia da avaliação estão apresentados na figura 1.

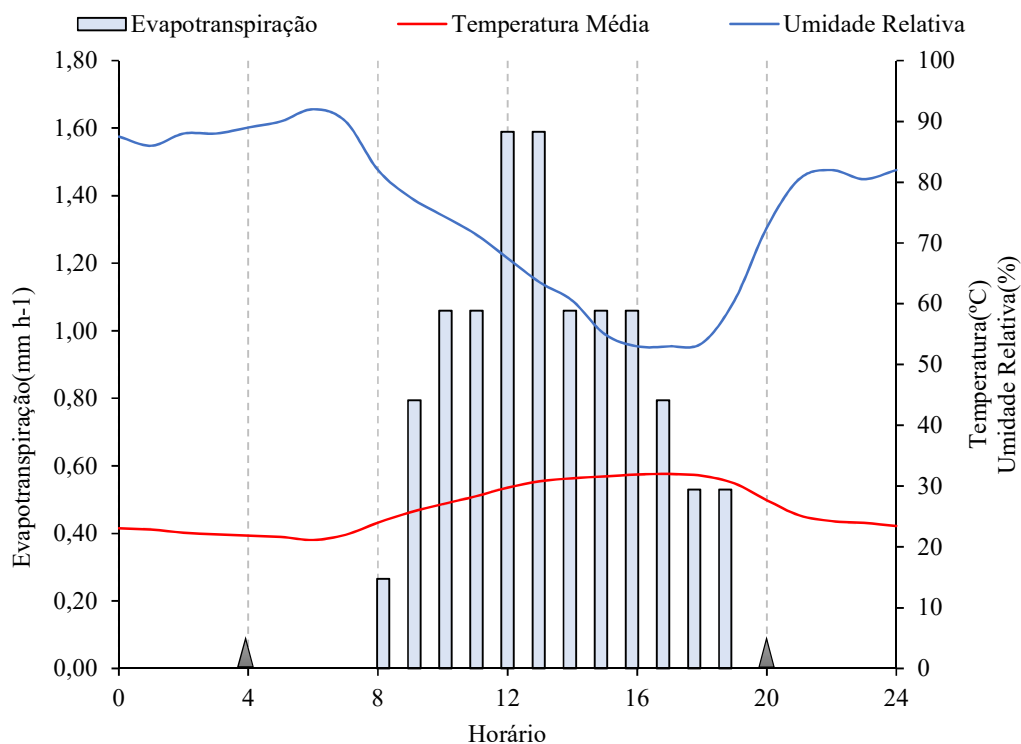


Figura 1 -Condições meteorológicas (temperatura média, umidade relativa e evapotranspiração) durante as avaliações de umidade do solo, teor relativo de água, tolerância protoplasmática, trocas gasosas e coletas das amostras para análise bioquímica. Triângulos cinza representam o início e o final da coleta das amostras e leitura de trocas gasosas.

As leituras de umidade relativa iniciaram o dia com valores médios de 89%, atingindo ponto mínimo de 53% as 17:00 horas e finalizando com 73% as 20:00 horas. Já a temperatura média iniciou com 21,85 °C, atingindo pico de 32,00 °C as 17:00 horas, e fechando as leituras com 27,70 °C. A evapotranspiração acumulada no dia foi de 11,39 mm, com picos de 1,59 mm h⁻¹ entre as 12:00 e 14:00.

A umidade gravimétrica do solo não sofreu alterações significativas desencadeadas pelos tratamentos utilizados, como verificado na figura 2A. Contudo, o teor relativo de água presente nos tecidos foliares apresentou números absolutos mais elevados em diversos momentos do dia para os tratamentos que continham *A. brasilense*, sendo que as 16:00 horas, próximos aos picos de temperatura e menores valores de umidade relativa do ar, os tratamentos que continham *A. brasilense* pulverizado via foliar possibilitaram menor redução do teor de água no tecido foliar das plantas de milho quando comparado ao controle (Figura 2B).

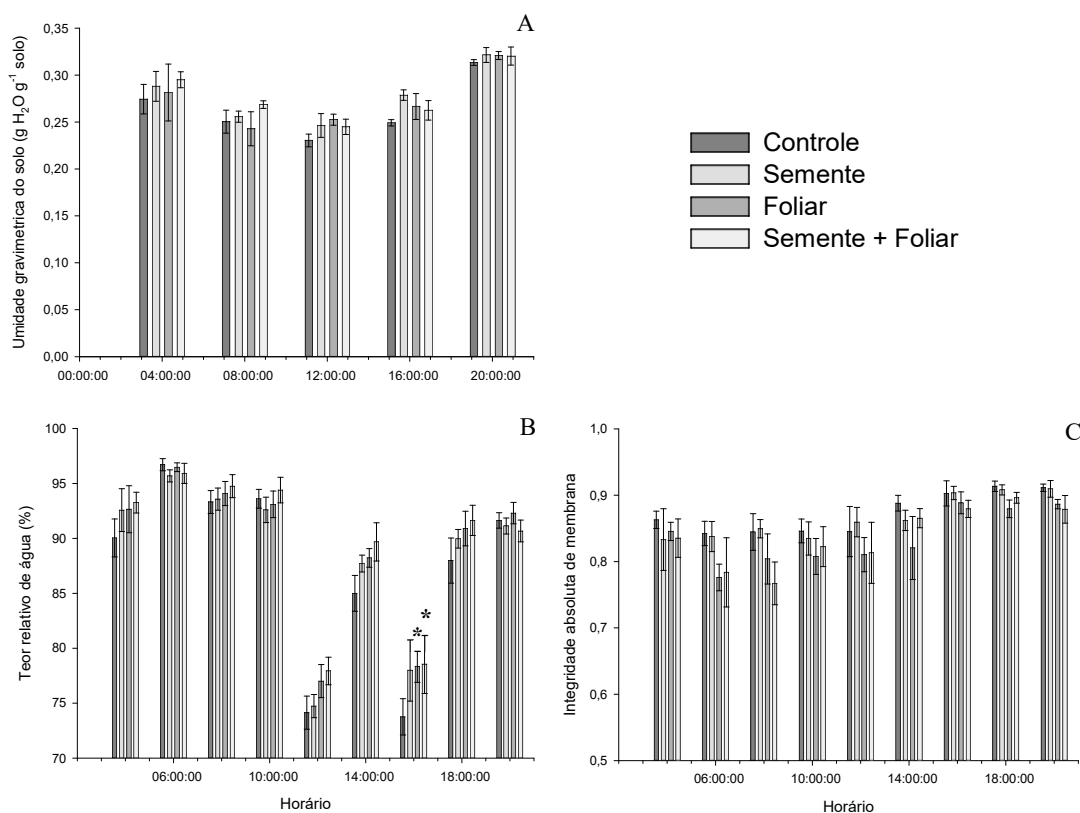


Figura 2 - Umidade gravimétrica do solo (A), teor relativo de água (B) e integridade absoluta de membrana do limbo foliar de milho submetido a inoculação via semente (C), pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* e baixa disponibilidade hídrica. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

Semelhante à umidade gravimétrica do solo, a integridade absoluta de membranas dos tecidos foliares não foi afetada nos diferentes horários do dia avaliados, porém nota-se tendência na redução de integridade de membranas celulares em valores absolutos (Figura 2C). Neste quesito, o princípio do teste pode ter colaborado para a redução da integridade da membrana nos tratamentos com pulverização de *A. brasilense*, visto que bactérias presentes no limbo foliar, ou demais resíduos, podem contaminar a análise.

6.3.2 Trocas gasosas

Às 12h00 algumas repetições do ensaio zeraram a taxas de fotossíntese líquida fotossintética, período de intensa transpiração que conduziu a queda brusca dos valores do teor relativo de água nos tecidos foliares (Figura 2A). Neste momento, 25% do volume da lâmina de água diária foi reposta, permitindo recuperação da turgescência (Figura 2A), porém com baixos efeitos de recuperação da fotossíntese após sua suspensão (Figura 3A).

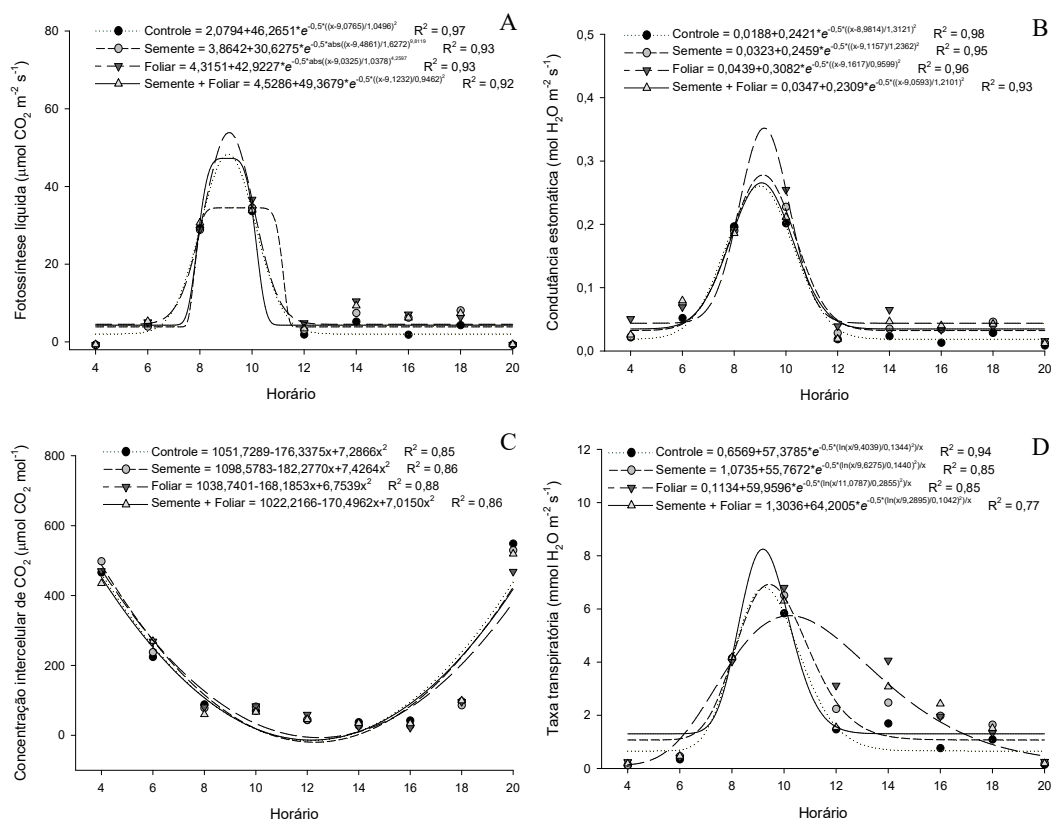


Figura 3 - Fotossíntese líquida (A), condutância estomática (B) concentração intercelular de CO_2 (C) e taxa transpiratória (D) de folhas de milho submetido a inoculação via

semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* e baixa disponibilidade hídrica.

O cálculo da integral das equações propostas para assimilação líquida de CO₂ indicam superioridade do tratamento com pulverização foliar de *A. brasilense* com 607,163 mmol CO₂ m⁻² dia⁻¹ assimilado, seguido de 588,704 mmol CO₂ m⁻² dia⁻¹ promovido pela inoculação via semente + pulverização foliar, 561,708 mmol CO₂ m⁻² dia⁻¹ proporcionado pela inoculação via semente e 557,547 mmol CO₂ m⁻² dia⁻¹ referente ao controle (Figura 3A).

A condutância estomática apresenta importante papel no destaque dado à pulverização foliar de *A. brasilense* para a fotossíntese diária (Figura 3A), pois além de proporcionar maior pico de abertura estomática, manteve maior abertura ao longo do dia, enquanto os demais tratamentos pouco destacaram-se do controle (Figura 3B). Por outro lado, maior abertura estomática não se refletiu em distinções na concentração intercelular de CO₂ (Figura 3C), o que reforça o fato da abertura estomática proporcionar maior entrada de CO₂, e sem que haja outros fatores limitantes a carboxilação, utiliza-se este dióxido de carbono diretamente no processo fotossintético, sem gerar acúmulos nos espaços intercelulares.

Do mesmo modo, a água disponível nos tecidos vegetais colabora para a manutenção da abertura estomática e transpiração, sendo que grande parte da condutância estomática se refere a necessidade de perda de água para arrefecimento dos tecidos vegetais. Deste modo, quando integralizadas as equações, a pulverização foliar com *A. brasilense* resultou em taxas de transpiração foliar de 70,272 mol H₂O m⁻² dia⁻¹ (+82,34%), seguido de 66,303 mol H₂O m⁻² dia⁻¹ perdido pelas plantas com inoculação via semente + pulverização foliar (+72,04%), 62,087 mol H₂O m⁻² dia⁻¹ pelas plantas que receberam inoculação via semente (+61,10%), em relação às plantas controle, que perdeu moléculas de água a uma taxa de apenas 38,540 mol H₂O m⁻² dia⁻¹ (Figura 3D). Estes incrementos de transpiração proporcionados por *A. brasilense* corroboram aos acréscimos nos valores de teor relativo de água (Figura 2B), reforçando a capacidade de maior exploração de água no solo (COHEN et al., 2015; HUNGRIA et al., 2010), culminando em manutenção do status hídrico e incrementos de fotossíntese anteriormente descrito, e reduzindo possíveis efeitos adversos de desnaturações proteicas e gastos energéticos com ressíntese de compostos celulares pela manutenção da temperatura foliar (dados não significativos não foram exibidos).

As demais variáveis, como temperatura foliar, eficiência do uso da água, eficiência intrínseca do uso da água e eficiência de carboxilação não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos testados.

6.3.3 Atividade bioquímica antioxidante

Do complexo de enzimas antioxidantes avaliadas, apenas a catalase e a superóxido dismutase apresentaram efeitos significativos para os tratamentos com inoculação de *A. brasilense*.

A catalase apresentou oscilações entre os tratamentos dentro de cada horário de avaliação, porém ao final do dia (20:00 horas), houve redução de sua atividade quando adotada pulverização via foliar e inoculação via semente + pulverização foliar de *A. brasilense* (Figura 4A).

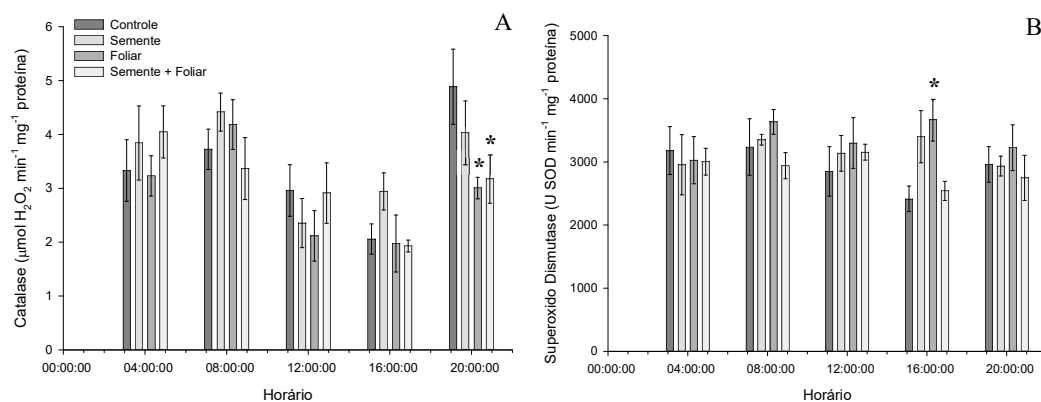


Figura 4 - Atividade de catalase (A) e superóxido dismutase (B) ao longo do dia em folhas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* e baixa disponibilidade hídrica. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

Por outro lado, a superóxido dismutase exerceu efeitos durante os momentos mais quentes do dia, e associados à menor umidade relativa, onde a pulverização foliar de *A. brasilense* elevou atividade desta enzima as 16:00 horas no limbo foliar do milho, retornando aos valores iniciais ao final do dia (Figura 4B).

6.4 DISCUSSÃO

A deficiência hídrica, assim como outros fatores de estresse abiótico, afeta diversas atividades fisiológicas e bioquímicas nas plantas. O monitoramento da umidade gravimétrica

do solo (Figura 2A) aliado ao conteúdo relativo de água das folhas (Figura 2B) indica influência dos tratamentos com pulverização foliar de *A. brasilense*, isolado ou combinado com inoculação via semente, em manter a turgescência vegetal sem efeitos na seletividade das membranas plasmáticas (Figura 2C). A pulverização foliar de *A. brasilense* utilizado conjuntamente à inoculação via semente promoveu aumentos tanto o volume quanto a massa seca de raiz, e apresentou tendência de aumento para a pulverização utilizada de forma isolada (dados apresentados no Capítulo 7), indicando maior área de exploração do solo (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; HUNGRIA et al., 2010) e, conseqüentemente, melhor absorção hídrica, mantendo os níveis de água nos tecidos elevados.

Pela capacidade de ser utilizado em pulverizações foliares (CLEMENTE et al., 2016; FUKAMI et al., 2016), tanto as células como os metabólitos de *A. brasilense* ocasionam incrementos no desenvolvimento vegetal, gerando efeitos em toda a planta, mesmo que sua presença *in vivo* não consiga ser detectada (FUKAMI et al., 2017). Os mesmos autores relatam que dentre os metabólitos produzidos por *A. brasilense* encontram-se compostos hormonais auxínicos e ácido salicílico que são transportados sistemicamente pela planta.

A ação das auxinas envolve-se diretamente com o desenvolvimento do sistema radicular para exploração de maior área de solo (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014; HUNGRIA et al., 2010), ao passo que o ácido salicílico está envolvido na regulação de processos metabólicos importantes em momentos de escassez hídrica, modulando o conteúdo celular de prolina, defesa antioxidante, regulação osmótica, eficiência transpiratória, condutância estomática e atividade fotossintética (MIURA; TADA, 2014; NOREEN; ATHAR; ASHRAF, 2013), capacitando o *A. brasilense* como indutor em momentos de estresse abióticos (CASSÁN et al., 2009b; MIURA; TADA, 2014). Como visto, esta proteção em situações de déficit hídrico culmina na manutenção do teor de água nos tecidos foliares (Figura 2B), como verificado em *Urochloa* (BULEGON et al., 2017b) e *Arabidopsis* (COHEN et al., 2015), induzido por um complexo de mecanismos de ação desencadeado por *A. brasilense* (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; CURÁ et al., 2017).

A manutenção da turgescência do limbo foliar do milho nos momentos mais críticos de deficiência de água no solo (Figura 2B) possibilitou respostas positivas nas trocas gasosas ao longo do dia. A pulverização foliar de *A. brasilense* elevou o acumulado fotossintético diário em 8, 90%, e quando combinada com a inoculação via semente, incrementou em 5, 59% a taxa fotossintética ao longo do dia (Figura 3A).

Em condições de escassez hídrica, altas temperaturas e elevadas taxas luminosas, ocorre rápida perda de água e de turgescência celular devido à intensa transpiração, forçando o

vegetal a fechar os estômatos para prevenir maiores perdas de água (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). O fechamento leva a baixas concentrações de CO₂ intercelular, limitando a fotossíntese (MUMM et al., 2011), sendo a principal causa de perdas no processo carboxilativo em condições de déficit hídrico (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). Além da fotossíntese, outros processos celulares essenciais são afetados pela falta de água nos tecidos, como a atividade enzimática, produção de energia, permeabilidade das membranas, metabolismo lipídico e síntese de elementos celulares estruturais (FILIPPOU et al., 2014).

Os incrementos transpiratórios promovidos por *A. brasilense* descritos nesta pesquisa reforçam a importância de elevados níveis de água nos tecidos para manutenção da produção vegetal. Deste modo, com mais água nos tecidos do limbo foliar, maior será a capacidade de manutenção da transpiração (Figura 3D) sem perda de turgor, mantendo a abertura estomática (Figura 3B) e a taxa fotossintética (Figura 3A).

Com a falta de turgor celular, o fechamento estomático ocorre rapidamente (ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013), porém, conforme o turgor é reestabelecido nos tecidos (Figura 2B), não necessariamente há rápida reabertura estomática (Figura 3B, 12:00 – 18:00 horas), devido ao efeito residual do acúmulo de ácido abscísico nas células guarda (SLAMA et al., 2015). Contudo, a capacidade de excreção de ácido salicílico acelera a sinalização celular (FUKAMI et al., 2017), e independente da forma de aplicação ou combinação de *A. brasilense*, observa-se promoção de rápida reabertura dos estômatos pela bactéria, possibilitando maior taxa transpiratória (aumento $\pm 71,82\%$ em relação ao controle ao longo do dia) e maior entrada de CO₂ a ser aproveitado na fotossíntese (Figura 3A), visto que a concentração interna de CO₂ manteve-se semelhante entre os tratamentos (Figura 3C).

Os períodos de maior demanda hídrica durante o dia coincidem com os momentos de maior luminosidade excedente e temperatura (Figura 1), sendo imprescindível a manutenção do turgor do vegetal para sustentar taxa adequada de trocas gasosas. Em caso de baixa disponibilidade hídrica, com os estômatos fechados e alta luminosidade, ocorre o segundo estágio de inibição fotossintética, conhecida como limitação não-estomática (FOYER; NOCTOR, 2009). A elevada luminosidade ambiental, aliada ao baixo nível de CO₂ disponível para assimilação, sobrecarrega o fotossistema II nas membranas dos tilacóides, induzindo formação de espécies reativas de oxigênio (BARBOSA et al., 2014; DAS et al., 2011), compostos danosos a diversas estruturas celulares e a proteína D1 do centro de reação do fotossistema II (VASS; CSER, 2009).

Como indutor do sistema bioquímico pós-formado de defesa celular contra espécies reativas de oxigênio, o *A. brasilense* modula a formação de enzimas antioxidantes como a

catalse e a superóxido dismutase (BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016), como detectado na presente pesquisa. A capacidade do vegetal em modular seu sistema antioxidante em condições de estresse é considerada característica importante de resistência (GHAHFAROKHIA et al., 2015), podendo ser mediada por microrganismos (BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016; CASSÁN et al., 2009b).

O acúmulo de ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) ao longo do dia demandou aumento da atividade da superóxido dismutase às 16:00 horas pela pulverização foliar de *A. brasilense* (Figura 4B), visando convertê-los a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e reduzir o potencial de danos. A superóxido dismutase possui maior atividade em condições de estresse elevado (BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016), principalmente devido à baixa assimilação de CO_2 verificada desde as 12:00 horas nas condições do ensaio, mantendo NADP em sua forma reduzida e indisponível para recepção de elétrons, induzindo maior formação de radicais superóxido no fotossistema I (FOYER; NOCTOR, 2009). Conforme os tecidos se reidrataram e a luminosidade incidente reduziu, ao final do dia, a superóxido dismutase diminuiu sua atividade devido ao decréscimo do substrato superóxido para conversão em H_2O_2 (CAMPOS et al., 2011).

Por outro lado, a catalase é uma das enzimas responsáveis pela redução de H_2O_2 a água, sendo que as peroxidases realizam a mesma atividade nas células vegetais (BARBOSA et al., 2014; GHAHFAROKHIA et al., 2015). Apesar de não identificadas diferenças na atividade das peroxidases, a catalase teve sua atividade reduzida ao final do dia por ambos tratamentos que receberam pulverização foliar de *A. brasilense*, seja isolado ou combinado com inoculação via semente (Figura 4A). Esta enzima usualmente é demandada em condições de estresse hídrico severo (BARBOSA et al., 2014), e passado o momento limitante na cultura do milho reduz-se a atividade a níveis menores do que aqueles encontrados antes do período limitante (GHAHFAROKHIA et al., 2015), como verificado as 20:00 horas.

A utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal, como neste caso o *Azospirillum*, visa otimizar a capacidade natural das plantas em superar condições ambientais adversas (CASSÁN et al., 2009b; COHEN et al., 2015; FUKAMI et al., 2017), modulando reações vegetais de ordem bioquímica e biofísica. Sob baixa disponibilidade hídrica no solo, estas alterações culminam em manutenção de turgor dos tecidos foliares, maior capacidade transpiratória, com consequente abertura estomática e fornecimento de CO_2 intercelular, reduzindo a inibição fotossintética nos períodos estressantes de maior luminosidade e temperatura do dia, modulando o sistema antioxidante do milho, realizando eliminação de ROS conforme necessidade momentânea do vegetal.

6.5 CONCLUSÃO

Estes resultados alcançados reforçam a habilidade do *A. brasilense*, seja por inoculação via semente, e principalmente por pulverização foliar, em mitigar estresses ocasionados por baixa disponibilidade hídrica no milho, reduzindo perdas de água relacionadas à turgescência dos tecidos vegetais, e promovendo aumento da atividade antioxidante visando proteger estruturas celulares, culminando em menores reduções de fotossíntese em momentos de alta luminosidade e demanda hídrica.

6.6 REFERÊNCIAS

- AHMAD, N. et al. Drought stress in maize causes differential acclimation responses of glutathione and sulfur metabolism in leaves and roots. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 247, 2016.
- AHMADI-RAD, S. et al. Foliar application of nitrogen fixing bacteria increases growth and yield of canola grown under different nitrogen regimes. **Rhizosphere**, v. 2, p. 34–37, 2016.
- ALI, Z. et al. Mitigation of drought stress in maize by natural and synthetic growth promoters. **Journal of Agriculture and Social Sciences**, v. 7, n. 2, p. 56–62, 2011.
- ANJUM, S. ; XIE, X. ; WANG, L. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 9, p. 2026–2032, 2011.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.
- BLUM, A. ; EBERCON, A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. **Crop Science**, v. 21, n. 1, p. 43–47, 1981.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BROETTO, F. **Métodos de trabalho em bioquímica vegetal e tecnologia de enzimas**. Botucatu: Cultura Acadêmica, 2014.
- BULEGON, L. G. et al. Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and rehydration conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1283–1289, 2017.

- 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.
- CAMPOS, M. K. F. et al. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic “Swingle” citrumelo plants over-accumulating proline. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 242–250, 2011.
- CASSÁN, F. et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 12–19, 2009.
- CASSÁN, F. ; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.
- 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.
- CHAVES, M. M. ; FLEXAS, J. ; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009.
- CLEMENTE, J. M. et al. *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization affecting wheat productivity. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 24, p. 2179–2184, 2016.
- COHEN, A. C. et al. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Physiologia Plantarum**, v. 153, n. 1, p. 79–90, 2015.
- CURÁ, A. et al. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 41, 26 jul. 2017.
- DAS, P. K. et al. Photosynthesis-dependent anthocyanin pigmentation in *Arabidopsis*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 1, p. 23–25, 2011.
- DUANGMAL, K. ; OWUSU APENTEN, R. K. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 351–359, 1999.
- EL-LATTIEF, E. A. A. Use of *Azospirillum* and *Azobacter* bacteria as biofertilizers in cereal crops: a review. **International Journal of Research in Engineering and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 36–44, 2016.
- FILIPPOU, P. et al. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 1–10, 2014.
- FOYER, C. H. ; NOCTOR, G. Redox Regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 861–905, 2009.

- FUKAMI, J. et al. Assessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016.
- FUKAMI, J. et al. 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.
- GHAHFAROKHIA, M. G. et al. Effects of drought stress and rewatering on antioxidant systems and relative water content in different growth stages of maize (*Zea mays* L.) hybrids. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 61, n. 4, p. 493–506, 2015.
- GIANNOPOLITIS, C. N. ; RIES, S. K. Superoxide dismutases: i. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977.
- HAMMERSCHMIDT, R. ; NUCKLES, E. M. ; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 73–82, 1982.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1–2, p. 413–425, 2010.
- KASIM, W. A. et al. Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 1, p. 122–130, 2013.
- KAVAMURA, V. N. et al. Screening of brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183–191, 2013.
- MIURA, K. ; TADA, Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. January, p. 1–12, 2014.
- MUMM, P. et al. Cell Type-specific regulation of ion channels within the maize stomatal complex. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 8, p. 1365–1375, 2011.
- NAVEED, M. et al. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 30–39, 2014.
- NOREEN, S. ; ATHAR, H. U. R. ; ASHRAF, M. Interactive effects of watering regimes and exogenously applied osmoprotectants on earliness indices and leaf area index in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) crop. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, n. 6, p. 1873–1881, 2013.
- NOVAIS, R. F. ; NEVES, J. C. L. ; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In: **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA, 1991. p. 189–198.
- PEIXOTO, P. H. P. et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137–143, 1999.
- SANDHYA, V. et al. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. **Plant Growth Regulation**, v. 62, n. 1, p. 21–30, 2010.

SANTOS, H. G. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília: Embrapa Solos, 2018. 356 p.

SHAO, H. -B. et al. Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants – biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment in arid regions of the globe. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 131–151, 2009.

SLAMA, I. et al. Water deficit stress applied only or combined with salinity affects physiological parameters and antioxidant capacity in *Sesuvium portulacastrum*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 213, p. 69–76, 2015.

TAKEDA, S. ; MATSUOKA, M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 444–457, 2008.

VASS, I. ; CSER, K. Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 4, p. 200–205, 2009.

ZHANG, S. et al. Temperature-dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO₂ assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday high irradiance. **Photosynthetica**, v. 39, n. 3, p. 383–388, 2001.

ZHOU, Y. ; LAMBRIDES, C. J. ; FUKAI, S. Drought resistance of bermudagrass (*Cynodon* spp.) ecotypes collected from different climatic zones. **Environmental and Experimental Botany**, v. 85, n. 1, p. 22–29, 2013.

ZLATEV, Z. ; LIDON, F. C. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 24, n. 1, p. 57–72, 2012.

ZUFFO, A. M. et al. Path analysis in soybean cultivars grown under foliar spraying and furrow inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 10, p. 137, 2017.

7 CAPÍTULO 6: APROVEITAMENTO DA RADIAÇÃO SOLAR E PROTEÇÃO ANTIOXIDATIVA EM MILHO IMPULSIONADOS POR *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

Resumo: Culturas C₄, como o milho, apresentam grande potencial de produção de grãos quando otimizada a utilização de recursos ambientais. Para tanto, bactérias promotoras de crescimento vegetal têm sido utilizadas junto à cultura como estimulantes quanto à eficiência fotossintética. Neste sentido, esta pesquisa objetivou avaliar plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* via semente ou pulverização foliar quanto às trocas gasosas e reações antioxidantes ao longo do dia. Estabeleceu-se como tratamentos: controle; inoculação via semente com *A. brasilense*; pulverização foliar de *A. brasilense* ao estágio V₄; e inoculação via semente + pulverização foliar. Folhas da espiga ao estágio R₃ foram avaliadas quanto às trocas gasosas em condições luminosas similares às ambientais do momento, em intervalo de duas horas, entre as 04h00min e 20h00min. Simultaneamente, amostras foliares foram coletadas para quantificação da atividade de complexo de enzimas antioxidantes. O aproveitamento dos recursos luminosos foi impulsionado por *A. brasilense*, principalmente nos momentos de maior radiação luminosa, aliado à alta transpiração. A maior assimilação de CO₂ foi proporcionada pela pulverização foliar de *A. brasilense*, atingindo patamar 36,02% superior ao controle. Os tratamentos com *A. brasilense* apresentam rápida resposta de abertura estomática, permitindo maior aporte de CO₂ à câmara subestomática e alta atividade carboxilativa/fotossintética. A atividade antioxidante é impulsionada pela inoculação e pulverização, principalmente nos momentos de alta luminosidade ambiental. Em suma, *A. brasilense* inoculado via semente, e principalmente pulverizado em parte aérea, proporcionam melhor aproveitamento dos recursos ambientais e assimilação de CO₂, atrelado ao aumento da atividade de enzimas antioxidante para proteção do aparato fotossintético.

Palavras-chave: Fotossíntese; Trocas gasosas; Bactérias promotoras de crescimento vegetal.

7.1 INTRODUÇÃO

A produção global de alimentos enfrentará grandes desafios no futuro próximo. Para produzir alimentos que atendam a previsão de crescimento da população mundial é necessário reduzir as diferenças entre o potencial produtivo das culturas e as produtividades atualmente alcançadas nos sistemas de produção agrícola (FISCHER, 2015), baseando-se principalmente no aumento da eficiência de uso de recursos ambientais (GODFRAY et al., 2010).

Culturas C₄, como o milho, apresentam grande potencial de produção de grãos desde que otimizado o uso da radiação solar ambientalmente disponível (CHEN et al., 2011). Para tanto objetiva-se, nos próximos anos, agregar tecnologias à cultura que permitam aumento da tolerância a altas temperaturas aliada à maior eficiência fotossintética, do uso da água e dos nutrientes (GODFRAY et al., 2010). Segundo os mesmos autores, a compreensão das técnicas disponíveis e seus efeitos na fisiologia vegetal permitem abordagem mais direcionada à seleção de boas práticas para otimizar a produção.

A capacidade de aproveitar picos de luminosidade, principalmente ao meio do dia, relacionam-se com o maior teor de água nos tecidos fotossintetizantes (GHANNOUM, 2009) para manutenção da abertura estomática, difusão de CO₂ e atividade da RUBPcase (LAWLOR; TEZARA, 2009), assim como o número de cloroplastos e teor dos pigmentos fotossintéticos presente nos tecidos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Contudo, mesmo que as plantas consigam suportar os picos de radiação ao meio do dia, luminosidade em excesso, mesmo em plantas C₄, como o milho, pode sobrecarregar os fotossistemas nas membranas dos tilacóides, ocasionando limitação não-estomática da fotossíntese (FOYER; NOCTOR, 2009). Neste momento a luminosidade em excesso sobrecarrega os fotossistemas I (PS I) e II (PS II), impedindo a dissipação correta de energia dos elétrons excitados, os quais induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BARBOSA et al., 2014).

Por consequência, estas ROS geram danos a biomoléculas celulares, incluindo proteína D1 do centro de reação do PS II (VASS; CSER, 2009), fundamentais para a atividade fotossintética. Como mecanismo de defesa contra ROS as células produzem, entre um complexo de mecanismos, gama de enzimas antioxidantes como peroxidases (POX), catalases (CAT), polifenoloxidasas (PPO) e superóxido dismutase (SOD) (BARBOSA et al., 2014; GILL; TUTEJA, 2010).

Alternativa promissora e sustentável, a adoção de biofertilizantes e/ou bioinoculantes é opção crescente para incremento de produtividades (SARANRAJ; SIVASAKTHIVELAN, 2013) neste cenário de desafio agrícola. Ressalta-se que as comunidades microbianas são importantes aliadas na manutenção do balanço de atividades metabólicas das plantas (KAVAMURA et al., 2013).

Relatos de aumento na taxa fotossintética em gramíneas promovidos por bactérias promotoras de crescimento são constantes na literatura, como reportados em arroz (KANNAN; PONMURUGAN, 2010; RUÍZ-SÁNCHEZ et al., 2011) e mais recentemente em milho (HUSSAIN et al., 2016) e braquiária (BULEGON et al., 2017b), indicando melhor aproveitamento da luminosidade ambientalmente disponível.

O gênero bacteriano *Azospirillum* tem sido vastamente utilizado em culturas como milho, arroz e trigo (SARANRAJ; SIVASAKTHIVELAN, 2013), tendo o posto de bioinoculante associativo mais comercializado no mundo (EL-LATTIEF, 2016). Sua associação com as plantas culmina em complexo de estímulos bioreguladores (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014), podendo sua aplicação ocorrer por inoculação diretamente às sementes ou pulverizações voltadas ao filoplano (FUKAMI et al., 2017), impactando positivamente variáveis fisiológicas (BULEGON et al., 2017b) e mecanismos de defesa (BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016), desenvolvimento (BATTISTUS et al., 2014; KLEIN et al., 2012) e produtividade vegetal (AHMADI-RAD et al., 2016; ZUFFO et al., 2017).

Deste modo, a utilização de *Azospirillum* sp. em milho, seja inoculado na semente ou pulverizado na parte aérea da planta, pode atuar como estimulante à fotossíntese (HUSSAIN et al., 2016) e à produção de pigmentos relacionados à fotossíntese (BATTISTUS et al., 2014), induzindo, por mecanismos de proteção ou estímulo, melhor aproveitamento da luminosidade natural incidente ao longo do dia.

Em vista do apresentado, esta pesquisa teve por objetivo avaliar plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense*, estirpes AbV5+AbV6, via semente ou pulverização foliar, quanto ao aproveitamento da luminosidade natural incidente sobre a fotossíntese, trocas gasosas e atividade protetora de enzimas antioxidantes ao longo do dia.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Tratamentos e delineamento experimental:

Estudou-se o comportamento de plantas de milho submetidas a três formas de aplicação de *A. brasilense* corrig. Tarrand et al., estirpes AbV5 + AbV6, compreendendo os tratamentos: 1. Controle; 2. Inoculação via semente de *A. brasilense* (100 mL/60.000 sementes); 3. Pulverização foliar de *A. brasilense* (300 mL ha⁻¹) ao estágio V₄; 4. Inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense* nas dosagens e estádios anteriormente citados. O ensaio foi conduzido em blocos casualizados com cinco repetições, com duas plantas por repetição.

7.2.2 Material vegetal e condução experimental

Plantas de milho híbrido Pionner 30F53 Leptra® RR2™ foram conduzidas a pleno sol em vasos de 25 litros (29 cm x 37 cm x 29 cm; AxDxd) preenchidos com substrato a base de horizonte A+B de LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef) (SANTOS, 2018).

Previamente a semeadura o substrato foi homogeneizado com 50 mg dm⁻³ de N (ureia), 300 mg dm⁻³ de P₂O₅ (superfosfato triplo) e 150 mg dm⁻³ de K₂O (cloreto de potássio) (NOVAIS; NEVES; BARROS, 1991). Ainda segundo a mesma recomendação, foi realizado aporte de 50 mg dm⁻³ de N (ureia) no estágio V₃ da cultura. Baseado na saturação de bases apresentada (V% de 62,68), não foi necessário calagem.

7.2.3 Trocas gasosas

Folhas com ausência de lesões foram avaliadas com auxílio do equipamento IRGA LI-6400XT (Licor Inc. Lincoln, NE) em condições de luminosidade similares às ambientais para a época do ano na folha da espiga ao estágio R₃, em intervalo de duas horas, iniciando as 04h00min e finalizando às 20h00min.

Quantificou-se a taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), taxa de transpiração da folha (*E*); condutância estomática (*gs*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*), temperatura de folhas

(°C), além das relações $WUE = A/E$, $iWUE = A/g_s$ e $F_c = A/C_i$ (ZHANG et al., 2001b), onde WUE representa a eficiência do uso de água, $iWUE$ a eficiência intrínseca do uso de água, e F_c a eficiência instantânea de carboxilação.

7.2.4 Análises bioquímicas

7.2.4.1 Coleta das amostras

Amostras dos tecidos do limbo foliar da folha da espiga no estágio R₃ foram coletadas em intervalo de quatro horas, iniciando-se às 04h00min e finalizando às 20h00min, excluindo-se a nervura central, e pesadas em massa fresca aproximada de 0,5 gramas, imediatamente acondicionadas em gelo para transporte até ultrafreezer (-80 °C), onde ficaram armazenadas até o momento da obtenção do extrato proteico.

7.2.4.2 Obtenção dos extratos

As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido, e posteriormente homogeneizadas em 5mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo 0,1 mM EDTA e 1% (p/p) de PVP (polivinilpirrolidona). Este macerado foi submetido a centrifugação a 4.000g durante 20 minutos em temperatura constante de 4 °C. O sobrenadante referente ao extrato enzimático foi recolhido com pipeta e transferido para microtubos, sendo armazenados em ultrafreezer a -80 °C, para ser utilizado posteriormente na determinação do conteúdo protéico e atividade enzimática de peroxidase, catalase, polifenoloxidase e superóxido dismutase (BROETTO, 2014).

7.2.4.3 Quantificação de proteínas solúveis totais

A quantificação de proteínas solúveis totais foi realizada em triplicata utilizando 30 µL de extrato enzimático, 2.250 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 600 µL do reagente de Bradford, homogeneizados em agitador de tubos, e submetido a leitura à 595 nm de

absorbância em espectrofotômetro após cinco minutos de reação (BRADFORD, 1976). Os valores de absorbância foram plotados em curva padrão de concentrações de albumina de soro bovino (ASB) e a concentração de proteínas expressa em mg de proteína g⁻¹ matéria fresca.

7.2.4.4 Atividade de peroxidase (POD; EC 1. 11. 1. 7)

A atividade da peroxidase do guaiacol foi determinada através da conversão do guaiacol em tetraguaiacol, via determinação da atividade à 30 °C pelo método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT; NUCKLES; KUĆ, 1982). Para a reação foi preparado substrato utilizando 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), suplementado com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio. Por sua vez a mistura da solução consistiu de 200 µL do extrato enzimático e 1.400 µL de substrato. A reação foi realizada em espectrofotômetro à 470 nm durante 2 min. A diferença entre o momento final e inicial foi utilizado para a determinação da atividade considerando coeficiente de extinção molar (ϵ) de 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹. Os resultados de atividade específica da peroxidase foram expressos em µmol H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹.

7.2.4.5 Atividade de catalase (CAT; EC 1. 11. 1. 6)

Para análise da atividade da catalase foi preparado tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), suplementado com peróxido de hidrogênio para obtenção de tampão à 12,5 mM de H₂O₂, substrato para reação da enzima. O tampão foi mantido a 30 °C em banho maria visando reação nessa temperatura. A mistura de reação consistiu na utilização de 90 µL de extrato enzimático da amostra com 2.910 µL do referido tampão, agitado previamente em agitador de tubos durante 15 segundos. A leitura direta da variação da absorção de peróxido de hidrogênio foi realizada à 240 nm de absorbância em espectrofotômetro durante dois minutos (BROETTO, 2014; PEIXOTO et al., 1999). Os resultados de atividade específica da catalase consideraram coeficiente de extinção molar (ϵ) de 36 mM⁻¹ cm⁻¹ e foram expressos em µmol H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹.

7.2.4.6 Atividade de polifenoloxidase (PPO; E. C. 1. 10. 3. 1)

A atividade da polifenoloxidase foi determinada usando-se a metodologia de (DUANGMAL; OWUSU APENTEN, 1999). Realizando mistura de leitura utilizando 100 μL de extrato enzimático e 1.800 μL de substrato para enzima, preparado utilizando tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6, 8) suplementado com catecol à 0,02 M. A leitura direta da variação da absorção de catecol foi realizada à 420 nm de absorbância em espectrofotômetro durante dois minutos. Os resultados de atividade específica da polifenoloxidase consideraram coeficiente de extinção molar (ϵ) de 26,9 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e foram expressos em $\mu\text{mol catecol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

7.2.4.7 Atividade de Superóxido dismutase (SOD; EC 1. 15. 1. 1)

A atividade da SOD foi determinada segundo capacidade de inibição da fotorredução do NBT (Cloreto de azul de nitrotetrazólio) e formação de formazana (coloração azul). Para tanto foi elaborado tampão de reação contendo metionina (13 mM), NBT (75 μM), EDTA (100 nM), riboflavina (2 μM) e tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8). Foram adicionados a tubos de ensaio de vidro branco 100 μL de extrato enzimático e 1.900 μL do tampão de reação. O controle consistiu do uso o tampão de reação puro. Tanto as amostras quanto os controles foram submetidos a reação de oxidação, conduzida sob 25 °C por 5 min, em tubos de ensaio acondicionados em grades de suporte metálicas brancas colocadas em caixa de madeira sob lâmpada fluorescente (45 W) a 15 centímetros de distância. A reação foi concluída pela interrupção da luz (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A leitura foi realizada à 560 nm em espectrofotômetro. O branco utilizado constituiu do uso do tampão de reação mantido ao abrigo da luz. A atividade enzimática foi expressa em unidades de superóxido dismutase necessária para a inibição de 50 % da fotorredução do NBT, U SOD mg^{-1} proteína.

7.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-wilk a 5% de probabilidade de erro. Na presença de normalidade dos erros, os dados passaram por análise de variância a 5% de probabilidade de erro pelo teste F de Fisher, e em caso positivo,

submetidos a teste de médias de Dunnett a 5% de probabilidade de erro visando comparar os tratamentos com *A. brasilense* ao tratamento controle, ou análise de regressão, definindo-se o ajuste mais adequado baseado em modelos significativos, com lógica biológica e elevado valor de coeficiente de determinação (R^2).

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Trocas gasosas

Os dados referentes as condições meteorológicas no dia da avaliação estão apresentadas na figura 1.

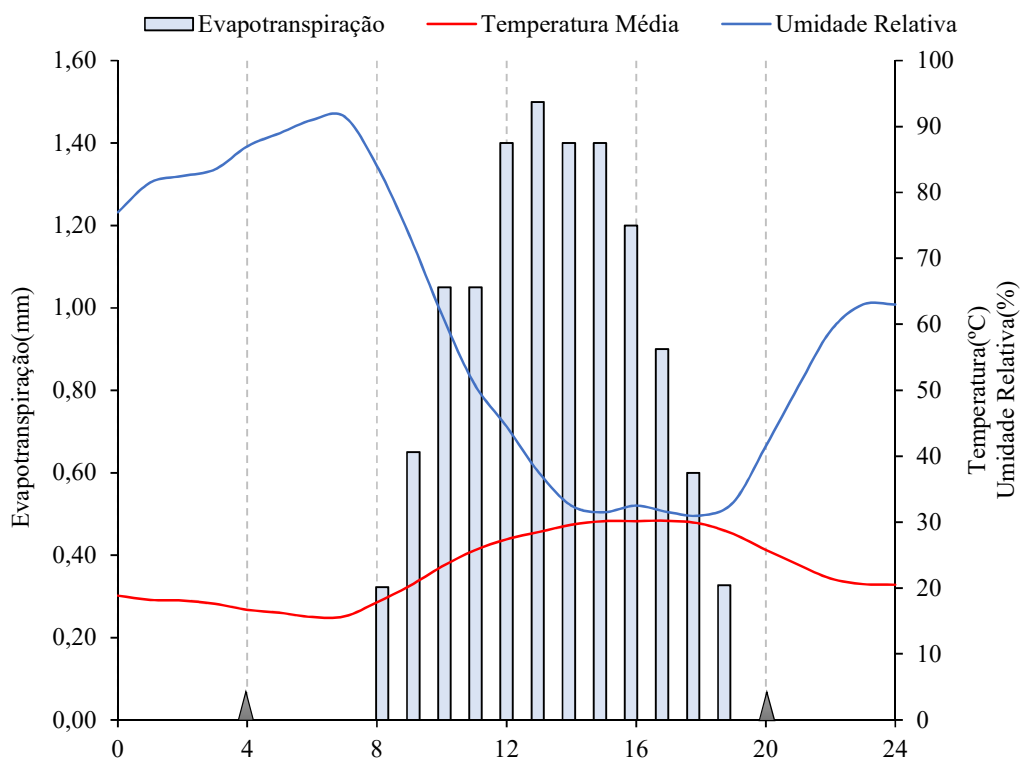


Figura 1 - Condições ambientais ao longo do dia (temperatura média, umidade relativa e evapotranspiração) durante a avaliação de trocas gasosas e coletas das amostras para análises bioquímicas. Triângulos cinza representam o início e fim da coleta de amostras e leitura de trocas gasosas.

As leituras de umidade relativa iniciaram o dia com valores de 87%, atingindo ponto mínimo de 31% as 18:00 horas e finalizando com 42% as 20:00 horas. Já a temperatura média iniciou com 16,70 °C, atingindo pico de 30,20 °C as 17:00 horas, e fechando as leituras com 25,80 °C. A evapotranspiração acumulada no dia foi de 11,80 mm, com picos de 1,50 mm h⁻¹ entre as 13:00 e 14:00.

A adequada disponibilidade hídrica durante o ensaio (manutenção da capacidade de campo) possibilitou a distinção da eficiência fotossintética e de trocas gasosas promovidas pela utilização de *A. brasilense* em suas diversas formas de aplicação (Figura 2).

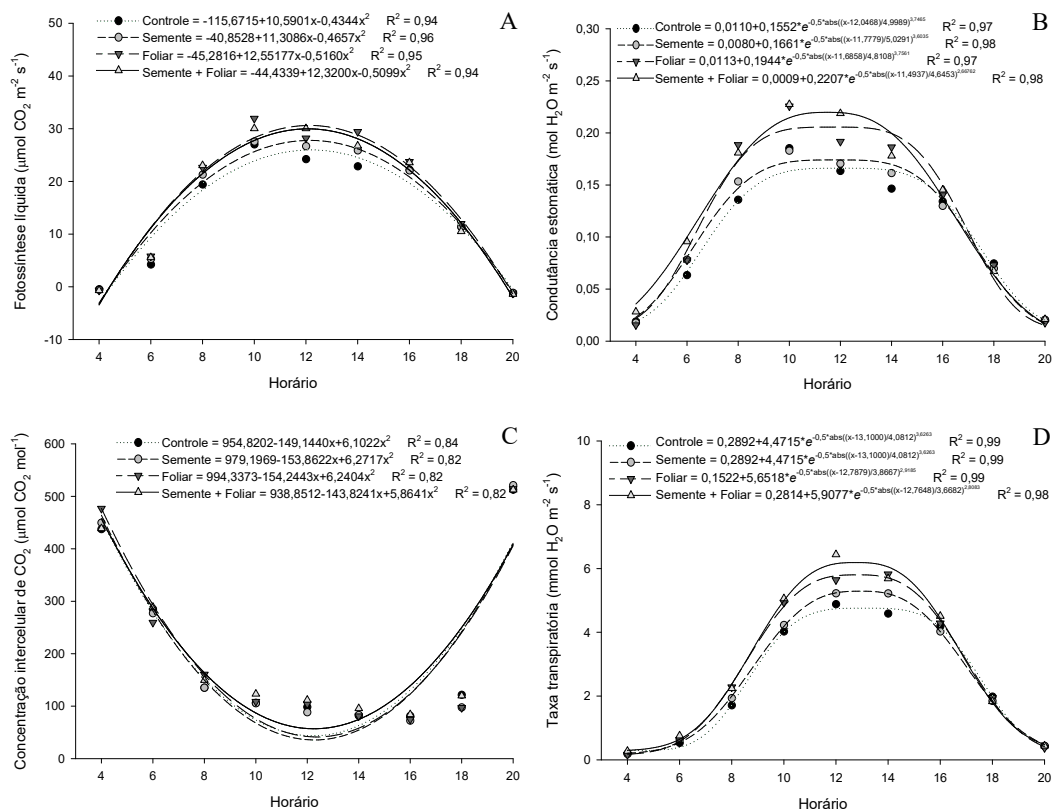


Figura 2 - Fotossíntese líquida (A), condutância estomática (B), concentração intercelular de CO_2 (C) e taxa transpiratória (D) de folhas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*.

O aproveitamento dos recursos luminosos naturais foi impulsionado pela inoculação das plantas com *A. brasilense*, independente de como utilizado, e com efeitos proeminentes nos momentos de maior radiação fotossinteticamente ativa do dia (Figura 2A). Integralizando os valores das equações para fotossíntese líquida, o tratamento controle apresentou assimilação

líquida de 870,455 mmol CO₂ m⁻² dia⁻¹, ao passo que a inoculação via semente de *A. brasilense* atingiu valores de 932,607 mmol CO₂ m⁻² dia⁻¹, seguido de 1.031, 260 mmol CO₂ m⁻² dia⁻¹ promovido pela utilização conjunta de *A. brasilense* via semente + pulverização foliar. A maior assimilação diária foi possibilitada quando adotado apenas a pulverização foliar de *A. brasilense*, atingindo patamares de 1.186,780 mmol CO₂ m⁻² dia⁻¹.

A condutância estomática apresentou fortes incrementos quando utilizado a pulverização foliar de *A. brasilense*, seja de forma isolada ou combinada com a inoculação via semente. Este último se apresentou mais eficiente na abertura dos estômatos desde o início do dia, equiparando-se ao controle somente após as 16:00 horas (Figura 2B). Novamente, o momento de maior distinção em relação ao controle se concentrou próximo ao início da tarde, momento de maior incidência de radiação luminosa.

Nota-se que os tratamentos com *A. brasilense* apresentam rápida resposta de abertura estomática no início do dia com relação ao controle (Figura 2B), permitindo rápido aporte de CO₂ a câmara subestomática. Contudo, este maior aporte de CO₂ é rapidamente utilizado na carboxilação (Figura 2A), sem se acumular nos espaços intercelulares das folhas de milho (Figura 2C). Para esta última variável, verifica-se que as diferenças são menos proeminentes entre os tratamentos com *A. brasilense* e controle (Figura 2C).

A taxa transpiratória foliar seguiu comportamento semelhante à condutância estomática, onde os tratamentos com *A. brasilense* apresentaram maior perda de água durante o dia. Integralizando as equações, a inoculação via semente + pulverização foliar apresentou 192,238 mol H₂O m⁻² dia⁻¹ transpirado, seguido de 186,055 mol H₂O m⁻² dia⁻¹ perdido pela pulverização foliar, 166,947 mol H₂O m⁻² dia⁻¹ pela inoculação via semente, e apenas 160,654 mol H₂O m⁻² dia⁻¹ transpirado pelo controle (Figura 2D).

Apesar da menor perda de água apresentado pelo controle, ressalta-se que a transpiração é um evento imprescindível ao vegetal para arrefecimento, principalmente nos momentos de maior incidência de radiação luminosa que superaquece os tecidos vegetais. Caso não haja arrefecimento adequado, mesmo em metabolismos C₄, há possibilidade de formação de espécies reativas de oxigênio e desnaturação proteica dos compostos celulares, demandando maiores taxas respiratórias, principalmente no período noturno, para ressíntese destes biocompostos essenciais.

Plantas de milho inoculadas via semente ou pulverizadas via foliar com *A. brasilense*, ambas de forma isolada, se mostraram mais eficientes quanto à atividade do processo carboxilativo em relação à quantidade de CO₂ presente na câmara subestomática (Figura 3). É possível verificar esta distinção a partir das 08:00 horas, que prossegue até o fim do dia com

maior eficiência. Este processo indica a maior capacidade carboxilativa proporcionada pelos tratamentos anteriormente citados, tanto na questão do aproveitamento da energia e poder redutor formado na fase da fotossíntese dependente de luz, quanto na atividade dos ciclos do malato e aspartato I e II, concentrando mais CO₂ nas células da bainha vascular.

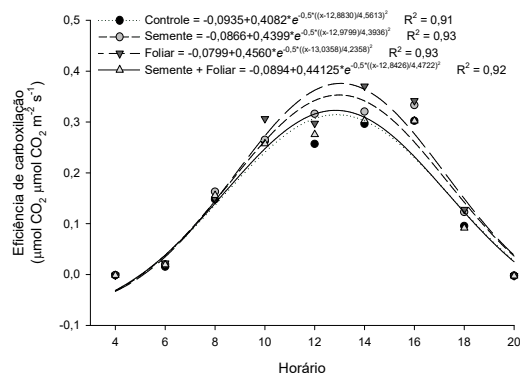


Figura 3 - Eficiência de carboxilação de folhas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*.

7.3.2 Atividade bioquímica antioxidante

Os níveis de proteínas solúveis contidos no tecido foliar foram reduzidos somente as 12:00 horas pelos tratamentos com *A. brasilense*, independente da forma de inoculação ou combinação (Figura 4A), voltando a equiparar-se ao controle nos horários mais avançados do dia.

Neste mesmo período do dia, a combinação via semente + pulverização foliar de *A. brasilense* incrementou a atividade de peroxidases (Figura 4B). A adoção isolada de *A. brasilense*, seja por inoculação ou pulverização na parte aérea, também evidenciaram aumento em valores absolutos da atividade de peroxidases, porém insuficientes para apresentar diferenças estatisticamente significativas.

De modo contrário à redução no teor das proteínas solúveis (Figura 4A), a catalase e polifenoloxidase tiveram sua atividade impulsionada pela utilização de *A. brasilense* em qualquer forma ou combinação. Alterações na atividade da catalase restringiram-se apenas à avaliação das 12:00 horas (Figura 4C), contudo a polifenol oxidase manteve sua atividade elevada as 16:00 horas pela inoculação via semente de forma isolada, e a combinação de formas de utilização de *A. brasilense* voltou a ser superior ao controle as 20:00 horas (Figura 4D).

Ressalta-se que o mesmo tratamento já apresentava, às 16:00 horas, tendência de manutenção da atividade da polifenoloxidase elevada em relação ao controle como visto as 12:00 horas, porém sem atingir significância estatística mínima.

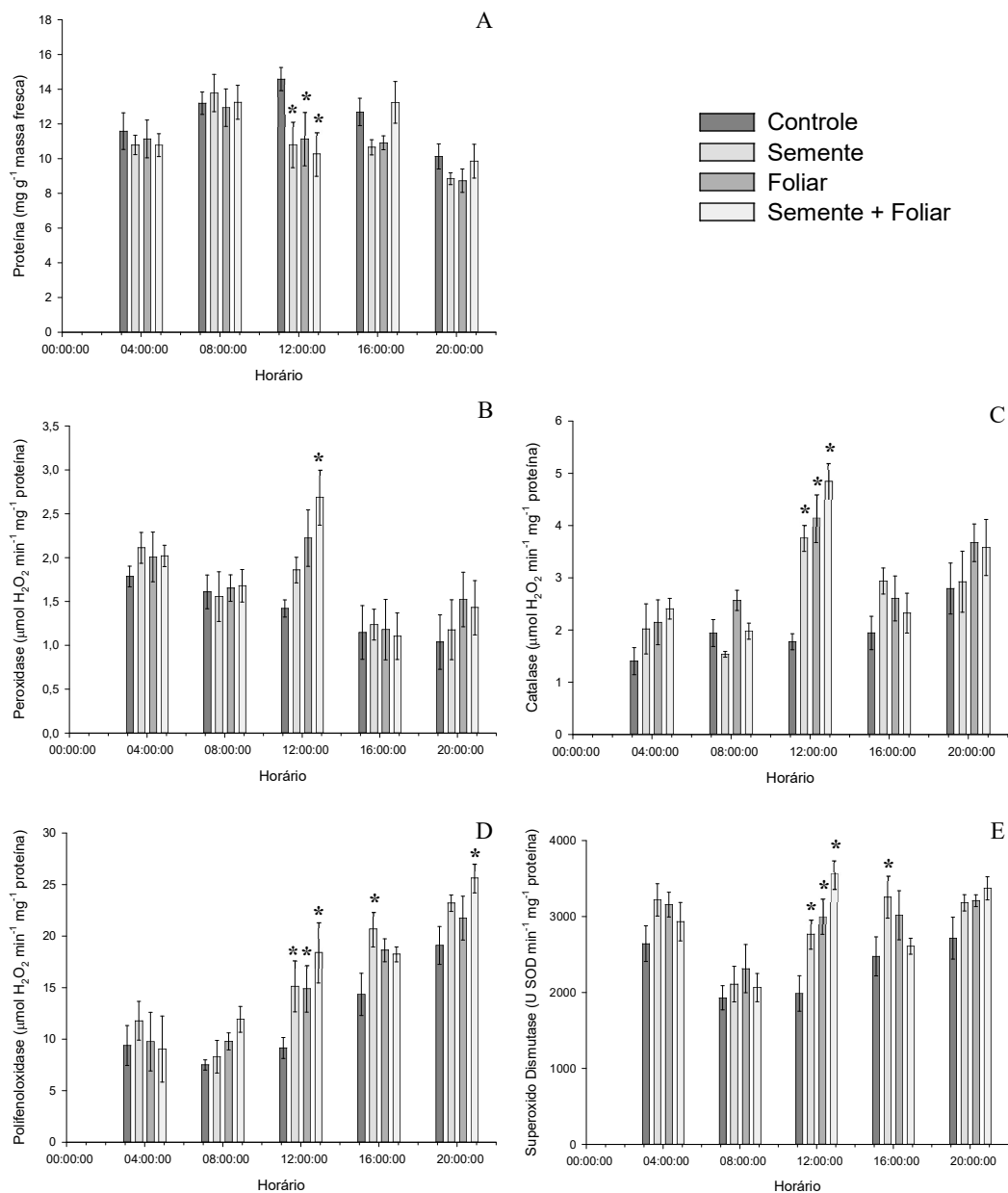


Figura 4 - Teor de proteína (A), atividade de peroxidase (B), atividade de catalase (C), atividade da polifenoloxidase (D) e atividade da superóxido dismutase (E) em folhas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasiliense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

A superóxido dismutase teve sua atividade elevada às 12:00 horas por todas as formas de inoculação de *A. brasilense*, isolado ou combinado. Destes tratamentos citados, apenas a inoculação de forma isolada via semente apresentou manutenção deste aumento de atividade até as 16:00 horas (Figura 4E). Ao final do dia, todos os tratamentos voltaram ao mesmo patamar do controle para a atividade da superóxido dismutase

7.4 DISCUSSÃO

A adoção de *A. brasilense* proporcionou efeitos benéficos na taxa fotossintética do milho, principalmente em momentos de maior luminosidade incidente, próximo ao meio do dia (Figura 2A), comprovando seu efeito estimulante à fotossíntese (HUSSAIN et al., 2016), seja inoculado na semente, pulverizado na parte aérea da planta ou combinada a aplicação dos métodos anteriores.

A capacidade de excreção de ácido salicílico por *A. brasilense* acelera a sinalização celular (FUKAMI et al., 2017), atuando em sinergismo com as citocininas no aumento dos teores de clorofila e síntese da RUBPcase nas folhas (ALI et al., 2011; RAO et al., 2012). As citocininas, por sua vez, são produzidas endogenamente pelas plantas, tendo seu principal sítio de síntese na raiz, sendo sua taxa de síntese impulsionada pela inoculação de *A. brasilense* (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014). Além de estimular a produção de clorofila, o *A. brasilense* promove redução das taxas de etileno pela ação da enzima ACC-deaminase (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; ESQUIVEL-COTE et al., 2010; GLICK, 2014; VURUKONDA et al., 2016), hormônio antagônico a atividade da RUBPcase e síntese de clorofila (CORTLEVEN; VALCKE, 2012). Deste modo, o aumento da carboxilação detectada em momentos de alta luminosidade verificada no presente trabalho justifica-se pela maior atividade da RUBPcase e maior conteúdo de clorofila foliar promovidos pela ação de hormônios promotores de crescimento e inibição de hormônios antagônicos ao desenvolvimento vegetal.

Quantificando os aumentos de assimilação de carbono, a inoculação de *A. brasilense* via semente elevou em 7,14% a capacidade fotossintética, ao passo que a combinação com a pulverização foliar incrementou em 18,47% esta reação ao longo do dia. O tratamento que mais elevou a fotossíntese foi a pulverização foliar utilizada de forma isolada, atingindo incrementos de 36,02% de assimilação de CO₂ em relação ao controle (Figura 2A), proporcionando às

plantas de milho maior aproveitamento da luminosidade ambiental, e potencial conversão para a produção de grãos da cultura (CHEN et al., 2011).

Outro fato relevante no aproveitamento da luminosidade, que usualmente é excessiva ao meio do dia, se dá na redução dos riscos de danos ao aparato fotossintético (MÜH et al., 2012). Maior eficiência do fotossistema indica menor dissipação de energia por *quenching* fotoquímico (fluorescência e calor) e não fotoquímico (gradiente eletroquímico/carotenoides) (SOUZA et al., 2013; ZAREA et al., 2012), e conseqüentemente menores chances de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), danosas aos cloroplastos, membrana e outros compostos celulares (BARBOSA et al., 2014; DAS et al., 2011).

Sob adequada disponibilidade hídrica, a condutância estomática (Figura 2B) é modulada pela demanda fotossintética e teor de água nos tecidos (Figura 2D) (DRAKE; FROEND; FRANKS, 2013), apresentando comportamento semelhante entre si. Quando nestas condições, não há necessidade de fechamento estomático visando economia de água e manutenção de turgor por parte da planta (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009), possibilitando adequado aporte de CO₂ à câmara subestomática (Figura 2C) para ser consumido pela fotossíntese (Figura 2A) (LAWLOR; TEZARA, 2009).

A excreção hormonal promovida pelo *A. brasilense* ganha destaque na manutenção da transpiração, devido aos estímulos na produção de auxinas, cadaverina e óxido nítrico (ALEN'KINA; NIKITINA, 2012; CASSÁN et al., 2009b; MASCIARELLI et al., 2013) que elevam a produção de pelos radiculares, e conseqüentemente, o contato solo/raiz e capacidade de absorção de água. Estes mecanismos de atuação do *A. brasilense* junto aos vegetais conduzem ao aumento do turgor vegetal, condutância estomática, da transpiração e fotossíntese (DEL AMOR; CUADRA-CRESPO, 2012; KANNAN; PONMURUGAN, 2010), aliado a maior capacidade de transporte hídrico interno pela ação das auxinas na formação de vasos condutores (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; MASCIARELLI et al., 2013; SORCE et al., 2013).

A eficiência instantânea de carboxilação, impulsionada pela utilização de forma isolada de *A. brasilense*, seja inoculado via semente, mas principalmente pela pulverização em parte aérea (Figura 3) relaciona-se a fotossíntese mais elevada (Figura 2A) promovida pela ação de citocininas produzidas por *A. brasilense* (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014) e seus efeitos na atividade do complexo antena e da RUBPcase (CORTLEVEN; VALCKE, 2012). Pela maior atividade da RUBPcase e carboxilação, os níveis de carbono intercelular reduzem-se (Figura 2C), evidenciando maior eficiência das plantas de milho inoculadas e pulverizadas com *A. brasilense* em utilizar o CO₂ disponível na câmara subestomática.

Com relação ao sistema antioxidante, a utilização de *A. brasilense* reduziu os teores de proteínas solúveis totais ao meio do dia, independente da forma ou combinação de aplicação (Figura 4A). Este evento é observado devido a menores teores de água na planta do tratamento controle, diluindo o teor de proteínas solúveis nos tecidos, sendo este expresso em massa fresca (ANJUM et al., 2011). Relatado pelos mesmos autores, plantas de milho encontram-se com maior teor de proteínas solúveis devido ao teor reduzido de água nas células, limitando transpiração, abertura estomática e fotossíntese, como verificado para o tratamento controle no presente ensaio (Figura 2).

Mesmo com teores reduzidos de proteínas solúveis totais nos tecidos vegetais em plantas com status hídrico superior, as proteínas antioxidantes ganham importância percentual nos momentos de demanda hídrica atmosférica (ANJUM et al., 2011). O combinação de aplicações de *A. brasilense* elevou a atividade das peroxidases ao meio dia (Figura 4B), visto que é uma enzima importante para proteção dos cloroplastos em momentos de alta incidência luminosa (FUKAMI et al., 2017).

No mesmo momento de alta luminosidade ambiental, todas as formas de utilização e combinação de *A. brasilense* elevaram a atividade da catalase (Figura 4C). Sua atuação nos peroxissomos, local de maior formação de ROS sob alta luminosidade, e no citosol (BARBOSA et al., 2014; BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016), é essencial para redução de danos de espécies reativas de oxigênio que atuam de forma generalizada na célula (FUKAMI et al., 2017; GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012).

O milho responde a períodos de deficiência hídrica elevando seus níveis de compostos polifenólicos para agirem principalmente como antioxidantes (HICHEM; MOUNIR; NACEUR, 2009), evento impulsionado por microrganismos promotores de crescimento, como descrita na interação *Azotobacter*-milho (ROJAS-TAPIAS et al., 2012). Visando manter o equilíbrio necessário, a atividade da enzima polifenol oxidase (Figura 4D) também se eleva nos tecidos vegetais em momentos de maior demanda evapotranspiratória (AKHTAR; MAHMOO, 2017), controlando os níveis de compostos fenólicos nas plantas, visando evitar a deterioração da atividade mitocondrial e danos às células pelo acúmulo excessivo de compostos fenólicos (SURENDAR et al., 2015). Este controle nos níveis de compostos fenólicos ficou mais ativo até o final do dia devido à presença de *A. brasilense* em interação com o milho (Figura 4D).

Ao meio dia, em situação de luminosidade ambiental favorável a formação de ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a superóxido dismutase (Figura 4E) teve atuação eliciada por todos os tratamentos de *A. brasilense*, sendo que para a inoculação isolada via semente a atividade foi menos proeminente em relação ao controle, porém continua até as 16:00 horas, visando redução

do alto potencial de danos oxidativos através conversão de $O_2^{\bullet-}$ em peróxidos de hidrogênio (BARBOSA et al., 2014; GILL; TUTEJA, 2010), e reduzindo sua atividade de acordo com a queda dos níveis de $O_2^{\bullet-}$ em condições de menor estresse luminoso (BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016; CAMPOS et al., 2011).

Devido ao padrão de atuação antioxidante estimulado por *A. brasilense*, é possível verificar gasto metabólico em antioxidantes para proteção pontual nos momentos de maior estresse do vegetal. Deste modo, no momento de condições adversas, como excesso de luminosidade ambiental que não pode ser aproveitado pela planta, o *A. brasilense* elicia o complexo de defesa contra ROS (BARBOSA et al., 2014; GILL; TUTEJA, 2010), protegendo principalmente a proteína D1 nos cloroplastos (VASS; CSER, 2009) e permitindo taxas fotossintéticas mais elevadas (Figura 2A). Esta capacidade modulativa é considerada importante propriedade de tolerância a condições ambientais adversas (GHAHFAROKHIA et al., 2015).

7.5 CONCLUSÃO

A associação de *A. brasilense* a cultivos de milho via inoculação de sementes ou pulverização foliar proporciona melhor aproveitamento da radiação solar, principalmente nos momentos de pico luminoso diário. Estes incrementos se relacionam com a ampliação da proteção antioxidante contra ROS, proporcionando redução de danos as membranas celulares, convertendo-se em maior eficiência fotossintética diária.

7.6 REFERÊNCIAS

- AHMADI-RAD, S. et al. Foliar application of nitrogen fixing bacteria increases growth and yield of canola grown under different nitrogen regimes. **Rhizosphere**, v. 2, p. 34–37, 2016.
- AKHTAR, W. ; MAHMOO, T. Response of rice polyphenol oxidase promoter to drought and salt stress. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n. 1, p. 21–23, 2017.
- ALEN'KINA, S. A. ; NIKITINA, V. E. *Azospirillum* lectin-induced changes in nitric oxide content in wheat seedling roots. **Russian Agricultural Sciences**, v. 37, n. 6, p. 462–464, 2012.
- ALI, Z. et al. Mitigation of drought stress in maize by natural and synthetic growth promoters. **Journal of Agriculture and Social Sciences**, v. 7, n. 2, p. 56–62, 2011.

ANJUM, S. A. et al. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, n. 3, p. 177–185, 2011.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.

BASHAN, Y. ; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. In: **Advances in Agronomy**. 1. ed. [s. l.] Elsevier Inc., 2010. v. 108p. 77–136.

BATTISTUS, A. G. et al. Synergistic action of *Azospirillum brasilense* combined with thiamethoxam on the physiological quality of maize seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 49, p. 4501–4507, 2014.

BHATTACHARYYA, P. N. ; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BROETTO, F. **Métodos de trabalho em bioquímica vegetal e tecnologia de enzimas**. Botucatu: Cultura Acadêmica, 2014.

BULEGON, L. G. et al. Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and rehydration conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1283–1289, 2017.

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.

CAMPOS, M. K. F. et al. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic “Swingle” citrumelo plants over-accumulating proline. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 242–250, 2011.

CASSÁN, F. et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 12–19, 2009.

CASSÁN, F. ; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.

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.

- CHAVES, M. M. ; FLEXAS, J. ; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009.
- CHEN, X. -P. et al. Integrated soil-crop system management for food security. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 16, p. 6399–6404, 2011.
- CORTLEVEN, A. ; VALCKE, R. Evaluation of the photosynthetic activity in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: lessons from cytokinin. **Physiologia Plantarum**, v. 144, n. 4, p. 394–408, 2012.
- DAS, P. K. et al. Photosynthesis-dependent anthocyanin pigmentation in *Arabidopsis*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 1, p. 23–25, 2011.
- DEL AMOR, F. M. ; CUADRA-CRESPO, P. Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 1, p. 82, 2012.
- DRAKE, P. L. ; FROEND, R. H. ; FRANKS, P. J. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 495–505, 2013.
- DUANGMAL, K. ; OWUSU APENTEN, R. K. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *romano*). **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 351–359, 1999.
- EL-LATTIEF, E. A. A. Use of *Azospirillum* and *Azobacter* bacteria as biofertilizers in cereal crops: a Review. **International Journal of Research in Engineering and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 36–44, 2016.
- ESQUIVEL-COTE, R. et al. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1–2, p. 65–75, 2010.
- FISCHER, R. A. Definitions and determination of crop yield, yield gaps, and of rates of change. **Field Crops Research**, v. 182, p. 9–18, 2015.
- FOYER, C. H. ; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 861–905, 2009.
- FUKAMI, J. et al. 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.
- GHAHFAROKHIA, M. G. et al. Effects of drought stress and rewatering on antioxidant systems and relative water content in different growth stages of maize (*Zea mays* L.) hybrids. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 61, n. 4, p. 493–506, 2015.
- GHANNOUM, O. C₄ photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 635–644, 2009.

- GIANNOPOLITIS, C. N. ; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–14, 1977.
- GILL, S. S. ; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.
- GODFRAY, H. C. J. et al. Food Security : the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, n. February, p. 812–818, 2010.
- HAMMERSCHMIDT, R. ; NUCKLES, E. M. ; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 73–82, 1982.
- HICHEM, H. ; MOUNIR, D. ; NACEUR, E. A. Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 1, p. 144–151, 2009.
- HUSSAIN, M. B. et al. Efficacy of rhizobia for improving photosynthesis, productivity, and mineral nutrition of maize. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 44, n. 11, p. 1564–1571, nov. 2016.
- KANNAN, T. ; PONMURUGAN, P. Response of paddy (*Oryza sativa* L.) varieties to *Azospirillum brasiliense* inoculation. **Journal of Phytology**, v. 2, n. 6, p. 8–13, 2010.
- KAVAMURA, V. N. et al. Screening of brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183–191, 2013.
- KLEIN, J. et al. Qualidade nutricional de plântulas de cultivares de trigo submetidas à inoculação com *Azospirillum*, bioestimulante e triadimenol. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. Suplemento, p. 59–69, 2012.
- LAWLOR, D. W. ; TEZARA, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 561–579, 2009.
- MASCIARELLI, O. et al. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590–597, 2013.
- MÜH, F. et al. Light-induced quinone reduction in photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1817, n. 1, p. 44–65, 2012.
- NOVAIS, R. F. ; NEVES, J. C. L. ; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In: **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA, 1991. p. 189–198.
- PEIXOTO, P. H. P. et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137–143, 1999.

RAO, S. R. et al. Role of foliar application of salicylic acid and L-Tryptophan in drought tolerance of maize. **The Journal Animal of Plant Science**, v. 22, n. 3, p. 768–772, 2012.

ROJAS-TAPIAS, D. et al. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 264–272, 2012.

RUÍZ-SÁNCHEZ, M. et al. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1031–1037, 2011.

SANTOS, H. G. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília: Embrapa Solos, 2018. 356 p.

SARANRAJ, P. ; SIVASAKTHIVELAN, P. *Azospirillum* and its formulations: A Review. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 3, p. 275–287, 2013.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

SORCE, C. et al. Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 6, p. 885–898, 2013.

SOUZA, T. C. et al. The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 2, p. 515–527, 2013.

SURENDAR, K. K. et al. Changes in proline and polyphenol oxidase enzyme activity in some banana cultivars and hybrids under water stress. **Genomics and Applied Biology**, v. 666, n. 444, p. 1–6, 2015.

VASS, I. ; CSER, K. Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 4, p. 200–205, 2009.

VURUKONDA, S. S. K. P. et al. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 184, p. 13–24, 2016.

ZAREA, M. J. et al. Effect of *Piriformospora indica* and *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 45, p. 139–146, 2012.

ZHANG, S. et al. Temperature-dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO₂ assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday high irradiance. **Photosynthetica**, v. 39, n. 3, p. 383–388, 2001.

ZUFFO, A. M. et al. Path analysis in soybean cultivars grown under foliar spraying and furrow inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 10, p. 137, 2017.

8 CAPÍTULO 7: DINÂMICA FOTOSSINTÉTICA E EFEITO *STAY-GREEN* EM MILHO: MODIFICAÇÕES MEDIADAS POR *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

Resumo: A busca por tecnologias sustentáveis na agricultura tem aberto espaço para a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal do gênero *Azospirillum* em culturas de alta relevância. Sua aplicação em milho é efetuada usualmente junto à semeadura, porém há possibilidade de adotar-se pulverização aérea após estabelecimento da cultura. Deste modo, buscou-se avaliar o desenvolvimento, trocas gasosas, efeitos *stay-green* e produtividade da cultura do milho inoculado via semente ou pulverização foliar de *A. brasilense*. Plantas de milho sob os tratamentos controle, inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente + pulverização foliar foram avaliadas com relação a variáveis morfométricas, trocas gasosas e índice SPAD em ensaio conduzido em vasos, e em relação aos componentes da produção e produtividade em quatro ensaios realizados a campo. Volume, massa seca de raiz e massa seca total foram incrementados pela inoculação + pulverização. Fotossíntese e abertura estomática foram aumentadas nas folhas próximas a espiga quando pulverizado *Azospirillum*, e a inoculação aumentou a transpiração das folhas no terço superior das plantas. O mesmo tratamento reduziu a eficiência do uso da água, e a pulverização isolada ou combinada aumentou a eficiência de carboxilação sistemicamente. Todos os tratamentos proporcionaram efeito *stay-green*, com efeitos mais proeminentes nas folhas próximas à espiga. Em condições com baixa oferta hídrica entre estádios V_4 e V_6 , o diâmetro da espiga foi elevado por todos os tratamentos, ao passo que apenas a pulverização isolada elevou a massa de grãos quando houve menor regime pluvial durante o ciclo. Em suma, a utilização de *A. brasilense* em milho proporciona maior exploração do solo, trocas gasosas mais acentuadas e efeito *stay-green* ao final da maturação, potencializando a massa de grãos.

Palavras-chave: Trocas gasosas; Morfometria vegetal; Componentes da produção.

8.1 INTRODUÇÃO

A utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal junto a culturas de grande importância mundial tem se apresentando como ferramenta de grande relevância para incremento da produtividade agrícola, com baixo custo relativo de investimento e sustentabilidade ambiental (OLIVEIRA et al., 2017). Dentre as diversas espécies bacterianas prospectadas até a atualidade para tal utilização, destaca-se a adoção do gênero *Azospirillum* principalmente na interação com gramíneas (SARANRAJ; SIVASAKTHIVELAN, 2013), e em menor escala com fabáceas (BULEGON et al., 2017a).

Os benefícios no desenvolvimento dos vegetais proporcionados pela interação com *Azospirillum* pautam-se em um conjunto de mecanismos de atuação simultânea e, ou em efeito cascata, ambos cumulativos (BASHAN; DE-BASHAN, 2010). Dentre estes mecanismos encontram-se o estímulo a atividade hormonal de auxinas (MASCIARELLI et al., 2013), giberelinas (ESQUIVEL-COTE et al., 2010), citocininas (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014), ácido salicílico (FUKAMI et al., 2017) e outros compostos reguladores, como poliaminas (CASSÁN et al., 2009b) e óxido nítrico (ALEN'KINA; NIKITINA, 2012); aumento na exploração do solo e captação de água (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016) e nutrientes (HUNGRIA et al., 2010); solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ; GONZALEZ; GOIRE, 2004); regulação na atividade bioquímica da enzima ACC-deaminase (ESQUIVEL-COTE et al., 2010), reduzindo a formação de etileno; indução de resistência contra patógenos (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2012); fixação de nitrogênio (MARQUES et al., 2017); dentre outros.

A ação conjunta destes mecanismos de promoção de crescimento induz o desenvolvimento de forma sistêmica do vegetal, promovendo incrementos no sistema radicular (BATTISTUS et al., 2014), parte aérea (GUIMARÃES et al., 2014), pigmentos clorofilianos e carotenoides (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; BULEGON; GUIMARÃES; LAURETH, 2016) e atividade fotossintética (BULEGON et al., 2017b), culminando em maior produtividade das culturas (ASKARY et al., 2009; HOSSAIN et al., 2015), com relatos diretos em milho (AHMADI-RAD et al., 2016; QUADROS et al., 2014; ZUFFO et al., 2017).

Grande parte dos estudos e relatos da literatura da interação *Azospirillum*-planta concentram-se em sua utilização via tratamento de sementes ou aplicação diretamente ao solo. Contudo, o gênero apresenta capacidade de colonizar a parte aérea das plantas (FUKAMI et al.,

2017), onde apesar do ambiente mais hostil, é possível evitar seu contato direto com defensivos químicos necessários ao sistema de cultivo, porém nocivos às bactérias (BATTISTUS et al., 2014; FUKAMI et al., 2016). Deste modo, surge importante e conveniente oportunidade de aplicação de bactérias promotoras de crescimento com rapidez e em larga escala, como a pulverização na parte aérea.

Discorrendo sobre incrementos de produtividade, estresses abióticos são responsáveis por mais de 50% das perdas de produtividade das culturas ao redor do mundo (QIN; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2011), sendo imprescindível que as tecnologias acrescidas ao sistema agrícola permitam mitigar estes estresses e reduzir seus impactos adversos na produtividade. Neste sentido, a utilização de *Azospirillum* ganha ainda mais relevância devido a seu complexo de estímulos também se caracterizar como indutor de mecanismos de resistência às plantas contra estresses bióticos e abióticos (CASSÁN et al., 2009b; FUKAMI et al., 2017; TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011).

Proteção ao vegetal nos momentos de estresse permite ao mesmo aproveitar melhor as condições ambientais, com grande destaque ao milho que possui grande potencial de produção (CHEN et al., 2011). Deste modo, aumento na concentração de pigmentos fotossintéticos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012) por longos períodos, e manutenção do teor de água nos tecidos vegetais (GHANNOUM, 2009) promovidos por *A. brasilense* (BOGHDADY; ALI, 2013; ROMERO; VEGA; CORREA, 2014) podem ser essenciais na manutenção de altas taxas carboxilativas e conversão produtiva da cultura.

Deste modo, sugere-se a hipótese de que os incrementos promovidos no desenvolvimento das plantas por *Azospirillum* possa conduzir a melhores condições do milho nos momentos de definição da produtividade, principalmente no estágio reprodutivo, elevando variáveis morfométricas e trocas gasosas, assim como alongando o período de atuação dos pigmentos clorofilianos com respostas em incrementos na produtividade.

Perante do exposto, se propõe como objetivo avaliar variáveis morfométricas, trocas gasosas, índice SPAD, componentes da produção e produtividade da cultura do milho inoculada com *Azospirillum brasilense*, estirpes AbV5+AbV6, via semente ou pulverização foliar.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Tratamentos e delineamento experimental

Estudou-se o comportamento de plantas de milho submetidas a três formas de aplicação de *A. brasilense* (corrig. Tarrand et al.) compreendendo os tratamentos: 1. Controle; 2. Inoculação via semente de *A. brasilense* (100 mL/60.000 sementes); 3. Pulverização foliar de *A. brasilense* (300 mL ha⁻¹) ao estágio V₄; 4. Inoculação via semente associada à pulverização foliar de *A. brasilense* nas dosagens e estádios anteriormente citados. Os ensaios foram conduzidos em blocos casualizados com cinco repetições.

8.2.2 Material vegetal e condução experimental

Plantas de milho híbrido Pioneer 30F53 Lepra[®] RR2[™] foram conduzidas a pleno sol em vasos de 25 litros (29 cm x 37 cm x 29 cm; AxDxd) preenchidos com substrato a base de horizonte A+B de LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef) (SANTOS, 2018).

Previamente a semeadura o substrato foi homogeneizado com 50 mg dm⁻³ de N (ureia), 300 mg dm⁻³ de P₂O₅ (superfosfato triplo) e 150 mg dm⁻³ de K₂O (cloreto de potássio) (NOVAIS; NEVES; BARROS, 1991). Ainda segundo a mesma recomendação, foi realizado aporte de 50 mg dm⁻³ de N (ureia) no estágio V₃ da cultura. Baseado na saturação de bases apresentada (V% de 62, 68), não foi necessário calagem.

8.2.3 Morfometria

No estágio V₁₂ foram efetuadas as análises morfométricas, onde foram coletadas as duas plantas da parcela, avaliando comprimento de planta e diâmetro de colmo. Posteriormente, as plantas foram seccionadas em colmo + bainha e folhas, acondicionadas em sacos de papel tipo kraft e levadas a estufa de circulação forçada de ar para secagem a 65 °C até obtenção de massa constante para determinação da matéria seca.

As raízes foram retiradas dos vasos, lavadas com água corrente, e seu volume estimado através do método do deslocamento de água na proveta após a imersão total do sistema

radicular. Em seguida foram alocadas em sacos de papel tipo kraft e levadas a estufa para determinação de massa de matéria seca de raiz. Para determinação da matéria seca total foram somados os valores de massa seca de parte aérea, massa seca de colmo e massa seca de raiz. A área foliar foi quantificada em Area Meter modelo Li-3100C.

No momento da colheita mensurou-se novamente altura de planta e diâmetro de colmo, além da altura de inserção de espiga, matéria seca de folhas, matéria seca de colmo, matéria seca de espiga e matéria seca total como descrito anteriormente. Após secas, as espigas foram mensuradas quanto ao número de fileira de grãos, número de grãos por fileira, massa de 100 grãos e produção por planta (BRASIL, 2009).

8.2.4 Dinâmica de trocas gasosas e índice SPAD

Para esta análise o delineamento experimental sofreu acréscimo de um fator, tornando-se fatorial 4x5, onde o primeiro fator continha os tratamentos com *A. brasilense* e o segundo fator foi composto pela disposição das folhas na planta de milho, onde: folha-1: é disposta abaixo e oposta a espiga; folha da espiga: é a folha disposta juntamente ao nó da espiga; folha+1: está disposta logo acima e oposta a espiga; folha+4: está disposta quatro folhas acima da espiga, estando também oposta a espiga; e folha ápice: sendo a folha mais próxima ao pendão da planta.

Folhas com ausência de lesões foram avaliadas no estágio R₃ com auxílio do equipamento IRGA LI-6400XT (Licor Inc. Lincoln, NE) fixando o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos em 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a concentração ambiental de CO₂ em 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$. Quantificou-se a taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração da folha (E); condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), temperatura de folhas ($^{\circ}\text{C}$), além das relações $WUE = A/E$, $iWUE = A/g_s$ e $F_c = A/C_i$ (ZHANG et al., 2001b), onde WUE representa a eficiência do uso de água, $iWUE$ a eficiência intrínseca do uso de água, e F_c a eficiência instantânea de carboxilação.

As leituras de índice SPAD foram realizadas no estágio de R₃ e no momento de colheita. Para determinação do índice SPAD foi utilizado um clorofilômetro portátil, SPAD 502 plus Konica Minolta, realizando-se leituras em dez pontos (5 de cada lado da nervura principal foliar) ao longo das folhas.

8.2.5 Ensaio de eficiência agrônômica

Quatro ensaios foram instalados ao longo das temporadas de cultivo de 2015/2016 (15/16) e 2016/2017 (16/17) nas fazendas experimentais Professor Alcebiades Luiz Orlando (latitude -24°68'20" S, longitude -54°28'21" O e altitude de 240 metros), no município de Entre Rios do Oeste – PR (ERO) e Professor Antônio Carlos dos Santos Pessoa (latitude -24°53'30" S, longitude -54°01'74" O e altitude de 400 metros), no município de Marechal Cândido Rondon – PR (MCR). Ambas as localidades apresentam solo classificado como LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef) (SANTOS, 2018), e clima Cfa mesotérmico úmido subtropical, com chuvas bem distribuídas durante o ano e verões quentes, de acordo com a classificação de Köppen.

As parcelas foram constituídas por 8 linhas com 9 metros de comprimento cada e espaçamento entrelinha de 0,70 m, totalizando 20 parcelas por ensaio, dispostas em cinco blocos. A parcela útil foi compreendida por 4 linhas x 6 metros de comprimento.

Previamente a semeadura, análises de solo foram coletadas de 0-20 cm. Os dados referentes a análise química estão exibidos na tabela 1, e as características físicas na tabela 2.

Tabela 1 – Análise de química solo da camada 0-20 cm coletadas nas estações experimentais Professor Alcebiades Luiz Orlando (ERO) e Professor Antônio Carlos dos Santos Pessoa (MCR) nas temporadas de cultivo de 2015/2016 (15/16) e 2016/2017 (16/17).

Elemento/ Característica	Unidade	ERO 15/16	MCR 15/16	ERO 16/17	MCR 16/17
P	g dm ⁻³	9,52	16,27	8,99	13,70
M. O.		20,51	15,47	25,97	29,00
pH (CaCl ₂)	mol L ⁻¹	4,89	6,04	5,72	4,20
K ⁺	cmolc dm ⁻³	0,43	0,10	0,29	0,15
Ca ⁺²		5,06	2,97	5,59	4,90
Mg ⁺²		2,22	0,74	1,19	2,20
H+Al		5,03	3,12	4,53	6,30
Al ⁺³		0,00	0,00	0,00	0,05
SB		7,71	3,81	7,07	7,25
CTC		12,74	6,93	11,60	13,55
Cu	mg dm ⁻³	-	-	7,10	6,70
Zn		-	-	2,10	2,30
Mn		-	-	100,00	122,20
Fe		-	-	32,40	39,20
V	%	60,52	54,98	60,95	53,51
Al		0,00	0,00	0,00	0,68

Tabela 2 – Análise granulométrica do solo da camada 0-20 cm coletadas nas estações experimentais Professor Alcebiades Luiz Orlando (ERO) e Professor Antônio Carlos dos Santos Pessoa (MCR) nas temporadas de cultivo de 2015/2016 (15/16) e 2016/2017 (16/17).

Granulometria	Unidade	ERO 15/16	MCR 15/16	ERO 16/17	MCR 16/17
Argila		627,82	782,37	587,29	831,20
Silte	g kg ⁻¹	319,87	157,80	351,00	114,80
Areia		52,31	59,83	61,71	54,00

As datas de semeadura estão dispostas na tabela 3, sendo utilizado como padrão o híbrido de milho Pioneer 30F53 Leptra[®] RR2[™]. Foram depositadas 4,6 sementes/metro a profundidade de 5 cm, almejando estande final de 65.714 plantas ha⁻¹. As sementes referentes aos tratamentos inoculação via semente e inoculação via semente associada à pulverização foliar foram previamente tratadas com inoculante comercial a base de *A. brasilense* AbV5+AbV6, com população bacteriana de acordo com tabela 2.

Tabela 3 - Palhada residual, data de semeadura, população bacteriana no inoculante no momento da semeadura, condições ambientais de pulverização e população bacteriana no inoculante no momento da pulverização dos ensaios de eficiência agrônômica de milho inoculado via semente e pulverização foliar com *A. brasilense* realizados nas estações experimentais Professor Alcebiades Luiz Orlando (ERO) e Professor Antônio Carlos dos Santos Pessoa (MCR) nas temporadas de cultivo de 2015/2016 (15/16) e 2016/2017 (16/17).

Característica	ERO 15/16	MCR 15/16	ERO 16/17	MCR 16/17
----- Semeadura -----				
Inoculante	2,00x10 ⁸ mL ⁻¹	4,33x10 ⁸ mL ⁻¹	3,33x10 ⁸ mL ⁻¹	3,33x10 ⁸ mL ⁻¹
Palhada residual	6420 kg ha ⁻¹ milho	Solo revolvido	6362 kg ha ⁻¹ trigo	5473 kg ha ⁻¹ trigo
Semeadura	07/10/2015	16/09/2015	06/10/2016	21/09/2016
----- Pulverização -----				
Inoculante	5,00x10 ⁷ mL ⁻¹	8,33x10 ⁷ mL ⁻¹	6,67x10 ⁷ mL ⁻¹	6,67x10 ⁷ mL ⁻¹
Temperatura	28 ± 1°C	30 ± 1°C	26,5 ± 0,5°C	28 ± 1°C
Umidade relativa	69,5 ± 2,5 %	52 ± 1 %	79,5 ± 3,5 %	69,5 ± 2,5 %
Velocidade do vento	9 km h ⁻¹	6 km h ⁻¹	11 km h ⁻¹	9 km h ⁻¹

Para adubação de base adotou-se 320 kg ha⁻¹ do formulado 10-15-15. Foi realizado aplicação a lanço de 180 kg ha⁻¹ de nitrogênio no estágio V₄ da cultura. Nenhuma das situações de cultivo demandou correção de acidez via calagem.

A aplicação foliar foi realizada no estágio V₄, utilizando inoculante comercial a base de *A. brasilense* AbV5+AbV6 na dose de 300 mL por ha⁻¹ e volume de calda foi de 300 L ha⁻¹. Para tal atividade utilizou-se pulverizador costal, mantido à pressão constante por CO₂,

equipado com seis pontas Magno 11002 ADGA, com espaçamento entre as mesmas de 50 cm, a pressão de 40 kgf cm⁻². As populações bacterianas no inoculante, condições de temperatura, umidade relativa e velocidade do vento de cada experimento encontram-se na tabela 3. As condições meteorológicas durante a condução dos ensaios a nível de campo encontram-se na figura 1.

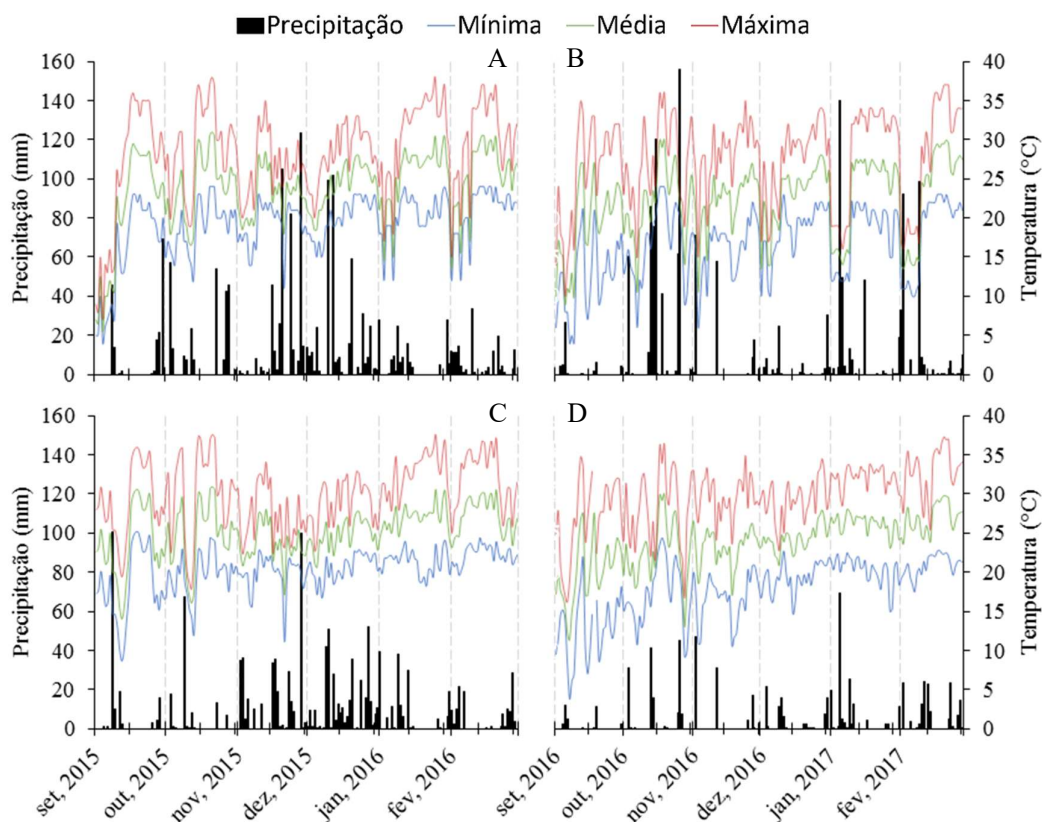


Figura 1 - Temperatura mínima, média e máxima (°C) e precipitação (mm) durante a condução dos ensaios a nível de campo em Entre Rios do Oeste 2015/2016 (A), Entre Rios do Oeste 2016/2017 (B), Marechal Cândido Rondon 2015/2016 (C) e Marechal Cândido Rondon 2016/2017 (D). Fonte: Inmet.

Quando a cultura atingiu o ponto de colheita, determinou-se o número de plantas por hectare. As espigas recolhidas foram contabilizadas no momento da colheita, expressas em espigas por hectare, possibilitando estimativa no número de espigas produzida por planta. Após trilhagem do material, o mesmo foi pesado e amostra de grãos conduzida a estufa de secagem de circulação forçada de ar a 105 °C durante 24 horas para determinação da umidade em base úmida e correção da produtividade líquida para 13% de umidade.

No mesmo momento foram coletadas dez espigas aleatórias dentro da parcela afim de avaliar o diâmetro de espiga, número de fileiras de grãos, número de grãos por fileira e massa

de mil grãos, determinada a partir de oito repetições de 100 sementes, pesadas em balança analítica, e a média das oito repetições multiplicada por 10, perfazendo o valor do peso de mil sementes (BRASIL, 2009).

Foram selecionadas três plantas para coleta de parte aérea e determinação da massa da matéria seca, utilizada para o cálculo do índice de colheita, expresso pela relação da massa seca de grãos dividida pela massa seca de parte aérea produzida pela planta (GIFFORD et al., 1984).

8.2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-wilk a 5% de probabilidade de erro. Na presença de normalidade dos erros, os dados passaram por análise de variância a 5% de probabilidade de erro pelo teste F de Fisher, e em caso positivo, submetidos a teste de médias de Dunnett a 5% de probabilidade de erro visando comparar os tratamentos com *A. brasilense* ao tratamento controle. Estimou-se também os coeficientes de correlação de Pearson entre o índice SPAD e as variáveis de trocas gasosas no estágio R₃ e SPAD no momento da colheita.

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Morfometria

Efeitos das formas e combinações da utilização de *A. brasilense* não se pronunciaram na parte aérea das plantas de milho no estágio V₁₂. Somente foram detectadas variações significativas no sistema radicular, sendo que a aplicação de *A. brasilense* via semente + pulverização foliar, de forma combinada, proporcionou incremento no desenvolvimento radicular, evidenciado pelo maior volume de raiz (Figura 2A) e maior acúmulo de matéria seca de raiz (Figura 2B), sendo que esta última variável contribuiu para a expressão de maior acúmulo de matéria seca total na planta (Figura 2C).

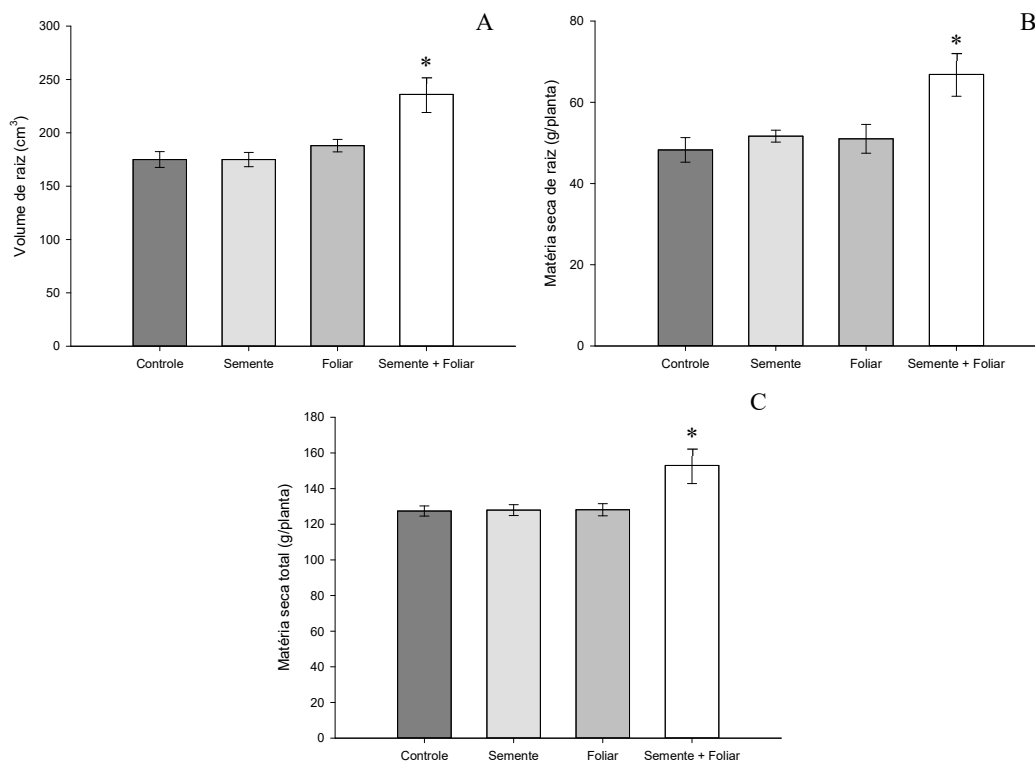


Figura 2 - Volume de raiz (A), matéria seca de raiz (B) e matéria seca total (C) de plantas de milho ao estágio V₁₂ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

8.3.2 Dinâmica de trocas gasosas e índice SPAD

Interação significativa entre os tratamentos e posicionamento das folhas foi verificada no estágio R₃ para fotossíntese líquida, condutância estomática e taxa transpiratória (Figura 3).

A pulverização foliar de *A. brasilense* se sobressaiu em relação ao controle nas folhas localizadas imediatamente abaixo e acima da folha da espiga, sendo ambas opostas a inserção da mesma (Figura 3A). O mesmo comportamento foi verificado para a condutância estomática, no mesmo tratamento e posicionamento de folhas (Figura 3B).

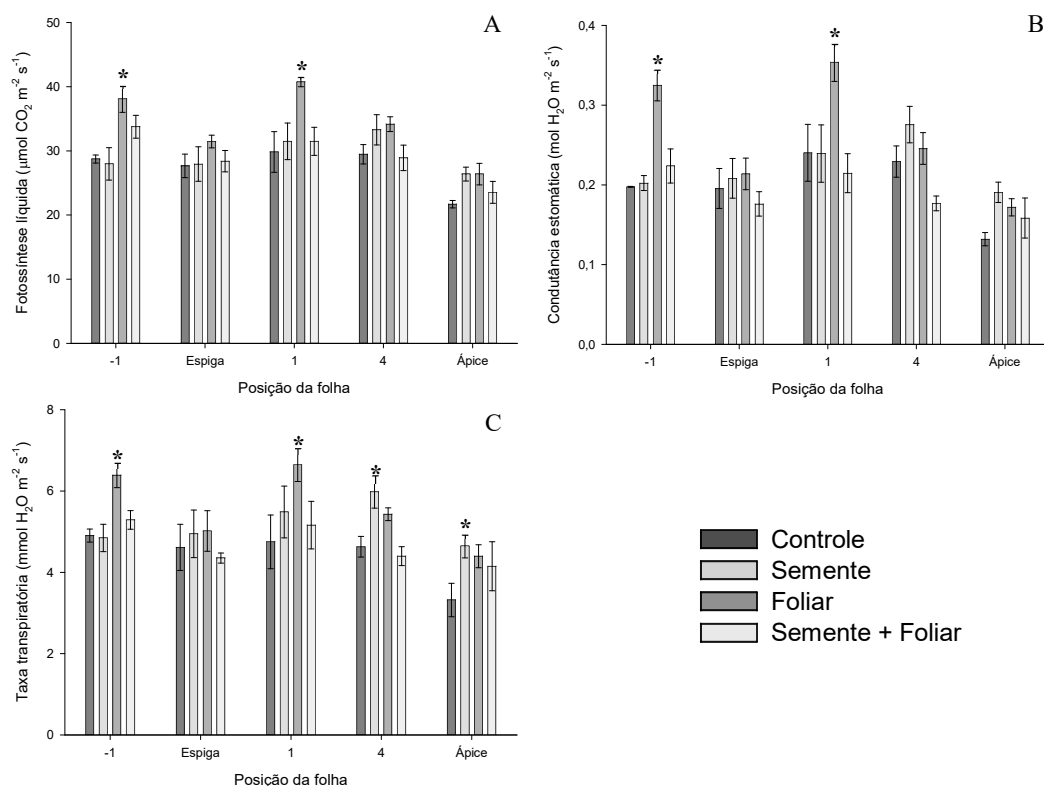


Figura 3 - Fotossíntese líquida (A), condutância estomática (B) e taxa transpiratória (C) mensurados em cinco folhas de milho ao estágio R₃ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

A taxa transpiratória também foi elevada pela pulverização foliar de *A. brasilense* nas folhas opostas abaixo e acima da inserção da espiga. Contudo, a inoculação efetuada de forma isolada via semente também elevou a transpiração das folhas posicionadas no ápice da planta e quatro folhas acima da espiga (Figura 3C).

As variáveis eficiência do uso da água e eficiência de carboxilação responderam apenas para os tratamentos com *A. brasilense*, sem diferenças significativas para o posicionamento das folhas (Figura 4).

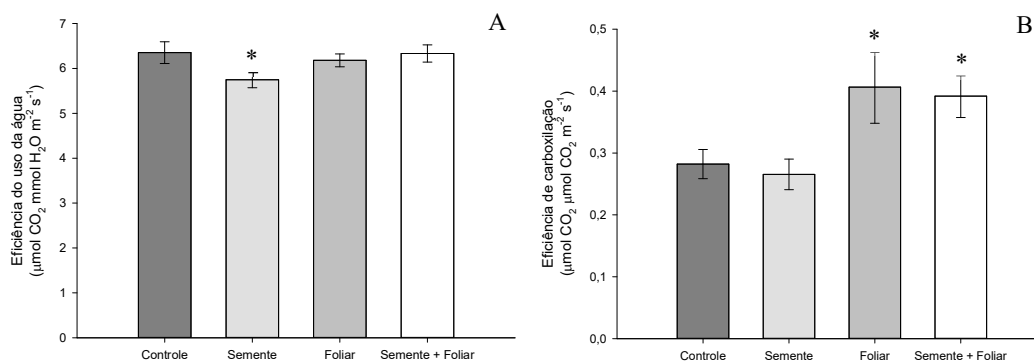


Figura 4 - Eficiência do uso da água (A) e eficiência de carboxilação (B) de folhas de milho ao estádio R₃ submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

Devido a incrementos na transpiração (Figura 2C) sem efeitos positivos na fotossíntese (Figura 3A), a eficiência no uso da água foi reduzida quando inoculado *A. brasilense* via semente de forma isolada (Figura 4A), indicando maior necessidade de água para manutenção de taxas semelhantes de fotossíntese quando comparado ao controle.

Significativos incrementos foram detectados para a eficiência de carboxilação para os tratamentos compostos pela pulverização foliar de *A. brasilense*, seja de forma isolada ou combinado com a inoculação via semente (Figura 4B), relacionando-se ao aumento da atividade bioquímica de captura de CO₂ da câmara subestomática e bombeamento para os sítios de carboxilação na bainha clorofilada.

O índice SPAD, índice relacionado ao teor relativo de clorofila, não sofreu alterações devido aos tratamentos estudados no estádio R₃. Contudo, a mesma sofreu menores reduções no momento da colheita na folha abaixo e oposta da espiga, quando utilizado combinadamente *A. brasilense* via semente + pulverização foliar, apresentado diferenças significativas. Maiores diferenças foram detectadas na folha da espiga, onde independentemente da forma de utilização, isolada ou combinada, o *A. brasilense* em média dobrou o índice SPAD. Este comportamento se repetiu na folha acima e oposta a espiga, porém com diferenças menos proeminentes quando comparado a folha da espiga (Figura 5A). As demais folhas não apresentaram modulações no índice SPAD mediadas por *A. brasilense*.

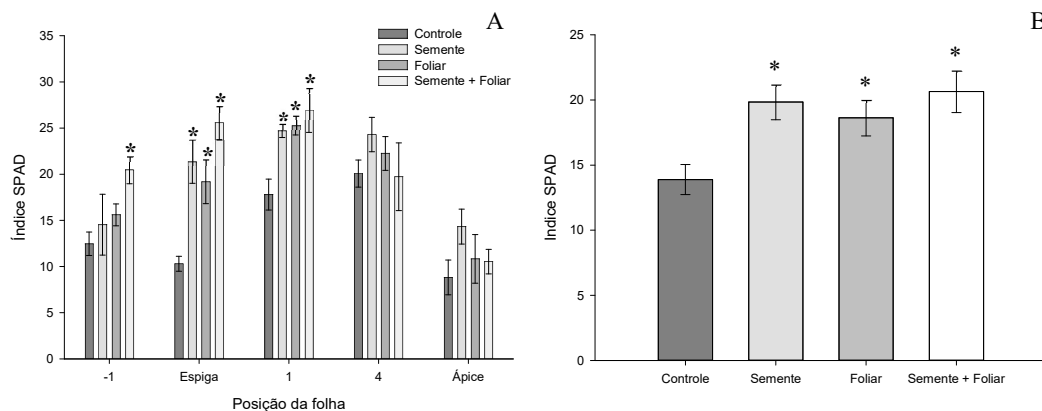


Figura 5 - Índice SPAD (A) e índice SPAD médio (B) de folhas de milho no momento da colheita submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

De modo geral, quando não efetuado o desdobramento, o índice SPAD evidenciou incrementos semelhantes para todas as formas de utilização de *A. brasilense* (Figura 5B), destacando seu potencial de indução de efeito *stay-green* na cultura do milho.

Análise de correlação de Pearson identificou tendências em relação ao incremento do índice SPAD, trocas gasosas e efeito *stay-green* (Figura 6) no estágio R₃. Mesmo que apresentem baixa força ($p_{\text{pearson}} < 0,4$), correlações positivas com fatores relacionados à fotossíntese são importantes, principalmente no ápice do processo reprodutivo das plantas.

A fotossíntese líquida, taxa transpiratória e condutância estomática responderam positivamente à menor queda do índice SPAD, relacionando o aumento da dinâmica de trocas gasosas à manutenção de maiores teores de clorofila em plantas inoculadas com *A. brasilense* em relação ao controle não inoculado, onde mantém-se maior aproveitamento da energia luminosa, mantendo a capacidade de fixação de carbono (Figura 6A) pela maior produção de energia (ATP) e poder redutor (NADP), demandando maior abertura estomática para entrada de CO₂ (Figura 6C) e conseqüentemente maior transpiração (Figura 6B), desde que haja condição hídrica interna no vegetal para manutenção da abertura estomática. Vale ressaltar que usualmente os dados referentes ao tratamento controle alocaram-se abaixo da linha de correlação, destacando mais uma vez o papel do *A. brasilense* no incremento das trocas gasosas, sendo no final do ciclo da cultura importante para maior enchimento de grãos, previamente a maturação fisiológica.

Com o aumento da abertura estomática para facilitar as trocas gasosas, e atrelado ao maior índice SPAD, a eficiência intrínseca do uso da água foi reduzida de acordo com o

incremento do índice SPAD (Figura 6D), ou seja, quanto maiores os valores de índice SPAD, mais a planta terá que utilizar água por quantidade de CO₂ fixada. Em regiões onde a disponibilidade hídrica é adequada ou se faz suplementação hídrica com irrigação, não há grandes problemas em maiores demandas hídricas, contudo, em situações de déficit hídrico, este maior consumo de água para fixação de CO₂ pode ser um empecilho à produtividade.

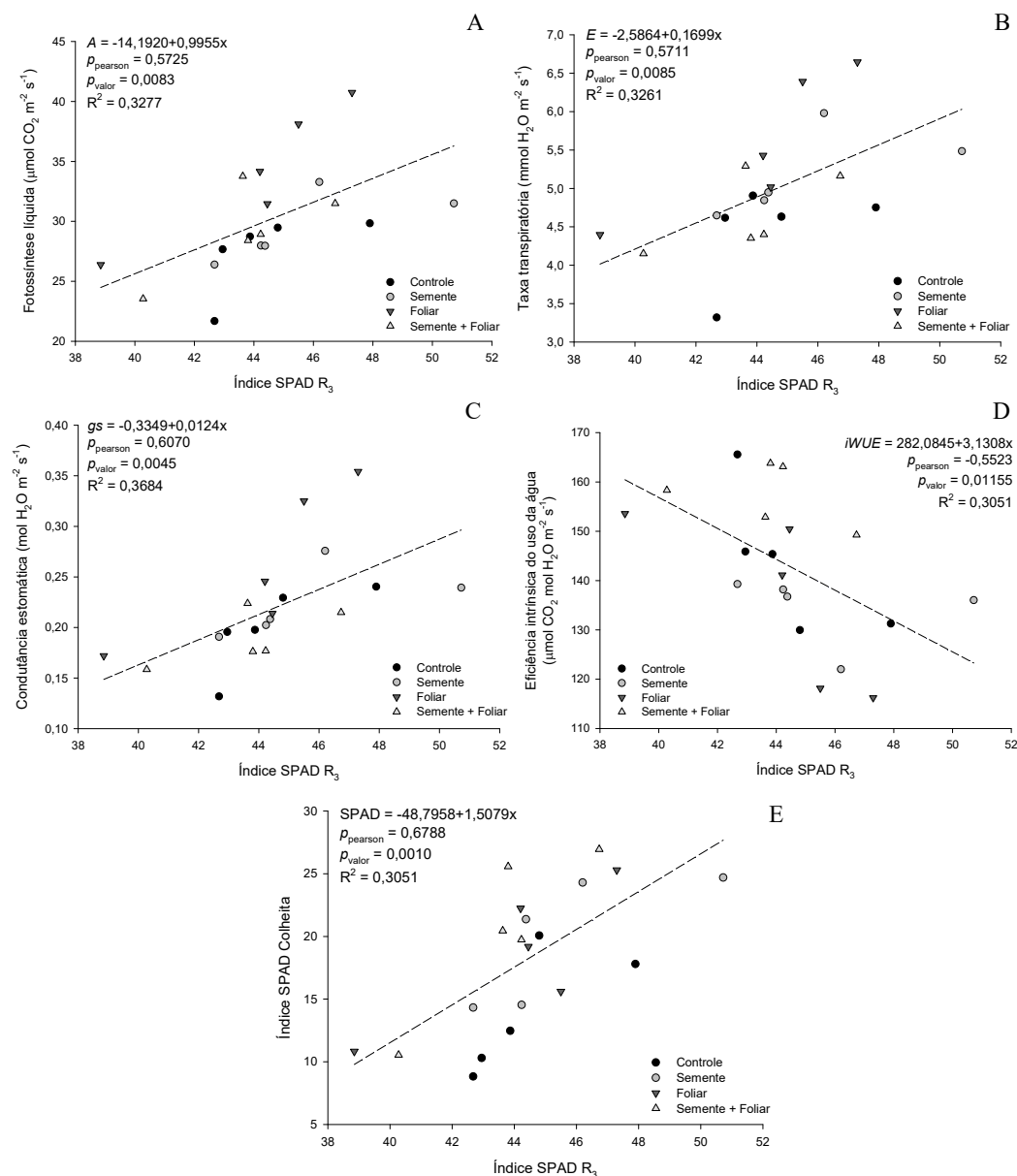


Figura 6 - Correlações de Pearson entre Índice SPAD mensurado ao estágio R₃ e fotossíntese líquida (A), taxa transpiratória (B), condutância estomática (C), eficiência intrínseca do uso da água (D) e índice SPAD ao momento da colheita (E) em cinco folhas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense*. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

Mesmo que não significativo no estágio R₃, como citado anteriormente, maiores valores de índice SPAD detectados nesta fase fenológica indicam retardamento na degradação de pigmentos e senescência foliar, promovendo efeito *stay-green* em estádios fenológicos próximos ao ponto de colheita da cultura (Figura 6E), sendo fator de destaque os dados referentes aos tratamentos de pulverização foliar (em maioria agrupados acima de sua linha de correlação), definindo maiores valores de p_{pearson} entre estas variáveis.

8.3.3 Ensaios de eficiência agrônômica

Com relação aos ensaios conduzidos em condições de campo, poucas variáveis foram afetadas significativamente pelos tratamentos utilizados. Ressalta-se que, devido ao número de fatores (ano, local e *A. brasilense*), os desdobramentos significativos apenas foram explorados quando envolviam os tratamentos estudados, ignorando-se interações ano vs. locais.

Dentre as variáveis analisadas, o diâmetro de espigas respondeu à interação dupla composta por ano vs. tratamentos, onde o primeiro ano (2015/2016) não possibilitou modulações do *A. brasilense* sobre o diâmetro de espigas (Figura 7A). De modo contrário, no segundo ano de cultivo (2016/2017), sendo composto de ensaios em dois locais (ERO e MCR), todos os tratamentos de *A. brasilense*, independente se utilizados de forma isolada ou combinados, permitiram o aumento do diâmetro médio das espigas (Figura 7B), contudo, sem afetar o número de fileira de grãos.

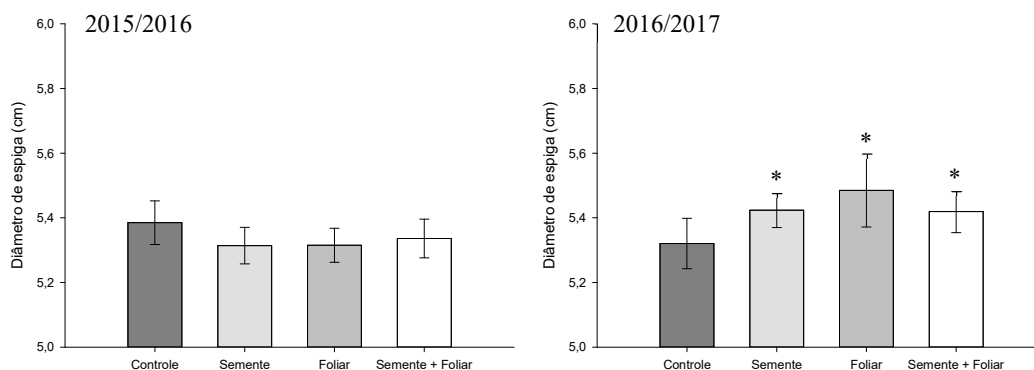


Figura 7 - Diâmetro de espigas de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* cultivado em duas temporadas de cultivo. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

A massa de mil grãos foi significativa para interação tripla (ano vs. local vs. *A. brasilense*) (Figura 8). Nos dois anos cultivados na localização de ERO (Figura 8A e 8B) não foram detectadas diferenças significativas, assim como no ano de 2015/2016 em MCR (Figura 8C). Porém, para o ano de 2016/2017 em MCR (Figura 8D), houve aumento da massa de mil grãos pela pulverização de *A. brasilense* via foliar, sendo que as demais inoculações não se distinguiram do controle.

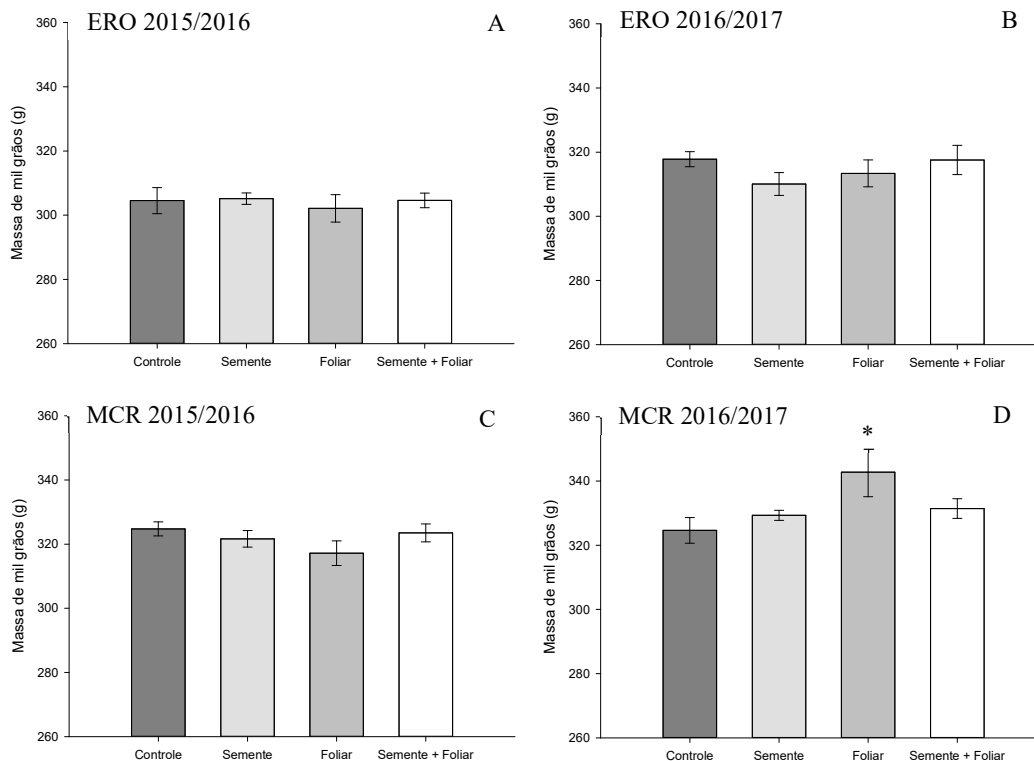


Figura 8 - Massa de mil grãos de milho submetido a inoculação via semente, pulverização foliar, e inoculação via semente associada a pulverização foliar de *A. brasilense* cultivado em quatro situações edafoclimáticas [Entre Rios do Oeste 2015/2016 (A); Entre Rios do Oeste 2016/2017 (B); Marechal Cândido Rondon 2015/2016 (C); Marechal Cândido Rondon 2016/2017 (D)]. * representa diferença estatística pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

8.4 DISCUSSÃO

O incremento no volume radicular (Figura 2A) e aumento de massa da raiz (Figura 2B) são efeitos largamente conhecidos do *A. brasilense* e vastamente descritos na literatura (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; DARTORA et al., 2013; LARRABURU; BUSUSCOVICH; LLORENTE, 2016; MOLINA-FAVERO et al., 2008;

MOUTIA et al., 2010; RUÍZ-SÁNCHEZ et al., 2011). A capacidade de excreção de compostos auxínicos (MASCIARELLI et al., 2013), poliamínicos como a cadaverina (CASSÁN et al., 2009b), e óxido nítrico (ALEN'KINA; NIKITINA, 2012), aliado a atividade da enzima ACC-deaminase (ESQUIVEL-COTE et al., 2010; GLICK, 2014) reduzindo os níveis de etileno, culminam em maior desenvolvimento radicular (FUKAMI et al., 2016; MOUTIA et al., 2010) e acúmulo de massa nos tecidos (PUENTE; GARCIA; ALEJANDRO, 2009).

Para as mesmas variáveis (Figura 2) nota-se leve incremento, porém não significativo, para as aplicações isoladas via semente e pulverização foliar, contudo quando combinadas os resultados são positivamente e significativamente alavancados. Resultados desta natureza indicam que mesmo que não seja detectado a presença *in vivo* de *A. brasilense* na parte aérea do milho quando pulverizado (FUKAMI et al., 2016), a produção e excreção de substâncias de crescimento pela bactéria (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016) apresentam papel fundamental na atividade radicular, conduzindo a alterações no córtex e aumento na taxa de divisão celular nestas extremidades (BASET MIA et al., 2010), desencadeando eventos de magnitude sistêmica na cultura.

Com maior volume radicular, as plantas aumentam a capacidade de exploração do solo, resultando em maior captação de água e nutrientes (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; HUNGRIA et al., 2010), possibilitando maior turgor vegetal (KANNAN; PONMURUGAN, 2010), manutenção da atividade bioquímica, desenvolvimento e acúmulo de massa seca da parte aérea (FUKAMI et al., 2016; PUENTE; GARCIA; ALEJANDRO, 2009) promovidos pela combinação da inoculação via semente + pulverização foliar de *A. brasilense* (Figura 2C).

Verifica-se dos tratamentos com *A. brasilense* estimularem a fotossíntese em todas as folhas amostradas, com destaque significativo as folhas posicionadas abaixo e acima, ambas opostas a espiga, das plantas que receberam pulverização foliar com *A. brasilense* (Figura 3A).

A capacidade de estímulo à fotossíntese pelo gênero *Azospirillum* é relatado na literatura (BULEGON et al., 2017a; HUSSAIN et al., 2016), como resultado de complexo de estímulos proporcionado as plantas (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016). A capacidade de impulsionar a produção de citocininas (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014) promove maior atividade enzima RUBPcase e regeneração do substrato RUBPi (ALI et al., 2011), chave do processo fotossintético. Aliado a este fator enzimático, o maior turgor celular, comprovado pelos maiores valores de condutância estomática (Figura 3B) e taxa transpiratória (Figura 3C), possibilita adequada atividade bioquímica (FILIPPOU et al., 2014) graças ao aporte de água pela maior exploração radicular do solo impulsionado pela interação milho-*Azospirillum* (HUNGRIA et al., 2010).

Maiores teores de auxinas promovido por *A. brasilense* (ESQUIVEL-COTE et al., 2010; MASCIARELLI et al., 2013) também conduzem a alterações morfológicas nos vasos xilemáticos (EL-AFRY et al., 2012) que incrementam o transporte hídrico e possibilitam aumento da atividade fotossintética (MCADAM et al., 2017), localizado próximo à espiga devido a ser zona de alta concentração auxínica. Este aumento na condutividade hidráulica é confirmado pela pulverização de *A. brasilense*, que incrementa a abertura estomática (Figura 3B) e transpiração (Figura 3C) das folhas localizadas acima e abaixo da espiga, assim como a inoculação via semente eleva a transpiração das folhas localizadas mais próximas ao ápice da planta (Figura 3C) possivelmente devido a melhor estruturação dos vasos condutores radiculares e caulinares (EL-AFRY et al., 2012).

Apesar da redução na eficiência do uso da água apresentada pela inoculação via semente em relação ao controle (Figura 4A), possivelmente pelo efeito de maior transpiração das folhas superiores (Figura 3C), esta variável apresenta pouca relevância em regiões de cultivo com pluviosidade adequadamente distribuída durante o ciclo e solos com boa capacidade de armazenamento (altos teores de matéria orgânica e argila). A capacidade de exploração radicular proporcionada pelo *A. brasilense* (Figura 2A e 2B) permite elevar o aporte de água ao vegetal (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; HUNGRIA et al., 2010), sendo o suficiente para manter as atividades fotossintéticas no mesmo nível ou superiores ao controle, mesmo que sejam demandas mais moléculas de água para cada molécula de carbono fixada.

A eficiência instantânea de carboxilação sofreu aumento, de forma geral, em todas as folhas das plantas pela pulverização isolada de *A. brasilense* ou combinada com inoculação via semente (Figura 4B), baseado nos aumentos de fotossíntese (Figura 3A) mesmo com os estômatos mais abertos (Figura 3B). Esta maior atividade atrela-se ao melhor aproveitamento dos recursos luminosos, gerando mais energia e poder reductor (dados não apresentados) devido à ação das citocininas (MASCIARELLI et al., 2013) e seus efeitos benéficos no complexo antena dos cloroplastos e da enzima RUBPcase (CORTLEVEN; VALCKE, 2012), reduzindo os níveis de carbono intercelular e reafirmando a eficiência das plantas de milho pulverizadas com *A. brasilense* em utilizar o CO₂ disponível na câmara subestomática.

A atuação sinérgica da excreção de ácido salicílico (FUKAMI et al., 2017) junto à ação das citocininas (CASSÁN et al., 2009a) agem com intensidade no aumento dos teores de clorofila e incremento na síntese de RUBPcase (ALI et al., 2011; RAO et al., 2012). Complementando esta regulação hormonal induzida por *A. brasilense*, a elevação da atividade das auxinas (ESQUIVEL-COTE et al., 2010; MASCIARELLI et al., 2013) e a redução da atividade do etileno via enzima ACC-deaminase (BHATTACHARYYA; JHA, 2012;

ESQUIVEL-COTE et al., 2010; GLICK, 2014; VURUKONDA et al., 2016) promovidas pela espécie bacteriana conduzem a maior atividade bioquímica e retardo da senescência vegetal, gerando efeito *stay-green* (Figura 5A e Figura 5B) para todas as suas formas de utilização. Ressalta-se que melhores incrementos se concentraram nas folhas ao redor da espiga, com papel de destaque para o enchimento de grãos do milho (QIN et al., 2013).

Diversos trabalhos demonstram o potencial, em várias situações, do *Azospirillum* incrementar os teores de pigmentos fotossintetizantes em estádios vegetativos e reprodutivos (BASHAN et al., 2006; BATTISTUS et al., 2014; CURÁ et al., 2017; DATTA et al., 2009; FASCIGLIONE et al., 2015; ZAREA et al., 2012), os quais se interrelacionam com variáveis importantes como fotossíntese (Figura 6A) e consolidação de efeito *stay-green* (Figura 6E).

A adoção de *A. brasilense* possibilita aos vegetais maior aproveitamento da luminosidade, confirmando seu estímulo à fotossíntese (HUSSAIN et al., 2016). Estes aumentos carboxilativos baseiam-se, inicialmente, no aumento do teor de pigmentos fotossintéticos (ZAREA et al., 2012) e a consequente elevação da eficiência quântica dos fotossistemas, permitindo maior captação de luminosidade e conversão em poder redutor e energia (BAKER, 2008; VIEIRA et al., 2010).

Os incrementos alcançados no transporte xilemático das raízes (dados não apresentados) pela utilização de *A. brasilense* também colaboram para o aumento da fotossíntese através de maior aporte de água aos tecidos foliares, proporcionando maior abertura estomática (Figura 6C) e confirmado pela maior transpiração elevações da transpiração (Figura 6B) e (LEITNER et al., 2014), fornecendo condições para manutenção da atividade bioquímica (FILIPPOU et al., 2014), e inter-relacionando-as com a pigmentação fotossintética. Contudo, altos valores de índice SPAD levam a maior abertura estomática por molécula de CO₂ fixada, culminando em relações desfavoráveis de eficiência intrínseca do uso da água (Figura 6D). Porém, este efeito adverso é diluído a ponto de não afetar a fotossíntese (Figura 6A) devido a maior condutividade hidráulica (PEREYRA et al., 2012; ROMERO; VEGA; CORREA, 2014) proporcionada pelo *A. brasilense*.

Apesar de não encontrados resultados significativos na produtividade a campo, possivelmente devido as ótimas distribuições pluviométricas (Figura 1) ao longo das temporadas agrícolas, o aumento na massa seca vegetal próximo ao estágio V₁₂ (Figura 2) possibilitaram aumento do diâmetro da espiga no ano agrícola 2016/2017 (Figura 7B) em todas as formas de utilização de *A. brasilense*. Por outro lado, apenas a pulverização foliar elevou a massa de grãos da cultura quando conduzida em Marechal Cândido Rondon, no ano agrícola 2016/2017 (Figura 8D), sendo a área/ciclo agrícola com menor acumulado pluviométrico

(Figura 1D) onde os incrementos no investimento radicular da planta (Figura 2), de fotossíntese no estágio reprodutivo (Figura 3) e principalmente o efeito *stay-green* (Figura 5) relatados anteriormente, são fatores decisivos para o aumento da massa de grãos (CHEN et al., 2011).

É interessante ressaltar que as respostas da utilização de *A. brasilense* são mais proeminentes quando a cultura é submetida a períodos de estresses (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; BULEGON et al., 2017b; CASSÁN et al., 2009b; CURÁ et al., 2017; ROMERO; VEGA; CORREA, 2014), estando sujeita à interação com o ambiente (QUADROS et al., 2014). Para tanto, é importante que a lavoura esteja previamente preparada para enfrentar estes períodos adversos (CASSÁN et al., 2009b; FUKAMI et al., 2017; TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2012), onde a maior exploração radicular do solo, estimulação da fotossíntese e efeito *stay-green* proporcionando pela interação do milho com *A. brasilense* (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; CURÁ et al., 2017) podem ser fatores essenciais no aumento ou redução de perdas em produtividade.

8.5 CONCLUSÃO

A inoculação aliada à pulverização de *A. brasilense* eleva a exploração radicular e acúmulo de massa. A pulverização isolada eleva as taxas fotossintéticas, abertura estomática e transpiração das folhas próximas à espiga, que conjuntamente ao efeito *stay-green* proporcionado por *A. brasilense*, culmina em maior acúmulo de massa nos grãos. Contudo, em condições de campo não encontrou-se modulações em produtividade mediadas por *A. brasilense*.

8.6 REFERÊNCIAS

- AHMADI-RAD, S. et al. Foliar application of nitrogen fixing bacteria increases growth and yield of canola grown under different nitrogen regimes. **Rhizosphere**, v. 2, p. 34–37, dez. 2016.
- ALEN'KINA, S. A. ; NIKITINA, V. E. *Azospirillum* lectin-induced changes in nitric oxide content in wheat seedling roots. **Russian Agricultural Sciences**, v. 37, n. 6, p. 462–464, 2012.
- ALI, Z. et al. Mitigation of drought stress in maize by natural and synthetic growth promoters. **Journal of Agriculture and Social Sciences**, v. 7, n. 2, p. 56–62, 2011.

ASKARY, M. et al. Influence of the co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on grain yield and N, P, K content of *Triticum aestivum* (Cv. Baccros and Mahdavi). **American-Eurasian Journal Agricultural & Environmental Science**, v. 5, n. 3, p. 296–307, 2009.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 89–113, 2008.

BASET MIA, M. A. et al. Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured *Musa* plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 2, p. 85–90, 2010.

BASHAN, Y. et al. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 4, p. 279–285, 2006.

BASHAN, Y. ; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. In: **Advances in Agronomy**. 1. ed. [s. l.] Elsevier Inc., 2010. v. 108p. 77–136.

BATTISTUS, A. G. et al. Synergistic action of *Azospirillum brasilense* combined with thiamethoxam on the physiological quality of maize seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 49, p. 4501–4507, 2014.

BHATTACHARYYA, P. N. ; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

BOGHDADY, M. S. ; ALI, A. S. Comparison between effect of *Azospirillum brasilense* and *Anabaena oryzae* on growth, yield and anatomical characters of wheat plants. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 1, p. 627–637, 2013.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BULEGON, L. G. et al. 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, 2017a.

BULEGON, L. G. et al. Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and rehydration conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1283–1289, 2017b.

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.

CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28–35, 2009a.

- CASSÁN, F. et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 12–19, 2009b.
- CASSÁN, F. ; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.
- 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, 10 2014.
- CHEN, X. -P. et al. Integrated soil-crop system management for food security. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 16, p. 6399–6404, 2011.
- CORTLEVEN, A. ; VALCKE, R. Evaluation of the photosynthetic activity in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: lessons from cytokinin. **Physiologia Plantarum**, v. 144, n. 4, p. 394–408, 2012.
- CURÁ, A. et al. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 41, 2017.
- DARTORA, J. et al. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plantas de milho e trigo inoculadas com estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. **Global Science and Technology**, v. 6, n. 3, p. 190–201, 2013.
- DATTA, J. K. et al. Impact of combined exposure of chemical, fertilizer, bio-fertilizer and compost on growth, physiology and productivity of *Brassica campestris* in old alluvial soil. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 5 Suppl, p. 797–800, 2009.
- EL-AFRY, M. M. et al. Anatomical studies on drought-stressed wheat plants (*Triticum aestivum* L.) treated with some bacterial strains. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 56, n. 2, p. 165–174, 2012.
- ESQUIVEL-COTE, R. et al. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1–2, p. 65–75, 2010.
- FASCIGLIONE, G. et al. *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 154–162, 2015.
- FILIPPOU, P. et al. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 1–10, 2014.
- FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016.
- FUKAMI, J. et al. 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.

- GHANNOUM, O. C₄ photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 635–644, 2009.
- GIFFORD, R. M. et al. Crop productivity and photoassimilate partitioning. **Science (New York, N. Y.)**, v. 225, p. 801–808, 1984.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.
- GUIMARÃES, V. F. et al. Morphophysiological characteristics of maize inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* as seed treatment, cultivated in different types of soil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 39, p. 2919–2924, 2014.
- HOSSAIN, M. et al. Effects of *Azospirillum* isolates from paddy fields on the growth of rice plants. **Research in Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 15–22, 2015.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1–2, p. 413–425, 2010.
- HUSSAIN, M. B. et al. Efficacy of rhizobia for improving photosynthesis, productivity, and mineral nutrition of maize. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 44, n. 11, p. 1564–1571, nov. 2016.
- KANNAN, T. ; PONMURUGAN, P. Response of paddy (*Oryza sativa* L.) varieties to *Azospirillum brasiliense* inoculation. **Journal of Phytochemistry**, v. 2, n. 6, p. 8–13, 2010.
- LARRABURU, E. E. ; BUSUSCOVICH, A. C. ; LLORENTE, B. E. *Azospirillum brasilense* improves *in vitro* and *ex vitro* rooting-acclimatization of jojoba. **Scientia Horticulturae**, v. 209, p. 139–147, 2016.
- LEITNER, D. et al. Impact of contrasted maize root traits at flowering on water stress tolerance – a simulation study. **Field Crops Research**, v. 165, p. 125–137, 2014.
- MARQUES, A. C. R. et al. Biological nitrogen fixation in C₄ grasses of different growth strategies of south america natural grasslands. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 54–62, 2017.
- MASCIARELLI, O. et al. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590–597, 2013.
- MCADAM, S. A. M. et al. Linking auxin with photosynthetic rate via leaf venation. **Plant Physiology**, v. 175, n. 1, p. 351–360, 2017.
- MOLINA-FAVERO, C. et al. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 7, p. 1001–1009, 2008.
- MOUTIA, J. -F. Y. et al. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1–2, p. 233–242, 2010.

NOVAIS, R. F. ; NEVES, J. C. L. ; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In: **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA, 1991. p. 189–198.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low n fertilizer input. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–18, 26 2017.

PEREYRA, M. A. et al. A better water status in wheat seedlings induced by *Azospirillum* under osmotic stress is related to morphological changes in xylem vessels of the coleoptile. **Applied Soil Ecology**, v. 53, n. 1, p. 94–97, 2012.

PUENTE, M. L. ; GARCIA, J. E. ; ALEJANDRO, P. *Azospirillum brasilense* in the inoculum and its plant growth regulator compounds on crop yield of corn (*Zea mays* L.) in the field. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 5, p. 604–608, 2009.

QIN, F. ; SHINOZAKI, K. ; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 9, p. 1569–1582, 2011.

QIN, S. et al. Abscisic acid and aldehyde oxidase activity in maize ear leaf and grain relative to post-flowering photosynthetic capacity and grain-filling rate under different water/nitrogen treatments. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 69–80, 2013.

QUADROS, P. D. DE et al. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014.

RAO, S. R. et al. Role of foliar application of salicylic acid and L-tryptophan in drought tolerance of maize. **The Journal Animal of Plant Science**, v. 22, n. 3, p. 768–772, 2012.

RODRIGUEZ, H. ; GONZALEZ, T. ; GOIRE, I. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp . **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552–555, 2004.

ROMERO, A. M. ; VEGA, D. ; CORREA, O. S. *Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 82, n. June, p. 38–43, 2014.

RUÍZ-SÁNCHEZ, M. et al. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1031–1037, 2011.

SANTOS, H. G. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília: Embrapa Solos, 2018. 356 p.

SARANRAJ, P. ; SIVASAKTHIVELAN, P. *Azospirillum* and its Formulations: A Review. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 3, p. 275–287, 2013.

TORTORA, M. L. ; DÍAZ-RICCI, J. C. ; PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275–286, 2011.

TORTORA, M. L. ; DÍAZ-RICCI, J. C. ; PEDRAZA, R. O. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 279–290, 2012.

VIEIRA, D. A. DE P. et al. Fluorescência e teores de clorofilas em abacaxizeiro cv. pérola submetido a diferentes concentrações de sulfato de amônio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 360–368, 2010.

VURUKONDA, S. S. K. P. et al. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 184, p. 13–24, 2016.

ZAREA, M. J. et al. Effect of *Piriformospora indica* and *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 45, p. 139–146, 2012.

ZHANG, S. et al. Temperature-dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO₂ assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday high irradiance. **Photosynthetica**, v. 39, n. 3, p. 383–388, 2001.

ZUFFO, A. M. et al. Path analysis in soybean cultivars grown under foliar spraying and furrow inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 10, p. 137, 2017.

9 CONCLUSÕES GERAIS

Apesar de não serem detectados efeitos significativos nos teores de pigmentos fotossintéticos em folhas de milho, pequenas alterações em seus níveis mediados por *A. brasilense* podem gerar efeito cascata nos eventos luminosos e bioquímicos da fotossíntese.

A pulverização de *A. brasilense* em plantas de milho possibilita maiores taxas fotossintéticas, baseadas em maior excitação eletrônica e aproveitamento luminoso para transporte de elétrons no centro de reação P680 do fotossistema II. Da carga eletrônica aproveitada pelo fotossistema II, a pulverização também incrementa a porcentagem desses elétrons que é aproveitada diretamente na assimilação líquida de CO₂.

O melhor aproveitamento da luminosidade ambiental promovida pela inoculação de *A. brasilense*, via semente ou pulverização foliar na cultura do milho, relaciona-se à maior transpiração, mantendo os estômatos mais abertos para permuta gasosa, facilitando a atividade das enzimas carboxilativas do metabolismo C₄ fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase) e ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase (RUBPcase). As maiores taxas transpiratórias baseiam-se no sistema radicular mais robusto e maior capacidade dos vasos condutores, mediados pela bactéria, para captação e transporte de água.

Em situações de baixa disponibilidade hídrica, a inoculação via semente, e principalmente a pulverização foliar de *A. brasilense* em milho, minimizam perdas de turgescência nos tecidos foliares, confirmados pela maior transpiração e menor fechamento estomático, aliviando a redução que momentos de alta luminosidade e déficit hídrico exercem sobre a fotossíntese. Semelhantemente, em situações com adequada disponibilidade de água, tanto a inoculação quanto a pulverização foliar de *A. brasilense* proporcionam melhor aproveitamento da radiação solar, convertendo-se em maior acúmulo diário de fotossíntese.

Momentos de alta luminosidade ambiental induzem a ampliação da proteção antioxidante contra espécies reativas de oxigênio mediada por *A. brasilense*, protegendo o aparato fotossintético (proteína D1 do centro de reação P 680) de folhas de plantas de milho contra a atuação das espécies reativas de oxigênio. Este mecanismo colabora para possibilitar maiores acúmulos de fotossíntese diária, seja em condições com baixa ou elevada disponibilidade hídrica.

Em detrimento ao sistema radicular de maior superfície de contato, a inoculação de *A. brasilense* via semente, na cultura do milho, reduz a capacidade de deposição de lignina neste órgão. Contudo, há aumento da deposição desta substância nas folhas pela combinação das aplicações de *A. brasilense* via semente e foliar.

A utilização de *A. brasilense* incrementa a capacidade do sistema vascular do milho, elevando o transporte xilemático e floemático, com a inoculação via semente, modulando o número de vasos do sistema vascular, e a pulverização foliar o diâmetro interno e área de transporte dos mesmos. Ao mesmo tempo, há ganhos na espessura da epiderme adaxial, limbo foliar e número de estômatos. Isto favorece o aproveitamento luminoso e proteção dos cloroplastos, e também favorece as trocas gasosas, facilitando a difusão de CO₂ nas câmaras subestomáticas.

Folhas de milho, acima e abaixo da inserção da espiga, têm a fotossíntese elevada pela pulverização de *A. brasilense*, contudo, sem ser detectada diferenças no índice SPAD ou teor de pigmentos fotossintéticos. Já ao final do ciclo todas as formas de aplicação e combinação de *A. brasilense* promovem efeito *stay-green*, verificado via índice SPAD.

Ressalta-se que em nível de campo respostas da utilização de *A. brasilense* em milho são mais proeminentes quando a cultura passa por períodos de estresses, estando sujeita a interação com o ambiente. Com dois anos agrícolas com adequada disponibilidade hídrica, não foi possível verificar incrementos na produtividade a campo para a cultura do milho.

Os resultados desta pesquisa reforçam o papel do *A. brasilense* na indução de importantes respostas na cultura do milho para aclimatação a condições ambientais adversas, sendo importante que a lavoura esteja previamente preparada para enfrentar estes períodos adversos, onde a maior exploração radicular do solo, aproveitamento dos recursos ambientais, estimulação da fotossíntese e efeito *stay-green*, promovidos pela inoculação via semente ou pulverização foliar, com efeitos mais proeminentes para esta última, de *A. brasilense*, podem ser fatores decisivos no aumento, ou redução de perdas, da produtividade do milho.