

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

FERNANDO FURLAN

EFEITO DO DÉFICIT HÍDRICO EM DUAS VARIEDADES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EM ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

Marechal Cândido Rondon

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

FERNANDO FURLAN

EFEITO DO DÉFICIT HÍDRICO EM DUAS VARIEDADES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EM ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação *Strictu senso* como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da costa.

Co-Orientadores: Prof.Dra. Eliane Cristina Gruszka
Vendruscolo.

Prof. Dra. Marise Fonseca dos Santos

Marechal Cândido Rondon

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

F985e	Furlan, Fernando Efeito do déficit hídrico em duas variedades de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) em associação com bactérias promotoras do crescimento vegetal / Fernando Furlan. - Marechal Cândido Rondon, 2013. 78 p. Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa Coorientadora: Prof. Dr. Eliane Cristina G. Vendruscolo Coorientadora: Prof. Dr. Marise Fonseca dos Santos Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2013. 1. Trigo. 2. <i>Azospirillum brasilense</i>. 3. <i>Herbaspirillum seropedicae</i>. 4. Trigo - Produtividade. 5. Interação planta-bactéria. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título. CDD 21.ed. 633.11 CIP-NBR 12899
-------	---

Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini-Leitzke CRB-9/539



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.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação do Biólogo **FERNANDO FURLAN**. No primeiro dia do mês de março de 2013, às 14 horas, sob a presidência do Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa, em sessão pública reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa da Dissertação do Biólogo Fernando Furlan, discente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Agronomia – Nível Mestrado e Doutorado com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof^a. Dr^a. Marise Fonseca dos Santos (UFPR - Palotina), Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Unioeste), Prof^a. Dr^a. Eliane Cristina Gruszka Vendrusculo (co-orientadora) e Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa (Orientador).

Iniciados os trabalhos, o candidato apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua Dissertação, intitulada: **"Efeito do déficit hídrico em duas cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) em associação com bactérias promotoras do crescimento vegetal"**.

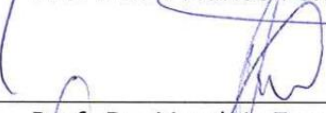
Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Prof ^a . Dr ^a . Marise Fonseca dos Santos.....	Aprovado
Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães.....	Aprovado
Prof ^a . Dr ^a . Eliane Cristina Gruszka Vendrusculo (co-orientadora).....	Aprovado
Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa (Orientador).....	Aprovado

Apurados os resultados, verificou-se que o candidato foi habilitado, fazendo jus, portanto, ao título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, área de concentração: **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 01 de março de 2013.


Prof^a. Dr^a. Marise Fonseca dos Santos


Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães


Prof^a. Dr^a. Eliane Cristina Gruszka Vendrusculo


Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa (Orientador)

*Aos meus pais, que sempre acreditaram e me incentivaram
a percorrer o caminho certo, que apostaram todas
suas forças e expectativas em mim
mesmo com tantas dificuldades,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao PPGA pela oportunidade de realização deste curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa, pela orientação, dedicação e sugestões durante a realização do mestrado.

Aos professores do Programa de Mestrado pelos ensinamentos, em especial Antônio Carlos Torres da Costa, Eliane Vendruscolo, Edmar Soares de Vasconcelos, Eurides Kuster Macedo, Fabíola Villa, José Barbosa Duarte Júnior, Paulo Sérgio Rabello de Oliveira e Vandeir Francisco Guimarães.

À UFPR Setor Palotina, em especial ao LABIOGEN, pela concessão do Laboratório, infraestrutura e por possibilitar minha capacitação, principalmente as Co-orientadoras Prof. Dra. Eliane Vendruscolo e Marise Fonseca dos Santos, pelos ensinamentos, incentivo, amizade e companheirismo, sempre mostrando o caminho certo, estendendo as mãos nos momentos mais difíceis e por acreditarem em meu potencial. Obrigado em especial por esses dois anos de convivência, confiança e dedicação.

À COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, pela concessão dos materiais e apoio durante a pesquisa, e principalmente pelo espaço cedido na casa de vegetação. Agradeço também todos os funcionários que me auxiliaram no decorrer do experimento.

Aos motoristas da UFPR Setor Palotina – PR, Anilton José Gomes, Marcos Rock Hochscheidt em especial ao Ivo Nelson Mascarello, que desempenhou não só suas atividades de motorista, mas também me auxiliou na realização do experimento, proporcionando momento de descontração, companheirismo e amizade.

Aos mais que amigos, e sim irmãos, equipe LABIOGEN, Andressa Estevam, Alice Barcki Koerich, Camila Gazola Volpiano, Fernanda Freitas de Oliveira, Fernanda Buraslan, Gislaine Rodrigues, Jaina Lunkes, Joel Abreu, Kléber Saatkamp, Maik Wiest, Maiara Daga, Maiara de Camargo, Mariana Moresco Ludtke e Sarah Romani, com quem convivi em todos os momentos durante esse tempo. Foram vocês que estavam ao meu lado nos momentos difíceis, e proporcionaram-me momentos de descontração, e me ensinaram o valor da amizade e espontaneidade.

Aos técnicos da UFPR, Mara Zadinello, Aline Gonzales, Taiomara Butzke, Vander Silva Alves, Suziana Galli, Juliana Kafka Bilha, Fernando França Giraldes pelo

companheirismo, e principalmente por disponibilizar os laboratórios, vidrarias e demais materiais que eram necessários.

Em especial as grandes amigas, Raquel M. Sereniski, Cleuza Aparecida da Rocha Montanucci, Adeline e Walkyria Neiverth, que sempre me incentivaram, me ajudaram, e estiveram ao meu lado nos momentos difíceis, pelas lágrimas compartilhadas e principalmente por serem amigas de todas as horas. A vocês meus sinceros agradecimentos.

As colegas do Mestrado, Sheila, Giovana, Maria Cristina e Tatiane, que nestes dois anos passamos por muitas coisas juntos e descobrimos que tudo pode ser superado.

As amigas do Doutorado, Norma Barbado, Ednéia Lourenço e Fabiane Cristina Gussatto, pela amizade, apoio, horas de estudos e descontração.

Aos demais amigos, Jeferson Klein, Elisiane Dall Oglio Chaves, Silvino Polla, Diva L. Schadeck, Tiago Hachmann, Laís Gehlen, Jussara Lunkes, Naura Gênero, Huillian Zecchin, Suellen Delai, Dayane M. Garcia, Izabel Zadinello, Mariane Sasso, Laura C. K. Gênero, Franciele B. de Souza e Paulo Ricardo Ternoski por toda confiança que depositaram em mim, sempre me incentivando e acreditando nos meus ideais. A vocês, muito obrigado.

Aos meus pais Valério José Furlan e Marcy Orzechowicz Furlan que são meus guias, me proporcionaram a dádiva da vida, me apoiaram em mais uma etapa importante e principalmente por serem os responsáveis pela minha educação, mostrando sempre que a honestidade e humildade são duas essenciais virtudes. Obrigado por acreditarem em meu potencial.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e não foram mencionados.

E finalmente a Deus que sempre esteve ao meu lado nas viagens e está sempre no comando de tudo, guiando e iluminando-me.

RESUMO

A cultura do trigo e as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* tem sido alvo de pesquisas. No entanto, necessita-se de mais pesquisas envolvendo o trigo sob condição de associação com estas bactérias e conjugados ao déficit hídrico em relação aos parâmetros fisiológicos e produtivos. Os objetivos deste trabalho foi avaliar a associação de bactérias *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5, inoculadas em duas cultivares de trigo (CD 120 e Frontana) e se esta associação é eficiente para conferir tolerância ao déficit hídrico. Oito condições combinando inoculação com a(s) bactéria(s) Hs e Az, com e sem adição de nitrogênio (N) foram propostos. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial 2 x 8 x 3. Os resultados foram submetidos a análise de variância – ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey 5% de probabilidade pelo programa GENES. Os déficits foram aplicados no florescimento e as coletas foram realizadas no início do espigamento, estágio fenológico Zadock 45. As coletas foram realizadas aos 0 dias, 8 dias para a condição de déficit severo e 16 dias para déficit parcial. Foi quantificado o Teor Relativo de Água (TRA), Índice de Estabilidade de Membrana (IEM), teores de nitrogênio total (NT) nas folhas, anatomia radicular e parâmetros produtivos (biomassa fresca e seca, número de perfilhos, número de espiga/planta, massa de grãos /planta e massa de 1000 grãos). A condição de déficit parcial não foi percebida nas diferentes condições de inoculação e/ou fertilização aplicadas, demonstrando que estas cultivares são parcialmente adaptadas a uma restrição hídrica progressiva. As condições contendo bactérias (Hs) e (Az e Hs), (Az e N) apresentaram TRA similares às plantas do controle irrigado, mostrando que conseguiram manter o turgor celular por apresentarem IEM altos (90%). Análises moleculares puderam comprovar a presença das bactérias nas plantas inoculadas, mas, não foram observadas diferenças na anatomia radicular induzidas pela presença das bactérias. Plantas da cv CD 120 em geral apresentaram maiores teores de NT nas folhas quando submetidas ao déficit severo e na cv Frontana houve um decréscimo nestes teores. Em relação aos parâmetros produtivos, plantas da cv CD 120 inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram 52% de aumento em sua biomassa fresca comparada ao controle irrigado, porém em déficit severo este incremento foi de 3%. A presença de *A. brasilense* promoveu uma redução de 31 % na biomassa fresca quando comparada ao controle, porém em déficit severo promoveu um acréscimo de 11% na massa fresca. A associação entre *H. seropedicae*, *A. brasilense* e nitrogênio proporcionou um acréscimo na biomassa 2% (irrigado) e 101% déficit severo. Para a cv Frontana os valores foram de 0,6%; -12%; -21%; 28%; -18% e -8% nas mesmas condições. As mesmas tendências foram observadas para massa seca. Em relação aos teores de NT das folhas, observa-se que a cv CD 120 demonstrou níveis aumentados em presença de uma restrição hídrica e a cv Frontana, apresentou a diminuição destes valores em todas as condições. A variável número de perfilhos não apresentou diferenças entre condições, cultivar ou condição hídrica aplicada. Plantas da cv CD 120 inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram 46% mais espigas/planta comparada ao controle irrigado, e 40% no déficit severo. Na cv Frontana não foram observadas diferenças. Ao compararmos os dados obtidos para massa de grãos por plantas entre condições aplicadas (irrigada x déficit severo), os valores obtidos foram proporcionalmente menores na condição de déficit, em virtude da menor massa seca, mas as plantas foram capazes de manter os valores de massa de 1000 grãos similares ao controle irrigado em ambas as cultivares.

Palavras-chaves: Produtividade, restrição hídrica, interação planta-bactéria.

ABSTRACT

EFFECT OF WATER STRESS IN TWO VARIETIES OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.) IN ASSOCIATION WITH BACTERIA GROWTH PROMOTING THE VEGETABLE

The wheat crop and bacteria *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* has been the subject of research. However, it requires more research involving wheat under the condition of association with these bacteria and conjugated to water deficit in relation to physiological parameters and productive. The objectives of this study was to evaluate the association of *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 and *Azospirillum brasilense* Ab-V5, inoculated in two wheat cultivars (CD 120 and Frontana) and whether this association is effective to confer tolerance to Dicit water. Eight conditions combining the inoculation (s) bacterium (s) and Hs Az with and without addition of nitrogen (N) have been proposed. The experimental design was a randomized block design in a factorial 2 x 8 x 3. The results were subjected to analysis of variance - ANOVA and means were compared by Tukey test at 5% probability GENES program. Deficits were applied at flowering and samples were collected at the beginning of the heading stage, growth stage Zadock 45. Samples were collected at 0 days, 8 days for severe deficit condition and 16 days for partial deficit. Were quantified using the Relative Water Content (TRA), Membrane Stability Index (AEI), total nitrogen (TN) in the leaves, root anatomy and productive parameters (fresh and dry biomass, tiller number, ear number / plant , grain yield / plant and weight of 1000 grains). The partial deficit condition was not perceived in different conditions of inoculation and / or fertilization applied, demonstrating that these cultivars are partially adapted to a water restriction progressive. Conditions containing bacteria (Hs) and (Az and Hs), (Az and N) had TRA similar to plants irrigated control, showing that managed to maintain cell turgor by presenting IEM high (90%). Molecular analysis could confirm the presence of bacteria in inoculated plants, but no differences were observed in root anatomy induced by the presence of bacteria. Plants of cv CD 120 generally showed higher levels of NT in the leaves when subjected to severe deficit and cv Frontana there was a decrease in these levels. In relation to production parameters, plants inoculated with 120 hp CD H. seropedicae showed 52% increase in their fresh biomass compared to the control irrigated, but in severe deficit this increase was 3%. The presence of A. brasilense promoted a 31% reduction in fresh weight compared to the control, but in severe deficit in an improvement of 11% in fresh weight. The association between H. seropedicae, A. brasilense and nitrogen provided a 2% increase in biomass (irrigated) and 101% severe deficit. For hp Frontana values were 0.6%, -12%, -21%, 28%, -18% and -8% in the same conditions. The same trends were observed for dry matter. Regarding NT contents of the leaves, it is noted that the CD 120 hp showed increased levels in the presence of a fluid restriction and cv Frontana, these values had decreased in all conditions. The variable number of tillers did not differ between conditions, cultivate or water condition applied. Plants inoculated with 120 hp CD H. seropedicae had 46% more spikes / plant compared to the control irrigated, and 40% in severe deficit. In cv Frontana no differences were observed. Comparing the data obtained for grain yield per plant between conditions applied (severe deficit irrigated x), the values were proportionally lower in deficit condition, due to less dry, but the plants were capable of maintaining mass values 1000 irrigated grain similar to control in both cultivars.

Keywords: Productivity, hidric restriction, plant-bacteria interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Teor Relativo de Água nas folhas das duas cultivares de trigo em três condições hídricas. (A) Irrigado; (B) Déficit Parcial e (C) Déficit Severo, em função das 8 diferentes condições de inoculação e/ou fertilização: C1 – Controle; C2 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C3 – Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C4 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5; C5 – Nitrogênio; C6 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C7 – Nitrogênio e Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C8 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5. Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente na avaliação do tempo 0 dias e letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente aos 8 e 16 dias pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).....38

Figura 2: Plantas de trigo CD 120 aos 78 dias de cultivo e 8 dias após a indução do estresse hídrico severo cultivadas em vasos com capacidade para 5 L dispostos em casa de vegetação, em função da ausência, presença ou combinação entre *H. seropedicae*, *A. brasilense* e Nitrogênio. Agosto de 2012.....39

Figura 3: Índice de Estabilidade de Membrana nas folhas das duas cultivares de trigo em três condições hídricas. (A) Irrigado; (B) Déficit Parcial e (C) Déficit Severo, em função das 8 diferentes condições de inoculação e/ou fertilização: C1 – Controle; C2 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C3 – Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C4 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5; C5 – Nitrogênio; C6 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C7 – Nitrogênio e Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C8 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5. Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente na avaliação do tempo 0 dias e letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente aos 8 e 16 dias pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).....40

Figura 4: Análises de PCR das bactérias *H. seropedicae* e *A. brasilense* isoladas nas raízes de trigo aos 30 dias após a germinação. Linha M – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb). Linhas 1 a 6 bactérias isoladas provenientes da cv CD 120. Linhas 7 a 12 bactérias isoladas provenientes da cv Frontana.....42

Figura 5: Parâmetros fisiológicos na cv CD 120. Taxa de fotossíntese líquida (A), Transpiração (B), Condutância Estomática (C) e Concentração interna de CO_2 na folha (D), em função das diferentes condições de inoculação e/ou fertilização. C1 – Controle; C2 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C3 – Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C4 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5; C5 – Nitrogênio; C6 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C7 – Nitrogênio e Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C8 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).....43

Figura 6: Parâmetros fisiológicos na cv Frontana. Taxa de fotossíntese líquida (A), Transpiração (B), Condutância Estomática (C) e Concentração interna de CO_2 na folha (D), em função das diferentes condições de inoculação e/ou fertilização. C1 – Controle; C2 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C3 – Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C4 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5; C5 – Nitrogênio; C6 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C7 – Nitrogênio e Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C8 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).....44

Figura 7: Estudos anatômicos realizados em raízes de trigo. (A) Controle da cv CD 120 e (B) Controle da cv Frontana. Observação 40X.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos realizados com diferentes estresses hídricos na cultura do trigo.....	20
.	
Tabela 2 – Características quanto ao ciclo, maturação plena (dias), estatura média (cm) e acamamento das duas cultivares avaliadas dois genótipos avaliados.....	32
Tabela 3: Massa Fresca da Parte Aérea (g), Massa Seca da Parte Aérea (g) e Teor de Nitrogênio Total (g.kg^{-1}) nas duas cultivares de trigo, nas diferentes condições de inoculação e/ou fertilização e aplicações do déficit hídrico.....	46
Tabela 4: Número de perfilhos/planta, número de espigas/planta, massa grãos/planta (g) e massa de 1000 grãos (g) nas duas cultivares de trigo, nas diferentes condições de inoculação e/ou fertilização e aplicações do déficit hídrico.....	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A Cultura do Trigo	17
2.2 Impactos Econômicos dos Estresses Abióticos Sobre a Cultura do Trigo	18
2.3 Fisiologia do Estresse	19
2.4 Principais Efeitos do Déficit Hídrico no Trigo	21
2.5 Aspectos Fisiológicos do Estresse Hídrico	21
2.5.1 Desidratação Celular e Potencial Osmótico	21
2.5.2 Danos à Membrana Celular	22
2.5.3 Fotossíntese e Trocas Gasosas	23
2.6 Adubação Nitrogenada	25
2.7 Fixação Biológica de Nitrogênio	26
2.8 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	27
2.9 <i>Azospirillum brasilense</i>	28
2.10 Interações entre Plantas e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Cultivo em Casa de Vegetação	32
3.1.1 Manutenção e Cultivo da Bactéria <i>H. seropedicae</i> SmR1 e <i>A. brasilense</i> Ab-V5	33
3.1.2 Avaliação do Teor Relativo de Água (TRA), Índice de Estabilidade de Membrana Celular (IEM) e Taxas Fotossintéticas	33
3.1.3 Determinação da Massa Fresca e Seca	35
3.1.4 Produção por Planta	35
3.1.5 Determinação do Teor de nitrogênio Total (NT)	35
3.1.6 Análise da Anatomia das Raízes	35

3.2	Análise Molecular.....	35
3.2.1	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	35
4	RESULTADOS	37
4.1	Avaliação da Percepção do estresse e interação planta bactéria	37
4.1.1	Respostas da Taxa de Fotossíntese Líquida, Condutância Estomática, Transpiração e Concentração Interna de CO ₂	42
4.1.2	Avaliação dos Parâmetros Produtivos	45
5	DISCUSSÃO	53
5.1	Parâmetros da Percepção do Estresse e Interação Planta Bactéria.....	53
5.2	Parâmetros Fisiológicos.....	57
5.1.3	Parâmetros Produtivos	58
6	CONCLUSÕES	62
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um dos principais alimentos que compõe a dieta humana, sendo que dois terços da população mundial tem o trigo e seus derivados como base da dieta alimentar diária (JONES, 2005). A produção nacional de trigo na safra 2012/13 foi cerca de 5.005.400 toneladas. Esta produção foi menor que na safra 2011/12 que foi em torno de 5.788.600 toneladas (CONAB, 2012).

No Paraná os avanços de novas tecnologias para as cultivares de trigo possibilitou a obtenção de cultivares adaptadas com produtividade superior às obtidas nas demais regiões do Sul do país (TAVARES et al., 2011). Mesmo com os avanços em cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico, o controle da água está disponível para o trigo e é de fundamental importância durante seu ciclo. De acordo com Brunetta et al. (2006), a cultura do trigo requer, além de elevados índices pluviométricos, uma boa distribuição durante todo o ciclo para alcançar produtividade em torno de 3,5 toneladas ha⁻¹.

Inúmeras são as respostas metabólicas que protegem a planta contra a perda de água imediata. Dentre elas, o rápido fechamento dos estômatos reduzindo a transpiração, o aprofundamento de raízes, o ajuste osmótico celular, redução da atividade fotossintética, bem como crescimento, produção e adaptação das plantas (TURNER e BAGG, 1981; BOYER, 1976; KAISER, 1987; CHAVES, 1991; REDDY, 2004; BECK et al., 2007). O aumento na produtividade e no conteúdo proteico está relacionado com o aumento na absorção de nitrogênio inorgânico (DÍAZ-ZORITA e FERNÁNDEZ-CANIGIA, 2008). Isso leva a um maior consumo de fertilizantes nitrogenados, pois depois da água, o nitrogênio é o nutriente que mais limita a produtividade desta cultura (DONATO e ANDRADE, 2004). Para diminuir o uso destes fertilizantes químicos, a alternativa é explorar e melhorar a capacidade de gramíneas, como o trigo, para obter nitrogênio através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) gasoso (N₂) (SAUBIDET et al., 2002; INIGUIZ et al., 2004).

A utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) colonizam a rizosfera de muitas espécies vegetais e ainda algumas colonizam os espaços intercelulares e conferem benefícios a elas, tais como um incremento no crescimento vegetal pela produção de fitohormônios, maior disponibilização de macro e micronutrientes e redução na susceptibilidade a doenças causadas por muitos patógenos (YANG et al., 2009; BABALOLA, 2010).

Herbaspirillum seropedicae e *Azospirillum brasilense* são fixadoras de nitrogênio, capazes de colonizar o trigo e outras não leguminosas, cuja eficiência para transferir

nitrogênio fixado para as plantas já foi descritos em arroz, milho e cana-de-açúcar (BASHAN et al., 1996; BALDANI et al., 1997; BALDANI e BALDANI, 2005; BHATTACHARJEE et al., 2008).

Diversos autores relatam que o genótipo da planta é um fator chave para a obtenção dos benefícios propiciados por BPCV (REIS et al., 2000; LOREDO-OSTI et al., 2004; WICHERN et al., 2008). Isto ocorre porque no interior da planta, as bactérias endofíticas estão protegidas de outros micro-organismos, além de terem maior acesso aos nutrientes disponibilizados pelas plantas (BALDANI e BALDANI, 2005; SALA et al., 2007).

Quando as BPCV são introduzidas no campo, por inoculação, a multiplicação e seu estabelecimento na rizosfera são fatores importantes para a obtenção dos benefícios propiciados por elas na associação com gramíneas, uma vez que precisam competir com outros micro-organismos no solo (BALDANI et al., 1986).

Um dos grandes empecilhos ao uso das rizobactérias como bioinoculantes é a falta de dados para a real comprovação dos efeitos aditivos destas bactérias em parâmetros produtivos e em condições a campo. Na literatura, diversos trabalhos relatando o desempenho da associação *Azospirillum brasilense* e cereais podem ser encontrados (RADWAN et al., 2004; ALAMRI e MOSTAFA, 2009; ARZANESH et al., 2011; KASIM et al., 2013; SALAMONE et al., 2012; VARGAS et al., 2012).

Tanto as bactérias (*A. brasilense* e *H. seropedicae*) e a cultura do trigo tem sido alvo de pesquisas. No entanto, a análise do trigo sob condição de associação com estas bactérias e conjugados ao déficit hídrico em relação aos parâmetros fisiológicos e produtivos ainda não foram avaliados. Diante disso, os objetivos deste trabalho foi avaliar a associação de bactérias *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5, inoculadas em duas cultivares de trigo (CD 120 e Frontana) e se esta associação é eficiente para conferir tolerância ao déficit hídrico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Cultura do Trigo

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma planta originária de clima frio, ciclo anual, cultivada durante o inverno e a primavera, cujo grão é destinado à alimentação humana, e quando não atinge a qualidade exigida, é destinado à ração animal (EMBRAPA, 2012). Os maiores produtores de trigo no mundo são a União Europeia, a China, a Índia e a Rússia. Já o Brasil ocupa o 13º lugar no ranking mundial na produção de trigo (ODEPA, 2012). No Brasil, a área de trigo cultivada na safra 2012 foi de 1,88 milhões de hectares, menor que a safra 2011 que atingiu 2,16 milhões de hectares. Esta redução da área cultivada ocorreu devido às intempéries climáticas, causando sérios prejuízos à cultura (CONAB, 2012).

O consumo interno brasileiro é de 10,4 milhões de toneladas, sendo que a produção nacional atinge cerca de 5 milhões de toneladas, o que deixa o país a mercê dos países produtores para o suprimento deste déficit na produção (CONAB, 2012), tornando o país o 5º maior importador de trigo (ODEPA, 2012).

No Brasil, o trigo é cultivado nas regiões Sul (PR, SC e RS), Sudeste (MG e SP) e Centro-oeste (MS, GO e DF), sendo que 90% da produção de trigo é oriunda da região Sul do Brasil (EMBRAPA/CNPT, 2012).

Botanicamente, o trigo é uma angiosperma da classe das Liliopsidas, pertencente à ordem Poales, família Poaceae e ao gênero *Triticum*. É uma espécie autógama, com flores perfeitas, que, em condições normais de cultivo, apresentam baixa frequência de polinização cruzada (NCBI *Taxonomy*, 2012). Este gênero é constituído de um grande número de espécies, das quais se encontram em estado silvestre, enquanto outras somente são conhecidas em estado de cultivo (CURTIS et al., 2002). As espécies podem ser divididas em três grupos dependendo do número de cromossomos: as diplóides que possuem 14 cromossomos, as tetraplóides com 28 cromossomos e as hexaplóides com 42 cromossomos (BRAMMER et al., 2001).

As espécies diplóides são quase todas silvestres, tais como *T. urartu* Tum; *T. boeoticum* Boiss; *T. monococcum* L. e *T. sinskajae* A. Filat & Kurk. A partir de um cruzamento natural entre uma espécie diplóide de trigo (*T. monococcum*) e uma gramínea silvestre, também diplóide, *Aegilops speltoides*, originou-se um produto diplóide que, após sofrer uma duplicação cromossômica natural, deu origem ao *T. turgidum* L. e outras espécies tetraplóides: *T. dicoccoides* (Korn.) Schweinf., *T. dicoccum* (Schavank) Schubl., *T. karamyshevii* Nevski, *T. jakubzineu* Udacz & Schachm; *T. polonicum* L., *T.*

ispahanicum Heslot; *T. durum* Desf; *T. aesthiopicum* Jakubz; *T. turanicum* Jakubz; *T. araraticum* Jakubz e *T. timopheevi* (Zhuk.) Zhuk. (SOBRINHO e SOUZA, 1983; CURTIS et al., 2002).

As espécies hexaplóides, desconhecidas como formas silvestres e apresentadas unicamente como plantas agrícolas cultivadas, surgiram do cruzamento natural entre uma espécie tetraplóide de trigo (*T. turgidum* Jakubz) e uma gramínea silvestre do gênero *Aegilops*, provavelmente a forma anual diplóide *Aegilops squarrosa*, cujo produto após sofrer uma duplicação cromossômica natural deu origem às formas hexaplóides: *T. zhukovski* Men. & Er; *T. spelta* L; *T. macha* Dek. & Men; *T. sphaerococcum* Pesc; *T. compactum* Host; *T. aestivum* L; *T. vavilovi* (Tum.) Jakubz; *T. petropavlovskyi* Udacz. & Migusch e *T. kilarae* Dorof. e Migusch, sendo esta última resultante do cruzamento natural entre as espécies diploide de trigo *T. timopheevi* (Zhuk) e a gramínea *Aegilops squarrosa* L. (SOBRINHO e SOUZA, 1983).

Atualmente a espécie *Triticum aestivum* L. é a mais estudada mundialmente do ponto de vista científico, tecnológico e econômico. No Brasil, diversos são os pesquisadores que se dedicam ao estudo das peculiaridades do sistema genético desta espécie (MOOLHUIZEN et al., 2007; PAUX et al., 2008) no melhoramento genético, dedicando-se principalmente ao aumento na produção, qualidade da panificação, respostas ao uso de fertilizantes, tolerância a estresses abióticos entre outras características (SCHIMIDT et al., 2009; KHODARAHMI et al., 2010).

No Brasil, a espécie predominantemente cultivada é a *T. aestivum* L., mas o trigo duro (*T. durum*) também é cultivado, em menor escala, em alguns Estados do Brasil, como Rio Grande do Sul e Santa Catarina (EMBRAPA, 2004).

2.2 Impactos Econômicos dos Estresses Abióticos Sobre a Cultura do Trigo

O Brasil, apesar da sua vasta extensão territorial, aparece timidamente com 0,5% da produção mundial de trigo, o que equivale a uma produção de 5,9 milhões de toneladas, que movimentam no país cerca de US\$ 60 milhões. Os Estados do Rio Grande do Sul e Paraná obtêm 92,3% da área cultivada e 91,1% da produção (CONAB, 2012).

A baixa produção do trigo, no Brasil, se deve a diversos fatores como medidas políticas-econômicas que desestimulam a produção nacional, preços mínimos não vantajosos para o produtor; custos mais elevados de produção vistos as condições climáticas propícias para o aparecimento de doenças e a necessidade de maior número de tratos culturais;

condições climáticas não apropriadas, como o surgimento de veranicos nas fases de plantio e espigamento e de geadas na fase de emborrachamento e florescimento, desmotivando o triticultor (CONAB, 2012).

Estudos econômicos dos danos causados pelos estresses abióticos são escassos na literatura, em virtude da sazonalidade com que ocorrem e ao fato de ocorrerem associados, como exemplo: a seca, a infestação de pragas, doenças, geadas, e alagamentos, o que dificulta a real contabilização do dano econômico associado àquele fator estressante específico. O Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão do Governo Federal cita, em 71% dos casos, a ocorrência de secas como o principal evento de perdas em culturas (GÖPFERT et al., 1993).

No Paraná, estimativas apontaram que as perdas ocorridas por estresses abióticos para a cultura do trigo no ano 2000 foram de 64,5%, no ano 2001 de 5,1%, no ano 2002 foi de 32% (CONAB, 2008) e 16% na safra 2008/2009, devido às estiagens que aconteceram no início do ciclo do trigo (IBGE, 2009).

2.3 Fisiologia do Estresse

O termo estresse é mais frequentemente usado subjetivamente e com vários significados. A definição fisiológica e o termo apropriado para o estresse são referenciados como respostas às situações fisiológicas diferentes (CHAVES et al., 2003; CHAVES et al., 2002; HU et al., 2006). Estes são, geralmente, definidos como fatores externos que exercem uma influência desvantajosa na planta. Na maioria dos casos, o estresse é avaliado em relação à sobrevivência da planta, crescimento (biomassa) ou aos processos primários de assimilação (absorção de CO₂ e minerais) que estão relacionados com o desenvolvimento completo (TAIZ e ZEIGER, 2010).

As tensões ambientais provocam uma grande variedade de respostas nas plantas, que vão desde a alteração na expressão genética até as alterações metabólicas na taxa de crescimento e produtividade da planta (HSIAO, 1973). A produção e produtividade de várias culturas continuam a ser adversamente afetadas devido a vários estresses bióticos e abióticos. Os danos causados por essas tensões são responsáveis pelas enormes perdas econômicas em todo o mundo (RAI et al., 2011).

O principal problema na agricultura é o estresse hídrico, pois a planta não tem a capacidade de suportar o estresse, que envolve sutis alterações na estrutura bioquímica celular. Esta parece ser o resultado da acumulação de solutos compatíveis e de proteínas

específicas que podem ser rapidamente induzidas por estresse osmótico (SHAO et al., 2005). As várias respostas fisiológicas da planta ao déficit de água, geralmente variam com a gravidade assim como com a duração da tensão de água (AGUERA et al., 1997; SHAO et al., 2008). Entre todos os tipos de estresses abióticos, a seca e as baixas temperaturas são as que afetam mais o crescimento vegetal. As plantas respondem ao déficit hídrico e às baixas temperaturas com uma diversidade de mudanças fisiológicas (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). Diversos autores já avaliaram estresses abióticos no trigo (Tabela 1).

Tabela 1: Estudos realizados com diferentes estresses hídricos na cultura do trigo.

Espécie	Estresse Aplicado	Referência
<i>Triticum aestivum</i>	Hídrico	Dorffling et al., 1993 Nayyar et al., 2003 Creus et al., 2004 Gallé et al., 2009 Arzanesh et al., 2011 Kasim et al., 2013
<i>Triticum durum</i>		Hasissou & Bouharmont, 1994
<i>Triticum aestivum</i>	Hídrico/Salino	Barakat e Abdel-Latif, 1995; 1996 El-Haris e Barakat, 1998 Pauk et al., 2002
<i>Triticum durum</i>		Lutts et al., 2004
<i>T. aestivum</i> e <i>T. durum</i>	Salino	Zair et al., 2003
<i>Triticum aestivum</i>		Liu et al., 2006 HongBo et al., 2006 Wang et al., 2007 Engamberdieva e Kucharova, 2009

O estresse hídrico pode ser definido como uma situação em que o potencial de água e o turgor nas plantas sejam reduzidos à níveis suficientes para fazer a interface com as funções normais, na qual é considerado uma perda moderada de água, o que leva ao fechamento estomático e a limitação de trocas gasosas (BERMAN e DEJONG, 1996; AMDT et al., 2001; CHAVES et al., 2003; JALEEL et al., 2006).

2.4 Principais Efeitos do Déficit Hídrico no Trigo

A deficiência hídrica é consequência de um período contínuo ou transitório de seca que provoca a redução no crescimento das plantas devido à redução do potencial osmótico da planta, da condutância estomática, da fotossíntese e da assimilação de nitrogênio pela planta (RODRIGUES et al., 1998; REDDY et al., 2004; TAIZ e ZEIGER, 2010).

É no estágio de desenvolvimento entre a iniciação floral até o desenvolvimento da inflorescência, antese e formação de grãos, que a deficiência hídrica causa maior redução na produção da cultura do trigo (RODRIGUES et al., 1998).

A deficiência hídrica também afeta o padrão de afilhamento da planta de trigo, reduzindo o tamanho e o número de afilhos quando ocorre antes da antese e causando a morte dos afilhos quando ocorre após a antese (LIMIN e FOWLER, 2000). A redução na área foliar também é observada na cultura do trigo, que pode ter reflexos negativos ou positivos no rendimento de grãos, uma vez que a área foliar influencia a eficiência do uso de água pela planta (RODRIGUES et al., 1998). Estes autores citam que os maiores efeitos negativos aconteceram nos estádios reprodutivos, que afeta os componentes de rendimento, em que a redução do número de grãos por espiga é o mais associado à diminuição de rendimento de grãos.

O déficit hídrico pode causar a redução da produtividade pelo fato de causar uma redução na expansão celular, que leva a um reduzido desenvolvimento de meristemas primários, entre eles aqueles que formam as inflorescências, também, podendo levar a um florescimento precoce (NAN et al., 2002). Este fato, possivelmente está associado à ação do hormônio ácido abscísico (ABA), levando a um reduzido enchimento de grãos (grãos chochos) (RODRIGUES et al., 1998).

2.5 Aspectos Fisiológicos do Estresse Hídrico

2.5.1 Desidratação celular e potencial osmótico

Os processos físicos e fisiológicos nas plantas dependem particularmente da quantidade de água disponível no solo para formar um sistema solo-planta-atmosfera (EITZINGER et al., 2003) e é um importante fator no crescimento, desenvolvimento e rendimento das culturas na maior parte das áreas agrícolas do planeta (BOYER, 1982; FARIA e MADRAMOOTOO, 1996; STRECK, 2004).

A água é um componente fundamental no metabolismo de todos os seres vivos e facilita muitas reações biológicas vitais por ser solvente, meio de transporte e agente de refrigeração (BONHERT e JENSEN, 1996; MUNDREE et al., 2002). Em plantas e em outros

seres autotróficos, a água tem um papel adicional de prover energia para a fotossíntese. Uma das maiores consequências do estresse hídrico é a perda de água protoplasmática, o que induz à concentração de íons tais como Cl^- e NO_3^- que leva a um estado viscoso-vítreo (HOEKSTRA et al., 2001; MUNDREE et al., 2002). Este estado viscoso aumentaria as chances de interações moleculares que pode causar a desnaturação de proteínas e a fusão de membranas (HARTUNG et al., 1998; HOEKSTRA et al., 2001).

O déficit hídrico, desidratação celular ou ainda estresse osmótico são termos usados na literatura para definir a falta de água que causa mudanças na turgescência da célula (HMIDA-SAYARI et al., 2005). As plantas respondem de inúmeras maneiras ao estresse osmótico: diminuem a produção de área foliar, fecham os estômatos, aceleram a senescência e promovem a abscisão foliar (DIMKPA et al., 2009).

2.5.2 Danos à membrana celular

A membrana celular é formada por uma bicamada de fosfolipídeos, entremeada com proteínas e esteróis. As propriedades físicas dos lipídeos têm grande influência sobre as atividades das proteínas de membrana, incluindo H^+ -ATPases, transportadoras e proteínas formadores de canais que regulam o transporte de íons, água e outros solutos, assim como o transporte de enzimas (HUGHES e DUNN, 1996; BAEK e SKINNER, 2003).

A membrana celular tem um papel fundamental na manutenção da integridade celular, bem como na transdução de sinais externos e na manutenção de homeostase iônica, principalmente, durante o estresse osmótico (MUNDREE et al., 2002).

Os danos causados pelo estresse hídrico podem estar relacionados com alterações nas propriedades da membrana celular. Como esta bicamada fosfolipídica tem alta porcentagem de ácidos graxos saturados, as membranas tendem a se solidificarem em estado semicristalino e tornam a membrana menos fluida, alterando muitas atividades metabólicas celulares (WILSON, 1991; BAEK e SKINNER, 2003).

Com este fenômeno, há desaceleração no bombeamento de íons para dentro e fora da célula, reduzindo a sua atividade metabólica. Este efeito, também, permite atraso na dissipação de energia, o que leva à formação de radicais livres e ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio tóxico para a célula (BECK et al., 2004).

Os radicais livres podem promover a peroxidação dos lipídios e, conseqüentemente, danificar a membrana por meio de rupturas ao longo de sua extensão (SAÍRAM e SAXENA,

2000). Além disso, podem causar a degradação de proteínas, inativação de enzimas, danos aos pigmentos clorofílicos e a quebra da fita de DNA (IMLAY e LINN, 1988; SAÍRAM et al., 1998).

Dependendo da duração e intensidade da deficiência de água, as limitações metabólicas são frequentemente observadas, correlacionada com a perda de ATP, a qual, por sua vez, diminui a capacidade regenerativa do RuBP (PARRY et al., 2002). Esta redução na síntese de ATP ocorre devido ao transporte de elétrons, diminuindo a fotofosforilação causada pela perda de membrana em reações associadas. As membranas sofrem danos estruturais devido à redução da água livre (LAWLOR e CORNIC, 2002).

Outro fator que causa redução do crescimento das plantas sob estresse é a toxicidade iônica, que desencadeia danos às membranas, reduzem a atividade de enzimas hidrolíticas, aumentam os níveis de peroxidação de lipídios e estimulam a formação de erros (ESSA, 2008).

2.5.3 Fotossíntese e trocas gasosas

A desidratação celular causada por estresse hídrico decresce a taxa fotossintética de muitas plantas (LAWLOR e CORNIC, 2002; REDDY et al., 2004). O fechamento dos estômatos pode ser considerado um dos primeiros ajustes desenvolvido pelas plantas a fim de evitar a continuidade da perda de água (SANTOS et al., 2011), e tem sido aceito como fator determinante na limitação da fotossíntese em condições de baixo potencial hídrico (CORNIC, 2000). A concentração interna de CO₂ e a diminuição da taxa fotossintética foliar, pelo enrolamento e outras mudanças estruturais, podem diminuir o metabolismo à medida que o déficit hídrico ocorre, os estômatos fecham-se progressivamente, reduzindo a taxa de fotossíntese líquida (TAIZ e ZGEIGER, 2010).

A interação entre o fechamento de estômatos e baixo potencial hídrico nas raízes está bem documentada (SOCIAS et al., 1997; REDDY et al., 2004). Um mecanismo de sinalização químico que envolve o ácido abscísico (ABA) e uma correlação direta entre seu conteúdo no xilema e condutância estomática foram demonstrados por Socias et al., (1997). O mecanismo de fechamento de estômatos sob baixo potencial hídrico também parece estar relacionado com a nutrição da planta, pH da seiva no xilema, condutividade hidrolítica do xilema e o déficit de pressão de vapor da folha (OREN et al., 1999).

Diversas respostas metabólicas protegem a planta contra a dessecação imediata. Sob tais condições, o rápido fechamento do estômato reduz a transpiração. Sendo assim, o seu

fechamento é considerado mais uma linha de defesa contra a seca (MACHADO e SASSAKI, 1999; TAIZ e ZEIGER, 2010).

O mecanismo de redução fotossintética por comprometimento metabólico é um fenômeno mais complexo. As mudanças no metabolismo celular de carbono, provavelmente, podem ocorrer no início do processo de desidratação celular e o déficit hídrico, geralmente, reduz a capacidade bioquímica para a assimilação e processamento de carbono (REDDY et al., 2004). A taxa fotossintética em plantas superiores depende da atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e da síntese de RuBP (TEZARA et al., 1999; REDDY et al., 2004).

Parece razoável supor que o suprimento de RuBP determina a atividade fotossintética, já que estas se correlacionam linearmente (TEZARA et al., 1999). A limitação na regeneração da RuBP (rubisco) poderia resultar no suprimento inadequado de ATP e/ou NADPH para o ciclo de Calvin ou devido à diminuição da reciclagem desta enzima devido à sua baixa atividade mesmo em plantas estressadas e não estressadas (TEZARA et al., 1999; REDDY et al., 2004). As reações de transformação da RuBP a (Gliceraldeído-3-fosfato) 3-PGA decrescem à medida que o estresse hídrico ocorre, sugerindo que a regeneração do RuBP é inibida sob estresse.

Em condições de estresse, o número de cloroplastos é reduzido e o seu volume também. Este fenômeno pode alterar a conformação da Rubisco. Outras alterações provocadas pelo déficit hídrico conhecidas são a acidificação do estroma que resultam na inibição da atividade da Rubisco (MEYER e GENTY, 1999).

Outras enzimas também têm suas atividades envolvidas no ciclo de Calvin, modificadas por ocasião de uma desidratação. A ribulose-5-fosfatoquinase e a frutose-1,6-bifosfatase (FBPase) têm suas atividades, proporcionalmente, reduzidas pela falta de água. Os produtos finais da fotossíntese: o amido e a glicose também têm suas sínteses diminuídas.

Outro efeito dos estresses é a degradação de proteínas do fotossistema II (PSII) (proteínas D1 e D2) e a precipitação de várias moléculas (EDREVA, 2005). A proteína D1, localizada no centro de reação PSII do cloroplasto está envolvida na captura de fótons. As baixas temperaturas e o estresse hídrico, ao modificarem a fluidez da membrana e danificar os aminoácidos aromáticos da proteína D1, diminuem a eficiência quântica do aparato fotossintético e causam o fenômeno da fotoinibição. Como consequência, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que tem efeito deletério sobre os pigmentos de cloroplastos e ao complexo de proteínas deste aparato (EDREVA, 2005).

Existem numerosas citações indicando que a assimilação de CO₂ pode ser limitada pelo fechamento estomático, seja em resposta a um decréscimo no potencial hídrico foliar (SCHULZE e HALL, 1982), diminuição da umidade relativa do ar (LANGE et al, 1971; BUNCE, 1997; PRADO et al, 1995), ou como uma resposta direta dos estômatos ao déficit hídrico do solo (BLACKMANN e DAVIES, 1985; GOLLAN et al, 1986).

A avaliação da fotossíntese em estudos com a planta de trigo em diferentes condições ambientais é prática importante para uma seleção mais “refinada” de genótipos, objetivando obter altas produtividades em meio à limitação climática (KIM et al., 2006). Juntamente com a fotossíntese e outros parâmetros de trocas gasosas, a fluorescência da clorofila também pode ajudar no entendimento fisiológico do processo em condições de seca, sendo que os padrões de fluorescência nessas condições são bem estabelecidos (DURÃES et al., 2005).

Na tolerância à seca, as respostas das plantas podem variar dependendo da severidade e da duração de imposição do estresse, do estágio fenológico e do material genético (SHAO et al., 2008).

2.6 Adubação Nitrogenada

O nitrogênio (N) é essencial para o desenvolvimento dos vegetais, e constitui um macroelemento limitante para a produtividade das plantas de interesse agrônomo (HARDY e HAVELKA, 1975). Este nutriente é essencial para a formação de proteínas e outros compostos como aminas, aminoácidos e polipeptídeos, sendo então, indispensável para a produção de cereais de altíssima qualidade (MAGALHÃES, 1979).

No solo, o N pode ser adicionado via fertilizantes minerais e orgânicos, por meio da água da chuva e pela fixação biológica de nitrogênio (MALAVOLTA, 2006). A adubação nitrogenada em culturas não-leguminosas é um dos insumos mais caros na agricultura, e aproximadamente 65% do nitrogênio mineral aplicado é perdido no sistema solo-planta através do escoamento, erosão, lixiviação, desnitrificação e volatilização (BHATTACHARJEE et al., 2008). Outro fator importante no elevado custo de produção do fertilizante nitrogenado está na sua dependência de combustível fóssil para sua síntese, o que o torna alvo das crises do petróleo (RAPPEL e LOIOLA, 1993).

O N no trigo é fundamental na produtividade, visto que determina o número de perfilhos, sendo essencial na fase de formação dos nós, no início do alongamento (SALA et al., 2005). Os fertilizantes nitrogenados são de extrema importância para as culturas não-leguminosas, tais como arroz, trigo e milho. Entretanto, o alto custo que esses fertilizantes

representam, a extensa área ocupada por esses cereais (aproximadamente cinco vezes mais que as culturas não-leguminosas), e levando em consideração que um dos objetivos para a agricultura sustentável é o aproveitamento eficiente de N atmosférico, esses fatores fazem com que a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) associada a essas culturas tornam-se de extrema importância (SALA et al., 2005).

O seu fornecimento adequado para o solo ou pela adição de fertilizantes, como regra, melhora a qualidade dos produtos agrícolas, porém o seu excesso, pode ser prejudicial a cultura (MALAVOLTA, 2006), isto porque o N promove algumas alterações na morfologia das plantas e sob condições de alto suprimento desse nutriente, ocorre aumento na área foliar, como consequência, a curvatura das folhas é ampliada de modo a interferir na captação de luz (MARSCHNER, 1995). De acordo com Malavolta, (2006), o N interfere no fluxo de tecidos das plantas, e seu suprimento se reflete no índice de área foliar, na produção de gemas vegetativas, no perfilhamento e no teor de proteínas dos grãos.

Um estudo realizado por Harber, (1994) mostra que 11% do N aplicado, é perdido pelo sistema solo-planta no período de 20 dias após sua aplicação. Por ser um nutriente com elevado dinamismo no sistema solo-planta, o manejo adequado do N é conhecido como um dos mais difíceis, portanto, é necessário que este seja fornecido à planta em locais e épocas adequadas (SANTOS et al., 2003). Deste modo, o manejo ideal da adubação nitrogenada deve ser definido como aquele que permite satisfazer a necessidade da cultura, mas com o mínimo de risco ao ambiente (FERNANDEZ, 2006).

2.7 Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) compreende um processo, executado por certas bactérias, no qual o nitrogênio atmosférico (N_2) de baixa reatividade é convertido em amônia (NH_3). Tais bactérias são denominadas diazotróficas: organismos capazes de crescer com N_2 atmosférico como única fonte de N. Algumas destas bactérias podem estar em íntima associação com plantas de interesse econômico (JAMES e OLIVARES, 1998; PERIN, 2007).

O N está presente de muitas formas na biosfera. A atmosfera terrestre contém aproximadamente 79% de N_2 , destes 0,04% são encontrados na ecosfera terrestre de forma combinada, onde 57% estão na forma orgânica e 43% na forma inorgânica (KERBAUY, 2008).

No solo, o N entra no ciclo biogeoquímico, no qual pode passar por várias formas orgânicas ou inorgânicas antes de retornar à forma molecular (HAVLIN et al., 2005;

KERBAUY, 2008). Na forma orgânica, o N é mineralizado no solo por dois processos microbiológicos: a amonificação, que é o catabolismo da matéria orgânica em NH_4^+ (por fungos e bactérias) e também através da nitrificação que é a oxidação bacteriana do NH_4^+ em NO_2^- e este em NO_3^- , por bactérias do gênero *Nitrossomonas* e *Nitrobacter*, respectivamente (SCHLESINGER, 1997).

A maior absorção de N pelas raízes pode ocorrer em razão da produção, pela bactéria, de auxinas, citocininas e giberelinas (BALDANI e BALDANI, 2005) e, ainda, graças ao aumento no número de raízes e pêlos radiculares (DOBBELAERE et al., 1999), o que permite melhor exploração do solo e benefícios em condições de estresse hídrico em trigo (CREUS et al., 2004).

Os íons de NH_4^+ e NO_3^- , gerados pela FBN ou simplesmente pela decomposição da matéria orgânica do solo, tornam-se objetos de intensa competição entre plantas e micro-organismos. As plantas desenvolveram mecanismos para capturar rapidamente esses íons. Suas raízes, tanto de dicotiledôneas como monocotiledôneas, apresentam regiões que estão em constante divisão, alongamento e diferenciação celular. Além destas características, as raízes ainda possuem a presença de pêlos radiculares, sendo estes responsáveis por aumentar a área de superfície de absorção de água e solutos, resultando na forte demanda de nutrientes nesses tecidos (TAIZ e ZAIGER, 2010).

Existem três tipos de organismos diazotróficos: os de vida livre, os que vivem associados a outros organismos e os que vivem em simbiose com outros organismos.

2.8 *Herbaspirillum seropedicae*

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* foi assim denominado por apresentar forma de espiral onde foi encontrada em associação com plantas herbáceas (BALDANI et al., 1986). *H. seropedicae* foi isolado em 1986 por Baldani e colaboradores na cidade de Seropédica, Rio de Janeiro, sendo esta espécie a mais estudada, por ser um diazotrófico que promove o crescimento de plantas de interesse agrônômico.

H. seropedicae é uma espécie que possui várias estirpes e, atualmente o genoma da estirpe SmR1 foi sequenciado, um mutante espontâneo apresentando resistência à estreptomicina da estirpe Z78. Seu genoma possui um cromossomo circular de 5.513.887 pb e um total de 4.735 ORFs potenciais, na qual codifica 3.108 proteínas com funções conhecidas, 497 proteínas preditas e 1.130 sem função conhecida. A estirpe SmR1 é capaz de crescer em meio com presença de monossacarídeos tais como D-glicose, D-frutose, D-galactose, D-

arabinose, com açúcar-álcool e ácidos orgânicos como L-malato e L-lactato. Porém, não é capaz de crescer em oligo ou polissacarídeos. Apresenta capacidade limitada de crescer em aminoácidos como fonte de carbono, sendo capaz de utilizar L-prolina, l-tirosina, D/L-alanina, β -alanina, L-isoleucina e L-glutamato (PEDROSA et al., 2011).

De acordo com os mesmos autores, os genes *nif* foram encontrados em uma região abrangendo 37.547 pb intercalados com os genes *fix*, *mod*, *hes*, *hsc* entre outros. *H. seropedicae* é uma bactéria aeróbia capazes de fixar nitrogênio em condições de limitação de oxigênio.

No metabolismo de ureia, ela é capaz de sintetizar e degradar ureia (acontece pela uréase). Possui genes que codificam para as enzimas do ciclo completo da ureia, sendo a principal via para a biossíntese de arginina, utilizando prolina e carbamoil-fosfato como precursores (PEDROSA et al., 2011).

2.9 *Azospirillum brasilense*

A. brasilense é uma bactéria diazotrófica de vida livre encontrada em solos de clima tropical e subtropical, estando associada com raízes de gramíneas de grande importância econômica, como trigo, arroz, milho e diversas forrageiras, e até mesmo em outras espécies vegetais (DÖBEREINER e DAY, 1976). Seu genoma é complexo, com cinco a sete megareplicons variando de 0,65 a 2,6 Mpb. Diversos megareplicons mostraram sinal de hibridização com o gene rDNA 16S, o que sugere a presença de múltiplos cromossomos nesta bactéria (MARTIN-DIDONET et al., 2000).

As fontes de carbono preferencialmente utilizadas por *Azospirillum brasilense* são ácidos orgânicos como malato, lactato, succinato e piruvato. Carboidratos como D-frutose e D-glucose podem ser utilizados por algumas espécies (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987). O metabolismo de nitrogênio é bastante versátil, podendo ser utilizados como fonte de nitrogênio: amônio, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio atmosférico (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

As espécies de *Azospirillum* apresentam um metabolismo de carbono e nitrogênio bastante dinâmicos e variados. As fontes de carbono preferenciais são ácidos orgânicos como malato, piruvato e succintao, também havendo uma aparente preferência de frutose sobre glicose. Nitrato, nitrito, amônio e aminoácidos, além de N₂, podem servir com fontes de nitrogênio (DÖBEREINER, 1992).

Duas características podem ser salientadas para a espécie *A. brasilense*, uma é sua alta motilidade, evidente mesmo em culturas alcalinas envelhecidas (DÖBEREINER, 1992) e a outra é sua incapacidade de utilizar glicose como fonte de carbono, devido à ausência de um transportador específico na membrana plasmática e de enzimas glicolíticas (GOEBEL e KRIEG, 1984).

2.10 Interações entre Plantas e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

No solo, existe uma grande infinidade de espécies de bactérias que vivem livremente ou em associação com plantas. Estes organismos são responsáveis por uma série de interferências no solo que podem garantir a qualidade do mesmo, sendo de extrema importância para a sustentabilidade agrícola, e desta forma, a relação entre planta-solo-bactérias importante para a proliferação microbiana (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007), onde se encontra um grande número de BPCV.

De acordo com Gray e Smith (2005), as BPCV podem ser classificadas dependendo do grau de proximidade com a raiz e a intimidade da associação, sendo nomeadas de rizobactérias extracelulares, as que estão na rizosfera ou no rizoplane (superfície entre raiz e solo); endofíticas as que vivem entre os espaços intercelulares do córtex radicular e rizobactérias intracelulares as quais vivem dentro das células da raiz, geralmente especializadas como os nódulos.

Em relação à sua localização, BALDANI et al. (1997) sugeriram três categorias para bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam gramíneas: 1) os organismos rizosféricos; 2) os endofíticos facultativos (capazes de viver na rizosfera ou em vida livre) e 3) os endofíticos obrigatórios (incapazes de viver no solo). Estudos com inoculação de micro-organismos diazotróficos mostram que bactérias endofíticas contribuem mais com a FBN, além de haver influência de genótipos na relação planta/bactéria (BALDANI e BALDANI, 2005). Taulé et al. (2012) propuseram ainda o termo “endofíticas promotoras do crescimento de plantas” para as bactérias endofíticas.

Segundo Monteiro et al. (2012), as bactérias endofíticas colonizam primeiramente as plantas, aderindo-se à superfície das raízes, em seguida, com a colonização das raízes laterais pela penetração da epiderme, na qual envolve lipopolissacarídeos, exopolissacarídeos bacterianos, e posteriormente ocupando os espaços intercelulares, colonizando também o xilema e a parte aérea das plantas. Bashan e De-Bashan (2005), relataram que estas bactérias

ainda podem colonizar as plantas por aberturas naturais (estômatos) ou artificiais (ferimentos) para sua entrada.

De acordo com estudos realizados por James et al. (2002) este tipo de colonização de endofíticos foi comprovado com a espécie *H. seropedicae* que encontra-se em raízes laterais e junções destas com a principal, em coleóptilos, em espaços intercelulares da raiz, aerênquima e células corticais, sendo encontradas colônias no xilema, folhas e caules de arroz.

As BPCV podem influenciar as plantas de duas formas (BASHAN e DE-BASHAN, 2005). Na primeira forma, afetando diretamente o metabolismo das plantas por estar fornecendo substâncias que normalmente estariam pouco disponíveis. Elas são capazes de fixar nitrogênio, solubilizar fósforo e ferro e até mesmo produzir hormônios como auxinas, giberilinas e etileno. A segunda forma de atuação dessas bactérias é o biocontrole de patógenos, na qual produz o crescimento de forma indireta permitindo que a planta expresse todo o seu potencial de crescimento, que poderia ser limitado, caso um patógeno estivesse presente (BASHAN e DE-BASHAN, 2005; DIMKPA et al., 2009).

Bactérias endofíticas podem desencadear um fenômeno conhecido como indução de resistência sistêmica (IRS) fazendo com que a planta evite a entrada de patógenos (RYAN et al., 2007). Dimpka et al. (2009) fazem a referência à proteção cruzada, sendo que genes ativados pelo reconhecimento de rizobactérias pelas plantas, além de ativarem a IRS, podem estar também envolvidos nas respostas a estresses abióticos como, seca, salinidade e frio.

A penetração das bactérias próximas às raízes laterais também tem sido observado pelo gênero *Azospirillum*, sugerindo que as bactérias não relacionadas taxonomicamente, podem compartilhar mecanismos semelhantes de interação com ambas as plantas, monocotiledôneas e dicotiledôneas (REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998).

Uma característica importante das bactérias endofíticas é a fixação de nitrogênio atmosférico, diminuindo aplicação de fertilizantes nitrogenados, o que propicia menor utilização desses insumos, cujo uso comumente causa poluição ambiental além de proporcionar uma economia para o triticultor. Essas bactérias são capazes de realizar FBN (BARBOSA et al., 2006), o que as denomina diazotróficas, e de viver no interior dos tecidos vegetais (endofítico) sem induzirem uma resposta de defesa à sua presença.

OLIVEIRA et al. (2003) relataram que os melhores resultados quanto à contribuição da FBN foram observados em solo de menor fertilidade, indicando que as bactérias contribuem mais para o aumento no conteúdo de nitrogênio quando em condições restritivas. Essas bactérias não são capazes de suprir totalmente a demanda de N das plantas somente pela FBN, porém, podem influenciar fortemente a nutrição nitrogenada das culturas as quais estão

associadas, aumentando a capacidade de assimilação de N, indiretamente, com o aumento do sistema radicular, ou diretamente, estimulando o sistema de transporte de N nas plantas (MANTELIN e TOURAINE, 2004).

A produção de fitormônios como ácido-3-indol-acético (AIA), citocininas, giberelinas e ABA por bactérias podem alterar o padrão e também o crescimento das plantas, interferindo no seu desenvolvimento (TSAVKELOVA et al., 2006, HAYAT et al., 2010). A maioria das associações entre bactéria e raízes que mostra efeitos promotores do crescimento em plantas tem sido relacionada com a produção de indóis (AIA), e a inoculação de várias espécies de bactérias resultou no crescimento da raiz e/ou no aumento da formação de raízes laterais. A promoção do crescimento resulta em um aumento da superfície de absorção e pode, por consequência, ter efeitos positivos na aquisição de água e nutrientes (DIMKPA et al., 2009; HAYAT et al., 2010).

Hormônios como etileno e ABA estão relacionados a estresses ambientais e podem ser regulados ou produzidos por bactérias em associação com plantas. O etileno produzido em situação de estresse afeta o crescimento radicular e, conseqüentemente, da parte aérea. Bactérias que possuem a enzima aminociclopropano-1-carboxilase deaminase (ACC deaminase) podem regular a produção desse hormônio sendo vantajoso para o crescimento sob condições de estresse (SALEEM et al., 2007; BELIMOV et al., 2009). CREUS et al. (2004), em trabalho com plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum*, relataram que plantas tratadas possuem maior hidratação, potencial hídrico e fração de água apoplástica maiores do que plantas controle em condições de estresse, podendo promover o aparecimento do ABA, também relacionado a sinais anti estresses, principalmente o hídrico, que estimula o fechamento dos estômatos (HARTUNG et al., 1998).

Bactérias podem induzir ou ser mediadoras de tolerância a estresses abióticos como salinidade, seca, inundações, temperaturas muito altas ou baixas, deficiência de nutrientes e metais tóxicos (DIMKPA et al., 2009). Bactérias podem ainda produzir substâncias osmotolerantes, como, por exemplo, glicina-betaína que pode atuar sinergicamente com os outros compostos vegetais na redução do potencial hídrico das células, ajudando na tolerância à seca (HAYAT et al., 2010).

Baseado neste contexto, a interação entre bactérias endofíticas diazotróficas e plantas de trigo, submetidas ao estresse hídrico deve ser compreendida para elucidar os aspectos fisiológicos envolvidos nesse complexo sistema biológico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo em Casa de Vegetação

O experimento foi realizado em casa de vegetação na Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – COODETEC, Cascavel/PR de maio a setembro de 2012. Foram avaliados, dois genótipos provenientes do programa de melhoramento da COODETEC (Tabela 2).

Tabela 2 – Características quanto ao ciclo, maturação plena (dias), estatura média (cm) e acamamento das duas cultivares avaliadas.

Cultivares	Ciclo	Média à maturação plena (dias)	Estatura média (cm)	Acamamento
FRONTANA	Médio	139	110 - Alta	Suscetível
CD 120	Médio	120	84 - Média	Moderadamente resistente

Fonte: Guia de produtos trigo, COODETEC, 2012.

A cv CD 120 é proveniente do germoplasma COODETEC e se caracteriza por ser uma cultivar que vem sendo melhorada para responder a adubação nitrogenada. Por outro lado, a cv Frontana foi utilizada como ancestral nesse mesmo germoplasma, não apresentando continuação no melhoramento para a questão de resposta a adubação nitrogenada. O objetivo em se utilizar genótipos contrastantes foi verificar o maior ou menor grau de associação com genótipos responsivos e não responsivos à adubação nitrogenada.

O estresse hídrico foi aplicado no início da fase do espigamento no estágio fenológico (Zadock 45). No déficit severo, as plantas foram submetidas a um período de 8 dias de restrição hídrica total sendo irrigado ao término. No déficit parcial os vasos tiveram a reposição de 50% de seu peso perdido em água, por um período de 16 dias. Após este período de déficit, as plantas foram irrigadas normalmente.

Os vasos plásticos continham aproximadamente 4,5 kg de solo previamente peneirado, mas sem adubação química. As características químicas do solo utilizado foram: pH 6,40; P = 60,00 mg/dm³; K = 1,14 cmol/dm³; Ca = 6,69 cmol/dm³; Mg = 3,03 cmol/dm³; H+Al = 3,18 cmol/dm³; Cu = 14,45 mg/dm³; Mn = 400,00 mg/dm³; Fe = 21,00 mg/dm³; Zn = 32,49 mg/dm³; SB = 10,86 cmol/dm³ e 41,6 g.dm³ de Matéria Orgânica.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com 5 repetições por tratamento em esquema fatorial 2 x 8 x 3, com 5 repetições, sendo 2 genótipos de trigo (CD 120 e Frontana), 8 condições de inoculação/fertilização (C1 – Testemunha; C2 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C3 – Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C4 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5; C5 – Nitrogênio; C6 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C7 – Nitrogênio e Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C8 –

Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5) e 3 condições hídricas (irrigado, déficit parcial e déficit severo) totalizando 48 tratamentos. Os dados foram avaliados pelo programa Genes (CRUZ, 2008) e os resultados das avaliações submetidos a análise de variância – ANOVA, e as médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os vasos foram dispostos aleatoriamente em casa de vegetação, de modo a terem as mesmas condições de radiação solar e temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de 60%). Foram semeadas 6 sementes por vaso previamente inoculadas, (10^6 células/semente para *H. seropedicae* SmR1 e 10^7 células/semente para *A. brasilense* Ab-V5 e após 30 dias da germinação foi realizado o desbaste, deixando-se 20 plantas por tratamento, e também neste período foi realizado a aplicação de nitrogênio na forma de uréia, 142 kg ha^{-1} .

3.1.1 Manutenção e Cultivo da Bactéria *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5

As bactérias foram mantidas por sucessivas passagens em meio sólido em placa NFb – Malato para *H. seropedicae* SmR1 e NFb – Lactato para *A. brasilense* Ab-V5 e mantidas em estufa de crescimento a 28°C . O inóculo foi preparado retirando-se uma colônia da bactéria e transferindo-a para um pré-inóculo. Este, foi preparado com 5 mL de meio DIGS (MOUTIA et al., 2003) em tubos falcon de 50 mL, e mantidos a 28°C em uma incubadora tipo Shaker a 120 rpm. Após 24 h, o crescimento foi quantificado por turbidimetria (Espectrofotômetro marca HOMIS modelo SF 200-DM Digital) em 600 nm. Para o preparo do inóculo 1,0 mL de pré-inóculo, com aproximadamente 1,0 unidade de densidade ótica (D.O), foi transferido para erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio NFb – Malato e Lactato por aproximadamente 22 h. O cultivo foi então utilizado para inoculação nas sementes de trigo quando atingiu a fase exponencial do crescimento e medida a turbidez.

3.1.2 Avaliação do Teor Relativo de Água (TRA), Índice de Estabilidade de Membrana Celular (IEM) e Trocas Gasosas

Para avaliação do déficit hídrico, foram realizadas medições nas folhas, estas foram monitoradas por meio do Teor Relativo de Água (TRA), seguindo recomendações de (SCHONFELD et al., 1988), onde folhas bandeiras foram retiradas aos 0, 8 e 16 dias após o início da restrição hídrica. Três amostras de folhas coletadas da mesma planta foram cortadas em forma de disco de tamanho uniforme. Obteve-se a massa fresca (MF) e em 40 mL de água

destilada e autoclavada os discos foliares foram adicionados aos recipientes de vidro (50 mL de capacidade) que foram fechados e incubados em sala de cultura de crescimento vegetal com temperatura de 25°C por 24 h. Após esse período os discos foliares foram dispostos em papel toalha para retirada do excesso de água, obteve-se a massa túrgida (MT), em seguida os discos foram dispostos em envelopes de papel alumínio previamente fechados e levados a estufa à 72°C por 24 h, para obtenção da massa seca (MS). O teor relativo de água foi calculado pela fórmula:

Teor Relativo de Água:

$$TRA \% = \left(\frac{MF - MS}{MT - MS} \right) \times 100$$

O índice de estabilidade de membrana celular foi determinado indiretamente pela medida da condutividade elétrica, seguindo o protocolo de CHANDRA BABU et al., (2004). Três amostras de folhas coletadas da mesma planta foram cortadas em forma de disco de tamanho uniforme e foram lavadas 3 vezes com água Milli-Q para remover eletrólitos aderidos à superfície. Em um recipiente (50 mL de capacidade) foram adicionadas 40 mL de água Milli-Q e os discos foliares foram imersos. Os frascos foram fechados e incubados no escuro por 24 h em sala de cultura de crescimento vegetal à 25°C. A condutividade foi medida usando o condutivímetro (modelo Micronal B331). Após a medição inicial (C_1), os tubos foram autoclavados por 20 min sob pressão de 120 psi. Os valores finais (C_2) da condutividade elétrica foram então obtidos após esfriamento dos recipientes de vidro. O índice de estabilidade de membrana foi calculado usando a seguinte fórmula:

Índice de Estabilidade de Membrana:

$$IEM \% = 1 - \left(\frac{C_1 \times 100}{C_2} \right)$$

Neste período de restrição hídrica foram realizadas também medições em folhas-bandeira completamente expandidas obtendo-se a taxa de assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (gs), taxa de transpiração (E) e concentração interna de CO₂ (Ci) utilizando sistema fotossintético portátil (modelo LI-6400 xt, LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre 8 h e 12 h no 6º dia de déficit hídrico.

3.1.3 Determinação da Massa Fresca e Seca

No final do ciclo foi obtido a massa fresca. Após a obtenção da massa fresca, as mesmas foram identificadas e acondicionadas em envelopes de papel e posteriormente colocadas em estufa de secagem com circulação forçada de ar a 72°C por 72 h para determinação da massa seca. Este ensaio foi realizado com 10 repetições para cada tratamento.

3.1.4 Produção por Planta

Foi obtido no final do ciclo para avaliação da produtividade massa de sementes por planta (g), número de perfilhos, número de espigas e massa de 1000 grãos (g).

3.1.5 Determinação do Teor de nitrogênio Total (NT)

As amostras da parte aérea seca foram destinadas a análise do teor de NT (Kjeldahl) de acordo com o método descrito por Bremner e Mulvaney, (1982) realizado com 5 repetições por tratamento.

3.1.6 Análise da Anatomia das Raízes

Os estudos anatômicos foram realizados em três plântulas escolhidas aleatoriamente de cada tratamento inclusive plantas testemunha. Para estes estudos, foram coletadas amostras de raízes no final do ciclo as quais foram fixadas em FAA 50 (álcool 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%), transferidas para álcool 100% e xilol na proporção volumétrica de 3:1, 1:1, 1:3 e xilol puro, em seguida mantidas em xilol e parafina 3:1, 1:1, 1:3 e parafina pura (v/v). Posteriormente, as amostras foram incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo de deslize Leitz (modelo 2108). Em seguida, os cortes (0,5µm) foram corados com azul de metileno por 5 min, seguindo protocolo de Johansen (1940). Para a documentação dos resultados, foram obtidas fotomicrografias em fotomicroscópio (Olympus modelo Bx50).

3.2 Análise Molecular

3.2.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para confirmar a presença de *H. seropedicae* e *A. brasilense* epifítica e endofiticamente, foi realizada a reação em cadeia de polimerase (PCR) para detectar a presença dos genes 16 S rRNA e nif *H*. O DNA genômico bacteriano foi extraído, seguindo

protocolo proposto por Cheng e Jiang, (2006). Para a reação de PCR, os oligonucleotídeos 16 SrRNA 1 e 2 (DG74 5' – AGG AGG TGA TCC AAC CGC A – 3' E RW1 5' – AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT – 3') e *nif H* 1 e 2 (senso 5' – ACC CGC CTG ATC CTG CAC GCC AAG G – 3' e antisenso 5' – ACG ATG TAG ATT TCC TGG GCC TTG TT – 3') foram utilizados para a amplificação de fragmentos internos dos genes (310 e 317 pb, respectivamente). Para cada reação (20 µL) continha 7 µL Tampão 5X Go Taq Flexi DNA polimerase (PROMEGA); 3 µL MgCl₂ (25 mM INVITROGEN); 4 µL de dNTP mix (2,5 mM – FERMENTAS); 1 µL de Taq polimerase 5U (INVITROGEN); 1 µL de DNA e 1 µL dos oligonucleotídeos específicos para os genes 16 *S* (100 mM) e *nif H* (100 mM). As reações foram submetidas aos seguintes programas: 16 *S* – 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (30s a 94°C; 30s a 54°C; 1 min a 72°C) e extensão final de 5 min a 72°C; *nif H* – 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação seguido de 35 ciclos de (45s a 94°C; 45s a 54°C; 45s a 72°C) e extensão final de 1 min a 72°C, em termociclador Biocycler modelo MJ96+. Os produtos das reações de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em tampão TBE 1X e agarose 1,5% (p/v) e utilizando marcador de 100 pb, visualizando após coloração em brometo de etídeo (0,5 µg/mL) em fotodocumentador Loccus Biotecnologia L.PIX.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do estresse e interação planta bactéria

O TRA na cv CD 120 na condição irrigada foi de 78,2% em média ao 0 dias após o início do déficit e 83,0% aos 8 dias. Para a cv Frontana foi de 83,0% ao 0 dias e 79,4% aos 8 dias, e não apresentaram diferenças entre as 8 condições nos dois períodos avaliados 0 e 8 dias para estas cultivares avaliadas (Figura 1A).

Na condição de déficit parcial, no tempo 0, para cv CD 120, todas as condições apresentaram TRA de 90%, similares ao controle. Os resultados obtidos após 16 dias da aplicação da restrição hídrica demonstram que o controle (C1) foi a que apresentou menores valores de TRA (65,5%), demonstrando maior percepção da falta de água em relação as demais condições de inoculação e/ou fertilização (Figura 1B). Na cv CD 120, a condição referente a associação de *H. seropedicae* com Nitrogênio (C6) foi o que apresentou maior tolerância ao estresse, diferindo do controle (C1) e das condições somente de inoculação com *H. seropedicae* (C2) e *A. brasilense* (C3), mas não tendo diferenças significantes em relação as demais condições (Figura 1B). Nesta condição, a presença da bactéria foi negativa e a presença do nitrogênio na forma de fertilizante mostrou-se positiva para a manutenção do turgor celular. Para a cv Frontana, a restrição hídrica parcial não trouxe diferenças significativas no TRA das células vegetais no tempo 0 e nem aos 16 dias após aplicação da restrição hídrica, o que demonstra que a capacidade de manutenção de turgor em condições de estresse abiótico é genótipo dependente (Figura 1B).

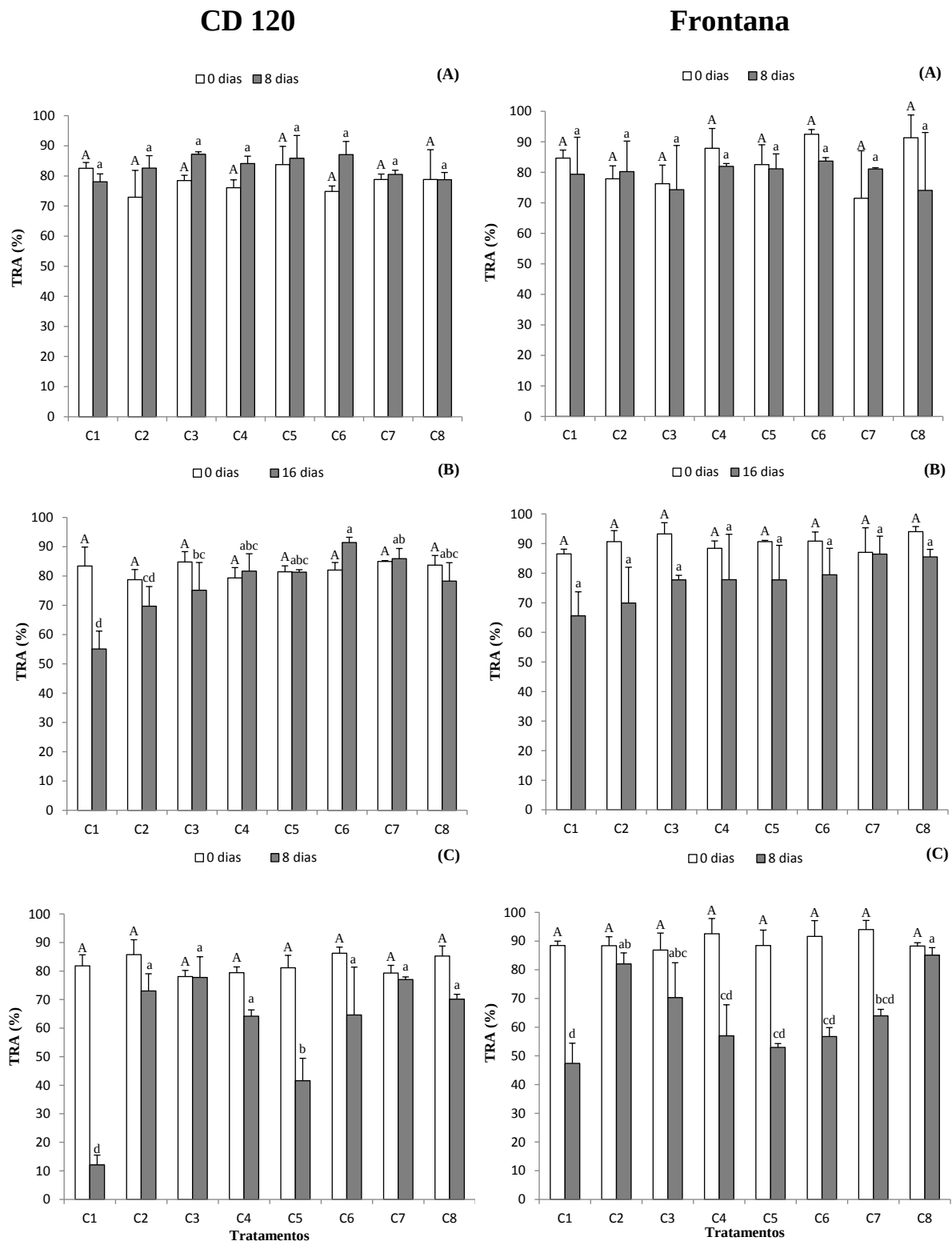


Figura 1: Teor Relativo de Água nas folhas das duas cultivares de trigo em três condições hídricas. (A) Irrigado; (B) Déficit Parcial e (C) Déficit Severo, em função das 8 diferentes condições de inoculação e/ou fertilização: C1 – Controle; C2 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C3 – Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C4 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5; C5 – Nitrogênio; C6 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C7 – Nitrogênio e Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C8 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5. Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente na avaliação do tempo 0 dias e letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente aos 8 e 16 dias pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

As maiores diferenças entre as condições e cultivares foram observadas na terceira condição hídrica avaliada, déficit severo. As cv CD 120 e cv Frontana não apresentaram diferenças significativas entre condições e/ou fertilização no tempo 0 de aplicação do déficit, mostrando uma mesma condição hídrica. No entanto, aos 8 dias após aplicação do déficit (Figura 1C), foram observadas respostas distintas entre as condições e cultivares avaliadas sob déficit hídrico severo. Visualmente, puderam-se observar diferenças entre as condições em relação ao controle que neste período apresentou-se praticamente senescente/seca com TRA de 12% para a cv CD 120 (Figura 2).

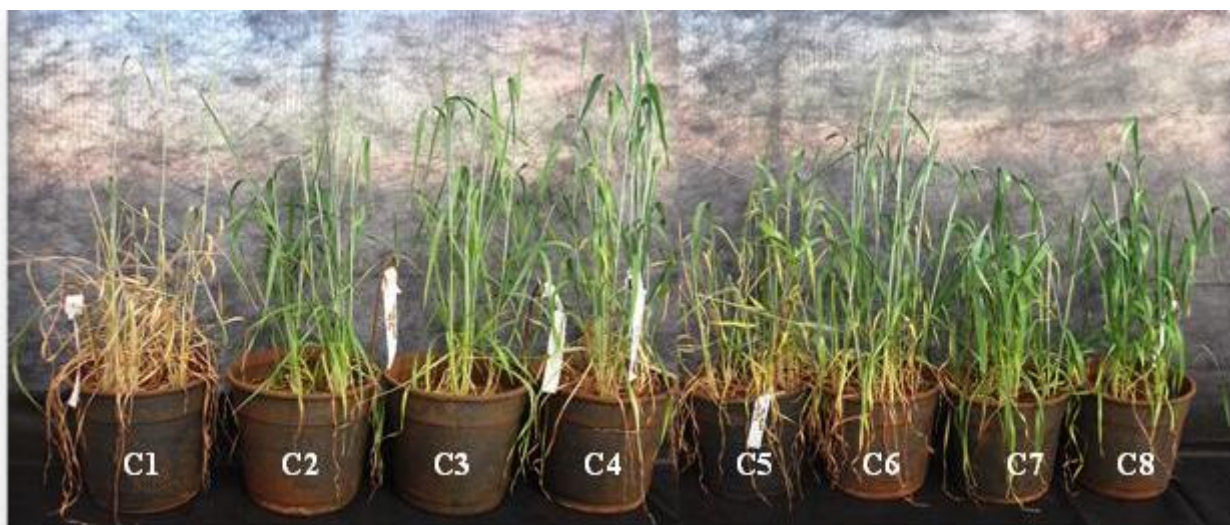


Figura 2: Plantas de trigo CD 120 aos 78 dias de cultivo e 8 dias após a indução do estresse hídrico severo cultivadas em vasos com capacidade para 5 L dispostos em casa de vegetação, em função da ausência, presença ou combinação entre *H. seropedicae*, *A. brasilense* e Nitrogênio. Agosto de 2012.

Nesta cultivar, todas as condições em que a bactéria esteve presente foram similares ao controle quando irrigado (TRA médio de 71,1%), demonstrando grande contribuição para a manutenção do turgor. Por outro lado, o fertilizante nitrogenado (C5) diferiu-se do controle e das demais condições de inoculação e/ou fertilização, apresentando um TRA de 41,5% (Figura 1C).

A cv Frontana apresentou resultados distintos entre as condições e/ou fertilização e dos obtidos para a cultivar anterior. Em todas as condições aplicadas, as plantas obtiveram TRA inferiores aos obtidos para o tempo 0 e para controle. Exceção foram as condições de inoculação somente com *H. seropedicae* (C2), inoculação com *A. brasilense* (C3) e a inoculação/fertilização de *H. seropedicae*, *A. brasilense* e N (C8), que apresentaram TRA similares ao tempo 0 e ao controle (TRA 88,3%, 70,4% e 85,1% respectivamente) (Figura 1C). Estes resultados concordam com os obtidos para a cv CD 120, onde a presença das bactérias foi positiva para a manutenção do turgor osmótico celular, possibilitando uma maior capacidade de recuperação às plantas após o déficit hídrico haver terminado (Figura 2).

O parâmetro de estabilidade de membrana é amplamente utilizado como indicador de danos à membrana, resultantes do déficit aplicado em todas as estruturas celulares.

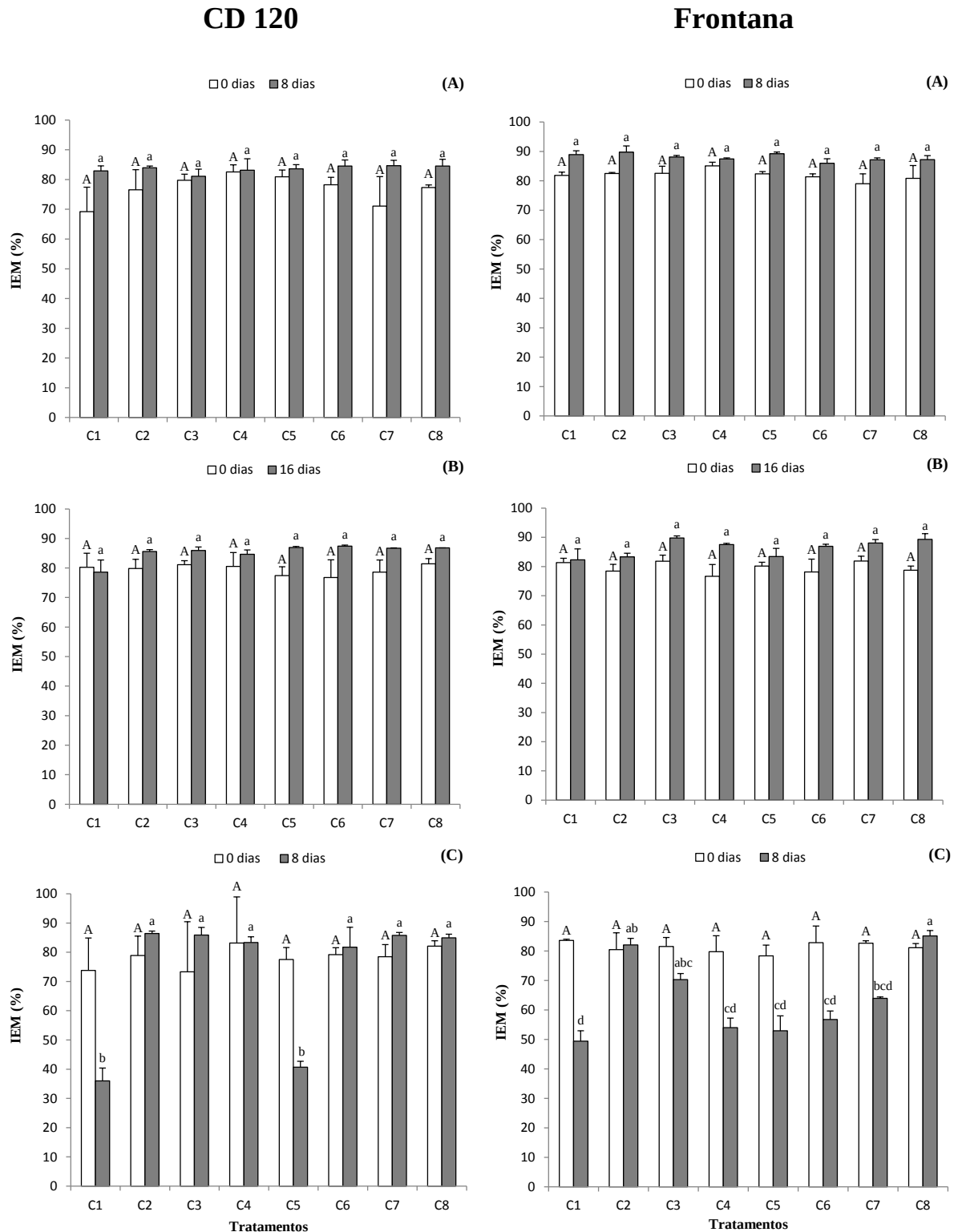


Figura 3: Índice de Estabilidade de Membrana nas folhas das duas cultivares de trigo em três condições hídricas. (A) Irrigado; (B) Déficit Parcial e (C) Déficit Severo, em função das 8 diferentes condições de inoculação e/ou fertilização: C1 – Controle; C2 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C3 – Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C4 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5; C5 – Nitrogênio; C6 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C7 – Nitrogênio e Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C8 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5. Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente na avaliação do tempo 0 dias e letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente aos 8 e 16 dias pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

Os resultados obtidos demonstram a relação do déficit hídrico com a diminuição da estabilidade de membranas. A cv CD120 apresentou IEM médio de 76,9% na condição irrigada e não houve variações significativas nestes índices entre o tempo 0 e 8 dias após a instalação do déficit hídrico nas plantas, demonstrando como esperado, que as plantas não estavam em condição de restrição hídrica (Figura 3A), ocorrendo o mesmo com a cv Frontana.

Os mesmos resultados foram observados no déficit parcial, demonstrando que as plantas embora com TRA menores, não sofreram injúrias em suas membranas citoplasmáticas (Figura 3B). Com estes resultados podemos observar que estes genótipos não perceberam o déficit hídrico parcial.

Porém, para a condição severa de restrição hídrica, na cv CD120, as condições de inoculação e/ou fertilização aos 8 dias tiveram comportamentos distintos gerando valores para o IEM bastante contrastantes. As condições com a presença de bactérias e/ou nitrogênio responderam de forma positiva e enfática elevando os índices de IEM a similaridade com o tempo 0, isto é, a planta parece não ter percebido o déficit, apresentando suas células com membranas citoplasmáticas intactas, embora apresentando TRA menores que o controle. Somente o controle e a condição de fertilização com N (C5) foram distintos significativamente com IEM inferiores ao controle 35,9% e 40,6% respectivamente (Figura 3C).

Resultados similares foram observados na cv Frontana. O controle (C1) com IEM de 49,4%, foi inferior ao controle do tempo 0. A condição de inoculação somente com *H. seropedicae* (C2), *A. brasilense* (C3) e inoculação com *H. seropedicae* e *A. brasilense* e N (C8) foram mais responsivos para a manutenção do turgor celular. Em ambas as cultivares, a utilização somente de N não foi suficiente para evitar os danos causados pela restrição hídrica e somente à presença da(s) bactéria(s) conseguiu diminuir os danos causados pela peroxidação de lipídios nas membranas celulares (Figura 3C).

As bactérias isoladas das raízes de trigo aos 30 dias após a germinação foram comprovadas quanto a sua origem pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). O DNA genômico das colônias crescidas em meio NFb – Malato e NFb – L foram analisadas para a presença do 16S rRNA e *Nif H*. Foram selecionadas colônias aleatoriamente das 8 condições (inoculação e/ou fertilização) e das 2 cultivares avaliadas, e através da PCR foram mostrados 2 fragmentos de 310 pb para o gene 16S rRNA e 317 pb para o gene *Nif H*, respectivamente (Figura 4). Como esperado, as bactérias presentes no inóculo apresentaram o mesmo padrão de bandas de *H. seropedicae* e *A. brasilense*.

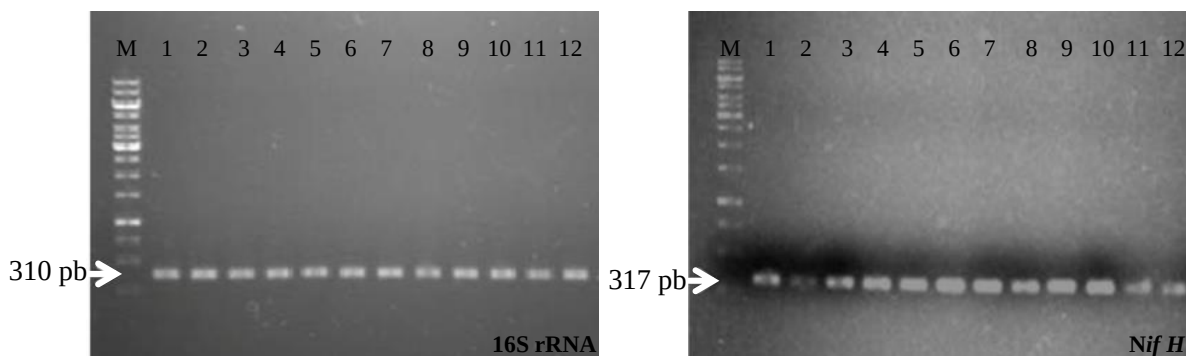


Figura 4: Análises de PCR das bactérias *H. seropedicae* e *A. brasilense* isoladas nas raízes de trigo aos 30 dias após a germinação. Linha M – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb). Linhas 1 a 6 bactérias isoladas provenientes da cv CD 120. Linhas 7 a 12 bactérias isoladas provenientes da cv Frontana.

4.1.1 Respostas da Taxa de Fotossíntese Líquida, Condutância Estomática, Transpiração e Concentração Interna de CO₂

Primeiramente, sabe-se que a queda nas taxas de condutância estomática afetam diretamente as taxas líquidas de fotossíntese e transpiração, pois o fechamento estomático é um dos fatores afetados em curto prazo pelo estresse hídrico (TAIZ e ZEIGER, 2010). Neste sentido, todas as medidas de trocas gasosas foram efetuadas em dia totalmente ensolarado, sem a presença de nuvens e com irradiância variando externamente na planta entre 150 à 1800 J mol m² s⁻¹, sendo fornecido artificialmente para a folha bandeira de trigo 1500 J mol m² s⁻¹, por meio do IRGA Licor LIX 6400 (Infra Red Gas Analyser).

Como previsto, a restrição hídrica proporcionou rápido fechamento estomático, sendo que em condições normais de suprimento de água, foram verificados diferentes comportamentos para taxa de fotossíntese líquida *A* nas duas cultivares estudadas com destaque para a fertilização com N (C5), independentemente da cultivar. Pois, a C5 apresentou maior *A* superando as condições de inoculação com *A. brasilense* associada com N (C7), e inoculada com *H. seropedicae* e *A. brasilense* e N (C8) para a cv CD 120 (Figura 5A), e o controle (C1), inoculação com *H. seropedicae* e N (C6) e inoculação com *A. brasilense* e N (C7) para a cv Frontana (Figura 6A). Em condições de déficit hídrico parcial e severo, nota-se uma redução na assimilação líquida de CO₂ nos tratamentos devido a restrição hídrica, porém nenhuma das condições aplicadas não prejudicaram a fotossíntese em relação ao controle (Figura 5A). Nestas mesmas condições, observou-se que a condição de inoculação com *H. seropedicae* (C2) para a cv Frontana, novamente superou as condições C1, C7 e C8 (Figura 6A).

Em relação à taxa de transpiração E da cv CD 120, nota-se que a saída de água pelos estômatos foi reduzida conforme a condição de restrição hídrica imposta, principalmente nas condições C2, C3, C4 e C5 (Figura 5B). No entanto, ao observar o comportamento dentro de cada restrição hídrica para esta cultivar é possível observar diferenças significativas quando as plantas estavam em condições de déficit parcial, sendo que as condições C1, C3, C4 e C5 apresentaram valores médios menores que o controle (C1) (Figura 5B). Porém a cv Frontana, mostrou-se ser influenciada ainda quando estavam em plena condição hídrica, onde a presença de N (C5) foi o que apresentou maiores valores para esta variável juntamente com as condições C3, C4, C6, C7 e C8, comparados ao C1 e C2 (Figura 6B). Por outro lado, a restrição de água tanto para déficit parcial e severo, não possibilitou diferenças entre nenhum das condições, porém, aqueles que continham bactérias e/ou nitrogênio, mostraram-se superiores ao (C1) (Figura 6B).

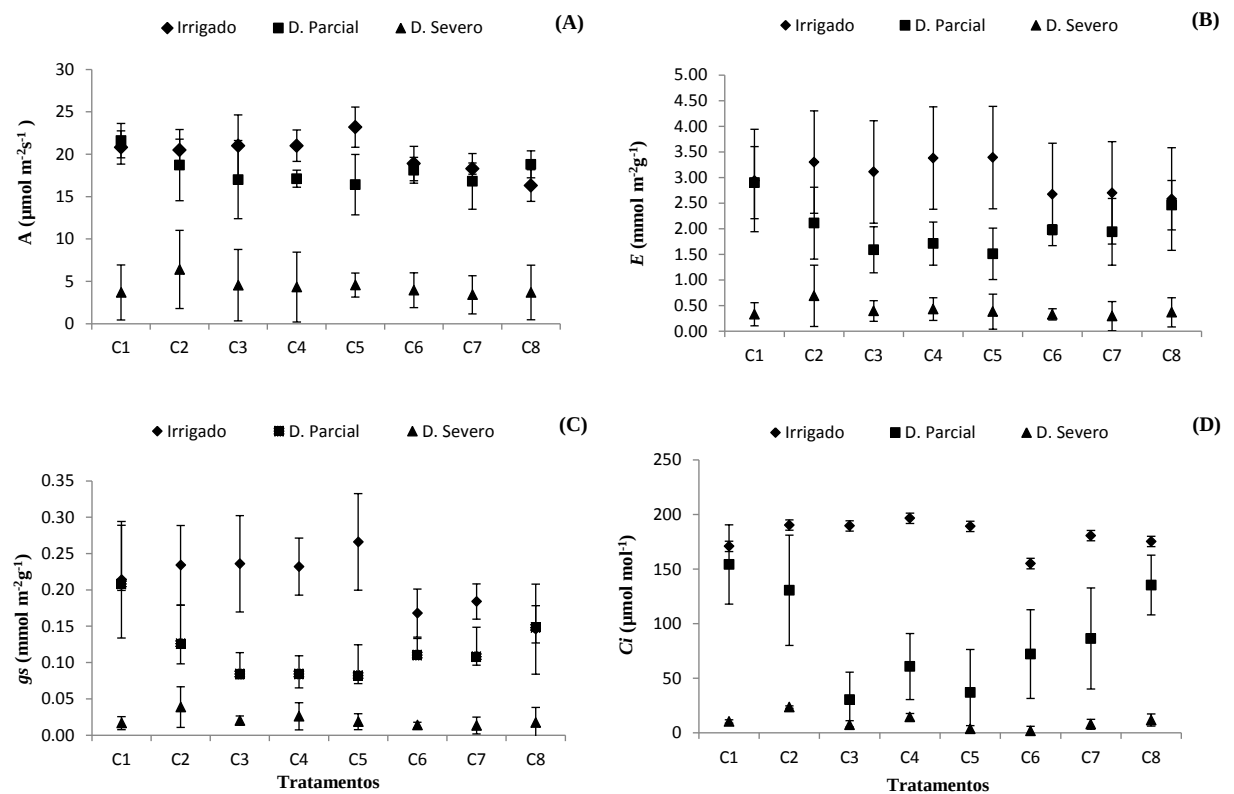


Figura 5: Parâmetros fisiológicos na cv CD 120. Taxa de fotossíntese líquida (A), Transpiração (B), Condutância Estomática (C) e Concentração interna de CO_2 na folha (D), em função das diferentes condições de inoculação e/ou fertilização. C1 – Controle; C2 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C3 – Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C4 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5; C5 – Nitrogênio; C6 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C7 – Nitrogênio e Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C8 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão (n=5).

Pôde ser observado de modo geral neste experimento que a imposição da restrição hídrica na cv CD 120, proporcionou diferenças bruscas na condutância estomática g_s das

condições diretamente relacionados com a restrição de água, exceto para o controle (C1) e a inoculação com *H. seropedicae* e *A. brasilense* e N (C8) nas condições normais de irrigação e parcialmente irrigado (Figura 5C). Para a cv Frontana este comportamento só não foi observado para a condição C5 (Figura 6C). Por outro lado, ao avaliar o comportamentos das condições de inoculação e/ou fertilização na cv CD 120 na condição irrigada, observa-se que a C5 apresenta valores médios maiores que aqueles observados pela C8 (Figura 5C). Na cv Frontana, nesta mesma condição apresentou valores médios superiores para a mesma condição em relação ao controle (C1) e demais condições de inoculação e/ou fertilização (Figura 5C). Ao impor a restrição hídrica parcial, nota-se que as condições C2, C3, C4, C5 e C6 na cv CD 120, apresentaram valores menores em relação ao controle (Figura 5C). Já, a inoculação com *H. seropedicae* (C2) na cv Frontana proporcionou os maiores valores médios da *gs* nesta condição hídrica em relação às demais condições, porém a inoculação com *H. seropedicae* associada com o N (C6) e a inoculação de *A. brasilense* associada ao N (C7) apresentaram valores menores quando comparados com o controle (C1) (Figura 6C).

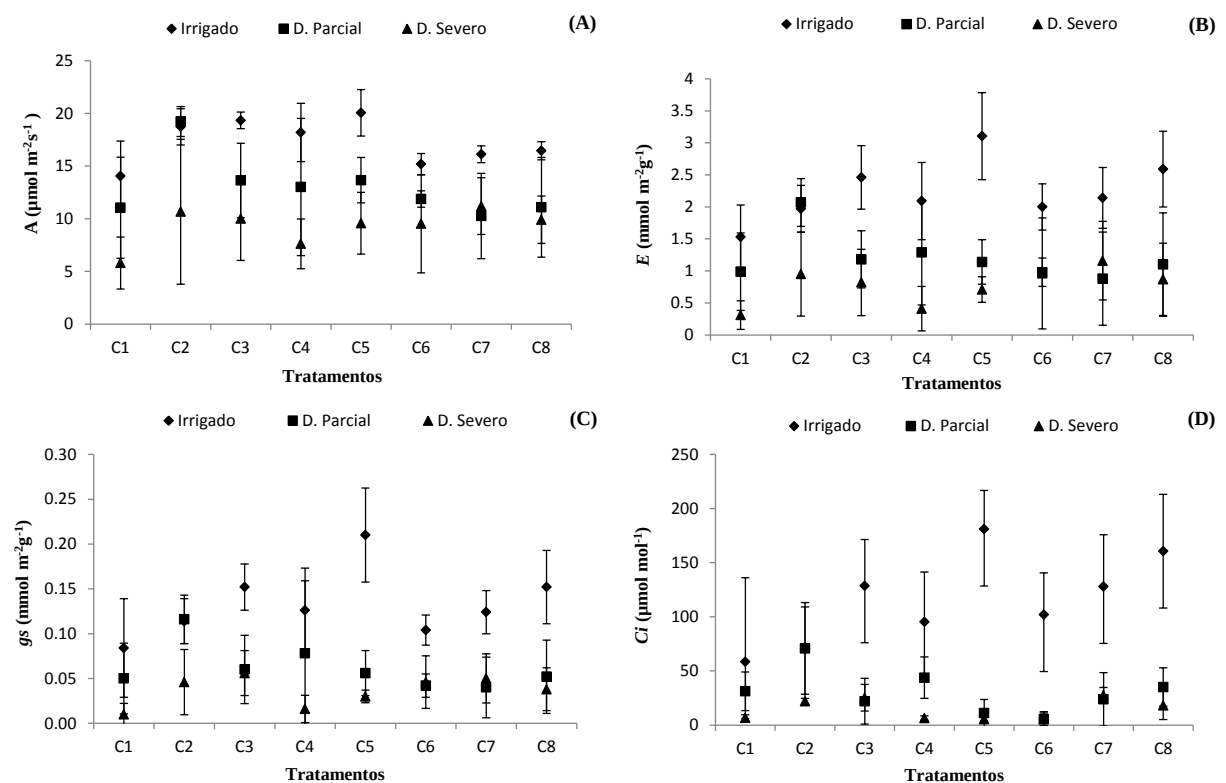


Figura 6: Parâmetros fisiológicos na cv Frontana. Taxa de fotossíntese líquida (A), Transpiração (B), Condutância Estomática (C) e Concentração interna de CO₂ na folha (D), em função das diferentes condições de inoculação e/ou fertilização. C1 – Controle; C2 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C3 – Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C4 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5; C5 – Nitrogênio; C6 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C7 – Nitrogênio e Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C8 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão (n=5).

Já em condição severas (8 dias sem reidratação), para a cv CD 120 observou-se que a presença de bactérias e/ou associada com nitrogênio mantiveram os estômatos nas mesmas condições irrigadas (Figura 5C). No entanto, a cv Frontana quando inoculada com *H. seropedicae* (C2) e *A. brasilense* (C3) mantiveram os estômatos melhores que o controle (C1) em total restrição hídrica por oito dias.

Para a concentração interna de CO₂ dentro da câmara subestomática (*C_i*) das folhas da cv CD 120, foi verificado na condição parcial de irrigação alteração nos valores de *C_i*, sendo que as condições, C3, C4, C5, C6 e C7 mantiveram-se valores médios inferiores daqueles observados pelo controle (Figura 5D).

A *C_i* nas folhas das plantas de trigo da cv Frontana quando mantidas em plena condição de irrigação apresentou diferenças significativas, onde os valores de *C_i* foram maiores na presença apenas de N (C5), juntamente com as condições C2, C3 e C8, que foram superiores ao controle (Figura 6D). Na condição de déficit parcial, a cv Frontana quando inoculada com *H. seropedicae* (C2) ou associada com *A. brasilense* e N (C8) superaram os valores observados pelo controle (C1). Já a inoculação com *H. seropedicae* e N (C6) para esta mesma variável nesta mesma condição, obteve valores de *C_i* menores que ao controle (C1) (Figura 5D). No entanto quando as plantas foram submetidas ao déficit severo, a *C_i* nas folhas das plantas de trigo foram reduzidas, sendo que somente na inoculação com *H. seropedicae* (C2), *A. brasilense* (C3), *A. brasilense* e N (C7) e quando inoculadas com *H. seropedicae* e *A. brasilense* e N (C8) apresentaram valores maiores que o controle.

4.2 Avaliação dos Parâmetros Produtivos

Os resultados referentes aos componentes da produção das cultivares de trigo, em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense* e/ou combinadas com N, são apresentadas na Tabela 3.

Na condição irrigada, a cv Frontana apresentou maior massa fresca da parte aérea comparando a cv CD 120. Neste último genótipo, a inoculação de *H. seropedicae* (C2) foi a única condição distinto estatisticamente dos demais, mostrando um possível efeito da bactéria. Para a cv Frontana, não houve diferenças significativas em nenhuma das condições aplicadas (Tabela 3).

Para a massa seca da parte aérea, a cv CD 120 apresentou valores inferiores a cv Frontana, com exceção da inoculação com *H. seropedicae* (C2), fertilização com N (C5) e

inoculação de *A. brasilense* e N (C7), demonstrando ser uma cultivar mais responsiva ao nitrogênio e à presença bacteriana.

Tabela 3: Massa Fresca da Parte Aérea (g), Massa Seca da Parte Aérea (g) e Teor de Nitrogênio Total (g.kg^{-1}) nas duas cultivares de trigo, nas diferentes condições de inoculação e/ou fertilização e aplicações do déficit hídrico.

IRRIGADO						
Condições	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana
	Massa Fresca da Parte Aérea (g)		Massa Seca da Parte Aérea (g)		Teor de Nitrogênio Total (g.kg^{-1})	
C1	10,14 Bb	22,20 Aa	7,73 Bb	15,19 Aa	1,38 Aab	1,93 Aa
C2	21,45 Aa	22,34 Aa	14,55 Aa	14,08 Aa	1,38 Bab	2,30 Aa
C3	7,70 Bb	17,60 Aa	6,33 Bb	11,92 Aa	1,86 Ba	2,36 Aa
C4	11,28 Bb	19,11 Aa	9,24 Bb	13,92 Aa	1,72 Aab	1,97 Aa
C5	7,92 Bb	13,18 Aa	6,24 Ab	8,27 Aa	1,29 Bab	2,53 Aa
C6	5,80 Bb	20,84 Aa	4,39 Bb	13,92 Aa	1,71 Bab	2,66 Aa
C7	7,25 Ab	13,07 Aa	5,66 Ab	9,45 Aa	1,53 Bab	2,75 Aa
C8	10,34 Bb	18,20 Aa	7,71 Bb	13,62 Aa	1,13 Bb	2,52 Aa
C.V (%)	36,81	38,50	35,29	27,68	22,62	17,09
DÉFICIT PARCIAL						
Condições	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana
	Massa Fresca da Parte Aérea (g)		Massa Seca da Parte Aérea (g)		Teor de Nitrogênio Total (g.kg^{-1})	
C1	6,52 Bb	12,45 Aa	5,94 Bbc	9,77 Aa	1,16 Aa	1,00 Bc
C2	9,12 Aab	13,19 Aa	6,81 Babc	11,51 Aa	1,51 Aa	1,11 Ac
C3	8,32 Bab	13,55 Aa	6,45 Babc	12,15 Aa	1,59 Ba	2,16 Aab
C4	11,18 Aa	24,44 Aa	9,62 Aa	10,19 Aa	1,62 Ba	2,20 Aab
C5	6,70 Bb	11,46 Aa	4,97 Bc	10,28 Aa	1,95 Aa	2,28 Aab
C6	10,00 Aab	12,74 Aa	7,26 Babc	11,24 Aa	1,62 Ba	2,19 Aab
C7	7,06 Aab	10,80 Aa	5,20 Bc	9,05 Aa	2,25 Aa	2,49 Aa
C8	10,22 Aab	9,87 Aa	8,50 Aab	8,42 Aa	1,20 Ba	1,93 Ab
C.V (%)	28,68	33,32	31,10	33,63	16,57	9,07
DÉFICIT SEVERO						
Condições	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana
	Massa Fresca da Parte Aérea (g)		Massa Seca da Parte Aérea (g)		Teor de Nitrogênio Total (g.kg^{-1})	
C1	5,13 Bab	11,08 Aa	4,41 Aab	6,04 Ab	1,99 Aab	1,24 Bab
C2	5,31 Bab	9,72 Aa	3,37 Bb	6,30 Aab	1,91 Aab	1,88 Aa
C3	5,71 Bab	14,21 Aa	4,39 Bab	9,80 Aab	1,78 Ab	1,57 Aab
C4	5,24 Bab	15,27 Aa	4,27 Bab	10,62 Aab	2,48 Aab	1,66 Bab
C5	4,23 Bb	11,68 Aa	3,97 Bab	7,87 Aab	2,27 Aab	2,09 Aa
C6	9,58 Aab	15,93 Aa	5,31 Bab	10,62 Aab	1,88 Ab	1,88 Aa
C7	8,75 Bab	17,66 Aa	5,13 Bab	12,49 Aa	2,39 Aab	0,65 Bb
C8	10,32 Aa	10,19 Aa	6,00 Aa	7,45 Aab	2,70 Aa	1,81 Ba
C.V (%)	49,45	41,62	33,63	41,57	18,16	32,17

C1 – Controle; C2 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C3 – Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C4 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5; C5 – Nitrogênio; C6 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C7 – Nitrogênio e Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C8 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5. Cada valor representa a média ($n=7$), seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação ao nitrogênio total (NT) da parte aérea, a cv CD 120 apesar de ter obtido uma menor massa fresca e seca, apresentou um aumento nos níveis de NT foliar. A cv

Frontana apresentou NT superior, proporcional à sua maior biomassa, característica explicada por ser um ancestral, muito difundido na década de 70 e ainda, apresentando porte maior. O NT na cv CD 120 foram similares, apresentando diferenças estatísticas entre as condições de inoculação com *A. brasilense* (C3) e inoculação e/ou fertilização com *H. seropedicae* e *A. brasilense* e N (C8) em relação aos demais (Tabela 3).

O número médio de perfilhos entre as cultivares avaliadas foi similar. A cv Frontana obteve 5,10 e o CD 120 obteve 5,19 perfilhos/planta. De modo geral, a variável número de perfilhos não apresentou diferenças entre as condições de inoculação e/ou fertilização nas cultivares, ou condições hídricas aplicadas, pelo fato de ser uma característica desenvolvida antes da aplicação do estresse, e, portanto não afetada por este. Exceção a esta afirmação são as condições de inoculação com *H. seropedicae* (C2) que promoveu o maior perfilhamento na cv CD 120 em condições irrigadas, mas este comportamento não foi repetido no déficit severo (Tabela 4). Os resultados similares obtidos em todas as condições demonstram que no experimento, as plantas usadas assemelhavam-se quanto a estrutura de perfilhos.

Foram observados 8 vasos xilemáticos em média na cv CD 120 e 12 na cv Frontana em estudos anatômicos das raízes (Figura 7).

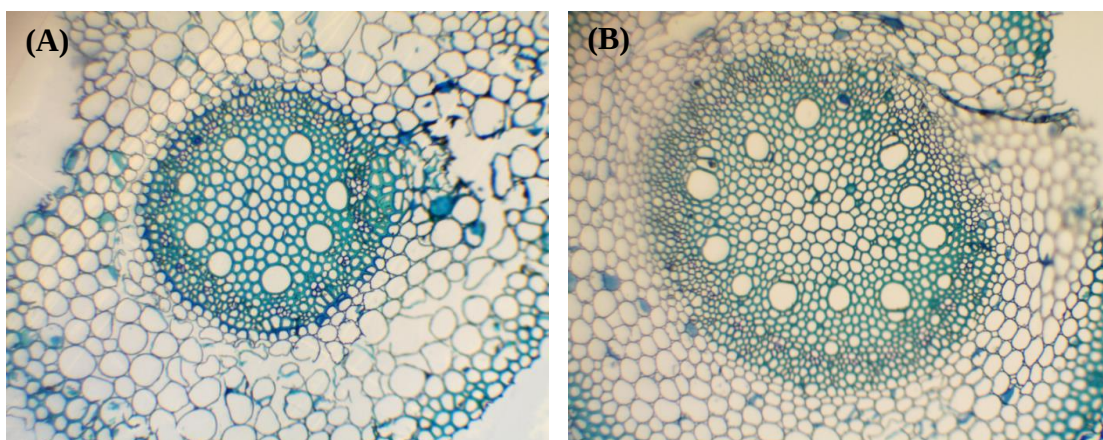


Figura 7: Estudos anatômicos realizados em raízes de trigo. (A) Controle da cv CD 120 e (B) Controle da cv Frontana. Observação 40X.

Não foram observados aumentos no número destes vasos condutores nas raízes das cultivares em nenhuma das condições aplicadas, demonstrando ser uma característica inerente a cultivar e não afetada pela presença de bactérias além de corroborar para uma maior biomassa da cv Frontana em relação à cv CD120.

A inoculação de *H. seropedicae* (C2) promoveu um aumento no número de espigas na condição irrigada para a cv CD 120, já a inoculação de *H. seropedicae* e N (C6) fez diminuir este parâmetro produtivo em relação ao controle neste mesmo regime hídrico. Na cv Frontana

não foram observadas diferenças estatísticas para esta variável ainda na condição irrigada (Tabela 4)

Ainda no regime irrigado, na cv CD 120, a inoculação com *H. seropedicae* (C2) promoveu aumento na massa de grãos, diferindo estatisticamente das demais condições, porém, na cv Frontana, a fertilização de N (C5) fez com que a massa de grãos diminuísse e a presença das bactérias resultou em massa igual ao controle (Tabela 4).

Em outra variável avaliada, massa de 1000 grãos, a cv CD 120 foi mais eficiente em utilizar o NT para transformá-lo em proteínas na forma de massa de grãos. Na cv Frontana, apenas as condições de fertilização com N (C5) e inoculação com *H. seropedicae* e N (C6) foram diferentes estatisticamente do controle (C1), porém foram iguais as condições de inoculação com *A. brasilense* e N (C7) e inoculação de *H. seropedicae* e *A. brasilense* e N (C8). Na cv CD 120 houve uma resposta distinta, onde os melhores resultados foram obtidos nas condições C2, C4, C6 e C8, onde a ação das bactérias e combinadas ao nitrogênio fez aumentar a massa de grãos em relação ao controle (C1) (Tabela 4).

Na condição de déficit parcial (Tabela 3), a massa da matéria fresca, as cv CD 120 e cv Frontana apresentaram redução da biomassa em relação controle irrigada (35,7% e 43,9%, respectivamente) indicando a percepção do déficit hídrico. Os resultados obtidos em toda as condições apresentaram uma tendência de perda de biomassa pela restrição hídrica empregada. Na cv CD 120, a matéria seca da parte aérea foi maior demonstrando respostas à presença das bactérias C4, C6 e C8, mas não à fertilização de N (C5), sendo o efeito do aumento possivelmente aplicado às bactérias. Na cv Frontana, não foram observadas diferenças significativas entre as condições avaliadas (Tabela 3).

Embora a cv CD120 tenha apresentado aumentos no NT, proporcionalmente maiores que no controle nos regimes de déficit hídrico parcial e severo, tais aumentos não redundaram em maior biomassa ou aumento na produção de sementes/planta. Porém, houve aumento na massa de 1000 grãos e o NT obtido foi possivelmente destinado a encher os grãos para garantir a perpetuação da espécie. Diferenças significativas entre as condições aplicadas não foram observadas na cv CD 120 em relação ao NT. Entre cultivares, o teor de NT foi distinto entre os controles, sendo que a cv CD 120 apresentou maiores teores que a cv Frontana. Este resultado evidencia uma percepção do déficit hídrico maior na cv Frontana, porém, na condição (C3) e (C4) ou ainda, (C6) e (C8), os teores de NT foram superiores quando comparadas às obtidas para a cv CD 120, evidenciando o efeito positivo bacteriano sobre esta variável (Tabela 3).

Tabela 4: Parâmetros produtivos avaliados. Número de perfilhos/planta, número de espigas/planta, massa grãos/planta (g) e massa de 1000 grãos (g) nas duas cultivar de trigo, nas diferentes condições de inoculação e/ou fertilização e aplicações do déficit hídrico.

IRRIGADO								
Condições	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana
	Número		Número		Massa		Massa de	
	Perfilhos/planta		Espigas/planta		Grãos/planta (g)		1000 grãos (g)	
C1	5,85 Ab	5,71 Aa	5,00 Abc	7,71 Aa	2,77 Abc	2,43 Aab	3,36 Ad	3,10 Ba
C2	10,28 Aa	4,85 Ba	9,42 Aa	4,71 Ba	6,87 Aa	3,11 Ba	3,79 Aabc	3,06 Ba
C3	4,00 Ab	5,00 Aa	3,57 Abc	4,14 Aa	2,77 Abc	2,35 Aab	3,57 Abcd	3,04 Ba
C4	5,85 Ab	6,28 Aa	5,21 Ab	4,85 Aa	3,71 Ab	2,40 Aab	4,01 Aa	2,78 Bab
C5	3,85 Ab	3,85 Aa	3,57 Abc	3,71 Aa	1,74 Ac	0,61 Ac	3,52 Acd	2,53 Bb
C6	2,85 Ab	4,75 Aa	2,57 Bb	4,42 Aa	2,58 Abc	2,47 Aab	3,93 Aab	2,54 Bb
C7	3,85 Ab	4,57 Aa	3,57 Abc	3,42 Aa	2,01 Ac	1,72 Abc	3,50 Acd	2,64 Bab
C8	5,00 Ab	5,85 Aa	4,85 Abc	5,71 Aa	2,97 Abc	2,01 Bab	3,68 Aabc	2,67 Bab
C.V (%)	36,18	33,02	32,97	38,91	27,70	37,08	6,56	6,85
DÉFICIT PARCIAL								
Tratamento	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana
	Número		Número		Massa		Massa de	
	Perfilhos/planta		Espigas/planta		Grãos/planta (g)		1000 grãos (g)	
C1	5,14 Aa	4,28 Aa	3,00 Aab	3,42 Aa	0,99 Bc	1,92 Aab	3,47 Bd	4,36 Aa
C2	5,85 Aa	4,28 Aa	4,42 Aab	4,00 Aa	2,20 Abc	2,21 Aa	3,89 Abc	3,79 Aab
C3	6,28 Aa	5,00 Aa	2,57 Bab	4,28 Aa	1,69 Ac	1,51 Aabc	3,75 Ac	2,72 Bc
C4	6,14 Aa	4,57 Aa	4,71 Aa	3,28 Aa	3,62 Aa	1,08 Bbc	4,13 Aab	3,14 Bbc
C5	4,71 Aa	4,42 Aa	2,42 Bb	4,28 Aa	1,29 Ac	0,77 Bc	3,92 Abc	2,53 Bc
C6	6,71 Aa	5,00 Aa	4,00 Aab	3,71 Aa	1,70 Ac	1,25 Aabc	4,13 Aab	3,11 Bbc
C7	4,28 Aa	4,28 Aa	3,28 Aab	3,14 Aa	1,69 Ac	1,81 Aab	3,94 Abc	3,00 Bc
C8	5,00 Aa	3,42 Aa	4,71 Aa	3,14 Aa	3,26 Aab	1,38 Babc	4,26 Aa	2,85 Bc
C.V (%)	34,33	35,76	36,62	38,45	38,64	38,62	5,45	6,23
DÉFICIT SEVERO								
Tratamento	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana	CD 120	Frontana
	Número		Número		Massa		Massa de	
	Perfilhos/planta		Espigas/planta		Grãos/planta (g)		1000 grãos (g)	
C1	5,57 Aa	4,00 Aab	1,28 Ac	2,00 Ab	0,18 Ab	0,19 Ad	2,87 Ad	3,10 Aab
C2	4,42 Aa	2,28 Bb	2,14 Aabc	1,85 Ab	0,59 Bb	1,51 Aab	3,34 Aabc	3,50 Aa
C3	4,42 Aa	5,42 Aa	2,28 Babc	4,28 Aa	0,85 Aab	1,49 Aab	3,11 Acd	3,27 Aab
C4	4,71 Aa	4,57 Aab	1,57 Bbc	3,57 Aab	0,27 Bb	1,54 Aab	3,26 Ac	2,79 Bbcd
C5	4,42 Aa	5,57 Aa	1,71 Abc	2,28 Aab	0,43 Ab	0,39 Acd	3,19 Acd	2,68 Bbcd
C6	5,42 Aa	4,42 Aab	3,14 Aabc	3,28 Aab	1,57 Aa	1,08 Abc	3,68 Aab	2,49 Bcd
C7	7,00 Aa	4,00 Bab	3,42 Aab	3,71 Aab	0,71 Bb	1,94 Aa	3,70 Aa	2,94 Babc
C8	8,57 Aa	3,71 Aab	4,00 Aa	2,42 Bab	0,73 Ab	0,24 Bcd	3,29 Abc	2,24 Bd
C.V (%)	55,90	42,50	50,55	44,29	32,56	25,65	4,68	5,36

C1 – Controle; C2 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C3 – Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C4 – Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5; C5 – Nitrogênio; C6 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1; C7 – Nitrogênio e Inoculação com *A. brasilense* Ab-V5; C8 – Nitrogênio e Inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Ab-V5. Cada valor representa a média (n=7), seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para o número de perfilhos, em condições de déficit parcial, não houve diferenças entre as condições de inoculação e/ou fertilização para as duas cultivares. Em relação ao número de espigas também não foram observadas diferenças significativas entre as condições, apenas uma redução de 40% nas plantas controle da cv Frontana e 55,6% na cv CD 120 em relação ao controle irrigado. Na cv CD 120, a inoculação com *H. seropedicae* e *A. brasilense* (C4) e inoculação com *H. seropedicae* e *A. brasilense* e N (C8) apresentaram médias maiores nas condições somente de N (C5) (Tabela 4). Estes resultados poderiam ser explicados pelo

solo apresentar alto teor de matéria orgânica (46,1 g.dm³) e o N, para a planta representar um excesso, apresentando diminuição das variáveis de produção.

A massa de grãos/planta foi afetada pela restrição hídrica parcial e, as condições de inoculação com *H. seropedicae* e *A. brasilense* (C4) e inoculação com *H. seropedicae* e *A. brasilense* e N (C8) apresentaram aumentos na massa de grãos/planta. Na cv CD 120, a redução na massa de grãos do controle foi de 64,3%, na cv Frontana a redução foi de 20,9%. Na cv Frontana, a inoculação de *H. seropedicae* (C2) promoveu um aumento na massa de grãos e esta foi distinta da fertilização com N (C5), demonstrando o efeito de *H. seropedicae* (Tabela 4).

Para a variável massa de 1000 grãos, na cultivar Frontana, as condições de inoculação com *A. brasilense* (C3), fertilização com N (C5) e inoculação com *H. seropedicae* e *A. brasilense* e N (C8) apresentaram redução da massa de 1000 grãos, com exceção a condição de inoculação com *H. seropedicae* (C2) que foi similar ao controle (C1) (Tabela 4). Para a cv CD 120, a presença das bactérias e nitrogênio (C8) foi a melhor condição, porém com resultados similares as condições (C4) e (C6), mas ainda assim superiores ao controle. As condições C2, C3, C4 e C6 foram distintos estatisticamente do controle, o que comprova que em condições de déficit hídrico parcial, a presença das bactérias por si só foi suficiente para prevenir os efeitos danosos da seca na produção de trigo nesta cultivar (Tabela 4).

Ao compararmos as cultivares, a cv CD 120 obteve em termos da massa de 1000 grãos, maior massa quando comparada com a cv Frontana, com exceção do controle. Tais resultados demonstram que esta cultivar seja mais responsiva à presença de nitrogênio (C5 e C8).

Para o déficit hídrico severo, houve uma redução de 50% na biomassa em ambas cultivares em relação aos controles irrigado, respectivamente. Entre as duas cultivares, a cv CD 120 em presença de N (C5) obteve numericamente menor massa fresca e na inoculação com *H. seropedicae* e *A. brasilense* e N (C8) apresentou a maior massa entre condições (Tabela 3). A cv Frontana continuou apresentando as maiores biomassas em todas as condições em relação a outra cultivar e, apenas na condição C6 e C8 esta variável foi similar entre as cultivares avaliadas.

Em relação à massa seca, a cv Frontana apresentou as maiores biomassas em relação a cv CD 120 e comparada ao controle, as condições em presença das bactérias e nitrogênio (C2, C3, C4, C6, C7 e C8) foram superiores. Porém, não houve diferenças na maioria das condições, sendo considerados como distintos apenas as condições C7 em relação ao controle

(C1). Na cv CD 120, a melhor condição foi a C8 e a de menor média C2. As demais condições foram estatisticamente similares (Tabela 3).

Para os teores de NT na cv CD 120, a interação entre *H. seropedicae*, *A. brasilense* e N (C8) proporcionaram os maiores valores e distintos das condições C3 e C6. As “flutuações” obtidas para o desempenho das condições na mesma cultivar nas diferentes restrições hídricas aplicadas, possivelmente podem ser explicadas pelas diferenças entre plantas quanto ao tamanho, posição desta no vaso, vigor de semente, partes integrantes do erro experimental. Na cv Frontana, os maiores teores foram encontrados nas condições de inoculação com *H. seropedicae* (C2), somente a presença de N (C5), inoculação com *H. seropedicae* e N (C6) e inoculação com *H. seropedicae* e *A. brasilense* e N (C8), demonstrando que para este parâmetro somente a aplicação de *H. seropedicae* equivaleria à aplicação de nitrogênio, promovendo baixos custos para o triticultor (Tabela 3). Entre cultivar, a cv CD 120 apresentou-se superior ao Frontana nas diferentes condições de inoculação e/ou fertilização, inclusive no controle, demonstrando que em condições de déficit hídrico, que esta cultivar converte uma maior proporção de nitrogênio em biomassa.

O número de perfilhos avaliados nesta condição hídrica foi afetado, na cv CD 120 a condição de inoculação com ambas bactérias e N (C8) foi o que melhor respondeu, obtendo em média 8,57 perfilhos/planta, porém estatisticamente igual as demais condições. Na cv Frontana, as diferenças entre as condições de inoculação e/ou fertilização não foram significativas, sendo que a presença apenas de N (C5) e a presença apenas de *A. brasilense* (C3) numericamente superiores as demais condições de inoculação e/ou fertilização (Tabela 4).

A característica número de espigas/planta foi altamente afetada por esta condição de severidade na restrição hídrica, e as diferenças entre as condições foi evidente. Na cv CD 120 a presença da(s) bactéria(s) (C2 e C3); *H. seropedicae* e nitrogênio (C6); *A. brasilense* e nitrogênio (C7) e *H. seropedicae* e *A. brasilense* e nitrogênio (C8) promoveram um aumento no número de espigas/planta. No Frontana, os melhores resultados foram obtidos na presença de *A. brasilense* (C3) quando comparado ao controle. Entre cultivares, a cv Frontana apresentou maior número de espigas/planta, condição associada a próprio cultivar por apresentar um maior porte e biomassa (Tabela 4).

A massa de grãos/planta também foi reduzida, na cv CD 120, a condição de inoculação com *H. seropedicae* e N (C6) foi a que apresentou em média 1,57g por planta, porém estatisticamente similar a C3. Na cv Frontana, as condições C1, C5 e C8 foram os que apresentaram menor massa de grãos/planta. A maior média para esta variável, nesta cultivar,

foi observada nas condições, C2, C3, C4 e C7 indicando que a presença da(s) bactéria(s) pode ter influenciado positivamente na massa de grãos (Tabela 4).

A resposta para a massa de 1000 grãos apresentou a mesma tendência dos resultados obtidos no déficit parcial, porém, com maiores reduções nesta variável em todas as condições e nas duas cultivares estudadas (Tabela 4). A cv CD 120 apresentou maiores valores quando comparadas a cv Frontana, exceção as condições C1, C2 e C3, porém, na cv CD 120 a presença de nitrogênio e das bactérias (C6 e C7) e somente *H. seropedicae* (C2) geraram as melhores massas de 1000 grãos. Na cv Frontana, a presença de *H. seropedicae* (C2) e de *A. brasilense* (C3) conseguiram manter a massa de grãos similar ao controle e a presença do nitrogênio (C5, C6, C7 e C8) e a presença de ambas as bactérias (C8) reduziu a massa de grãos, demonstrando que em condições de baixa umidade no solo, alta concentração de matéria orgânica (M.O 46,1 g.dcm³) e conseqüentemente alta concentração de nitrogênio, se torna prejudicial.

5 DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros da Percepção do Estresse e Interação Planta Bactéria

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir diferenças entre as condições aplicadas, cultivares e condições hídricas avaliadas. As flutuações nos TRA em plantas sob condições irrigadas podem ser explicadas por fatores fisiológicos inerentes às próprias plantas tais como: vigor da semente, posicionamento da planta no vaso, diferenças na irradiação solar, fatores que compõem o erro experimental.

Os dados obtidos para os parâmetros fisiológicos como (taxa fotossintética, transpiração, condutância estomática e concentração interna de CO₂) e o estado de água nas plantas (TRA) não foram concordantes entre si. Isto pode ser explicado pela metodologia de obtenção destes parâmetros. Os parâmetros fisiológicos foram medidos no 6º dia após o início do estresse. As avaliações foram únicas e apresentaram grande variação, não sendo suficientes para a real avaliação do estado funcional das células vegetais. Porém, foram capazes de caracterizar as diferentes condições de déficit impostas às plantas e condições de inoculação e/ou fertilização. Nas Figuras 1, 2 e 3 fica evidente que a restrição hídrica total por 8 dias promoveu uma condição aguda de falta de hidratação nas plantas, apresentando em ambas as cultivares valores e índices baixos e próximos a zero.

A condição de restrição hídrica parcial não proporcionou diferenças entre parâmetros usados para quantificar os parâmetros fisiológicos como a taxa fotossintética, transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO₂ e TRA. A reposição de 50% da umidade perdida pelas plantas não foi percebida nas diferentes condições de inoculação e/ou fertilização, demonstrando que estas cultivares são parcialmente adaptados a uma restrição hídrica progressiva. Deste modo, os dados obtidos foram similares aos da condição irrigada. Apenas o déficit severo foi percebido, gerando diferenças contrastantes em relação à condição irrigada nas diferentes condições e cultivares.

Índices de TRA (avaliados ao 0 e 8 dias de imposição do déficit permitiram observar diferenças entre as condições de inoculação e/ou fertilização nas diferentes condições hídricas impostas, sendo uma ferramenta útil para a certificação da condição de restrição hídrica.

Os valores obtidos para o TRA permitem concluir que a presença das bactérias (*H. seropedicae* e *A. brasilense*) foi determinante para a manutenção da condição de água principalmente no estado mais severo da restrição hídrica. Para a cv CD 120, a condição apenas com N (C5) obteve um TRA 51% menor e distinto das plantas controle (C1), o que permite concluir uma resposta positiva desta cultivar à presença bacteriana e não ao

fertilizante. Para a cv Frontana, os resultados demonstram também um efeito positivo das bactérias, mas a presença de N foi prejudicial à manutenção do TRA, exceção é a condição de inoculação de *H. seropedicae*, *A. brasilense* e N (C8) onde a presença exógena do N na forma do fertilizante foi minimizada pela presença das bactérias. Os valores do TRA obtidos para plantas irrigadas (em média 78%) foram similares aos obtidos por Lemos et al., (2011) em outra cv COODETEC que submetidas a 8 dias de déficit alcançaram TRA em torno de 21% diferindo do valor de 12% para o controle sob déficit obtido neste trabalho. Dados obtidos por Arzanesh et al., (2011) demonstram TRA para trigos iranianos com valores de 90%, demonstrando que esta característica inerente às plantas e a inoculação com estirpes de *Azospirillum lipoferum* conseguiram a manutenção (86%) dos valores de TRA mesmo em condições de déficit hídrico (25% da capacidade de campo) .Os resultados obtidos também, concordam com Santos et al., 2012 que observou valores de TRA menores à medida que a restrição hídrica era imposta.

Gonçalves et al., (2012), estudaram o efeito de plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* e observaram que estas se recuperaram mais rapidamente quando comparadas com as que não foram inoculadas. El-Komy et al., (2003) citam que plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum* tiveram os efeitos da seca diminuídos pela manutenção de uma maior pressão de água. Kasim et al., (2013) observaram TRA 20% maiores em planta inoculadas com *A. brasilense* NO40. Dessa forma, fica evidente que a bactéria contribui positivamente para que a planta possa elevar o seu TRA com mais eficiência, gastando menos tempo e menos energia.

O déficit hídrico é conhecido por levar ao estresse oxidativo devido à aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), como resultado direto do desequilíbrio nas taxas de transporte de elétrons e da atividade metabólica do consumidor de energia redutora (BECK et al., 2007). Como consequência das EROs ocorre a peroxidação de lipídios e a consequente ruptura das membranas celulares em plantas submetidas ao déficit (HERNANDEZ et al., 2000; MUNDREE et al., 2002; MILLER et al., 2010). Em condições de crescimento ótimas, as EROs são principalmente produzidos a baixo nível em organelas, tais como cloroplastos, mitocôndrias e peroxisomos (APEL e HIRT, 2004). O aumento da produção de EROs durante o déficit pode representar uma ameaça para as células, no entanto, as EROs também podem agir como sinais para a ativação da resposta ao déficit e vias de defesa (PITZSCHKE et al., 2006). Embora não tenha sido realizada a quantificação da peroxidação de lipídios, através de métodos indiretos, como o conteúdo de malondialdeído

(PARVANOV et al., 2004; SHAO et al., 2005) , a peroxidação de lipídios está diretamente correlacionada com o IEM (VENDRUSCOLO et al., 2007).

Neste experimento apenas a condição de déficit hídrico severo, apresentou resultados distintos para o IEM nas diferentes condições de inoculação e/ou fertilização aplicados. Os resultados apontam que na cv CD 120 mostram que o controle apresentou uma redução de 51% e a presença somente de N (C5) uma redução de 44% no IEM. Em ambas as cultivares, as condições contendo bactérias diazotróficas C2, C3 e C8 apresentaram TRA similares às plantas do controle irrigado, demonstrando que conseguiram manter o turgor celular por apresentarem IEMs altos (83% em média). Em todas as outras condições com a presença da(s) bactéria(s) a manutenção do turgor celular foi observada, dando indícios de que esta cultivar seria promissor no uso comercial. Lemos et al., (2011) relatam uma redução de 32% no IEM de plantas de trigo cv COODETEC submetidas a 8 dias de déficit hídrico.

As plantas com níveis elevados de antioxidantes, constitutivas ou induzidas, têm sido referidas como tendo uma maior resistência a este dano oxidativo (AHMAD et al., 2008; KOHLER et al., 2008). As atividades das enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), ascorbatoperoxidase (APX), guaicol peroxidase (POX), glutathionaredutase (GR) e superóxido dismutase (SOD), sob déficit em plantas, e uma correlação entre estas enzimas a níveis de tolerância a déficit hídrico tem sido descrita (APEL e HIRT, 2004; FAROOQ et al., 2009). Em resposta ao déficit hídrico, as plantas aumentam a síntese de osmólitos, aumentando assim o potencial osmótico no interior das células (FAROOQ et al., 2009). Compostos exsudados pelas bactérias osmo-tolerantes na zona radicular podem incluir osmólitos tais como glicina betaina que, possivelmente atuando sinergicamente com glicina betaína produzida pela planta, aumentam a tolerância à seca, aumento o potencial osmótico das células radiculares (DIMKPA et al., 2009). Ashraf et al., (2004) avaliaram o efeito de exopolissacarídeos bacterianos (EPS) e a absorção de íons K^+/Na^+ . Os autores observaram que a inoculação com rizobactérias diminuiu o fluxo de K^+/Na^+ disponível para a absorção pelas plantas, e, assim, as EPS contribuíram para aliviar o estresse salino em plantas.

Em plantas de *Medicago* inoculadas com BPCV produtoras de AIA e submetidas a estresse salino, apresentaram alta atividade de enzimas antioxidantes o que contribuiu para a sobrevivência destas plantas (BIANCO e DEFEZ, 2009). Por outro lado, Kasim et al., (2012) observaram que as presenças de *Azospirillum brasilense* NO40 e *Bacillus* 5113 aliviaram os efeitos da seca no trigo por melhorar a sobrevivência das plantas além de aumentar seu peso fresco e seco e o conteúdo de água das plantas submetidas a seca. Os autores comprovaram que plântulas de trigo submetidas a 7 dias de restrição hídrica e inoculadas (10^7 células/mL⁻¹)

apresentaram uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes, por diminuírem os níveis de EROs nas plantas por mecanismos homeostáticos. Entre estes mecanismos está um complexo mais eficiente de proteção à proteínas importantes no metabolismo. Omar et al., (2009) relatam resultados similares em cevada submetidas à estresse salino. A manutenção do turgor celular observado nos tratamentos contendo *H. seropedicae* poderia contribuir para uma melhor recuperação das plantas estressadas traduzindo-se em maior produtividade até que o potencial de água a campo seja restabelecido.

Análises moleculares puderam comprovar a presença das bactérias inoculadas (Figura 4), mas, não foram observadas diferenças na anatomia radicular induzidas pela presença das bactérias *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (Figura 7). Na literatura, ainda não está bem esclarecido como as bactérias induzem modificações na anatomia/morfologia radicular e celular (DIMKPA et al., 2009). Pereyra et al., (2012) observaram mudanças no tamanho dos vasos condutores e potenciais de água maiores quando plântulas de trigo foram inoculadas com *Azospirillum* em condições *in vitro* (PEG 8000 20%) o que pode ser traduzido em um fluxo maior de água, explicando o maior crescimento destas plântulas. Pereyra et al., (2010) em hipocótilos de pepino observaram mudanças na extensibilidade da parede celular e na menor atividade da NADH oxidase e algumas peroxidases demonstrando que estas alterações podem estar relacionadas com a promoção do crescimento pelo *Azospirillum*.

Bashan et al., (1992) descrevem os efeitos da presença de *Azospirillum* sobre soja em condições de restrição hídrica como sendo de aumentar o fluxo de prótons, reduzir o potencial de membrana, modificações nos conteúdos de fosfolipídios na membrana celular e tais modificações seriam induzidas por moléculas de baixo peso produzidos pelas bactérias. Creus et al., (2004) relatam que em trigo inoculado com *Azospirillum* sob estresse hídrico apresentaram coleótilos com paredes celulares mais elásticas permitindo às células desta região ficarem menos vulneráveis à desidratação. Sueldo et al., (1996) relatam que em plântulas de trigo, o déficit hídrico acarretou em mudanças na composição fosfolipídica da células radiculares pelo aumento dos teores de fosfatidilcolina e a redução de fosfatidiletanolamina e a inoculação com *Azospirillum* impediu estas mudanças. Embora que, em comparação com as plantas irrigadas os teores de fosfatidilcolina foram superiores e de fosfatidiletanolamina foram inferiores em plântulas estressadas e inoculadas (PEREYRA et al., 2006). Estes resultados sugerem que alterações mediadas pelas bactérias na elasticidade da membrana das células da raiz podem ser um dos primeiros passos para se conhecer mecanismos que promovam maior tolerância à deficiência de água.

5.2 Parâmetros Fisiológicos

Foi observado que a cultivar Frontana, de modo geral, possui melhor capacidade para tolerar a restrição hídrica progressiva em um primeiro momento. Provavelmente, tal comportamento esteja ligado com o fato desta cultivar apresentar em média um maior porte com cerca de 110 cm, maior teor de clorofila em suas folhas, da mesma forma que um maior número de vasos condutores, como já mencionado. Estes resultados são semelhantes àqueles obtidos por Dalla Santa et al., (2004), onde verificaram resposta favoráveis da inoculação das sementes de trigo com *Azospirillum* sp. RAM-7, dependendo da cultivar avaliada. Ainda, na literatura, há relatos confirmando a eficiência de *Azospirillum* sp. em trigo, principalmente por meio da produção de fitohormônios estimulando o crescimento das raízes (HUNGRIA, 2011). Desta forma, com sistemas radiculares maiores a planta de trigo pode manter por um maior período sua hidratação foliar, possibilitando maior troca gasosa por mais tempo (FOLLI-PEREIRA et al., 2012). Segundo Barassi et al. (2008), relataram sobre os mecanismos de respostas metabólicas e fisiológicas de plantas quando inoculadas com *Azospirillum*, melhoraram os parâmetros fotossintéticos das folhas, incluindo maior teor de clorofila e condutância estomática melhorando o potencial hídrico das plantas.

Ao avaliar a folha bandeira de trigo, observa-se que a adição de nitrogênio (C5), proporcionou incremento, pois de modo geral os melhores índices de trocas gasosas foram obtidos para esta condição em ambas as cultivares. No entanto, é a presença de *H. seropedicae* (C2) ou acompanhada com o nitrogênio (C6) promoveram as maiores produtividades para a cv CD 120 na condição irrigada e com déficit parcial. Este resultado mostra que a presença desta bactéria é importante para auxiliar a manutenção do status hídrico das folhas. Porém, não se mostrou eficiente para a outra cultivar Frontana, apresentando baixos valores médios para a massa de 1000 grãos. Tal comportamento é reflexo da compatibilidade entre micro-organismo e planta, onde uma estirpe pode proporcionar resultados favoráveis para uma cultivar e desfavoráveis para outra (ROESCH et al., 2005).

Foi confirmado que a presença de qualquer tipo de imposição hídrica testada neste experimento modificou o comportamento fisiológico das folhas bandeira das plantas de trigo, pois após o início do déficit parcial, observou-se uma redução nítida na (*gs*) de todas as condições comparados ao controle (C1) para a cv CD 120. Este fenômeno, segundo Chaves (1991) e Medici et al., (2010) tem sido identificado como a primeira resposta à seca moderada com a finalidade de reduzir a perda de água por meio da transpiração. No entanto, a cv CD 120 quando inoculada manteve alto o nível de assimilação de dióxido de carbono bem

próximo do controle, mostrando que as condições de inoculação e/ou fertilização provavelmente melhoraram a eficiência do uso da água na folha reduzindo com isso a sua transpiração e mantendo alto a (A). Outro aspecto importante é o fato destas condições mesmo após a redução da abertura estomática e por consequência o influxo de CO_2 interno (C_i), observa-se altos níveis da (A) na planta. Isto comprova, que as condições de inoculação e/ou fertilização de alguma forma mantém ativo os mecanismos de fixação do dióxido de carbono, mesmo em condições adversas, ou seja, déficit hídrico severo. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Sasaki e Machado (1999) ao avaliar a eficiência fotossintética de duas espécies de trigo cultivadas em diferentes teores de água no solo.

As condições observadas neste experimento proporcionadas por ambas as bactérias nas respectivas cultivares em relação a tolerância à desidratação mostrada pelas variáveis de trocas gasosas associadas com os valores do TRA e IEM corroboram a hipótese de que as bactérias auxiliaram na manutenção fisiológica tanto do aparato metabólico quanto fisiológico das plantas de trigo. Pois, o TRA em folhas de plantas que receberam a inoculação e/ou fertilização mantiveram sua turgescência próxima a 80%, mantendo-se aproximadamente iguais às plantas irrigadas, exceto na C1 e C5, onde os valores do TRA ficaram abaixo de 40%. Provavelmente a rápida resposta do fechamento estomático avaliado pela condutância estomática promovida pela ação direta das condições tenha contribuído para diminuir a perda de água mantendo valores estáveis do TRA. Em condições severas de déficit hídrico, a inoculação com *H. seropedicae* (C2) proporcionou maiores valores do TRA, mostrando o efeito benéfico desta bactéria.

A concentração interna de CO_2 (C_i) nas 3 condições hídricas foram distintas para a cv CD 120, sendo que o déficit hídrico severo promoveu os menores índices para este parâmetro (Figura 5D). Tais resultados parecem indicar que o decréscimo da (A) só foi consequência do aumento da resistência estomática, mas também, do efeito do déficit hídrico na (A), visto que um alto valor de (C_i) associado à baixa (g_s) indicaria um decréscimo na eficiência de carboxilação. O mecanismo de abertura estomática em resposta à (C_i) parece agir também em conjunto com outros estímulos, como intensidade e qualidade da radiação solar (RASCHKE, 1979; FARQUHAR e SHARKEY, 1982).

5.3 Parâmetros Produtivos

Plantas da cv CD 120 em geral apresentaram maiores teores de N nas folhas quando submetidas ao déficit severo, e na cv Frontana houve um decréscimo nestes teores. Em relação aos parâmetros produtivos, plantas da cv CD 120 inoculadas com *H. seropedicae*

apresentaram 52% de aumento em sua biomassa fresca comparada ao controle irrigado, porém em déficit severo este incremento foi de 3%. A presença de *A. brasilense* promoveu uma redução de 31 % na biomassa fresca quando comparada ao controle, porém em déficit severo promoveu um acréscimo de 11% na massa fresca. A associação entre *H. seropedicae*, *A. brasilense* e N (C8) proporcionou um acréscimo na biomassa 2% (irrigado) e 101% no déficit severo. Em relação aos parâmetros produtivos, plantas da cv Frontana inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram 0,6% de aumento em sua biomassa fresca comparada ao controle irrigado, porém em déficit severo houve uma redução 12%. A presença de *A. brasilense* promoveu uma redução de 21 % na biomassa fresca quando comparada ao controle, porém em déficit severo promoveu um acréscimo de 28% na massa fresca. A associação entre *H. seropedicae*, *A. brasilense* e N (C8) proporcionou um redução na biomassa 18% (irrigado) e 8% (déficit severo), demonstrando o efeito das bactérias na manutenção do turgor celular para a cv CD 120 e índices negativos para o Frontana. Neiverth, 2011 observou um acréscimo de 13% na biomassa na cv CD 120 em presença de *H. seropedicae* (10^7) células, e a presença da bactéria e nitrogênio reduziram a biomassa das plantas em 2%.

Tais incrementos em condições estressantes, resultados sugerem uma melhor proteção ao dano oxidativo resultante de um sistema antioxidante mais eficiente em que ocorreria o sequestro e inativação dos radicais livres e na proteção de enzimas antioxidantes (LUTTS e GUERRIER, 1995; GONG et al., 2005). Os resultados também apontam para uma especificidade entre a associação planta x bactéria e que estudos de diferentes estirpes, cultivar e local são importantes para o melhor uso desta biotecnologia.

Para a cv Frontana, a presença das bactérias C2 e C3 e C8 foram determinantes para os altos índices de IEM, porém a presença de N (C5) foi negativa para os resultados desta variável. Em relação aos teores de N das folhas, observa-se que a cv Frontana apresentou na condição irrigada níveis de N maiores que a cv CD 120. Tal observação pode ser explicada por essa cultivar apresentar maior porte e biomassa fresca e seca. Dados obtidos para a cv CD 120 demonstraram níveis aumentados de NT na condição de restrição hídrica severa, a cv Frontana, apresentou uma diminuição generalizada para esses valores em todos as condições de inoculação e/ou fertilização no mesmo regime hídrico. Possivelmente, os teores acumulados de N na cv CD 120 sejam canalizados para a formação de grãos. A presença de *H. seropedicae*, *A. brasilense* e N (C8) embora apenas numericamente superior ao controle, apontam para uma possível contribuição bacteriana na maior fixação de nitrogênio pelas bactérias. Neiverth, (2011) avaliaram as alterações nos teores de NT obtidos em 5 diferentes cultivares COODETEC inoculados com *H. seropedicae*. Para a cv CD 120 os níveis obtidos

foram de 0,2074 mg/g e Lemos, (2011) inoculando os mesmos genótipos com *A. brasilense* obteve 30 mg/kg. Os resultados concordam com os autores mencionados.

Alamri e Mostafa, (2009) avaliando o efeito do suprimento de N e/ou a inoculação com *A. brasilense* em trigo submetido a estresse salino, observou que o tratamento controle originou 0,32g de grãos por planta e a presença do *A. brasilense* promoveu um acréscimo de 28% nesta variável. Acréscimos maiores foram obtidos quando a adubação nitrogenada foi aplicada com a bactéria (190%).

As variáveis números de espigas e massa de grãos/planta foram afetados com uma maior redução pela severidade do déficit hídrico. Alamri e Mostafa, (2009) avaliando o efeito do suprimento de N e/ou a inoculação com *A. brasilense* em trigo submetido a estresse salino, observou que o tratamento controle originou 8,66 espigas por planta e a presença do *A. brasilense* promoveu um acréscimo de 3,9% no número de espigas. No entanto os maiores ganhos foram obtidos com a adubação nitrogenada 27% (kg de N há⁻¹) e a associação *A. brasilense* mais N promoveu o desenvolvimento de 46% no número de espigas.

Ao compararmos os dados obtidos para massa de grãos por plantas entre condições aplicadas (irrigada x déficit severo), os valores obtidos foram proporcionalmente menores na condição de déficit hídrico, em virtude da menor massa seca, mas as plantas foram capazes de manter os valores de massa de 1000 grãos, similares ao controle irrigado. Os dados obtidos para massa de 1000 grãos concordam com Alamri e Mostafa, (2009), que em condição irrigada observaram um aumento na massa de 1000 grãos na ordem de 5,5% na presença de *A. brasilense* e 15% com a adubação nitrogenada (kg.ha⁻¹). Aranganarasan et al, (1998) comprovaram que a inoculação com *H. seropedicae* em condições à campo pode incrementar a biomassa, o peso de 1000 grãos e a produção de grãos em arroz. Mirza et al., (2000) observaram aumento de 7,5 g/planta na produtividade de arroz inoculada com *H. seropedicae* em casa de vegetação. Nas condições deste experimento este incremento foi na ordem de 8,3% e 11,14% respectivamente. Os autores relataram incrementos de 40% quando na presença dos dois adjuvantes e em estresse salino. Os dados obtidos não concordam com os autores e o incremento observado foi de 29%. Arzanesh et al., (2011) ao avaliar o efeito da inoculação de *A. lipoferum* em trigo em condições de déficit severo, obteve uma redução de 14,6% quando a estirpe bacteriana foi adicionada.

Estudos de déficit hídrico tem algumas dificuldades de obtenção de dados extrapolantes para condições de campo, pois necessitam de ambiente controlado, o que não pode ser encontrado em condição de campo. Os dados observados neste trabalho demonstram que devem considerados os efeitos genótipo x estirpe x ambiente dependente da associação

para que diferentes estirpes bacterianas promotoras de crescimento sejam amplamente comercializadas. Contudo, o uso destas bactérias é uma abordagem promissora para mitigar os efeitos do estresse hídrico nesta cultura promovendo maiores produtividades e minimizando os custos, uma vez que a adubação nitrogenada não seria necessária em algumas cultivares.

6 CONCLUSÕES

- O déficit hídrico severo foi o que proporcionou diminuição na maioria dos parâmetros produtivos.
- A presença de *H. seropedicae* e *A. brasilense* e combinações apresentaram sustentação do TRA por uma membrana mais intacta.
- A cv Frontana não sofreu com déficit parcial (irrigado e déficit parcial foram iguais).
- A cv CD 120 quando inoculado com *H. seropedicae* possui desempenho produtiva similar ao uso exclusivo de fertilizantes nitrogenados.
- A presença das bactérias conseguiu manter a massa de 1000 grãos em déficit severo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive oxygen species, antioxidants and signalling in plants. **Journal of Plant Biology**, v.51, p.167 - 173. 2008.
- ALAMRI, S. A.; MOSTAFA, Y. S. Effect of nitrogen supply and *Azospirillum brasilense* Sp-248 on the response of wheat to seawater irrigation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.16, p.101 - 107. 2009.
- AMDT, S. K.; CLIFFORD, S. C.; WANEK, W.; JONES, H. G.; POPP, M. Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. **Tree Physiology**, v.21, p.705–715. 2001.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373 - 399. 2004.
- ARANGANARASAN, V.; PALANIAPPAN, A. D.; CHELLIAH, S. Inoculation effects of diazotrops and phosphobacteria on rice. **Indian Journal Microbiology**, v.38, p.111 - 112. 1998.
- ARZANESH, M. H.; ALIKHANI, H. A.; KHOVAZI, K.; RAHIMIAN, H. A.; MIRANSORI, M. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. Under drought stress. **World Journal of Microbio Biotechnol**, v.27, p.197-205. 2011.
- ASHRAF, M.; HASNAIN, S.; BERGE, O.; MAHMOOD, T. Inoculating wheat seeds with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. **Biology and Fertility and Soil**, v.40, p.157 - 162. 2004.
- BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnol Lett**, v.32, n.11, p.1559-1570. 2010.
- BAEK, K.; SKINNER, D. Z. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. **Plant Science**, v.165, p.1221-1227. 2003.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History a the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v.77, n.3, p.549-579. 2005.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, n.1, p.86-93. 1986.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOL, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.911-922. 1997.
- BARAKAT, M. N.; ABDEL-LATIF, T. H. *In vitro* selection for drought tolerant lines in wheat I. Effect of PEG on the embryonic cultures. **Alexandria Journal of Agricultural Research**, v.40, p.97-112. 1995.

BARAKAT, M. N.; ABDEL-LATIF, T. H. *In vitro* selection of wheat callus tolerant to high level of salt and plant regeneration. **Euphytica**, v.91, p.127-140. 1996.

BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CA-SANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. Potencialidad de *Azospirillum* op-timizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. **Argentina: Asociación Argentina de Microbiología**, p.49 - 59.2 008.

BARBOSA, E.A.; PERIN, L.; REIS, V.M. Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p. 827-833. 2006.

BASHAN, Y. HOLGUIN, G.; FERRERA CERRATO. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos II. Bacterias asociativas de la rizosfera. **Terra** v.14, n.2, p.195-210. 1996.

BASHAN, Y.; ALCARAZ-MELENDZ, L.; TOLEDO, G. Responses of Soybean and Cowpea Root Membranes to Inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Symbiosis**, v.13, p.217 - 228. 1992.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Plant Growth-Promoting In: HILLEL, D., **In Encyclopedia of soils in the environment**. 1.ed, Oxford, v.1, p.103-115. 2005.

BECK , H. E.; FETITIG, S.; KNAKE, C.; HARTIG, K.; BHATTARAI, T. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. **Journal of Biosciences**, v.32, p.501-510. 2007.

BECK, E.H.; HEIM, R.; HANSEN, J. Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. **Journal of Bioscience**, v.29, p.449-459. 2004.

BELIMOV, A. A.; DODD, I. C.; HONTZEAS, N.; THEOBALD, J. C.; SAFRONOVA, V. I.; DAVIES, W. J. Rhizosphere bacteria containing ACC deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. **New Phytologist**, v.181, p.413-423. 2009.

BERMAN, M. E.; DEJONG, T. M. Water stress and crop load effectson fruit fresh and dry weights in peach (*Prunus persica*). **Tree Physiology**, v.16, p.859–864. 1996.

BHATTACHARJEE, R. B., SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiological biotechnology**, v.80, p.199-209. 2008.

BIANCO, C.; DEFEZ, R. Medicago truncatula improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing Sinorhizobium meliloti strain. **Journal of Experiment Botany**, v.60, p.3097 - 3107. 2009

BLACKMAN, P. G.; DAVIES, W. J. Root to shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. **Journal of Experimental Botany**, v.36, p.39–48. 185.

BONHERT, H. J.; JENSEN, R. G. Strategies for genetic engineering water stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, v.14, p.244-255. 1996.

BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, v.218, n.4571, p.443-448. 1982.

BRAMMER, S. P.; MARTINELLI, P.; MORAIS-FERNANDES, M. I. B. et al. A potencialidade de *Agropyron*, espécie afim ao trigo cultivado, como fonte de introgressão de genes agronomicamente importantes. **Documentos online**; 08. Secondary BRAMMER, S. P.; MARTINELLI, P.; MORAIS-FERNANDES, M. I. B. et al. Passo Fundo: Embrapa Trigo: 8 p. 2001.

BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America, p.595-624. 1982.

BRUNETTA, D.; BASSOI, M. C.; DOTTO, S. R.; SCHEEREN, P. L.; MIRANDA, M. Z.; TAVARES, L. C. V.; MIRANDA, L. C. Características e desempenho agrônômico da cultivar de trigo BRS 229 no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.889-892. 2006.

BUNCE, J.A. Does transpiration control stomatal responses to water vapour pressure deficit? **Plant Cell Environ**, v.20, p.131-135. 1997.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUUEIRA, M. A. A. Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas. In: SILVEIRA, A.P.D., FREITAS, S.D.S. Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas Não-Leguminosas. In: **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. 1.ed. Campinas: Instituto Agrônômico, p.79-96. 2007.

CHANDRA BABU, R.; ZHANG, J. X.; BLUM, A.; HO, D. T-H.; WU, R.; NGUYEN, H. T. HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. **Plant Science**, v.166, p.855–862. 2004.

CHAVES M. M. Effects of water déficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v.42, p.1 – 16. 1991

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, S. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v.30, p.239–264. 2003.

CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J. P.; RODRIGUES, C. P. P. RICARDO.; OSORIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth, **Annals of Botany**, v.89, p.907–916. 2002.

CHENG, H. R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology Lettes**, v.28, n.1, p.55-59. 2006.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo_safra.pdf. 2008. Acesso em 15 out 2012.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2012/13 – Primeiro Levantamento, Outubro/2012**. Brasília: CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. 2012. 36 p.

COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola. Guia de produtos trigo. Disponível em: http://www.coodetec.com.br/downloads/Guia_de_produtos_Trigo.pdf. Acesso em 20 jan 2012.

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. **Trends Plant Science**, v.5, p.187-188. 2000.

CREUS, C. M.; GRAZIANO, M.; CASANOVAS, E. M.; PEREYRA, M. A.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; BARASSI, C. A.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Plants**, v. 221, p. 297–303, 2004.

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v.82, n.2, p.273-281. 2004.

CRUZ, C. D. **Programa Genes – Diversidade Genética**. 1ed. Viçosa, MG. Editora UFV, v.1, 278p. 2008.

CURTIS, B. C.; RAJARAM, S.; MACPHERSON, H. G. **Bread Wheat Improvement and production**. Rome: Food and agriculture organization of the United Nations. (Plant Production and Protection Series). v.30, p.554. 2002.

DALLA SANTA, O.R.; HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; RONZELLI JUNIOR, P.; SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. Brazilian Archives of Biology and Technology , v.47, p.843 – 850. 2004.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNÁNDEZ-CANIGIA, M. V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. **European Journal of Soil Biology**, v.45, n.1, p.3-11. 2008.

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

DOBBELARE, S.; CROONENBORGH, A.; TRY, A.; VANDE BROECK, A.; VANDERLEYDEN, J.; Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v.212, p.155-164. 1999.

DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophic in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v.13, n.1, p.1-13. 1992.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. T. (Ed). **Nitrogen Fixation**, Pullman: Washington State University, Washington, v.2, p.518-538. 1976.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Science Tech Publishers/Springer-Verlag. 1987.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G. D.; SOUZA, E. S.; FRANÇA, J. G. E.; MACIEL, G. A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.11, p.1087-1093. 2004.

DORFFLING, K.; DORFFLING, H.; LESSELICH, G. *In vitro* selection and regeneration of hydroxy proline-resistant lines of winter wheat with increased proline content and increased frost tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v.142, p.222-225. 1993.

DURÃES, F. O. M.; MAGALHÃES, P. C.; GAMA, E. E. G.; OLIVEIRA, A. C. Caracterização fenotípica de linhagens de milho quanto ao rendimento e à eficiência fotossintética. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.4, n.3, p.355-361. 2005.

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.106, p.119-133. 2005.

EGAMBERDIEVA, D.; KUCHAROVA, Z. Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. **Biol Fertil Soils**, v.45, p.563-571. 2009.

EITZINGER, J. STASTNÁ, M.; ZALUD, Z.; DUBROVSKY, M. A simulation study of the effect of soil water balance and water stress on winter wheat production under different climate change scenarios. **Agricultural Water Management**, v.61, n.3, p. 195-217. 2003.

EL-HARIS, M. K.; BARAKAT, M. N. Evaluation of the *in vitro* selected drought-tolerant wheat line under drought stress conditions. **Alexandria Journal of Agricultural Research**, v.43, p.293-302. 1998.

EL-KOMY, H. M.; SAAD, O. A.; HETTA, A. M. Significance of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and/or straw amendment on growth and dinitrogen fixation of wheat using 15N-dilution method. **Folia microbiologica**, v.48, n.6, p.787-793. 2003.

EMBRAPA 2004. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp57.pdf. Acesso em 08 dez 2012.

EMBRAPA/CNPT. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Cultura do Trigo. 2012. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>. Acesso em: 12 nov. 2012.

EMBRAPA-TRIGO. Importações 2008: principais origens por quantidade exportada. 2008. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/trigo2008.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2012.

ESSA, T. A. Effect of salinity stress on growth and nutrient composition of three soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars. **Journal of Agronomy Crop Science**, v.188, p.86-93. 2008.

FARAOOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJETA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agross Sustain Dev**. v.29, p.185 - 212. 2009.

FARIA, R. T. de; MADRAMOOTOO, C. A. Simulation of soil moisture profiles for wheat in Brazil. **Agricultural Water Management**, v.31, n.1-2, p.35-49. 1996.

FARQUHAR, G. D.; SHARKEY, T. D. Stomatal conductance and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, Boca Raton, v.33, p.317 – 345. 1982.

FERNANDES, F. C. S. **Dinâmica do nitrogênio na cultura do milho (*Zea mays* L.), em cultivo sucessivo com aveia preta (*Avena strigosa*), sob implantação do sistema plantio direto**. 2006, 198p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

FOLLI-PEREIRA, M. S. da; MEIRA-HADDAD, L. S.; BAZZOLLI, D. M. S.; KASUYA, M. C M. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, n6, p.1663 - 1679. 2012.

GALLÉ, A.; CSISZAR, J.; SECENJI, M.; GUÓTH, A.; CSEUZ, L.; TARI, I.; GYÖRGYÉY, J.; ERDEI, L. Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.1878-1891. 2009.

GOEBEL, E. M.; KRIEG, N. R. Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.159, p.86-92, 1984.

GOLLAN, T.; PASSIOURA, J. B.; MUNNS, R. Soil water status affects the stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.459-464. 1986.

GONÇALVES, E. D. V.; RODRIGUES, L. F. O. S.; SILVA, M. B.; MATIELLO, V. D.; BERTÉ, L. N.; MEINERZ, C. C.; GUIMARÃES, V. F. Influência da inoculação de *Azospirillum brasilense* em milho submetido a condições de restrição hídrica. XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Águas de Lindóia – SP. 2012.

GONG, R.; SUN, Y.; CHEN, J.; LIU, H.; YANG, C. Effect of chemical modification on dye adsorption capacity of peanut hull. **Dyes and Pigments**, v.67, p.175-181. 2005.

GOPFERT, H.; ROSSETTI, L.A.; SOUZA, J. **Eventos generalizados e securidade agrícola**. Brasília, DF: IPEA, Ministério do Planejamento.1993. 78p.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.395–412. 2005.

HARDY, R. W.; HAVELKA, U. D. Nitrogen fixation research: a key to world food? **SCIENCE**, v.188, n.4188, p.633-643. 1975.

HARPER, J. E. Nitrogen metabolismo. In: BOOTE, K. J. et al. **Physiology and determination of crop yield**. American Society of Agronomy. Cap.11A, p.285-302. 1994.

HARTUNG, W.; SCHILLER, P.; KARL-JOSEF, D. Physiology of poikilohydric plants. **Progress in Botany**, v.59, p.299-327. 1998.

HARTUNG, W.; WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.361-367. 1998.

HASSISSOU, D.; BOUHARMONT, J. In vitro selection and characterization of drought tolerant plants of durumwheat (*Triticum durum* desf). **Agronomy**, v.14, p.65–70. 1994.

HAUPT-HERTING, S.; FOCK, H. P. Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water-stressed leaves during photosynthesis. **Annals of Botany**, v.89, p.851-859. 2002.

HAVLIN, J. L.; BEATON, J. D.; TISDALE, S. L. et al. **Soil fertility and fertilizers, An introduction to nutrient management**. New Jersey: Pearson Prentice Hall. 515p. 2005.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiol**, v.60, p.579–598. 2010.

HERNANDEZ, J. A.; JIMÉNEZ, A.; MULLINEAUX, P.; SEVILIA, F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated to induction of antioxidant defences. **Plant and Cell Environment**, v.23, p.853 - 862. 2000.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDANI, A.; JAOUA, L.; SAUVORÉ, A.; JAOUA, S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v.169, n.4, p.746-752. 2005.

HOEKSTRA, P. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINIK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, p.431-438. 2001.

HONGBO, S.; ZOUNGSUO, L.; MINGANS. Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.47, p.132–139. 2006.

HSIAO, T. C. Plant response to water stress, **Annual Review of Plant Physiology**, v.24, p.524–570. 1973.

HU, Y. C.; SHAO, H. B.; CHU, L.Y.; WU, G. Relationship between water use efficiency (WUE) and production of different wheat genotypes at soil water deficit, **Colloids Surf.: Biointerface**, v.53, p.271–277. 2006.

HUGHES, M.A.; DUNN, M.A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. **Journal of Experimental Botany**, v.47, n.296, p.291-305. 1996.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Embrapa Soja – Documentos 325, 2011.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acesso em 23 out. 2012.

- IMLAY, J. A.; LINN, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**, v.240, p.1302-1309.1988.
- INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant - Microbe Interact**, v.17, n.10, p.1078-1085. 2004.
- JALEEL, C. A.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; PANNEERSELVAM, R. Paclobutrazol influences vegetative growth and floral characteristics of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Indian Journal of Applied Pure Biology**, v.21, p.369-372. 2006.
- JALEEL, C. A.; JAYAKUMAR, K.; CHANG-XING, Z.; IQBAL, M. Low concentration of cobalt increases growth, biochemical constituents, mineral status and yield in *Zea Mays*. **Journal of Scientific Research**, v.1, p.128 - 137. 2009.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. **Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs**. Philadelphia, PA, ETATS-UNIS: Taylor & Francis. 119p. 1998.
- JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W. L.; REDDY, P. M.; IANNETTA, P. P. M.; OLIVARES, F. L.; LADHA, J.K. Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promoting Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **The American Phytopathological Society**, v.15, p.894-906. 2002.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. Mc Graw Hill, New York. 1940.
- JONES, H. D. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. **Journal of Cereal Science**, v.41, p.137-147. 2005.
- KASIM, W. A.; OSMAN, M. G.; OMAR, M. N.; EL-DAIM, A.; BEJAI, S.; MEIJER, J. Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth-Promoting Bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.32, p.122-130. 2013.
- KERBAY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.
- KHODARAHMI, M.; NABIPOUR, A.; ZARGARI, K. Genetic improvement of agronomic and quality traits of wheat cultivars introduced to temperate regions of Iran during 1942 – 2007. **African Journal of Agricultural Research**, v.5, n.9, p.947-954. 2010.
- KIM, S. H.; SICHER, R. C.; BAE, H.; GITZ, D. C.; BAKER, J. T.; TIMLIN, D.; REDDY, V. R. Canopy photosynthesis, evapotranspiration, leaf nitrogen, and transcription profiles of maize in response to CO₂ enrichment. **Global Change Biology**, v.12, p.588-600. 2006.
- KLOEPPER, J. W.; SCHIPPERS, B.; BAKKER, P. H.M Proposed elimination of the term *Endorhizosphere*. **Phytopathology**, v.82, n.7, p.726-727. 1992.
- KOHLER, J.; HERNANDEZ, J. A.; CARAVACA, F.; ROLDÁN, A. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. **Functional Plant Biology**, 35:141-151. 2008.
- LANGE, O. L.; LÖSCH, R.; SCHULZE, E. D.; KAPPEN, L. Responses of stomata to changes in humidity. **Planta**, v.100, p.76-86. 1971.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.275-294. 2002.

LEMOS, J. M. Resposta de cultivares de trigo à inoculação com *Azospirillum brasilense*, via sementes e à adubação nitrogenada. Dissertação, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2011.

LEMOS, J. M.; VENDRUSCOLO, E. C. G.; SCHUSTER, I.; SANTOS, M. S. Physiological and biochemical responses of wheat subjected to water deficit stress at different phenological stages of development. **Journal of Agricultura Science and Tecnology**, v.1, p.1116 – 1124. 2011.

LIMIN, A.E.; FOWLER, D.B. Morphological and cytological characters associated with low temperature tolerance in wheat. **Canadian Journal of Plant Science**. v.80, p.687-692. 2000.

LIU, W. J.; YUAN, S.; ZHANG, N. H.; LEI, T.; DUAN, H. G.; LIANG, H. G.; LIN, H. H. Effect of water stress on photosystem II in two wheat cultivars. **Biologia Plantarum**, v.50, n.4, p.597-602. 2006.

LOREDO-OSTI, C., L. LÓPEZ-REYES, L.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. **TERRA Latinoamericana**, v.22, n.2, p.225-239. 2004.

LOREDO-OSTI, C.; LÓPEZ-REYES, L.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. **TERRA Latinoamericana**, v.22, n.2, p.225-239. 2004.

LUTTS, S.; ALMANSOURI, M.; KINET, J. M. Salinity and water stress have Contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. **Plant Science**, v.167, p.9–18. 2004.

LUTTS, S.; GUERRIER, G. Peroxidase activities of two rice cultivars differing in salinity as affected by proline and NaCl. **Biologia Plantarum**, v.37, p.577 - 586. 1985.

MACHADO, E. C.; SASSAKI, R. M. Trocas gasosas e condutância estomática em duas espécies de trigo em diferentes teores de água no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1571-1579. 1999.

MAGALHÃES, J. C. A. J. Calagem a adubação para trigo na região do cerrado. **Informe Agropecuário**, n. 50, p.23-28. 1979.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição Mineral de Plantas**. São Paulo: Editora Agronomia Ceres Ltda. 251p. 2006.

MANTELIN, S.; TOURAINE, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.27-34. 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 889p. 1995.

MARTIN-DIDONET, C.C.G.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E.M.; KLEINA, M.; REGO, F.G.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Characterization of the genomic structure of the genus *Azospirillum*. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.4113-4116. 2000.

MEDICI, L. O.; ROCHA, H. S.; CARVALHO, D. F. de; PIMENTEL, C.; AZEVEDO, R. A. Automatic controller to water plants. **Scientia Agrícola**, v.67, p.727 – 730. 2010.

MEYER, S.; GENTY, B. Heterogenous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubinosa* L. during water stress and abscisic acid treatment: induction of a metabolic component by limitation of CO₂ diffusion. **Planta**, v.210, p.126-131. 1999.

MILLER, G.; SUSUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MILLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant and Cell Environment**, v.33, p.453 - 467. 2010.

MIRZA, M. S.; RASUL, G.; MEHNAZ, S.; LADHA, J. K.; SO, R. B.; ALI, S.; MALIK, K. A. Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice. In: Ladha JK, Reddy PM (Eds), The Quest for Nitrogen Fixation in Rice. **International Rice Research Institut**, Los Baños, p.191 - 204. 2000.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS; L. C. C.; SCHIMIDT, M. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; PANKIEVICZ, V. C. S.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. *Herbaspirillum*- plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v.356, p.175-196. 2012.

MOOLHUIZEN, P.; DUNN, D. S.; BELLGARD, M. CARTER, M.; JIA, J.; KONG, X.; GILL, B. S.; FEUILLET, C.; BREEN, J.; APPLES, R. Wheat genome structure and function: genome sequence data and the International Wheat Genome Sequencing Consortium. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.58, n.6, p.470-475. 2007.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. Revisão. **Comunicata Scientia**, v.1, n.2, p.74-99. 2010.

MOUTIA, J. F. Y.; UMRIT, G.; SAUMTALLY, A. S.; KWONG, K. The role of diazotrophic bacteria in the nitrogen nutrition of sugar cane in Mauritius: Preliminary Results. **Food and Agricultural Research Council**. 2003.

MUNDREE, S. G.; BAKER, B.; MOWLA, S.; PETERS, S., MARAIS, S.; WILLIGEN, C. V.; GOVENDER, K.; MAREDZA, A.; MUYANGA, S.; FARRANT, J.M.; THOMSON, J.A. Physiological and molecular insights into drought tolerance. **African Journal of Biotechnology**, v.1, p.28–38. 2002.

NAN, R.; CARMAN, J.G.; SALISBURY, F.B. Water stress, CO₂ and photoperiod influence hormone levels in wheat. **Journal of Plant Physiology**. v.159, p.307-312. 2002.

NAYYAR, H. Accululation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. **Environmental and Experimental Botany**, v.42, p.253-264. 2003.

NCBI Taxonomy. Base de dados de taxonomia. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>. Acesso em 26 out. 2012.

NEIVERTH A. Desempenho de genótipos de trigo associados com *Herbaspirillum seropedicae* em relação afixação biológica de nitrogênio e promoção do crescimento vegetal. Dissertação, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2011.

ODEPA. **Boletín de Trigo – Enero y Febrero 2012**. Santiago: Publicación de la Oficina de Estudios e Políticas Agrárias (ODEPA) del Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. 2012. 44 p.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZÁLEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, n.12, p.1591-1601. 1994.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.59-61. 2003.

OMAR, M. N. A.; OSMAN, M. E. H.; KASIM, W. A.; ABD, EL-DAIM, I. A. Improvement of salt tolerance mechanisms of barley cultivated under salt stress using *Azospirillum brasiliense*. **Tasks Vegetation Science**, 44:133-147.2009.

OREN, R.; SPERRY, J. S.; KATUL, G. C.; PATAKI, D. E.; EWERS, B. E.; PHILLIPS, N.; SCHAFER, K. V. R. Survey and synthesis of intra and inter specific variation of stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. **Plant Cell Environment**, v.22, p.1515-1526. 1999.

PARRY, M. A. J.; ANDRALOJC, P. J.; KHAN, S.; LEA, P. J.; KEYS, A. J. Rubisco activity: effects of drought stress. **Annals of Botany**, v.89, p.833-839. 2002.

PARVANOV, D.; IVANOV, S.; KONSTANTINOVA, T.; KARANOV, E.; ATANASSOV, A.; TSVETKOV, V.; DJILIANO, D. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. **Plant Physiology Biochemistry**, v.42, p.57 - 63. 2004.

PAUK, J.; ERTUGRUL, F.; BARTÓK, T.; MIHÁLY, R.; KISS, O.; CSEUS, L.; DUDITS, D. Improvement of wheat abiotic stress resistance via genetic transformation. **Acta Biologica Szegediensis**, v.46, p.5-7. 2002.

PAUX, E.; SOURDILLE, P.; SALSE, J. R. M. et al. A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. **Science**, v.322, n.5898, p.101-104. 2008.

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v.7, n.5, 1-10. 2011.

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007, 88p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2007.

PEREYRA, M. A.; GARCÍA, P.; COLABELLI, M. N.; BARASSI, C. A.; CREUS, C. M. 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, p.94-97. 2012.

PEREYRA, C. M.; RAMELLA, N. A.; PEREYRA, M. A.; BARASSI, C. A.; CREUS, C. M. Changes in cucumber hypocotyl cell wall dynamics caused by *Azospirillum brasilense* inoculation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p. 62–69. 2010.

PEREYRA, M. A.; ZALAZAR, C. A.; BARASSIA, C. A. Root phospholipids in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings exposed to water stress. **Plant Physiol Biochem**, v.44, p.873-879. 2006.

PITZSCHKE, A. M.; FORZANI, C.; HIRT, H. Reactive oxygen species signalling in plants. **Antioxidant e Redox Signaling**, v.8, p.1757 - 1764. 2006.

PRADO, F. E.; GONZALEZ, J. A.; BOERO, C.; GALLARDO, M.; BOERO, C.; KORTSARZ A. Changes in soluble carbohydrates and invertase activity in *Chenopodium quinoa* developed for saline stress during germination. **Current Topics in Phytochemistry**, v.14, p.1-5. 1995.

RADWAN, T.; EL-S, E. L.-D, MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, v.32, p.39 - 54. 2002.

RAI, M. K.; KALIA, R. K.; SINGH, R.; GANGOLA, M. P.; DHAWAN, A. K. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress. **Environmental and Experimental Botany**, v.71, p.89-98. 2011.

RAPPEL, E.; LOIOLA, E. Estudo da Competitividade da Indústria Brasileira. In: COUTINHO, L. G. (Ed.). **Competitividade da Indústria de Fertilizantes. Nota Técnica Setorial do Complexo Químico**. Campinas: MCT, FINEP, PADCT. Estudo da Competitividade da Indústria Brasileira, p.79. 1993.

RASCHKE, K. Movementus using turgo rmechanisms. In: HAUPT, W.; FEINLEIB, M. E., eds. *Physiology of movements*. Berlin, Springer-Verlag, 1979. v.7, p. 383-441.(Encyclopedia of plant physiology).

REDDY, A. R.; CHALTANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1189-1202. 2004.

REINHOLD-HURECK, B., HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v.6, n.4, p.139-144. 1998.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19 n.3, p.227 - 247. 2000.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19 n.3, p.227-247. 2000.

RODRIGUES, O.; LHAMBY, J.C.B.; DIDONET, A.D.; MARCHESE, J.A.; SCIPIONI, C. Efeito da deficiência hídrica na produção de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.839-846, 1998.

ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F.; PEREIRA PASSAGLIA, L.; et al. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, n.9. p.967-974. 2006.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. O. ; SELBACH, P. A.; SA, E. S. de. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, v.35, n5, p.1201 - 1204. 2005.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS – Microbiology Letters**, v.278, p.1-9. 2007.

SAÍRAM, R. K.; DESMUKH, P. S.; SAXENA, D. C. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerant to water stress. **Biologia Plantarum**, v.41, p.387-394. 1998.

SAIRAM, R. K.; SAXENA, D. C. Oxidative estress and antioxidants in wheat genotypes: Possible mechanism of water stress tolerance. **Journal of Agronomy and Crop Scienci**, v.184, p.55-61. 2000.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N. et al. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, n.6, p.833-842. 2007.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.6, p.833-842. 2007.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. D. S.; DONZELI, V. P. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.345-352. 2005.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. D.S.; DONZELI, V. P. FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.29, p.345-352. 2005.

SALAMONE, I. E. G.; FUNES, J. M.; DI-SALVO, L. P.; ESCOBAR-ORTEGA, J. S. D.; AURIA, F.; FERRANDO, L.; FERNANDEZ-SCAVINO, A. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. **Applied Soil Ecology**, v.61, p.196 - 204. 2012.

SALEEM, M.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, S.; BHATTI, A. S. Perspectiva of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress griculture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.636-648. 2007.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRA, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 142-149, 2012.

SANTOS, A. B.; FAGEIRA, N. K.; SILVA, O. F.; MELO, M. L. B. Resposta do feijoeiro ao manejo de nitrogênio em várzeas tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1265-1271. 2003.

SASSAKI, R.M. & MACHADO, E.C. Trocas gasosas e condutância estomática em duas espécies de trigo em diferentes teores de água no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.9, p.1571 – 1579. 1999.

SAUBIDET, M. I.; FATTA, N.; BARNEIX, A. J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v. 245, n.2, p.215-222. 2002.

SUELDO, R. J.; INVEMATI, A.; PLAZA, S. G.; BARASSI, C. A. Osmotic stress in wheat seedlings: effects acid composition and phospholipid turnover in coleoptiles. **Cereal Research Communications**, v.24, p.74-84. 1996.

SCHIMIDT, D. A. M.; CARVALHO, F. I. F. D.; OLIVEIRA, A. C. D. et al. Variabilidade genética em trigos brasileiros a partir de caracteres componentes da qualidade industrial e produção de grãos. **Bragantia**, v.68, n.1, p.43-52. 2009.

SCHLESINGER, W. H. **Biogeochemistry: an analysis of global change**. San Diego: Academic Press. 588p. 1997.

SCHONFELD, M. A.; JOHNSON, R. C.; CARVER, B. F.; MORNHINWEG, D. W. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. **Crop Science**, v.28, p.526-531. 1988.

SCHULZE, E. D.; HALL, A. E.; Stomatal responses, water loss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. In: Lange OL, PS Nobel, CB Osmond & H Ziegler (eds) **Encyclopedia of plant physiology, physiological plant ecology II**, v.2, p.181-230. 1982.

SHAO, H. B.; CHU, L. Y.; LU, Z. H.; KANG, C. M. Main antioxidants and redox signaling in higher plant cells, **International Journal of Biological Science**, v.44, p.12–18. 2008.

SHAO, H. B.; LIANG, Z. S.; SHAO, M. A.; SUN, Q.; HU, Z. M. Investigation on dynamic changes of photosynthetic characteristics of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes during two vegetative growth stages at water deficits, Colloids Surf. B: **Biointerface**, v.43, p.221 – 227. 2005.

SHAO, H. B.; LIANG, Z. S.; SHAO, M. A.; SUN, Q.; HU, Z. M. Investigation on dynamic changes of photosynthetic characteristics of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes during two vegetative growth stages at water deficits, *Colloids Surf. B: Biointerface*, v.43, p.221–227. 2005.

SHAO, H.; CHU, L.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, v.331, p.215-225. 2008.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, v.3, p.217-223. 2000.

SOBRINHO, J. S. e SOUZA, M. A. Origem, descrição botânica e desenvolvimento do trigo. *Informe Agropecuário*, v. 97, p. 9-13. 1983.

SOCIAS, F. X.; CORREIA, M. J.; CHAVES, M.; MEDRANO, H. The role of abscisic acid and water relations in drought responses of subterranean clover. *Journal of Experimental Botany*, v.48, p.1281-1288. 1997.

STEENHOUT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing and ecological aspects. *FEM Microbiology Ecology*, England, v.24, p.487-506. 2000.

STRECK, N. A. Do we know how plants sense a drying soil. *Ciência Rural*, v.2, n.34, p.581-584. 2004.

SUELDO, R. J.; INVEMATI, A.; PLAZA, S. G.; BARASSI, C. A. Osmotic stress in wheat seedlings: effects acid composition and phospholipid turnover in coleoptiles. *Cereal Research Communications*, v.24, p.74 - 84. 2008.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant and Soil*, v.356, p.35-49. 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*, 5.ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc. Publishers, 2010. 782p.

TAVARES, L. C. V.; BASSOI, M. C.; MIRANDA, L. C.; PRETE, C. E. C. Transferência de tecnologia para cultivares de trigo no estado do Paraná. *Revista Brasileira de Sementes*, v.33, p.21-27. 2011.

TEZARA, W.; MITCHELL, V. J.; DRISCOLL, S. D.; LAWLOR, D. W. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, v.401, p.914-917. 1999.

TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. YU.; CHEDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Hormones and Hormone-Like Substances of Microorganisms: A Review, *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 42, p.229–235. 2006.

VARGAS, L.; CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; HEMERLY, A. S. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant bacterial genotypes. **Plant and Soil**, v.356, p.127. 2012.

VENDRUSCOLO, E. C. G.; SCHUSTER, I.; PILEGGI, M.; SCAPIM, C. A.; MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; VIEIRA, L. C. G. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1367-1376, 2007.

WANG, Z. Q.; YUAN, Y. Z.; OU, J. Q.; LIM, Q. H.; ZHANG, C. F. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.695-701. 2007.

WICHERN, F.; ELBERHARDT, E.; MAYER, J.; JOERGENSEN, R. G.; MÜLLER, T. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, n.1, p.30-48. 2008.

WILSON, J. Mechanisms of chilling resistance in plants. In: **Mechanisms of environmental stress resistance in plants** . Hartwood, USA: Academic Publishers. 1991.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v.14, p.1-4. 2009.

ZAIR, I.; CHLYAH, A.; SABOUNJI, K.; TITTAHSEN, M.; CHLYAH, H.; Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of in vitro selection pressure. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.73, p.237-244. 2003.