

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

**LUCAS GUILHERME BULEGON**

**RELAÇÕES HÍDRICAS, TROCAS GASOSAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE  
*Urochloa ruziziensis* INOCULADA COM *Azospirillum brasilense*, SOB DÉFICIT  
HÍDRICO**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ**

**2016**

**LUCAS GUILHERME BULEGON**

**RELAÇÕES HÍDRICAS, TROCAS GASOSAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE  
*Urochloa ruziziensis* INOCULADA COM *Azospirillum brasilense*, SOB DÉFICIT  
HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco  
Guimarães

Coorientadores: Prof. Dr. Paulo Sérgio Rabello  
de Oliveira

Prof. Dr. Leandro Rampim

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B933r

Bulegon, Lucas Guilherme

Relações hídricas, trocas gasosas e atividade enzimática de *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense*, sob déficit hídrico. Lucas Guilherme Bulegon. Marechal Cândido Rondon, 2016.

116 p.

Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Rabello de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Rampim

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2016

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia

1. Promoção de crescimento vegetal. 2. Água. 3. Gramínea forrageira. 4. Condutância estomática. 5. Análise de trilha. 6. Enzimas antioxidativas. I. Guimarães, Vandeir Francisco. II. Oliveira, Paulo Sérgio Rabello de. III. Rampim, Leandro. IV. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. V. Título.

CDD 21.ed. 581.1

CIP-NBR 12899

LUCAS GUILHERME BULEGON

RELAÇÕES HÍDRICAS, TROCAS GASOSAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA  
DE *Urochloa ruziziensis* INOCULADA COM *Azospirillum brasilense*, SOB  
DÉFICIT HÍDRICO.

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná, como parte das exigências  
do Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia, para obtenção do título  
de Magister Scientiae.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2016



---

Prof. Dr. Tiago Zoz  
(UEMS)



---

Prof. Dr. Eurides Kuster Macedo Júnior  
(UNIOESTE)



---

Prof. Dr. José Barbosa Duarte Júnior  
(UNIOESTE)



---

Prof. Dr. Vander Francisco Guimarães  
(Orientador)  
(UNIOESTE)

*A meus pais, Vilma Batistus Bulegon e João Bejamim Bulegon. Ao meu irmão Mateus Eduardo Bulegon. Assim como aos demais familiares, servindo-me como exemplo de educação, sabedoria, sucesso, incentivo e apoio durante mais essa etapa.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade de realização do Mestrado em Agronomia. E aos professores pelos conhecimentos transmitidos.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães e aos meus coorientadores Prof. Dr. Paulo Sergio Rabello de Oliveira e Prof Dr. Leandro Rampim pelas orientações, confiança, credibilidade e conhecimento transmitidos durante essa jornada.

Aos Professores Dr. Claudio Yuji Tsutsumi, Dr. Gilberto Costa Braga e Dr. Edmar Soares de Vasconcelos pela ajuda nas análises dos dados estatísticos e disponibilização de instalações laboratoriais.

A Camila Molon Delazeri pelo companheirismo, amizade e compreensão durante o período de realização do mestrado.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Deise Dalazen Castagnara pelos conhecimentos de pesquisa e experimentação transmitidos, os auxílios constantes e a amizade construída.

Aos integrantes do Grupo de Estudos em Fixação Biológica de Nitrogênio (GEFBN), André Gustavo Battistus, Adriano Mitio Inagaki, Aline Kelly Pomini de Souza, Débora Kestring Klein e Luiz Claudio Offemann.

A Capes, CNPq e INCT-Fixação Biológica de Nitrogênio pela bolsa de estudos e recursos para realização do experimento.

A Silvio Douglas Ferreira, Jéssica Cristina Urbanski Laureth, Vanessa Aline Egewarth, Rafael M. Yassue e Marcelo Gonçalves dos Santos, pela amizade, auxílio e disposição na condução do experimento.

Aos demais amigos e colegas pela convivência, amizade e toda ajuda que recebi durante o decorrer deste mestrado.

E a todos aqueles que não foram citados, mas que direta ou indiretamente contribuíram na realização desse trabalho

## RESUMO

BULEGON, Lucas Guilherme, Engenheiro Agrônomo, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. **Relações hídricas, trocas gasosas e atividade enzimática de *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense*, sob déficit hídrico.** Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães. Coorientadores: Prof. Dr. Paulo Sérgio Rabello de Oliveira; Prof. Dr. Leandro Rampim.

O déficit hídrico causa na planta um descontrole fisiológico e bioquímico, assim busca-se formas para reduzir esses efeitos e aumentar a tolerância das plantas a restrição hídrica. Desta forma, o presente estudo objetivou, avaliar o comportamento fisiológico e bioquímico de *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense* via semente e foliar, em condições de déficit hídrico induzido e controlado. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados e os tratamentos, controle, inoculação de *A. brasilense* nas sementes, aplicação foliar de *A. brasilense*, combinação entre inoculação das sementes e aplicação foliar de *A. brasilense*, segmentado em quatro etapas. I - Esquema fatorial 2x2x13, presença e ausência da inoculação nas sementes, presença e ausência de déficit hídrico, e níveis de luminosidade, avaliando as trocas gasosas em déficit hídrico moderado, severo e reidratação. II - Esquema fatorial 2x4, a presença e ausência do déficit hídrico, e os quatro tratamentos, avaliando-se diariamente teor relativo de água, umidade do solo e as trocas gasosas. III- Utilizou-se os tratamentos em déficit hídrico e o controle irrigado, determinando-se, o teor de proteínas solúveis e a atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidase (SOD) e catalase, e os teores de clorofila *a* e *b*, e carotenoides. IV - consistiu na análise de correlações, trilha e de componentes principais para as plantas mantidas em restrição hídrica e mantidas irrigadas. Os resultados mostraram que o uso de *A. brasilense* via semente, faz com que a cultura alcance maior atividade fotossintética, com menor ponto de compensação em condições de déficit severo. Para as relações hídricas, trocas gasosas e atividade enzimática, o *A. brasilense*, inferiu positivamente, se destacando a aplicação foliar, com efeitos pronunciados na regulação estomática e ação enzimática. Ao observar as variáveis ligadas a manutenção da fotossíntese destacou-se a condutância estomática (moderado e severo) e a SOD (severo). Na reidratação o *A. brasilense* atuou na regulação estomática e enzimática, levando a uma recuperação de forma a não prejudicar a planta. Conclui-se que o uso de *A. brasilense* independente da forma eleva a tolerância ao déficit hídrico em *U. ruziziensis*, contudo a aplicação foliar tem efeito pronunciado em relação as principais variáveis ligadas a manutenção da fotossíntese, além de maior perspectiva de uso.

**Palavras Chaves:** Promoção de crescimento vegetal. Água. Gramínea forrageira. Condutância estomática. Análise de trilha. Enzimas antioxidativas.

## ABSTRACT

BULEGON, Lucas Guilherme, Agronomist, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. **Water relations, gas exchange and enzymatic activity of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense*, to drought.** Adviser: Prof. PhD. Vandeir Francisco Guimarães. CoAdvisers: Prof. PhD. Paulo Sérgio Rabello de Oliveira; Prof. PhD. Leandro Rampim.

The water deficit causes the plant physiological and biochemical disarray, so is sought ways to reduce these effects and increase the tolerance of plants to water stress. Thus, the present study aimed to evaluate the physiological behavior and biochemical *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* via seed and leaf (foliar spray) in conditions induced and controlled water deficit. We used the randomized block design and the treatments, control, inoculation of *A. brasilense* in seeds, foliar spray application of *A. brasilense*, combination of seed inoculation and foliar spray application of *A. brasilense*, segmented into four steps. I - factorial scheme 2x2x13, presence and absence of inoculated seeds, presence and absence of water deficit, and light levels, evaluating gas exchange in moderate drought, severe and rehydration. II - 2x4 factorial scheme, the presence and absence of drought, and the four treatments by assessing daily relative water content, soil moisture and gas exchange. III - was used treatments in drought and irrigated control, being determined, the soluble protein content and the activity of superoxide dismutase, peroxidase (SOD) and catalase, and the contents of chlorophyll *a* and *b*, and carotenoid. IV - was the analysis of correlations, track and major components for the plants kept in water restriction and irrigated maintained. The results showed that the use of *A. brasilense* via seed, makes the culture reach greater photosynthetic activity, less point compensation in severe stress conditions. For water relations, gas exchange and enzyme activity, *A. brasilense*, inferred positively, especially foliar application, with pronounced effects on stomatal regulation and enzymatic action. By observing the variables linked to maintenance of photosynthesis stood out stomatal conductance (moderate and severe) and SOD (severe). In rehydrating the *A. brasilense* acted in stomatal and enzymatic regulation, leading to a recovery in order to not harm the plant. It follows that the use of *A. brasilense* regardless of the form increases the tolerance to water deficit in *U. ruziziensis*, however foliar application has pronounced effect in relation to the main variables associated with the maintenance of photosynthesis and greater prospect of use.

**Key Words:** Promote plant growth. Water. Forage grass. Stomatal conductance. Path analysis. Antioxidative enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- Figura 1:** Trocas gasosas de *U. ruziziensis* na presença (símbolos vazios) ou ausência (símbolos cheios) de déficit hídrico moderado, quando inoculadas ( $\ominus$ ) ou não inoculada ( $\ominus$ ) com *A. brasilense* nas sementes, em respostas a densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015..... 36
- Figura 2:** Trocas gasosas de *U. ruziziensis* na presença (símbolos vazios) ou ausência (símbolos cheios) de déficit hídrico severo, quando inoculadas ( $\ominus$ ) ou não inoculada ( $\ominus$ ) com *A. brasilense* nas sementes, em respostas a densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos. em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015..... 38
- Figura 3:** Trocas gasosas de *U. ruziziensis* na presença (símbolos vazios) ou ausência (símbolos cheios) de déficit hídrico após a reidratação das plantas, quando inoculadas ( $\ominus$ ) ou não inoculada ( $\ominus$ ) com *A. brasilense* nas sementes, em respostas a densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos. em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015..... 40

### CAPÍTULO III

- Figura 4:** Condição de temperatura e umidade relativa durante a imposição do déficit hídrico, barras verticais indicam as temperaturas ambiente, e linhas indicam as temperaturas internas da casa de vegetação, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. .... 53
- Figura 5:** Umidade gravimétrica do solo cultivado com plantas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. .... 56
- Figura 6:** Teor relativo de água em plantas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. .... 57
- Figura 7:** Integridade Absoluta de Membrana – PIA (A) e Integridade Relativa de Membrana – PIR (B) em plantas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015..... 58
- Figura 8:** Taxa de Assimilação Líquida de CO<sub>2</sub> – A (A) e Transpiração Foliar – E (B) em plantas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015 ..... 60

<b>Figura 9:</b> Condutância Estomática – $g_s$ (A) e Concentração Interna de $CO_2$ – $C_i$ (B) em plantas de <i>U. ruziziensis</i> inoculada com <i>A. brasilense</i> , via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015 .....	62
<b>Figura 10:</b> Eficiência no Uso da Água – $WUE$ (A) e Eficiência Intrínseca no Uso da Água – $iWUE$ (B) em plantas de <i>U. ruziziensis</i> inoculada com <i>A. brasilense</i> , via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.....	63

#### CAPÍTULO IV

<b>Figura 11:</b> Teor de proteínas solúveis totais em folhas de plantas de <i>U. ruziziensis</i> inoculada com <i>A. brasilense</i> , via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. ....	79
<b>Figura 12:</b> Atividade da enzima superóxido dismutase em folhas de <i>U. ruziziensis</i> inoculada com <i>A. brasilense</i> , via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. ....	80
<b>Figura 13:</b> Atividade da enzima peroxidase (A) e catalase (B) em folhas de <i>U. ruziziensis</i> inoculada com <i>A. brasilense</i> , via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.....	81
<b>Figura 14:</b> Concentração de clorofila a (A), clorofila b (B), e carotenoides (C) em folhas de <i>U. ruziziensis</i> inoculada com <i>A. brasilense</i> , via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. ....	83

#### CAPÍTULO V

<b>Figura 15:</b> Análise de componentes principais de <i>U. ruziziensis</i> inoculada com <i>A. brasilense</i> , via semente e foliar em condições de déficit hídrico moderado, para plantas mantidas sob restrição hídrica (A) e mantidas irrigadas (B), em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.....	99
<b>Figura 16:</b> Análise de componentes principais de <i>U. ruziziensis</i> inoculada com <i>A. brasilense</i> , via semente e foliar em condições de déficit hídrico severo, para plantas mantidas sob restrição hídrica (A) e mantidas irrigadas (B), em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.....	100
<b>Figura 17:</b> Análise de componentes principais de <i>U. ruziziensis</i> inoculada com <i>A. brasilense</i> , via semente e foliar em condições de déficit hídrico após a reidratação, para plantas mantidas sob restrição hídrica (A) e mantidas irrigadas (B), em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.. ....	101

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

**Tabela 1:** Valores médios das condições hídras foliares, do solo e ambientais no momento das avaliações de trocas gasosas em diferentes níveis de luz, em plantas de *U. ruziziensis* em condições de déficit hídrico, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. .... 35

### CAPÍTULO V

**Tabela 2:** Variância de cada componente principal (CP) e sua importância em relação à variância total em planta de *Urochloa ruziziensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* em condições de déficit hídrico, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015 ..... 98

**Tabela 3:** Correlações entre variáveis avaliadas em *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense* em condições de déficit hídrico moderado, para plantas mantidas em restrição hídrica e irrigadas, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015 ..... 102

**Tabela 4:** Análise de trilha das características ligadas a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, em plantas de *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense*, na presença ou ausência do déficit hídrico em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. .... 103

**Tabela 5:** Correlações entre variáveis avaliadas em *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense* durante o déficit hídrico severo, para plantas mantidas em restrição hídrica e irrigadas, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. .... 104

**Tabela 6:** Correlações entre variáveis avaliadas em *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense* após a reidratação, para plantas mantidas em restrição hídrica e irrigadas, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. .... 105

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

#### RELAÇÕES HÍDRICAS DE CAPINS FORRAGEIROS DO GÊNERO *Urochloa*, SUAS ADAPTAÇÕES E OPÇÕES PARA ELEVAR A TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO

1. Introdução .....	15
2. A importância da água nas plantas.....	16
3. Déficit hídrico.....	17
4. Processos adaptativos de gramíneas plantas forrageiras ao déficit hídrico.....	18
5. Métodos para elevar a tolerância ao déficit hídrico .....	19
6. Produção de espécies reativas de oxigênio em condições de déficit hídrico.....	20
7. Utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal no gênero <i>Urochloa</i> ....	22
8. Referências Bibliográficas .....	23

### CAPÍTULO II

#### RESTRICÇÃO FOTOSSINTÉTICA DE *Urochloa ruziziensis* INOCULADA COM *Azospirillum brasilense* SOB DÉFICIT HÍDRICO

1. Introdução .....	32
2. Material e métodos .....	33
2.1 Descrição da área experimental .....	33
2.2 Delineamento experimental .....	33
2.3 Condução .....	34
2.4 Trocas gasosas em função da DFFFA.....	34
2.5 Análise estatística.....	35
3. Resultados .....	35
4. Discussões .....	41
5. Conclusões .....	44
7. Referências .....	45

### CAPÍTULO III

#### RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Urochloa ruziziensis* INOCULADAS COM *Azospirillum brasilense* SOBRE O DÉFICIT HÍDRICO SEVERO

1. Introdução .....	51
2. Material e métodos .....	52
2.1 Descrição da área experimental.....	52

2.2 Delineamento experimental .....	53
2.3 Condução .....	53
2.4 Determinação da umidade gravimétrica do solo.....	54
2.5 Determinação do teor relativo de água (TRA) .....	54
2.6 Tolerância protoplasmática .....	55
2.7 Trocas gasosas.....	55
2.8 Análise estatística .....	55
<b>3. Resultados .....</b>	<b>56</b>
3.1 Umidade gravimétrica do solo.....	56
3.2 Teor relativo de água e tolerância protoplasmática .....	57
3.3 Trocas gasosas.....	59
<b>4. Discussões .....</b>	<b>64</b>
4.1 Umidade do solo .....	64
4.2 Teor relativo de água e tolerância protoplasmática .....	64
4.3 Trocas gasosas.....	66
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>69</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>69</b>

## CAPÍTULO IV

### ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE PIGMENTOS FOLIARES EM *Urochloa ruziziensis* INOCULADA COM *Azospirillum brasilense* SOB DÉFICIT HÍDRICO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>75</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>76</b>
2.1 Descrição da área experimental .....	76
2.2 Delineamento experimental .....	76
2.3 Condução .....	77
2.4 Determinação do teor de proteína solúveis e atividade das enzimas antioxidativas ..	77
2.5 Determinação do teor de pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores .....	78
2.6 Análise estatística.....	78
<b>3. Resultados .....</b>	<b>78</b>
3.1 Proteínas Solúveis .....	78
3.2 Enzimas relacionados ao estresse oxidativo.....	79
3.3 Pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores.....	82
<b>4. Discussões .....</b>	<b>83</b>

4.1 Proteínas Solúveis .....	83
4.2 Enzimas relacionados ao estresse oxidativo .....	84
4.3 Pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores.....	86
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>87</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>87</b>

## CAPÍTULO V

### *Azospirillum brasilense* MANTÉM ASSIMILAÇÃO DE CO<sub>2</sub> EM *Urochloa ruziziensis* DURANTE DÉFICIT HÍDRICO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>94</b>
<b>2. Material e métodos .....</b>	<b>95</b>
2.1 Descrição da área experimental .....	95
2.2 Delineamento experimental .....	96
2.3 Condução .....	96
2.4 Avaliações .....	97
2.5 Análise estatística.....	97
<b>3. Resultados .....</b>	<b>98</b>
<b>4. Discussões .....</b>	<b>105</b>
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>109</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>109</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>114</b>

**CAPÍTULO I****RELAÇÕES HÍDRICAS DE CAPINS FORRAGEIROS DO GÊNERO *Urochloa*, SUAS  
ADAPTAÇÕES E OPÇÕES PARA ELEVAR A TOLERÂNCIA AO DÉFICIT  
HÍDRICO****WATER RELATIONS GRASSES FORAGE *Urochloa*, YOUR ADJUSTMENTS AND  
OPTIONS TO RAISE WATER DEFICIT TOLERANCE**

## 1. Introdução

A água exerce funções primordiais dentro das plantas e são fundamentais para a vida existente na Terra. Na planta tem elevada representatividade na massa fresca podendo chegar em algumas culturas a valores superiores a 95%. Dentre as funções de destaques estão a germinação das sementes, manutenção do turgor da planta, manutenção da fotossíntese, transporte de nutrientes, fecundação e formação de sementes.

A falta de água numa planta é representada pelo déficit hídrico e leva a uma série de respostas negativas. O déficit hídrico é resultado de um balanço hídrico negativo entre a água absorvida e perdida pela planta. Esse fator é definido em estágios distintos que vão desde de uma falta de água momentânea, até condições drásticas, levando a planta a morte, sendo agravado pois, a planta não consegue absorver a água disponível no solo.

As plantas, mais especificamente as gramíneas forrageiras possuem vários processos adaptativos para superar o déficit hídrico, eles têm como finalidade evitar a perda de água excessiva, sendo constatados mecanismos de tolerância a níveis fisiológicos, morfológicos e estruturais.

Embora as plantas possuem mecanismos naturais para tolerar o déficit hídrico, a obtenção de plantas com maior tolerância é um objetivo do melhoramento genético, contudo os avanços e focos iniciais se restringem a culturas com alto valor agregado. Para as demais culturas são utilizados a curto prazo formas alternativas, como a semeadura direta, uso de hormônios vegetais, e mais recentemente de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV).

O uso de BPCV em capins do gênero *Urochloa*, ocorre devido o gênero realizar a interação com BPCV naturalmente. Contudo as respostas da inoculação artificial são controversas, sendo demonstrados efeitos positivos, negativos e/ou ausência. Se destacando o aumento na produção das forrageiras em estações secas do ano.

Desta forma, o *A. brasilense* através de sua ação de promover o desenvolvimento radicular, de parte aérea, bem como atuar em níveis hormonais, podendo desta forma, representar ganhos significativos quando a planta sofre uma condição adversa, como o déficit hídrico.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo geral, avaliar o comportamento fisiológico e bioquímico de *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense* via semente e foliar, quando submetidas a condições de déficit hídrico induzido e controlado.

## 2. A importância da água nas plantas

A água é um elemento de suma importância para a manutenção da vida na terra, tanto para os vegetais como para os animais (PIMENTEL, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2013). Nos vegetais a água pode representar cerca de 90% da massa fresca (AZEVEDO et al., 2005). Em culturas anuais e pastagens essa representatividade varia de acordo com o estágio de desenvolvimento da cultura, 40% a 80% (LIMA et al., 2012), e em árvores lenhosas 35% a 75%. Desta forma, na média para cada dois gramas de matéria seca produzida pela planta, são consumidos um litro de água, sendo que grande parte desse montante (aproximadamente 80%) é perdido para a atmosfera na forma de vapor de água.

A água exerce funções primordiais dentro da planta, essas são exercidas devidos as suas características químicas e físicas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Dentre as funções, se destacam a manutenção do turgor da planta, que possibilitam o alongamento celular, as trocas gasosas e o transporte nos vasos condutores. A perda do turgor pela falta de água leva a desorganização celular e interrupção do fluxo nos vasos condutores pela formação de cavitações (CATUCHI et al., 2012). A hidrólise da água durante a fotossíntese, fornece os primeiros elétrons para o transporte eletrônico e início da fotossíntese, além de proteger o aparato fotossintético eliminando radicais livres (SLAMA et al., 2015). Outras funções estão no transporte de nutriente da raiz para a parte aérea, na translocação de fotoassimilados, fecundação, composição estrutural da célula e manutenção da temperatura da planta. A água tem fundamental importância, na germinação das sementes, para a ativação do metabolismo da semente e quebra das substâncias de reserva (ROSA et al., 2005).

A falta de água nas plantas pode levar a uma série de respostas negativas, que podem ser de curto prazo ou de longo prazo. A curto prazo a planta inicia um fechamento estomático e diminuição da sua taxa fotossintética, apresentando uma leve murcha pela perda de turgor. A longo prazo os efeitos são drásticos, representando menor desenvolvimento, produtividade e podendo culminar em morte da planta em situações severas (MATTOS; GOMIDE; HUAMAN, 2005; ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013; LAUTERI et al., 2014; DARDEAU et al., 2015).

Portanto, a falta da água ocasiona grandes prejuízos aos sistemas agrícolas, como demonstrados em gramíneas do gênero *Urochloa* (MATTOS; GOMIDE; HUAMAN, 2005; SILVA et al., 2005) e do gênero *Cynodon* (ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013) pelo menor desenvolvimento da planta e menor taxa de expansão foliar. Em culturas anuais a deficiência hídrica também causam efeitos severos como no trigo (SANTOS et al., 2012), soja (FIOREZE

et al., 2013) e arroz (LAUTERI et al., 2014), pela menor produção de massa seca e grãos das plantas.

### 3. Déficit hídrico

O déficit hídrico é definido como o resultado do balanço hídrico negativo que ocorre entre a água que entra na planta via sistema radicular e aquela perdida (transpirada) para a atmosfera via parte aérea, ocasionado por um potencial hídrico do solo negativo.

Tendo em vista que o déficit hídrico ocorre pelo comportamento da água dentro de três potenciais: matricial, planta e atmosfera (pressão), o seu efeito é pronunciado em condições de maior déficit de pressão de vapor, onde o potencial água da atmosfera é reduzido favorecendo assim a perda de água das planta e solo (PIMENTEL, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Quando em condições de temperaturas muito elevadas a planta perde água mais rapidamente do que ela consegue absorver, o que ocasiona um déficit hídrico temporário ou ligeira deficiência hídrica (Estádio I), originário da formação de cavitações nos vasos xilemáticos que causam uma interrupção do transporte ascendente, que só é retomado durante a noite. A continuidade das condições ambientais que favorecerem o menor potencial água na atmosfera faz com que o déficit temporário seja mais longo, sendo classificado como moderado (Estádio II), assim a recuperação durante a noite ocorre mais lentamente. Continuando as condições adversas a planta tem a condição de se recuperar durante a noite dificultada levando a um déficit hídrico severo (Estádio III), ocorrendo um total desarranjo hormonal, fotossintético e bioquímico, podendo rapidamente passar para uma deficiência hídrica letal (Estádio IV), dependendo da sua tolerância a falta de água (SINCLAIR; LUDLOW, 1986; PIMENTEL, 2004).

Para superar essa condição as plantas fazem o uso de alguns mecanismos distintos. Evitar a seca: mantendo o seu status hídrico mesmo em ambientes secos. Tolerar a seca: as funções essenciais são mantidas em equilíbrio mesmo com a falta de água. Escapar a seca: a planta completa seu ciclo antes de ocorrer o déficit hídrico (KRAMER, 1980; PIMENTEL, 2004).

Embora o déficit hídrico seja ocasionado pelo balanço hídrico negativo do solo (SILVA et al., 2014), em resposta a um diferencial de pressão, a planta sente a falta de água quando o solo possui teor de água considerado alto. Tal condição ocorre devido a planta conseguir retirar água de uma fração restrita do solo, chamada de fração de água disponível as plantas (FAD), que é de aproximadamente 50% do valor total da água presente no solo (CARLESSO, 1995).

Deve-se ainda considerar que as plantas possuem uma área de exploração limitada pelo seu sistema radicular (SILVA et al., 2014), fator que pode limitar ainda mais o FDA do solo.

Desta forma, o efeito do déficit hídrico já foi demonstrado em várias gramíneas forrageiras, causando redução do seu desenvolvimento, principalmente pela restrição da expansão foliar, aumento da senescência foliar e diminuição da emissão de perfilhos. Mattos; Gomide; Huaman, (2005), citam o efeito do déficit hídrico sobre pastagens do gênero *Urochloa*. Também são demonstraram redução no desenvolvimento do gênero *Cynodon* cultivado sobre restrição hídrica (SILVA et al., 2005; ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013).

Portanto, o déficit hídrico é um importante fator a ser considerado nos sistemas produtivos, principalmente em países onde a produção agrícola ocorre de forma majoritária em áreas não irrigadas.

#### **4. Processos adaptativos de gramíneas plantas forrageiras ao déficit hídrico**

As gramíneas forrageiras que predominam no Brasil são pertencentes ao grupo de plantas C<sub>4</sub>, ou seja, possuem maior capacidade de uso da água, maior capacidade fotossintética e maior produtividade. Contudo, o Brasil possui um baixo rendimento das pastagens, ocasionado pela sazonalidade climática, sendo que a limitação hídrica é tratada como um dos principais fatores para essa condição (SOUZA; MATTA; FÁVERO, 2014).

Contudo, as gramíneas forrageiras possuem características que mesmo quando submetidas a condições adversas de déficit hídrico, garantem que elas consigam se propagar e/ou produzir massa seca. Dentro das adaptações das gramíneas forrageiras destacam-se as fisiológicas, morfológicas e estruturais.

As adaptações fisiológicas, são definidas como as adaptações primárias e desencadeadas de forma rápida em resposta ao déficit hídrico (SHERRARD; MAHERALI; LATTA, 2009). Sendo representadas pelo fechamento estomático, que ocasionada redução da transpiração e limitando a entrada de CO<sub>2</sub>, reduzindo a taxa fotossintética, culminado em menor perda de água, comprovados em *U. humidicola* e *U. mutica* (MATTOS; GOMIDE; HUAMAN, 2005), em *Poa pratensis* (HU; WANG; HUANG, 2010). Outra resposta pode ser explicada pela menor atividade da Rubisco (HU; WANG; HUANG, 2010) e maior acúmulo de clorofila nas plantas (SHERRARD; MAHERALI; LATTA, 2009).

As modificações morfológicas ocorrem com o aumento do déficit hídrico, envolvem diminuição ou paralisação total do crescimento de caule e principalmente folhas (MATTOS; GOMIDE; HUAMAN, 2005; SOUZA; MATTA; FÁVERO, 2014), abortamento de folhas,

iniciando pelas as localizadas no terço inferior (PONSENS et al., 2010) e redução da área foliar e aumento da densidade do limbo foliar (SHERRARD; MAHERALI; LATTA, 2009).

As adaptações estruturais, são resultado das modificações morfológicas, ou seja, reduções drásticas na sua estrutura natural, representado por: redução no número de folhas (CARMO-SILVA et al., 2009), redução em altura de plantas e produção de massa seca (PONSENS et al., 2010), no comprimento foliar (SILVA et al., 2005) e no número final de perfilhos (COUSO et al., 2010).

Assim, podemos concluir que as gramíneas forrageiras possuem uma ampla gama de fatores dos quais fazem o uso para superar uma condição de déficit hídrico. Contudo, com exceção das adaptações fisiológicas, as demais causam variações de grande impacto, resultando em menor desenvolvimento, produtividade e qualidade da forragem. Assim, as técnicas que elevam a tolerância ao déficit hídrico, devem interferir nas adaptações fisiológicas que trazem menor impacto sobre o desempenho agrônomo da forrageira.

## **5. Métodos para elevar a tolerância ao déficit hídrico**

A busca por plantas resistentes/tolerantes ao déficit hídrico atualmente é grande desafio para o melhoramento genético. Sabe-se que é impossível fazer com que as plantas se desenvolvam sem a água, contudo, com o avanço dos estudos em fisiologia e melhoramento genético, é conhecido que pode-se manipular algumas condições nas plantas para elevar sua eficiência no uso da água.

Porém, esses conhecimentos são gerados primeiramente para as culturas que trazem grandes retornos econômicos, como o milho (MAKUMBI et al., 2011). Assim, o melhoramento genético ainda é a principal forma de se buscar uma tolerância ao déficit hídrico. Contudo, os ganhos são a longo prazo, e a necessidade de plantas tolerantes ao déficit hídrico é imediata (SOUZA; MATTA; FÁVERO, 2014). Assim, técnicas de manejo vem sendo estudadas e apresentando ganhos satisfatórios.

A técnica de manejo mais consagrada e amplamente utilizada, embora não tenha finalidade direta sobre a elevação da tolerância ao déficit hídrico, mas agindo de forma secundária é a semeadura direta (SILVA et al., 2009), que pelo não revolvimento do solo, manutenção de matéria vegetal na superfície do solo e incorporação gradativa de matéria orgânica, reduzem a evapotranspiração do solo (SOUZA et al., 2011; LIMA et al., 2013), elevando a disponibilidade de hídrica para as plantas por um maior período de tempo.

Outra forma, é o uso de hormônios vegetais exógenos, que regulam a abertura e fechamento estomático, como o ácido abscísico, que em condições adversas nas plantas se acumulam nas folhas e reduzem a perda de água (TARDIEU; PARENT; SIMONNEAU, 2010). Também pode-se citar o uso de hormônios como a auxina que auxiliam no desenvolvimento radicular (TAIZ; ZEIGER, 2013) e conseqüentemente aumentam a área de contato solo-raiz, favorecendo a absorção de água de camadas mais profundas do solo (CHIODEROLI et al., 2012), com maior disponibilidade hídrica (SERAFIM et al., 2013), em ambos os casos auxiliam na maximização na eficiência no uso da água nas plantas, que representa um indicativo na seleção de plantas tolerantes ao déficit hídrico (THAMEUR; LACHIHEB; FERCHICHI, 2012; ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013; HOSSAIN et al., 2014).

Outra técnica que pode resultar em elevação na tolerância é o uso de bactérias promotoras de crescimento, do gênero *Azospirillum*, visto a capacidade de excretar e incrementar a produção de fitohormônios vegetais, tais como auxina, giberelina e citocininas (CROZIER et al., 1988; BOTTINI et al., 1989; CACCIARI et al., 1989; KUSS et al., 2007; PERRIG et al., 2007). Também é relatado a produção de ácido abscísico (KOLB; MARTIN, 1985), principal hormônio ligado a tolerância a falta de água. Portanto, como esses hormônios elevam a eficiência no uso da água, interferem na tolerância ao déficit hídrico nas plantas.

Assim, algumas opções estão disponíveis para maximizar a eficiência no uso da água pelas plantas, contudo esses ganhos são de poucos dias (FIOREZE et al., 2013), e precisam serem melhores elucidados, principalmente no que diz respeito às gramíneas forrageiras, que recebem baixos investimentos em melhoramento genético.

## **6. Produção de espécies reativas de oxigênio em condições de déficit hídrico**

As espécies reativas de oxigênio (ERO's) são moléculas instáveis e extremamente reativas que possuem a capacidade de transformar outras moléculas, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos (BARBOSA et al., 2014). As ERO's são originadas em processos dependentes do oxigênio molecular ( $O_2$ ), como a respiração e a fotossíntese. As ERO's formadas a partir do  $O_2$ , podem ser do tipo superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radicais hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), tendo esse o maior poder de oxidação dos substratos orgânicos (ESTEVES; SUZUKI, 2008; ASHRAF, 2009). Desta forma, a planta procura evitar a formação da  $HO^{\bullet}$  e também das demais ERO's, para isso ela faz o uso de um sistema de enzimas antioxidativas (MITTLER, 2002), formadas em resposta a

estresses ambientais a qual a planta é submetida, dentro os quais podemos destacar o déficit hídrico.

Quando a planta sofre um déficit hídrico, tem início uma desordem fisiológica (SANTOS et al., 2014), principalmente do ponto de vista fotossintético (ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013), ocasionando uma sobra de  $O_2$  culminando na formação do  $O_2^{\bullet-}$ , ainda em condições de déficit hídrico ocorre a fotorrespiração que também resulta na formação de ERO's. Sendo os principais sítios de formação as mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, nas mitocôndrias a taxa de formação é reduzida, quando se compara aos demais sítios (BARBOSA et al., 2014).

Quando as ERO's são originadas as plantas utilizam seu mecanismo de enzimas antioxidantes, representado principalmente pela superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases (POD), principalmente (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). A SOD é a primeira linha de defesa vegetal, responsável pela dismutase do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ , entretanto o radical formado é mais reativo que o inicial, mas evita a formação das hidroxilas. Visto que a ação da SOD forma um radical ainda reativo, a planta utiliza as CAT e POD para a remoção do  $H_2O_2$ , liberando água e oxigênio. A diferença básica da ação dessas enzimas, é representada pois a CAT não necessita de um agente redutor para sua atividade, enquanto a POD necessita de um agente redutor (GILL; TUTEJA, 2010; BARBOSA et al., 2014).

Assim, vários trabalhos demonstram elevação na atividade das enzimas do estresse oxidativo em condições de déficit hídrico (AIMAR et al., 2014; AHMED et al., 2015; HENDGES et al., 2015; KUMAR et al., 2015). Contudo, sendo demonstrado em alguns momentos maior importância da SOD (LI et al., 2015), da POD (LIU; CHAN, 2015; NAWAZ et al., 2015) e outros com maior importância da CAT (CAMPOS et al., 2011; AIMAR et al., 2014). Embora o sistema de defesa das plantas seja eficiente, é prejudicado em condições de déficit hídrico severo (CAO et al., 2015), onde ocorre o rompimento da relação entre a atividade das enzimas antioxidativas e as remoção das ERO's, ficando a planta exposta a degradação de suas estruturas biológicas e conseqüentemente morte celular. Visto que a atividade dessas enzimas estão diretamente ligada com a condição hídrica das plantas (SHI et al., 2014), o aumento na eficiência do uso da água, resultará em um melhor balanço no sistema antioxidativo. Assim o uso de bactérias promotoras de crescimento, pode resultar em um melhor equilíbrio entre a produção de ERO's e a remoção das mesmas, pois possuem a capacidade de elevar a eficiência no uso da água nas plantas.

## 7. Utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal no gênero *Urochloa*

O gênero *Urochloa* ou (sinonímia – *Brachiaria*) é amplamente utilizado em toda a América Latina, devido sua elevada adaptabilidade ao clima tropical e ao sistema de integração lavoura-pecuária (MACEDO, 2009). Na pecuária se destaca devido ao grande potencial na produção de matéria seca total e residual, e adequada composição bromatológica com elevada palatabilidade (MARANHÃO et al., 2010). Devido a esses fatores o gênero representa no Brasil 85% das pastagens implantadas e/ou reformadas (SANTOS et al., 2009).

O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) em gramíneas está sendo amplamente pesquisado e vários relatos mostram resultados satisfatórios em culturas anuais como o milho (REIS Jr et al., 2008; QUADROS et al., 2014), trigo (PICCININ et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014) e arroz (RADWAN; MOHAMED; REIS, 2004; ANDREAZZA et al., 2013).

Sabe-se que naturalmente ocorre a associação de capins do gênero *Urochloa* com várias bactérias que possuem capacidade de promover o crescimento vegetal. No estudo de Reis Jr et al. (2004), foram identificadas espécies de BPCV associadas as raízes das espécies *U. brizantha*, *U. humidicola* e *U. decumbes*, com predomínio de *A. amazonense* na região do cerrado e de Mata Atlântica, sendo todas as BPCV possuindo a capacidade de produzir ácido indol-acético (AIA), também são relatados grande presença de bactérias pertencente ao gênero *Bacillus*, com capacidade de produção de AIA (ARAUJO; GUABERTO; SILVA, 2012). Um dos primeiros trabalhos desenvolvidos no Brasil pelo grupo de estudo de Joana Döbereiner, ainda quando se utilizava o *Azospirillum* como fixador de N atmosférico, em capins do gênero *Urochloa*, mostrou que a BCPV foi capaz de elevar a produtividade (MIRANDA; SEIFFERT; DÖBEREINER, 1985).

Embora a capacidade de interação entre as BCPV e o gênero *Urochloa* ocorra, as respostas em relação a produtividade vegetal, são divergentes. Respostas positivas são relatadas em *U. decumbes* onde o uso de BPCV propiciou acúmulo de N superior variando de 10% a 42%, resultando em maior massa seca da cultura, principalmente na estação seca do ano (SILVA et al., 2010), para Guimarães et al. (2011), o uso de BPCV do gênero *Azospirillum* resultou em maior massa seca, contudo inferior a adubação mineral. Em espécie de *Urochloa* no Pantanal – MS, são relatados incrementos em massa seca de folha e raiz com a combinação de *A. brasilense* e *A. lipoferum* (BRASIL et al., 2005). Por sua vez são relatados ausência de respostas em trabalhos envolvendo várias espécies de gramíneas forrageiras (MOREIRA et al.,

2014) e quando se utilizou o *Azospirillum* associado a adubação química e/ou mineral (PARREIRA et al., 2015).

Assim, a eficiência do uso de BPCV em gramíneas forrageiras requer maiores informações e estudos, para que se busque respostas concretas, visando maximizar a produtividade e a qualidade da forragem produzida.

## 8. Referências Bibliográficas

AHMED, I. M.; NADIRA, U. A.; BIBI, N.; CAO, F.; HE, X.; ZHANG, G.; WU, F. Secondary metabolism and antioxidants are involved in the tolerance to drought and salinity, separately and combined, in Tibetan wild barley. **Environmental and Experimental Botany**, v. 111, p. 1–12, 2015.

AIMAR, D.; CALAFAT, M.; ANDRADE, A. M.; CARASSAY, L.; BOUTEAU, F.; ABDALA, G.; MOLAS, M. L. Drought effects on the early development stages of *Panicum virgatum* L.: Cultivar differences. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 49–59, 2014.

ANDREAZZA, R.; KUSS, A. V.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S.; SANTOS, M. L.; KÖNIG, F.; DAHMER, S. F. B. Bactérias diazotróficas e vermicomposto como fontes alternativas de N para o arroz irrigado. **Ciência e Natura**, v. 35, n. 2, p. 15–23, 2013.

ARAUJO, F. F.; GUABERTO, L. M.; SILVA, I. F. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 3, p. 521–527, 2012.

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 84–93, 2009.

AZEVEDO, B. M.; BASTOS, F. G. C.; VIANA, T. V. A.; RÊGO, J. L.; D'ÁVILA, J. H. T. Efeitos de níveis de irrigação na cultura da melancia. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 1, p. 9–15, 2005.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins a1, a3, and iso-a3 in cultures of *Azospirillum lipoferuml*. **Plant Physiology**, v. 90, p. 45–47, 1989.

BRASIL, M. S.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M. Efeitos da inoculação

de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras do Pantanal. **Pasturas Tropicales**, v. 27, n. 3, p. 22–33, 2005.

CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v. 115, p. 151–153, 1989.

CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, K.; SOUZA, F. S.; MARUR, C. J.; PEREIRA, L. F. P.; FILHO, J. C. B.; VIEIRA, L. G. E. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic “Swingle” citrumelo plants over-accumulating proline. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 242–250, 2011.

CAO, B.; MA, Q.; ZHAO, Q.; WANG, L.; XU, K. Effects of silicon on absorbed light allocation, antioxidant enzymes and ultrastructure of chloroplasts in tomato leaves under simulated drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 53–62, 2015.

CARLESSO, R. Absorção de água pelas plantas: água disponível versus extraível e a produtividade das culturas. **Ciência Rural**, v. 25, n. 1, p. 183–188, 1995.

CARMO-SILVA, A. E.; FRANCISCO, A.; POWERS, S. J.; KEYS, A. J.; ASCENSAO, L.; PARRY, M. A. J.; ARRABACA, M. C. Grasses of different C4 subtypes reveal leaf traits related to drought tolerance in their natural habitats: Changes in structure, water potential, and amino acid content. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 7, p. 1222–1235, 2009.

CATUCHI, T. A.; VIEIRA, F.; GUIDORIZZI, C.; GUIDORIZZI, K. A. Respostas fisiológicas de cultivares de soja à adubação potássica sob diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 519–527, 2012.

CHIODEROLI, C. A.; MELLO, L. M. M.; GRIGOLLI, P. J.; FURLANI, C. E. A.; SILVA, J. O. R.; CESARIN, A. L. Atributos físicos do solo e produtividade de soja em sistema de consórcio milho e braquiária. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 1, p. 37–43, 2012.

COUSO, L. L.; GATTI, M. L.; CORNAGLIA, P. S.; SCHRAUF, G. E.; FERNÁNDEZ, R. J. Are more productive varieties of *Paspalum dilatatum* less tolerant to drought? **Grass and Forage Science**, v. 65, n.1, p. 296-303, 2010.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Related Indoles in Culture Medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2833–2837, 1988.

DARDEAU, F.; BERTHIER, A.; FEINARD-DURANCEAU, M.; BRIGNOLAS, F.;

- LAURANS, F.; LIEUTIER, F.; SALLÉ, A. Tree genotype modulates the effects of water deficit on a plant-manipulating aphid. **Forest Ecology and Management**, v. 353, n. 2, p. 118–125, 2015.
- ESTEVEES, S.; SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 662–679, 2008.
- FIOREZE, S. L.; RODRIGUES, J. D.; CARNEIRO, J. P. C.; SILVA, A. D. A.; LIMA, M. B. Fisiologia e produção da soja tratada com cinetina e cálcio sob deficit hídrico e sombreamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 11, p. 1432–1439, 2013.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.
- GUIMARÃES, S. L.; BONFIN-SILVA, E. M.; KROTH, B. E.; MOREIRA, J. F.; REZENDE, D. Crescimento e desenvolvimento inicial de *Bracharia decumbes* inoculada com *Azospirillum* spp. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 286–295, 2011.
- HENDGES, F. B.; RAMBO, C. R.; ALCASSA, L. P.; LIEBL, J.; VENDRUSCOLO, E. C. G.; COSTA, A. C. T. Avaliação enzimática e fisiológica de plântulas de milho submetidas à seca. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 2, p. 52–63, 2015.
- HOSSAIN, M. M.; LIU, X.; QI, X.; LAM, H.-M.; ZHANG, J. Differences between soybean genotypes in physiological response to sequential soil drying and rewetting. **The Crop Journal**, v. 15, n. 5, p. 1–15, 2014.
- HU, L.; WANG, Z.; HUANG, B. Diffusion limitations and metabolic factors associated with inhibition and recovery of photosynthesis from drought stress in a C<sub>3</sub> perennial grass species. **Physiologia Plantarum**, v. 139, n. 1, p. 93–106, 2010.
- KOLB, W.; MARTIN, P. Response of Plant Roots to Inoculation with *Azospirillum brasilense* and to Application of Indole Acetic Acid. In: **Azospirillum III**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1985. p. 215–221.
- KRAMER, P. J. Drought stress, and the origins of adaptations. In: TUNER, N. C.; KRAMER, P. J. (Ed.). **Adaptation of plants to water and high temperature stress**. New York: Wiley publ, 1980. p. 7–22.
- KUMAR, M. S. S.; ALI, K.; DAHUJA, A.; TYAGI, A. Plant physiology and biochemistry role of phytosterols in drought stress tolerance in rice. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 96, p. 83–89, 2015.
- KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária**

**Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459–1465, 2007.

LAUTERI, M.; HAWORTH, M.; SERRAJ, R.; MONTEVERDI, M. C.; CENTRITTO, M. Photosynthetic diffusional constraints affect yield in drought stressed rice cultivars during flowering. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109054, 2014.

LI, J.; CANG, Z.; JIAO, F.; BAI, X.; ZHANG, D.; ZHAI, R. Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, p. 1–7, 2015.

LIMA, M. D. B.; CARRIJO, M. S.; COSTA, K. A. P.; DAN, H. A.; SIMON, G. A. Water use efficiency in alfafa production under different irrigation managements. **Brazilian Journal of Irrigation and Drainage**, v. 17, n. 4, p. 448–455, 2012.

LIMA, R. A. S.; SILVA, S.; SANTOS, M. A. L.; NETO, J. D.; WANDERLEY, J. A. C.; ALVINO, F. C. G. Eficiência no uso da água por cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com e sem cobertura morta. **Agropecuária científica no semiárido**, v. 9, n. 3, p. 18–25, 2013.

LIU, X.; CHAN, Z. Application of potassium polyacrylate increases soil water status and improves growth of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) under drought stress condition. **Scientia Horticulturae**, 2015.

MACEDO, M. C. M. Integração lavoura e pecuária: o estado da arte e inovações tecnológicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. Supl. Especial, p. 133–146, 2009.

MAKUMBI, D.; BETRÁN, J. F.; BÄNZIGER, M.; RIBAUT, J.-M. Combining ability, heterosis and genetic diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) under stress and non-stress conditions. **Euphytica**, v. 180, n. 2, p. 143–162, 2011.

MARANHÃO, C. M. A.; BONOMO, P.; PIRES, A. J. V.; COSTA, A. C. P. R.; MARTINS, G. C. F.; CARDOSO, E. O. Características produtivas do capim-braquiária submetido a intervalos de cortes e adubação nitrogenada durante três estações. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, n. 4, p. 375–384, 2010.

MATTOS, J. L. S.; GOMIDE, J. A.; HUAMAN, C. A. M. Effect of water deficit on the growth of Brachiaria species in greenhouse. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 746–754, 2005.

MIRANDA, C. H. B.; SEIFFERT, N. F.; DÖBEREINER, J. Efeito de aplicação de molibdênio no número de Azospirillum e na produção de brachiaria decumbens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 5, p. 509–513, 1985.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

- MOREIRA, C. D. A.; PEREIRA, D. H.; COIMBRA, R. A.; MOREIRA, I. D. A. Germinação de Gramíneas Forrageiras em Função da Inoculação de Bactérias Diazotróficas. **Scientific Electronic Archives**, v. 6, n. 1, p. 90–96, 2014.
- NAWAZ, F.; AHMAD, R.; ASHRAF, M. Y.; WARAICH, E. A.; KHAN, S. Z. Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 113, p. 191–200, 2015.
- PARREIRA, L. H.; MARTINS, M. E. P.; RIBEIRO, M. M.; SENA JR, J. M. Efeito da bactéria *Azospirillum brasilense* na adubação química e orgânica em pastagens constituídas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 838–850, 2015.
- PERRIG, D.; BOIERO, M. L.; MASCIARELLI, O. a; PENNA, C.; RUIZ, O. a; CASSÁN, F. D.; LUNA, M. V. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143–50, 2007.
- PICCININ, G. G.; BRACCINI, A. L.; GOMES, L.; DAN, D. M.; LOLI, G.; HOSSA, K. R.; PONCE, R. M. Rendimento e desempenho agrônômico da cultura do trigo em manejo com *Azospirillum brasilense*. **Revista Agrarian**, v. 6, n. 22, p. 393–401, 2013.
- PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropedica: Edur, 2004.
- PONSENS, J.; HANSON, J.; SCHELLBERG, J.; MOESELER, B. M. Characterization of phenotypic diversity, yield and response to drought stress in a collection of Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth) accessions. **Field Crops Research**, v. 118, n. 1, p. 57–72, 2010.
- QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; OLIVEIRA CAMARGO, F. A. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014.
- RADWAN, T. E. S. E. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 987–994, 2004.
- REIS Jr, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 2, p. 103–113, 2004.
- REIS Jr, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio.

**Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 32, n. 1, p. 1139–1146, 2008.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123–130, 2003.

RODRIGUES, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B.; JUNIOR, A. S. P.; KLEIN, J.; COSTA, A. C. P. R. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 31–37, 2014.

ROSA, S. D. V. F.; VON PINHO, É. V. R.; VIEIRA, E. S. N.; VEIGA, R. D.; VEIGA, A. D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas lea associadas à tolerância de sementes milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 91–101, 2005.

SANTOS, D.; GUIMARÃES, V. F.; KLEIN, J.; FIOREZE, S. L.; MACEDO JÚNIOR, E. K. Cultivares de trigo submetidas a déficit hídrico no início do florescimento, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 8, p. 836–842, 2012.

SANTOS, L. C.; BONOMO, P.; SILVA, V. B.; PATÊS, N. M. S.; SILVA, C. C. F.; PIRES, A. J. V. Características morfogênicas de Braquiárias em resposta a diferentes adubações. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 2, 2009.

SANTOS, O. O.; FALCÃO, H.; ANTONINO, A. C. D.; LIMA, J. R. S.; LUSTOSA, B. M.; SANTOS, M. G. Desempenho ecofisiológico de milho, sorgo e braquiária sob déficit hídrico e reidratação. **Bragantia**, v. 73, n. 2, p. 203–212, 2014.

SERAFIM, M. E.; OLIVEIRA, G. C. De; LIMA, J. M.; SILVA, B. M.; ZEVIANI, W. M.; LIMA, V. M. P. Disponibilidade hídrica e distinção de ambientes para cultivo de cafeeiros. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 4, p. 362–370, 2013.

SHERRARD, M. E.; MAHERALI, H.; LATTA, R. G. Water stress alters the genetic architecture of functional traits associated with drought adaptation in *Avena barbata*. **Evolution**, v. 63, n. 3, p. 702–715, 2009.

SHI, H.; CHEN, L.; YE, T.; LIU, X.; DING, K.; CHAN, Z. Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 82, p. 209–217, 2014.

SILVA, A. A. da; GALON, L.; FERREIRA, F. A.; TIRONI, S. P.; FERREIRA, E. A.; SILVA, A. F.; ASPIAZÚ, I.; AGNES, E. L. Sistema de plantio direto na palhada e seu impacto na

- agricultura brasileira. **Ceres**, v. 56, n. 4, p. 496–506, 2009.
- SILVA, L. L. G. G.; ALVES, G. C.; RIBEIRO, J. R. A.; URQUIAGA, S.; SOUTO, S. M.; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 225, p. 21–30, 2010.
- SILVA, M. M. P.; VASQUEZ, H. M.; BRESSAN-SMITH, R. E.; SILVA, J. F. C.; ERBESDOBLER, E. D.; ANDRADE JR, P. S. C. Respostas morfogênicas de gramíneas forrageiras tropicais sob diferentes condições hídricas do solo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1493–1504, 2005.
- SILVA, R. A. B.; LIMA, J. R. D. S.; ANTONINO, A. C. D.; GONDIM, P. S. D. S.; SOUZA, E. S.; BARROS, G. Balanço hídrico em neossolo regolítico cultivado com braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf). **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 38, n. 1, p. 147–157, 2014.
- SINCLAIR, T.; LUDLOW, M. Influence of Soil Water Supply on the Plant Water Balance of Four Tropical Grain Legumes. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, n. 3, p. 329, 1986.
- SLAMA, I.; M'RABET, R.; KSOURI, R.; TALBI, O.; DEBEZ, A.; ABDELLEY, C. Water deficit stress applied only or combined with salinity affects physiological parameters and antioxidant capacity in *Sesuvium portulacastrum*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 213, n. 1, p. 69–76, 2015.
- SOUZA, A. P.; PEREIRA, J. B. A.; SILVA, L. D. B.; GUERRA, J. G. M.; CARVALHO, D. F. Evapotranspiração, coeficientes de cultivo e eficiência do uso da água da cultura do pimentão em diferentes sistemas de cultivo. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 1, p. 15–22, 2011.
- SOUZA, F. H. D.; MATTA, F. P.; FÁVERO, A. P. **Construção de ideótipos de gramíneas para usos diversos**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artemed, 2013.
- TARDIEU, F.; PARENT, B.; SIMONNEAU, T. Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non-hydraulic processes? **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 4, p. 636–47, 2010.
- THAMEUR, A.; LACHIHEB, B.; FERCHICHI, A. Drought effect on growth, gas exchange and yield, in two strains of local barley Ardhaoui, under water deficit conditions in southern Tunisia. **Journal of Environmental Management**, v. 113, n. 3, p. 495–500, 2012.
- ZHOU, Y.; LAMBRIDES, C. J.; FUKAI, S. Drought resistance of bermudagrass (*Cynodon* spp.) ecotypes collected from different climatic zones. **Environmental and Experimental Botany**, v. 85, n. 1, p. 22–29, 2013.

**CAPÍTULO II**

**RESTRIÇÃO FOTOSSINTÉTICA DE *Urochloa ruziziensis* INOCULADA COM  
*Azospirillum brasilense* SOB DÉFICIT HÍDRICO**

**PHOTOSYNTHETIC RESTRICTION *Urochloa ruziziensis* INOCULATED WITH  
*Azospirillum brasilense* UNDER DROUGHT**

**Resumo:** Objetivou-se avaliar a restrição fotossintética de *Urochloa ruziziensis* submetida a crescentes densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), inoculadas com *Azospirillum brasilense*, sob déficit hídrico e na reidratação. Utilizou-se um delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 2x2x13, representando a presença ou ausência da inoculação das sementes com *A. brasilense*; e déficit hídrico, e níveis de DFFFA: 0; 20; 40; 80; 150; 300; 400; 700; 900; 1200; 1600; 2000 e 2400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As avaliações foram realizadas em déficit hídrico moderado, severo e após a completa reidratação, determinado a taxa assimilatória líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), e eficiências no uso da água ( $WUE$  e  $WUE_i$ ). Os resultados mostraram que se inoculando *A. brasilense* em déficit hídrico moderado limita-se a  $g_s$  sem reduzir  $A$ , não ocorrendo essa limitação no tratamento controle, apresentando maior  $E$ . Em déficit severo o uso de *A. brasilense* possibilitou a manutenção da  $A$  com  $A_{\text{max}}$  de 4,45  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e menor ponto de compensação comparado ao controle. Na reidratação foi retomada  $A$  contudo *A. brasilense* voltou a limitar a  $g_s$ . Para as plantas mantidas irrigadas, não houve diferenças entre o comportamento dos tratamentos, em nenhuma das avaliações. Assim, o uso de *A. brasilense* atua sobre a  $g_s$ , tornando a planta mais tolerante ao déficit hídrico, e alcançando  $A$  positiva com menor luminosidade.

**Palavras Chaves:** Trocas gasosas, Densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, Ponto de compensação luminosa, Eficiência do uso da água

**Abstract:** Water deficit directly affects gas exchange, the *Azospirillum brasilense* acts as a promoter of plant growth, with answers in functions directly connected to the water deficit. The objective was to evaluate the photosynthetic restriction *Urochloa ruziziensis* subjected to photon flux densities photosynthetically active (PPFD), inoculated with *A. brasilense* under water deficit moderated and rehydration. We used a randomized block design in a factorial 2x2x13, representing the presence or absence of water stress and seed inoculation with *A. brasilense*, and levels of PPFD: 0; 20; 40; 80; 150; 300; 400; 700; 900; 1200; 1600; 2000 and 2400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The evaluations were performed in mild drought, severe and after complete rehydration, given the net assimilation rate of  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration ( $E$ ), and efficiencies in water use ( $WUE$  and  $WUE_i$ ). The results showed in mild drought that inoculating *A. brasilense* is limited to gas, without reducing  $A$ , when you do not inoculate this limitation does not occur with higher  $E$ . In severe deficit using *A. brasilense* enabled the maintenance of  $A$  with  $A_{\text{max}}$  4.45  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and less point compensation, the non-inoculated. In rehydration was taken up *A. brasilense*  $A$  the yet again, limit the  $g_s$ . For irrigated

held there is no difference between the behavior of treatments in any of the evaluations. Suggesting that the use of *A. brasilense* acts on the  $g_s$ , making the plant more tolerant to drought, and reaching  $A$  positive less light.

**Keywords:** Gas exchange, Photon flux density photosynthetically active, Point of light compensation, Water use efficiency

## 1. Introdução

Dentre os fatores abióticos que interferem na produtividade das culturas, destaca-se o déficit hídrico. Esta condição ocorre quando a planta não consegue repor a água perdida para a atmosfera (TAIZ; ZEIGER, 2013), acarretando em perda de turgescência e déficit em funções bioquímica e biofísicas básicas, como a fotossíntese, em casos severos inibindo tal atividade primordial (CHASTAIN et al., 2014).

As culturas perenes são mais afetadas pelo déficit hídrico frente as anuais, cultivadas em zoneamentos específicos que favorecem seu desenvolvimento. No caso das pastagens, além de serem cultivadas perenemente, apresentam o agravante de serem cultivadas em solos de baixa fertilidade natural, degradados e sem adubação mineral (BARCELLOS et al., 2008). O gênero *Urochloa* ocupa lugar de destaque dentre pastagens cultivadas, por possuírem elevada produção de matéria seca (MATTOS; GOMIDE; HUAMAN, 2005), níveis satisfatórios de proteína e fibras, além de ampla adaptabilidade aos mais diversos solos e climas (SOUZA; MATTA; FÁVERO, 2014).

A principal forma utilizada para elevar a tolerância ao déficit hídrico está no melhoramento genético, entretanto esse é um processo oneroso e lento, restringindo-se a culturas com maior valor agregado, como milho e soja. Contudo, relatados indicam que práticas de manejos podem elevar a tolerância das plantas ao déficit hídrico, pela maior capacidade de manutenção de água no solo, através de cobertura vegetal (SILVA et al., 2014), ou pela maior capacidade de exploração do solo (FERREIRA; KNUPP; MARTIN-DIDONET, 2014), ou ainda pela melhor nutrição e balanço hormonal da planta (FIOREZE et al., 2013).

Tendo em vista o exposto, o uso de bactérias promotoras de crescimento está sendo amplamente estudado, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Azospirillum* (PERRIG et al., 2007; GITTI et al., 2012), pois atuam na planta elevando as condições que levam a tolerância ao déficit hídrico. A inoculação de *A. brasilense* em plantas, resultam em incrementos no sistema radicular (DARTORA et al., 2013), na produção de massa seca (RODRIGUES et al., 2014), na produtividade das culturas (DARTORA et al., 2013), nas trocas gasosas

(INAGAKI et al., 2015) e no balanço hormonal. Mais recentemente foi demonstrado que essa bactéria também exerce uma importante função na planta, maximizando a capacidade da planta em tolerar ambientes salinos (SLAMA et al., 2015).

Outro ponto agravante em condições de déficit hídrico é a elevada luminosidade incidente, levando ao aumento da temperatura foliar, culminando em fechamento estomático ou ocasionando a degradação da clorofila, e conseqüentemente saturação ou redução da atividade fotossintética (CHAVARRIA et al., 2015).

Tendo em vista, as ações do *A. brasiliense* e as respostas positivas no desenvolvimento vegetal, objetivou-se avaliar a restrição fotossintética de *Urochloa ruziziensis* submetida a crescentes densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, inoculadas com *Azospirillum brasilense*, sob níveis de déficit hídrico e na reidratação das plantas.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Descrição da área experimental

O experimento foi conduzido em ambiente protegido, do tipo teto em forma de arco, coberto com filme de polietileno difusor de baixa densidade, com 150  $\mu$  espessura e proteção anti-UV, com laterais protegida com tela branca de 40% sombreamento, na estação experimental Professor Dr. Mário César Lopes, localizada nas coordenadas - 24°558'S e - 54°045'O, situada na Universidade Estadual do oeste do Paraná – UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, - Paraná, no período de 02 de fevereiro a 26 de abril de 2015. Foram utilizados vasos plásticos com capacidade nominal de 8,7 litros (altura: 23 cm; diâmetro superior: 26 cm; diâmetro inferior: 19 cm), que recebeu como substrato solo proveniente do horizonte A de LATOSSOLO VERMELHO Eutróferrico. O solo apresentava as seguintes características químicas: saturação de bases de 60,2%, pH de 5,5 e teor de matéria orgânica de 24,61 g dm<sup>-3</sup>, teor de P de 3,08 mg dm<sup>-3</sup> e K de 0,28 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, não sendo necessária a correção, com uma população natural de bactérias diazotróficas, determinada pelo método do número mais provável de 4 x 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> solo (DÖBEREINER, BALDANI, BALDANI, 1995).

### 2.2 Delineamento experimental

Foi adotado delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 2x2x13 com quatro repetições. O primeiro fator foi representado pela presença ou ausência da inoculação de *A. brasiliense* nas sementes, o segundo pela presença ou ausência do déficit hídrico e o terceiro

pelas densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) utilizados 0; 20; 40; 80; 150; 300; 400; 700; 900; 1200; 1600; 2000 e 2400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 2.3 Condução

Para a realização do experimento foram utilizadas sementes da espécie *U. ruziziensis*, sendo conduzidas duas plantas por vasos. A aplicação de *A. brasilense* estirpes AbV5 + AbV6 (produto comercial) nas sementes foi realizada na dose de 1 mL de inoculante ( $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) para cada 1000 sementes de *U. ruziziensis*, as quais foram homogeneizadas e mantidas à sombra por cerca de 30 minutos. Os vasos foram mantidos em capacidade de campo, com reposição diária de água. As plantas foram constantemente monitoradas, para garantir adequado desenvolvimento, não sendo realizada aplicação de nutrientes durante a condução do ensaio.

Quando as plantas alcançaram adequado desenvolvimento foliar, recomendado para o pastejo (45 dias após a semeadura), foi realizada a imposição do déficit hídrico. Para tanto, os vasos foram previamente irrigados até alcançarem a capacidade de campo. Os tratamentos destinados ao déficit hídrico tiveram sua irrigação suspensa, sendo mantidos em restrição hídrica até o momento em que ao menos as plantas de um tratamento atingiu taxa fotossintética próxima a zero. A partir desse momento as plantas foram reidratadas através do restabelecimento da capacidade de capacidade de campo do substrato. A reidratação foi avaliada até a recuperação da taxa fotossintética das plantas, próxima a condição inicial. Para a determinação dos estádios de avaliação e o momento da reidratação as plantas foram diariamente monitoradas determinando o teor relativo de água (SLAVIK, 1974) e umidade gravimétrica do solo em pré-dawn, além das trocas gasosas.

### 2.4 Trocas gasosas em função da DFFFA

As trocas gasosas em função dos diferentes níveis de luz foram determinadas em três momentos, sendo no quarto dia após a imposição do déficit hídrico, o qual caracterizou déficit hídrico moderado, no sexto dia após a imposição do déficit hídrico, déficit hídrico severo e três dias após a reidratação (Tabela 1). Para isso utilizando-se o equipamento IRGA (*Infra Red Gas Analyser*) modelo LI-6400XT (*Licor Inc. Lincoln, NE*). As leituras foram efetuadas pela manhã entre 09h00min e 11h00min utilizando teor de CO<sub>2</sub> de 380  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , realizadas em folhas completamente desenvolvidas, fotossinteticamente ativas e sem lesões, localizadas no terço médio.

Determinou-se a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*), taxa de transpiração da folha (*E*); condutância estomática (*gs*), além das seguintes relações:  $WUE = A/E$ ,  $iWUE = A/gs$

(ZHANG et al., 2001), em que  $WUE$  corresponde à eficiência do uso de água, e  $WUE_i$  à eficiência intrínseca do uso de água.

**Tabela 1:** Valores médios das condições hídricas foliares, do solo e ambientais no momento das avaliações de trocas gasosas em diferentes níveis de luz, em plantas de *U. ruziziensis* em condições de déficit hídrico, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.

Condição	Déficit moderado	Déficit severo	Reidratação
TRA em plantas em déficit hídrico (%)	86,91 $\pm$ 4,00	64,01 $\pm$ 1,88	91,97 $\pm$ 5,76
TRA em plantas sem déficit hídrico (%)	89,57 $\pm$ 5,02	94,50 $\pm$ 3,26	92,73 $\pm$ 11,40
UGS em déficit hídrico (%)	20,85 $\pm$ 1,91	17,49 $\pm$ 0,68	41,76 $\pm$ 3,23
UGS sem déficit hídrico (%)	43,37 $\pm$ 1,64	36,73 $\pm$ 2,94	38,88 $\pm$ 2,65
DPV (kPa)	1,07 $\pm$ 0,23	2,21 $\pm$ 0,45	1,88 $\pm$ 0,33
Temperatura (°C)	31,30 $\pm$ 1,83	34,15 $\pm$ 2,07	30,19 $\pm$ 2,40

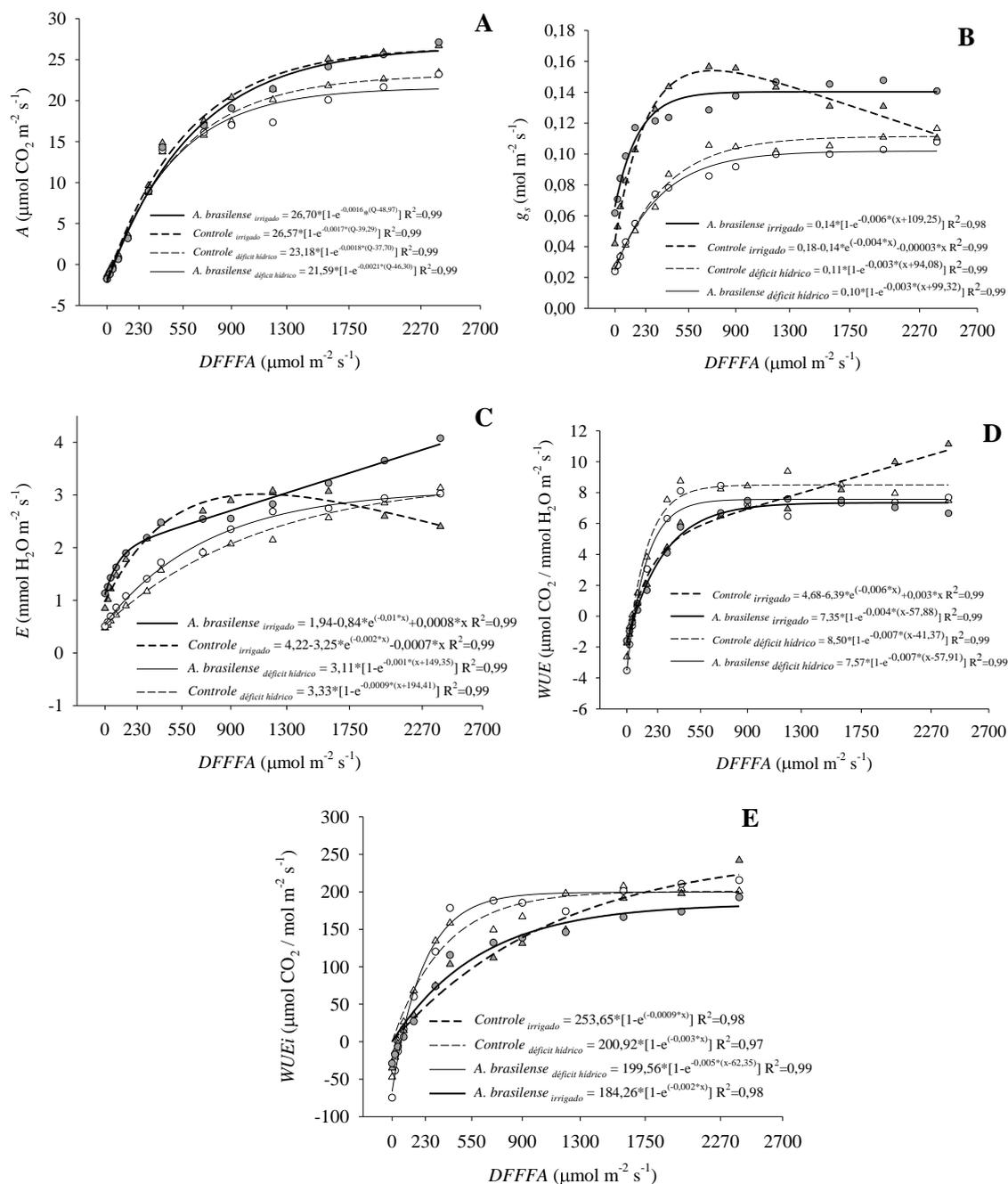
TRA: Teor Relativo de Água; UGS: Umidade Gravimétrica do solo; DPV: Diferença de Pressão de Vapor entre folha e atmosfera

### 2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), a 5% de probabilidade, e quando constada diferenças significativas as médias, foram ajustadas através de análise de regressões, sendo as equações escolhidas com base nos modelos significativos de elevado coeficiente de determinação. Para as curva de resposta de  $A$  em função da DFFFA, de 2400 até  $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , quando apresentaram ajustes significativo foi utilizado a equação:  $A = A_{\text{máx}} [1 - e^{-k(Q-I_c)}]$ , que permite estimar a assimilação líquida máxima ( $A_{\text{máx}}$ ), onde:  $k$  é uma constante e  $I_c$  é o ponto de compensação luminosa (PRADO; MORAES, 1997).

## 3. Resultados

Ao observar as trocas gasosas dentro da condição de déficit hídrico moderado, verificou-se o efeito significativo da interação entre a disponibilidade de água no solo e a DFFFA, sobre todas as variáveis de trocas gasosas de *U. ruziziensis* (Figura 1).



**Figura 1:** Trocas gasosas de *U. ruziziensis* na presen\u00e7a (s\u00edmbolos vazios) ou aus\u00eancia (s\u00edmbolos cheios) de d\u00e9ficit h\u00eddrico moderado, quando inoculadas ( $\text{---}\text{O}\text{---}$ ) ou n\u00e3o inoculada ( $\text{---}\Delta\text{---}$ ) com *A. brasilense* nas sementes, em respostas a densidades de fluxo de f\u00f3tons fotossinteticamente ativos, em Marechal C\u00e2ndido Rondon, Paran\u00e1, 2015.

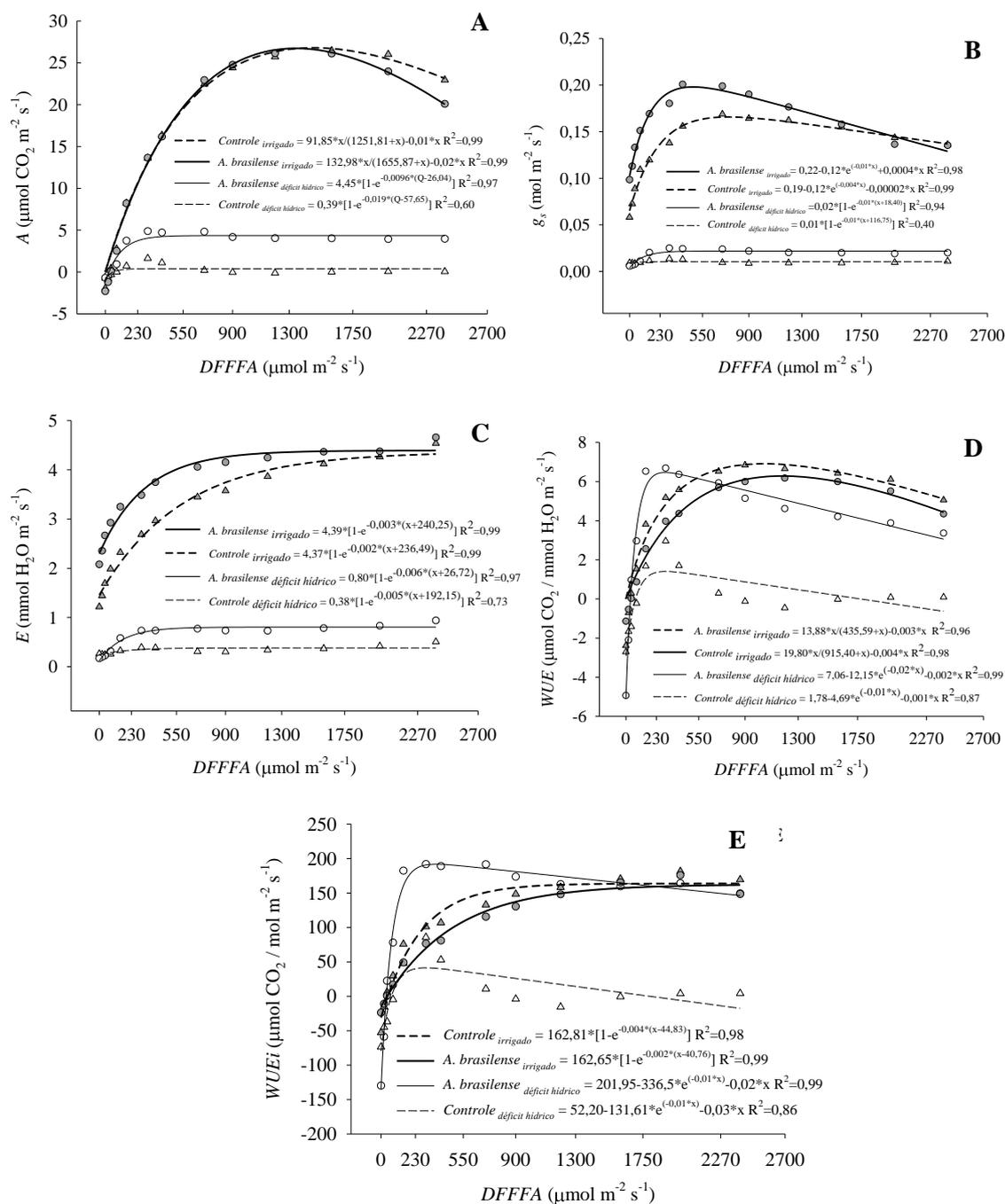
Na presen\u00e7a ou aus\u00eancia da inocula\u00e7\u00e3o das sementes com *A. brasilense* os valores de  $A$  aumentaram com o aumento da DFFFA at\u00e9  $2400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , contudo as plantas mantidas em d\u00e9ficit h\u00eddrico apresentaram menores valores de  $A$ , com pontos de compensa\u00e7\u00f5es entre  $37,70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $46,30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , com valores de  $A_{\text{max}}$  entre  $23,18 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a  $21,59 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Figura 1A). Ao avaliar o comportamento da condut\u00e2ncia estom\u00e1tica, as

plantas em restrição hídrica iniciaram uma limitação na abertura estomática (Figura 1B), correspondendo em redução da taxa transpiratória, sendo verificada ao observar a  $E$ , onde as plantas mantidas em restrição hídrica apresentaram menores valores (Figura 1C). Para o tratamento irrigado com inoculação de *A. brasilense* o comportamento de  $g_s$  foi exponencial, com estabilização em aproximadamente  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz. Contudo não foi observado estabilização para a  $E$  neste tratamento, o qual acompanhou positivamente a elevação na DFFFA. Entretanto o controle mantido irrigado apresentou um comportamento diferenciado, abrindo seus estômatos até  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sendo que em maiores níveis de DFFFA se iniciou o fechamento, limitando a transpiração, sem reduzir a taxa fotossintética (Figura 1A).

O comportamento de  $WUE$  e  $WUE_i$ , foram semelhantes entre si, tendo para as plantas mantidas sobre restrição hídrica maiores picos em menores valores de DFFFA. Para  $WUE$  ambos os tratamentos sob déficit tiveram seu pico em  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com posterior estabilização, enquanto o controle irrigado teve estabilização em  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e o *A. brasilense* elevou-se continuamente até  $2400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 1D). Para a  $WUE_i$  o controle e o *A. brasilense* tiveram seu pico em  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente, com posterior estabilização. Por sua vez, quando mantidos irrigados ambos elevaram sua taxa de  $WUE_i$  até o nível de  $2400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 1E).

Em condições de déficit hídrico severo novamente se verificou o efeito significativo da interação entre a disponibilidade de água no solo e a DFFFA, sobre todas as variáveis de trocas gasosas da *U. ruziziensis* (Figura 2).

As plantas mantidas em déficit hídrico apresentaram menores valores de  $A$ , sendo que a inoculação de *A. brasilense* na semente fez com que a planta mantivesse maior  $A$ , tendo ponto de compensações de  $26,40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  com  $A_{\text{max}}$  de  $4,45 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , enquanto o controle obteve ponto de compensações de  $57,65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  com  $A_{\text{max}}$  de  $0,39 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 2A). A condutância estomática seguiu os padrões obtidos para  $A$ , contudo na condição de déficit hídrico severo a inoculação de *A. brasilense* promoveu maior abertura estomática que o controle (Figura 2B), o mesmo teve maior valor de  $E$  (Figura 2C),  $WUE$  (Figura 2D) e  $WUE_i$  (Figura 2E), sendo para  $WUE$  e  $WUE_i$  semelhantes aos tratamentos mantidos irrigados.



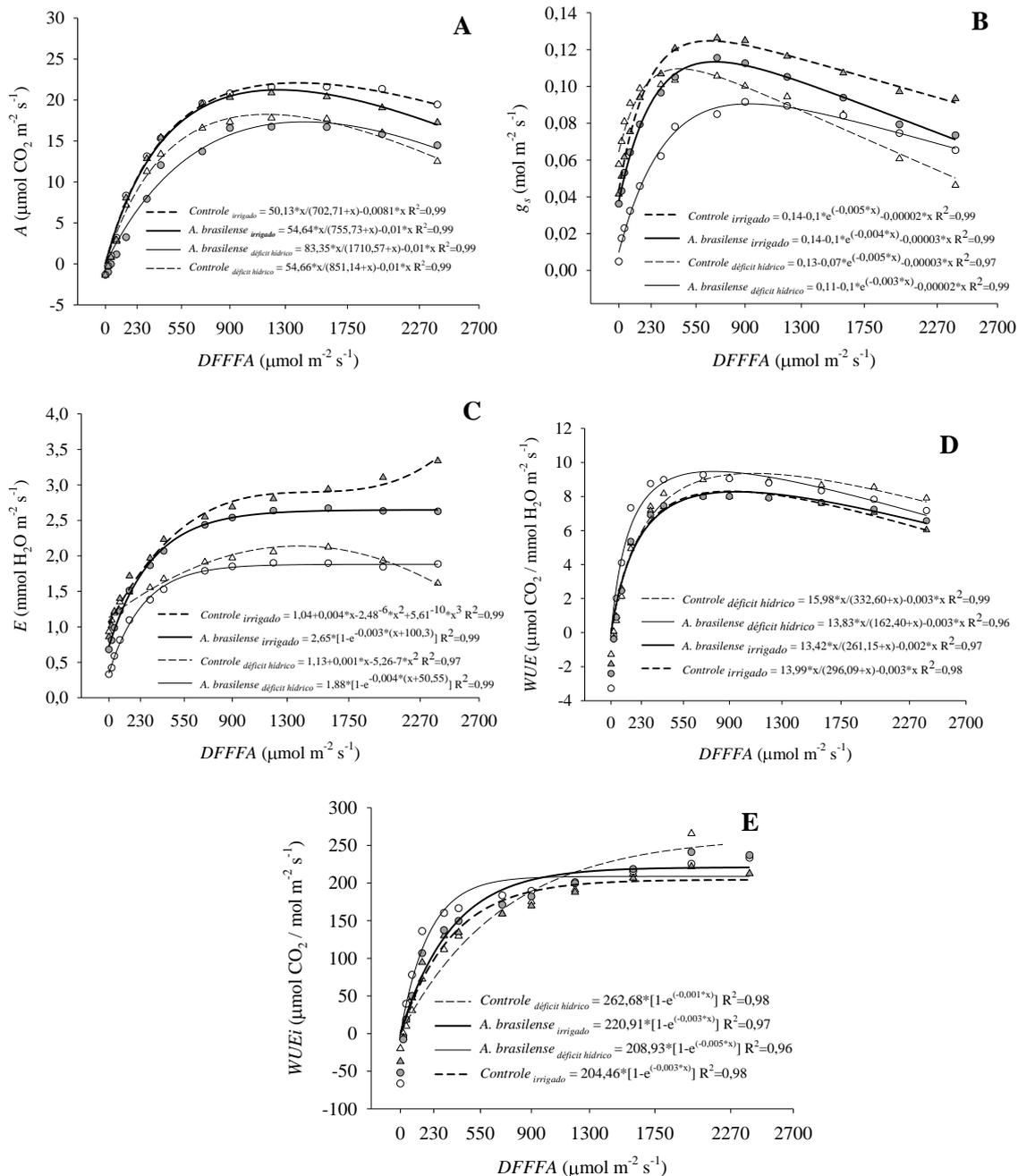
**Figura 2:** Trocas gasosas de *U. ruziziensis* na presença (símbolos vazios) ou ausência (símbolos cheios) de déficit hídrico severo, quando inoculadas (—○—) ou não inoculada (—△—) com *A. brasiliense* nas sementes, em respostas a densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.

O controle mantido sob restrição hídrica apresentou menores valores para todas as variáveis avaliadas, esse resultado está ligado ao obtido no déficit moderado (Figura 1), com o controle mantendo seus estômatos abertos favorecendo a perda de água para o ambiente, estando ainda associada as altas temperaturas, que levaram a maior evapotranspiração do

substrato, e rápida perda da água disponível tanto na planta quanto no solo, enquanto as plantas inoculadas com *A. brasilense* limitaram a perda de água na planta no déficit moderado até alcançarem o déficit severo, o que possibilitou os presentes resultados.

Para os tratamentos mantido irrigados, ao se observar  $A$ , ambos apresentaram comportamento semelhante, elevando suas taxas até os níveis de  $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com posterior queda (Figura 2A). Para a  $g_s$  e  $E$  foi observado que quando inoculou o *A. brasilense*, as plantas mantiveram os valores acima do controle, observando abertura estomática até  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 2B) e maiores taxas transpiratórias até  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 2C), propiciando maiores valores de  $WUE$  e  $WUE_i$  que o controle.

Após reestabelecimento da capacidade de campo e completa reidratação das plantas, não foram encontrados ajustes significativos para valores de  $A$  segundo o modelo proposto por (PRADO; MORAES, 1997), sendo verificado comportamento exponencial. O tratamento controle e inoculação de *A. brasilense* nas sementes tiveram seus valores de  $A$  completamente recuperados, tendo em alguns momentos superados até mesmos aqueles que foram mantidos irrigados, entretanto pode-se observar uma pequena queda no controle mantido sob restrição hídrica, a partir de  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 3A). Tal comportamento se relaciona com o maior fechamento estomático que o controle promoveu em valores acima de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de DFFFA, enquanto os tratamentos que foram mantidos irrigados durante todo o ciclo iniciaram o fechamento estomático com DFFFA próximo a  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 3B). Este mesmo evento também ocorreu com a inoculação de *A. brasilense* mantida sobre déficit hídrico, sendo novamente verificado que esse tratamento limitou a abertura estomática, mesmo tendo nesse momento água disponível, sem ter reduzido a fotossíntese.



**Figura 3:** Trocas gasosas de *U. ruziziensis* na presença (símbolos vazios) ou ausência (símbolos cheios) de déficit hídrico após a reidratação das plantas, quando inoculadas (—○—) ou não inoculada (—△—) com *A. brasilense* nas sementes, em respostas a densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos. em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.

Embora a fotossíntese tivesse sido completamente recuperada nos tratamentos que foram mantidos sob restrição hídrica, esses ainda limitavam a sua perda de água pela transpiração ( $E$ ), sendo obtido comportamento quadrático para o controle, e novamente exponencial para a inoculação de *A. brasilense*, estabilizando em  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Figura 3C). Embora foram observados comportamentos diferenciados para  $g_s$  e  $E$ , ressalta-se que o  $WUE$  e

*WUEi* apresentou-se semelhante para todos os tratamentos, independente da presença ou ausência do déficit hídrico, evidenciando que as plantas em déficit igualaram às mantidas irrigadas, principalmente por limitar sua perda de água.

#### 4. Discussões

As adaptações fisiológicas à restrição hídrica e às variações de luminosidades são importantes fatores que fazem com que as plantas tolerem o déficit hídrico por maior ou menor tempo (SOUZA; MATTA; FÁVERO, 2014), sendo citado que as variações das trocas gasosas são causadas pela luminosidade incidente e interceptada, somado com a capacidade de aproveitamento da luz e da água (PINZÓN-TORRES & SHIAVINATO, 2008).

O fato da presença de *A. brasilense* trazer respostas fisiológicas do ponto de vista de melhor aproveitamento da água (SWARTHOUT et al., 2009; INAGAKI et al., 2015), o qualifica como tratamento alternativo para elevar a tolerância das plantas ao déficit hídrico, com relação as variações fisiológicas (Figura 2 e 3).

O uso de fungos endofíticos como promotores de crescimento vegetal, assim como as bactérias da espécie *A. brasilense*, promoveram maior eficiência no uso da água e maior controle estomático em grama festuca, sob estresse hídrico, quando avaliadas aos 21 dias após a retirada da irrigação (SWARTHOUT et al., 2009). Os mesmos autores sugerem ainda, que esse mecanismo de controle estomático por parte de fungos endofíticos deve ser melhor estudado.

Não há conhecimento sobre o que está diretamente ligado com a regulação estomática quando se utiliza promotores de crescimento, mas sabe-se que a abertura e fechamento estomático sofrem influência de vários fatores, como turgidez da planta, metabolismo bioquímico e hormonal, temperatura, umidade relativa do ar e luminosidade incidente (TAIZ; ZEIGER, 2013), sendo os ligados ao ambiente não podendo ser modificados pelos microrganismos. Desta forma, especula-se que o metabolismo bioquímico e/ou hormonal, exercem influência sobre a regulação estomática. O *A. brasilense* possui capacidade de produzir e excretar hormônios vegetais principalmente auxinas (KUSS et al., 2007), além de citocininas e giberelinas (PERRIG et al., 2007). Desta forma, são relatados incrementos nos níveis de auxinas e crescimento radicular de plantas, mesmo em condições de déficit hídrico (PERES; ZSÖGÖN; KERBAUY, 2009). Outro ponto relevante está na competição do substrato precursor do etileno, que atua nas plantas como um inibidor de desenvolvimento radicular (TAIZ; ZEIGER, 2013). Portanto, a regulação estomática no caso do uso de *A. brasilense* está

relacionada com os níveis hormonais que modulam o crescimento radicular, mesmo em solo seco, possibilitando maior exploração do substrato pela água nele contida.

As altas taxas fotossintéticas, obtidas para as plantas mantidas irrigadas em todas as avaliações, se relacionam com a eficiência fotossintética da *U. ruziziensis*, sendo essa uma C<sub>4</sub> com elevada capacidade fotossintética e muito responsiva a elevação da luminosidade, quando em condições adequadas (Figura 1A, 2A, 3A) e/ou com moderado restrição hídrica (Figura 1A). As variações encontradas para *A* em condições de déficit moderado, mostram que as plantas estavam respondendo ao ambiente de cultivo, ou seja, a falta de água, visto que a adaptação fisiológica é rápida (ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013; SOUZA; MATTA; FÁVERO, 2014). No déficit severo a fotossíntese foi limitada drasticamente, sendo uma das causas a necessidade de quebra da molécula de água para a excitação eletrônica, liberando os elétrons que são utilizados como aceptores iniciais na produção de ATP (TAIZ; ZEIGER, 2013). Entretanto o uso de *A. brasilense* sob déficit hídrico severo fez com que as plantas tivessem maior valor de  $A_{\max}$  4,45  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , ligado ao maior teor relativo de água (65,05%) das plantas inoculadas com *A. brasilense*, frente ao controle (49,47%).

O comportamento obtido para a transpiração das plantas, é resposta direta do comportamento da condutância estomática, visto que essas são duas características que apresentam forte correlação positiva (MATTOS; GOMIDE; HUAMAN, 2005). A planta, quando em maiores níveis de luminosidade e água disponível, tende a aumentar sua transpiração, gerando uma diferença de potencial água entre a planta e o solo, possibilitando a entrada de água, mantendo o fluxo constante dentro dos vasos condutores e, conseqüentemente, a turgidez, além de garantir também adequada nutrição mineral. Outro ponto importante no processo transpiratório é o resfriamento foliar, garantindo abertura estomática para entrada de CO<sub>2</sub> e manutenção da fotossíntese (PIMENTEL, 2004). Esse fato explica o comportamento semelhante da curva de *E* com a de *g<sub>s</sub>* e *A*. Quando em condições de déficit hídrico severo, a transpiração foi aproximadamente zero no tratamento controle (Figura 1C), desta modo a folha não era resfriada, impedindo a abertura estomática (Figura 1B) e reduzindo a fotossíntese (Figura 1A), enquanto quando se utilizou *A. brasilense*, a água foi utilizada pelo vegetal de forma moderada antecedendo o déficit severo, possibilitando melhores resultados.

Quando se observa a *WUE* e *WUE<sub>i</sub>*, comprova-se que o uso do *A. brasilense* eleva a tolerância da *U. ruziziensis* ao déficit hídrico, elevando a eficiência do uso da água de forma a superar, em alguns momentos, o encontrado para as plantas constantemente irrigadas, mesmo quando em déficit severo (Figura 2D e 2E). A avaliação dessas variáveis são de importância, pois plantas que apresentam maiores eficiência em utilizar a água, são mais tolerantes ao déficit

hídrico (THAMEUR; LACHIHEB; FERCHICHI, 2012; ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013; HOSSAIN et al., 2014).

Ao se observar os níveis de luz incidentes, esses exerceram influência na condutância estomática das plantas, mantidas sobre restrição hídrica moderada e na reidratação, por volta de  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , enquanto em déficit severo ocorreu em torno de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Em ensaios com luminosidade natural, foi observado em amendoim, uma  $C_3$ , limitação estomática por volta de  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mas continuando elevar a fotossíntese (ERISMANN; MACHADO; DE GODOY, 2006). Em cana-de-açúcar, uma  $C_4$ , também são demonstradas limitações da  $g_s$  em níveis semelhantes de luminosidade (MACHADO et al., 2013). Vale ressaltar que em condições médias de cultivo são citados valores de DFFFA próximos a  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , incidente nas horas mais quentes do dia (ERISMANN; MACHADO; DE GODOY, 2006). Estas constatações evidenciam que o uso de *A. brasilense* não antecipa o fechamento estomático, mas mantém os estômatos fechados após determinado nível de luz, que em condições de déficit moderado está abaixo das plantas controle (Figura 1B). Mojzes & Kalapos (2008), estudando plantas invasoras  $C_4$ , pertencentes à família das poaceae, também relatam menor abertura estomática, quando se eleva a DFFFA, contudo também relatam que essa não reduziu a fotossíntese, sugerindo que essa resposta a luz se dá por um processo evolutivo das gramíneas invasoras/forageiras.

Nas plantas mantidas constantemente irrigadas e as em déficit hídrico moderado, *A* foi estabilizada em aproximadamente  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em todas as avaliações, semelhante aos relatados de  $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em *Sorghum halepense* (MOJZES; KALAPOs, 2008), uma planta próxima a *Urochloa*. Em amendoim são relatados pontos de máxima fotossíntese com  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (ERISMANN; MACHADO; DE GODOY, 2006), em soja com  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (CHAVARRIA et al., 2015) e citros com  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (HABERMANN et al., 2003), evidenciando que os  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em condições adequadas segue os padrões das demais culturas. Tais valores são explicados pela fotoinibição dinâmica ou protetora da fotossíntese, para que não ocorra prejuízo no aparato fotossintético.

Em déficit hídrico severo, o *A. brasilense* na semente responde mais à luminosidade que o controle (Figura 1A), sendo saturada em  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Com a falta de água a fotoinibição ocorre antecipadamente, devido aos mecanismos de defesa da planta ao excesso de luz estarem desorganizados e/ou em menor número.

A reidratação por três dias foi suficiente para que as trocas gasosas de *U. ruziziensis* fossem recuperadas, algumas plantas necessitam de um maior período para tal recuperação, chamado de “efeito residual do déficit hídrico” (MANSFIELD; DAVIES, 1985), não sendo

observada variações entre o controle e o *A. brasilense* que foram mantidos em déficit hídrico. Estas evidências reforçam que a inoculação traz respostas mais pronunciadas quando a planta passa por um estresse, nesse caso, o déficit hídrico, pois tem-se desequilíbrio no metabolismo da planta, assim os efeitos hormonais e de promoção de crescimento do *A. brasilense* passam a serem mais pronunciados, e evidenciam melhor condição da planta para desenvolver-se. Confirma-se a ausência de resposta pronunciada na ausência do déficit hídrico quando se observa os tratamentos irrigados, que apresentaram comportamento semelhante entre si.

Assim, pode-se considerar que o comportamento apresentado nas plantas inoculadas com *A. brasilense*, no déficit hídrico moderado, refletiu no comportamento sob déficit severo, possibilitando as plantas a manter maior taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, e maior capacidade de utilização da água disponível. Estas observações evidenciam que a inoculação de *A. brasilense* exerce uma espécie de sinalização para que se produza mais compostos que atuam no déficit hídrico como o ácido abscísico, ocasionando um fechamento dos estômatos mais rapidamente em condições de déficit moderado, assim a planta se mantém fisiologicamente ativa por um maior período. Mesmo após a reidratação a inoculação de *A. brasilense* limitou a gs nas plantas que sofreram déficit hídrico, sugerindo maior controle da abertura estomática por parte da planta, evitando transpiração excessiva, mesmo quando a água no solo está prontamente disponível, sem interferir na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>.

## 5. Conclusões

A inoculação de *A. brasilense* limita a abertura estomática das plantas de *U. ruziziensis* em condições de déficit hídrico moderado a partir da densidade de 700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sem reduzir sua taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>.

Em déficit hídrico severo a inoculação de *A. brasilense* eleva a fotossíntese, mantendo os estômatos abertos até 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , necessitando menor luminosidade 26,40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para atingir fotossíntese positiva  $A_{\text{max}}$  de 4,45  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

A inoculação de *A. brasilense* limita a abertura estomática após a reidratação das plantas, na densidade de 700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sendo que as plantas mantidas em déficit recuperam sua fotossíntese, contudo, elas ainda restringiam a perda de água pela transpiração, culminando em eficiência do uso da água semelhante as das plantas mantidas irrigadas.

O uso da inoculação com *A. brasilense* torna a planta mais tolerante ao déficit hídrico em relação aos diferentes níveis de luminosidade empregados, principalmente quando em

condições de déficit severo, onde ela passa a ter fotossíntese positiva com menor densidade de fótons.

## 7. Referências

BARCELLOS, A. O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G. B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. Suplemento Especial, p. 51–67, 2008.

CHASTAIN, D. R.; SNIDER, J. L.; COLLINS, G. D.; PERRY, C. D.; WHITAKER, J.; BYRD, S. a. Water deficit in field-grown *Gossypium hirsutum* primarily limits net photosynthesis by decreasing stomatal conductance, increasing photorespiration, and increasing the ratio of dark respiration to gross photosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 17, p. 1576–1585, 2014.

CHAVARRIA, G.; DURIGON, M. R.; KLEIN, V. A.; KLEBER, H. Restrição fotossintética de plantas de soja sob variação de disponibilidade hídrica. **Ciência Rural**, v. 45, n. 8, p. 1387–1393, 2015.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; PINTO JUNIOR, A. S.; CRUZ, L. M.; MENSCH, R. Influência do tratamento de sementes no desenvolvimento inicial de plântulas de milho e trigo inoculados com *Azospirillum brasilense*. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 3, p. 175–181, 2013.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L.D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Embrapa Agrobiologia, Brasília. 60p.

ERISMANN, N. D. M.; MACHADO, E. C.; DE GODOY, I. J. Capacidade fotossintética de genótipos de amendoim em ambiente natural e controlado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1099–1108, 2006.

FERREIRA, E. P. de B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience journal**, v. 30, n. 3, p. 655–665, 2014.

FIGUEIREDO, S. L.; RODRIGUES, J. D.; CARNEIRO, J. P. C.; SILVA, A. D. A.; LIMA, M. B. Fisiologia e produção da soja tratada com cinetina e cálcio sob déficit hídrico e sombreamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 11, p. 1432–1439, 2013.

GITTI, D. D. C.; ARF, O.; PORTUGAL, J. R.; CORSINI, D. C. D. C.; RODRIGUES, R. A. F.; KANEKO, F. H. Coberturas vegetais, doses de nitrogênio e inoculação de sementes com

*Azospirillum brasilense* em arroz de terras altas no sistema plantio direto. **Bragantia**, v. 71, n. 4, p. 509–517, 2012.

HABERMANN, G.; MACHADO, E. C.; RODRIGUES, J. D.; MEDINA, C. L. CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthetic light response curves, and water relations of “Pêra” sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, n. 2, p. 79–87, 2003.

HOSSAIN, M. M.; LIU, X.; QI, X.; LAM, H.-M.; ZHANG, J. Differences between soybean genotypes in physiological response to sequential soil drying and rewetting. **The Crop Journal**, v. 15, n. 5, p. 1–15, out. 2014.

INAGAKI, A. M.; GUIMARÃES, V. F.; LANA, C.; KLEIN, J.; ANDRÉIA CRISTINA RODRIGUES, P.; FERNANDO, L.; RODRIGUES, O. S.; RAMPIM, L. Maize initial growth with the inoculation of plant growth-promoting bacteria (PGPB) under different soil acidity levels. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 4, p. 271–280, 2015.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459–1465, 2007.

MACHADO, D. F. S. P.; ANDRADE LAGÔA, A. M. M.; RIBEIRO, R. V.; RIBEIRO MARCHIORI, P. E.; MACHADO, R. S.; MACHADO, E. C. Baixa temperatura noturna e deficiência hídrica na fotossíntese de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 487–495, 2013.

MANSFIELD, T. A.; DAVIES, W. J. Mechanisms for leaf control of gas exchange. **BioScience**, v. 35, n. 3, p. 158–164, 1985.

MATTOS, J. L. S.; GOMIDE, J. A.; HUAMAN, C. A. M. Effect of water deficit on the growth of Brachiaria species in greenhouse. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 746–754, 2005.

MOJZES, A.; KALAPOS, T. Leaf gas exchange responses to abrupt changes in light intensity for two invasive and two non-invasive C<sub>4</sub> grass species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64, n. 3, p. 232–238, 2008.

PERES, L. E. P.; ZSÖGÖN, A.; KERBAUY, G. B. Abscisic acid and auxin accumulation in *Catsetum fimbriatum* roots growing in vitro with high sucrose and mannitol content. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 3, p. 560–564, set. 2009.

PERRIG, D.; BOIERO, M. L.; MASCIARELLI, O. A.; PENNA, C.; RUIZ, O. A.; CASSÁN, F. D.; LUNA, M. V. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically

important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143–50, 2007.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropedica: Edur, 2004.

PINZÓN-TORRES, J. A.; SHIAVINATO, M. A. Crescimento , eficiência fotossintética e eficiência do uso da água em quatro espécies de leguminosas arbóreas tropicais. **Hoehnea**, v. 35, n. 3, p. 395–404, 2008.

PRADO, C. H. B. A.; MORAES, J. A. P. V. Photosynthetic capacity and specific leaf mass in twenty woody species of cerrado vegetation under field condition. **Photosynthetica**, v. 33, n. 1, p. 103–112, 1997.

RODRIGUES, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B.; JUNIOR, A. S. P.; KLEIN, J.; COSTA, A. C. P. R. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 31–37, 2014.

SILVA, R. A. B.; LIMA, J. R. D. S.; ANTONINO, A. C. D.; GONDIM, P. S. D. S.; DE SOUZA, E. S.; BARROS, G. Balanço hídrico em neossolo regolítico cultivado com braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf). **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 38, n. 1, p. 147–157, 2014.

SLAMA, I.; M'RABET, R.; KSOURI, R.; TALBI, O.; DEBEZ, A.; ABDELLEY, C. Water deficit stress applied only or combined with salinity affects physiological parameters and antioxidant capacity in *Sesuvium portulacastrum*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 213, n. 1, p. 69–76, 2015.

SLAVIK, B. **Methods of studying plant water relations**. Berlin: Springer, 1974. 452p

SOUZA, F. H. D.; MATTA, F. P.; FÁVERO, A. P. **Construção de ideótipos de gramíneas para usos diversos**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2014.

SWARTHOUT, D.; HARPER, E.; JUDD, S.; GONTHIER, D.; SHYNE, R.; STOWE, T.; BULTMAN, T. Measures of leaf-level water-use efficiency in drought stressed endophyte infected and non-infected tall fescue grasses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 1, p. 88–93, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artemed, 2013.

THAMEUR, A.; LACHIHEB, B.; FERCHICHI, A. Drought effect on growth, gas exchange and yield, in two strains of local barley Ardhaoui, under water deficit conditions in southern Tunisia. **Journal of Environmental Management**, v. 113, n. 3, p. 495–500, 2012.

ZHANG, S.; LI, Q.; MA, K.; CHEN, L. Temperature-dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO<sub>2</sub> assimilation of quercus liaotungensis under midday high irradiance. **Photosynthetica**, v. 39, n. 3, p. 383–388, 2001.

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

### CAPÍTULO III

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Urochloa ruziziensis* INOCULADAS COM  
*Azospirillum brasilense* SOBRE O DÉFICIT HÍDRICO SEVERO**

**PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF *Urochloa ruziziensis* INOCULATED WITH  
*Azospirillum brasilense* ON THE SEVERE WATER DEFICIT**

**Resumo:** A água exerce suma importância nos sistemas produtivos, sendo uma das principais limitações para a produção de forragem, mesmo as gramíneas forrageiras apresentando tolerância ao déficit hídrico. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar a tolerância de *U. ruziziensis* cultivada em condições de déficit hídrico severo induzido e sua recuperação quando reidratada, pelas respostas, de teor de água, tolerância protoplasmática e trocas gasosas da cultura. Para isso foi utilizado um delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial 4x2, onde o primeiro fator representou as formas de inoculação sendo: controle; inoculação de *A. brasilense* via semente; aplicação de *A. brasilense* via foliar; inoculação de *A. brasilense* via semente mais aplicação foliar, e o segundo a presença e ausência do déficit hídrico. A imposição do déficit hídrico foi realizada 45 dias após a semeadura, sendo avaliada a umidade gravimétrica do solo, teor relativo de água foliar, tolerância protoplasmática, além das trocas gasosas da cultura. A umidade do solo não apresentou variação dentro dos tratamentos, contudo o teor relativo de água foi inferior no controle, não sendo observados maiores variações na tolerância protoplasmática. Ao observar as trocas gasosas, o controle e a inoculação de *A. brasilense* via sementes apresentaram menores valores. A recuperação da atividade fotossintética das plantas ocorreu após três dias para todos os tratamentos. Assim, o uso de *A. brasilense* via foliar no perfilhamento eleva a tolerância da *U. ruziziensis* ao déficit hídrico, enquanto em condições irrigadas o *A. brasilense* não interfere no teor relativo de água e nas trocas gasosas.

**Palavras Chaves:** bactérias promotoras de crescimento; gramíneas forrageiras; teor relativo de água; trocas gasosas.

**Abstract:** The water has great importance within the productive systems, one of the main constraints for the production of forage, even the grasses showing tolerance to drought. Thus, this study aimed to evaluate the tolerance of *U. ruziziensis* grown in severe water deficit conditions induced and recovery when rehydrated, the responses of water content, protoplasmic tolerance and gas exchange of culture. For this we used a randomized block design, in 4x2 factorial scheme, where the first factor represented forms of inoculation being: control; inoculation of *A. brasilense* seed; application *A. brasilense* foliar; inoculation of *A. brasilense* seed more foliar application, and to the presence and absence of water deficit. The imposition of drought was held 45 days after sowing, being evaluated gravimetric soil moisture on the leaf water content, protoplasmic tolerance in addition to the gas exchange of the culture. Soil water content did not change within the treatments, yet the relative water content was lower in control, not being observed major changes in the protoplasmic tolerance. By observing the gas exchange

control and inoculation of *A. brasilense* via seeds had lower values. The recovery of the photosynthetic activity of the plants occurred after three days for all treatments. Thus, the use of *A. brasilense* on leaves at tillering increases the tolerance of *U. ruziziensis* to drought, while in irrigated conditions *A. brasilense* not interfere with the relative water content and gas exchange.

**Keywords:** promoting bacteria growth; forage grasses; gas exchange; relative water content.

## 1. Introdução

A água é um elemento de suma importância dentro dos sistemas produtivos, Nos vegetais a água pode representar cerca de 90% da massa fresca (AZEVEDO et al., 2005). Em culturas anuais e pastagens essa representatividade varia de acordo com o estágio de desenvolvimento da cultura, 40% a 80% (LIMA et al., 2012).

O déficit hídrico ocorre quando a taxa de transpiração da planta, excede a taxa de absorção de água do solo (TAIZ; ZEIGER, 2013). A sua ocorrência leva a um desequilíbrio fisiológico da planta (FIOREZE et al., 2013), desencadeando uma série de reações como a redução na produção de forragem, de grãos e em casos extremos a morte de órgãos ou na totalidade da planta (SOUZA et al., 2014).

As pastagens possuem em seus ideótipos características que lhe garantem resistência ao déficit hídrico, através de adaptações morfológicas e fisiológicas (SOUZA et al., 2014). No Brasil as pastagens ocupam a maior parte da área agrícola nacional, e são responsáveis pela manutenção dos rebanhos nacionais. Nesse cenário destacam-se as gramíneas, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*), representando cerca de 80% das pastagens plantadas e/ou reformadas (CARVALHO et al., 2011). Contudo, geralmente são cultivadas em solos de baixa fertilidade, em áreas declivosas e com dificuldade de mecanização, o que levam essas dependerem das precipitações naturais, que são irregulares (MARANHÃO et al., 2010).

Desta forma, o efeito do déficit hídrico foi demonstrado em várias gramíneas forrageiras, causando redução do desenvolvimento, principalmente pela restrição da expansão foliar, aumento da senescência foliar e diminuição da emissão de perfilhos. Mattos et al. (2005), relataram o efeito do déficit hídrico sobre pastagens do gênero *Urochloa*. Também demonstraram redução no desenvolvimento do gênero *Cynodon* cultivado sobre restrição hídrica (SILVA et al., 2005; ZHOU et al., 2013).

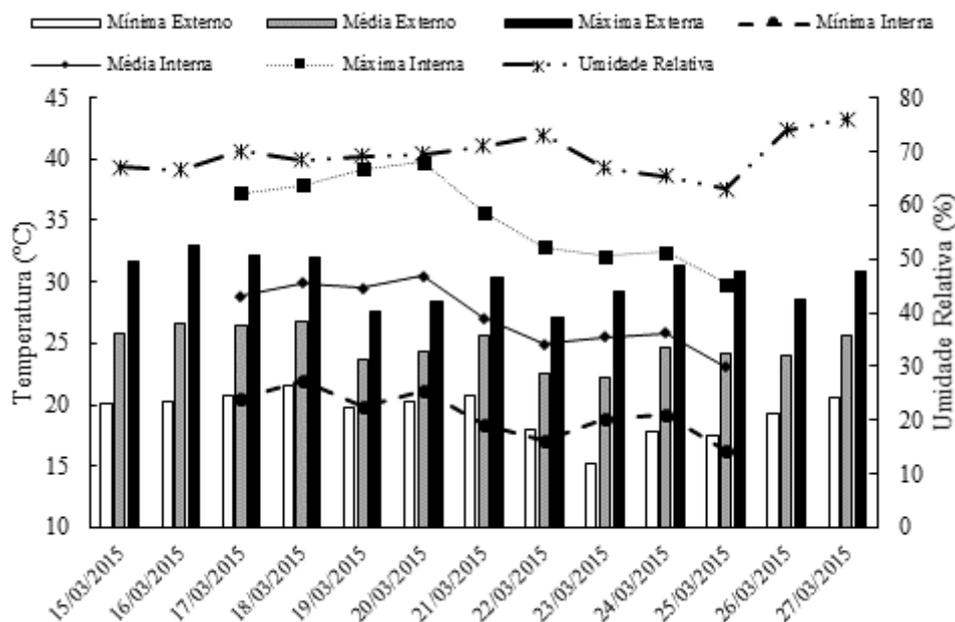
Vários estudos buscam formas de elevar a tolerância hídrica das culturas, basicamente via o melhoramento genético. Contudo, a aplicação de bactérias promotoras de crescimento, elevam a tolerância das plantas ao déficit hídrico em condição de campo. Entre essas o *Azospirillum brasilense* se destaca, sendo amplamente empregado em diversas culturas (DARTORA et al., 2013; BULEGON et al., 2014; QUADROS et al., 2014). Entre os efeitos proporcionados está a produção de hormônios vegetais (KUSS et al., 2007), estímulos no desenvolvimento radicular e aumento de massa seca de parte aérea (DARTORA et al., 2013), incrementos na fotossíntese (KASCHUK et al., 2012) e na produtividade das culturas (QUADROS et al., 2014). Sendo em grande parte esses resultados associado ao melhor aproveitamento dos recursos produtivos, como a água.

Assim, como o *A. brasilense* maximiza o uso dos recursos produtivos, como o água, objetivou-se avaliar a tolerância de *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense* e cultivada em condições de déficit hídrico severo induzido e sua recuperação quando reidratada, pelas respostas, de teor de água, tolerância protoplasmáticas e as trocas gasosas da cultura.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Descrição da área experimental

O experimento foi conduzido em ambiente protegido, do tipo teto em forma de arco, coberto com filme de polietileno difusor de baixa densidade, com 150  $\mu$  espessura e proteção anti-UV, com laterais protegida com tela branca de 40% sombreamento, na estação experimental Professor Dr. Mário César Lopes, localizada nas coordenadas - 24°558'S e - 54°045'O, situada na Universidade Estadual do oeste do Paraná – UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, - Paraná, no período de 02 de fevereiro a 26 de abril de 2015. Foram utilizados vasos plásticos com capacidade nominal de 8,7 litros (altura: 23 cm; diâmetro superior: 26 cm; diâmetro inferior: 19 cm), que recebeu como substrato solo proveniente do horizonte A de LATOSSOLO VERMELHO Eutróferrico. O solo apresentava as seguintes características químicas: saturação de bases de 60,2%, pH de 5,5 e teor de matéria orgânica de 24,61 g dm<sup>-3</sup>, teor de P de 3,08 mg dm<sup>-3</sup> e K de 0,28 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, não sendo necessária a correção, com uma população natural de bactérias diazotróficas, determinada pelo método do número mais provável de 4 x 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> solo (DÖBEREINER, BALDANI, BALDANI, 1995).



**Figura 4:** Condição de temperatura e umidade relativa durante a imposição do déficit hídrico, barras verticais indicam as temperaturas ambiente, e linhas indicam as temperaturas internas da casa de vegetação, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.

## 2.2 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido sobre o delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial 4x2, onde o primeiro fator foi representado pelas formas de aplicação de *A. brasilense* estirpes AbV5 e AbV6 (produto comercial) sendo elas: sementes, aplicação foliar e semente mais aplicação foliar com um tratamento controle. O segundo fator foi representado pela presença ou ausência do déficit hídrico, com quatro repetições, totalizando 32 parcelas experimentais.

## 2.3 Condução

Para a realização do experimento foram utilizadas sementes da espécie *U. ruziziensis*, conduzidas duas plantas por vasos. A aplicação de *A. brasilense* estirpes AbV5 e AbV6 nas sementes foi realizada na dose de 1 mL de inoculante ( $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) para cada 1000 sementes, as quais foram homogeneizadas e mantidas a sombra por cerca de 30 minutos, e após semeadas. Após a semeadura os vasos foram mantidos em capacidade de campo, com reposição diária de água. A aplicação de *A. brasilense* estirpes AbV5 e AbV6 foliar foi realizada quando as plantas se encontravam no início do perfilhamento, o que representou 20 dias após a

semeadura, fazendo o uso de uma dose de 300 mL de inoculante por hectare e um volume de calda de 300 L ha<sup>-1</sup>, com auxílio de um pulverizador costal de CO<sub>2</sub> com pressão constante, equipado com pontas Magno 11002 ADGA, espaçadas em 0,5 m, a pressão de 40 kgf cm<sup>-2</sup> realizada de forma noturna.

As plantas foram constantemente monitoradas, para garantir adequado desenvolvimento, não sendo realizada aplicação de nutrientes durante a condução do ensaio.

Aos 45 dias após a semeadura (DAS), onde as plantas encontravam-se em um estágio de desenvolvimento foliar adequado, recomendado para pastejo, foi realizada a imposição do déficit hídrico. Para isso todos os vasos foram previamente irrigados até alcançarem a capacidade de campo. Os tratamentos destinados ao déficit hídrico tiveram sua irrigação suspensa sendo mantidos em restrição hídrica até o momento em que as plantas em pelo menos um tratamento alcançou taxa fotossintética próxima a zero. A partir desse momento as plantas foram reidratadas, sendo os vasos irrigados até alcançarem a capacidade de campo. A reidratação foi avaliada até o momento que as plantas recuperassem sua taxa fotossintética próxima a condição inicial. Nos tratamentos sem restrição hídrica os vasos foram irrigados periodicamente com suprimento adequado de água.

#### *2.4 Determinação da umidade gravimétrica do solo*

Foi avaliada diariamente em pré-dawn retirando-se uma amostra do perfil do solo contido em cada vaso, que foi pesada no momento da coleta (U1), após foram levadas para secagem em estufa de circulação forçada de ar a 105°C, por 24 horas, sendo posteriormente pesadas o solo seco (U2), sendo a umidade gravimétrica obtida pela fórmula:

$$UG \text{ (kg kg}^{-1}\text{)} = \frac{U1-U2}{U2}$$

#### *2.5 Determinação do teor relativo de água (TRA)*

A determinação do TRA foi realizada diariamente em pré-dawn coletando-se amostras foliares de 1,5 cm<sup>2</sup> as quais foram pesadas no momento da coleta (MF), sendo posteriormente colocadas em placas de petri com água destilada, e levadas para B.O.D. por seis horas a 25°C para ocorrer a saturação das amostras foliares. Os discos tiveram sua superfície secas e pesados para obter a massa fresca turgida (MFT) e posteriormente levados a estufa de circulação forçada de ar a 65°C até obterem peso constante, para a determinação da massa seca (MS) (SLAVIK 1974). Sendo o TRA calculado pela equação:

$$\text{TRA (\%)} = \frac{(\text{MF} - \text{MS})}{(\text{MFT} - \text{MS})} \times 100$$

### 2.6 Tolerância protoplasmática

Segmentos foliares de 1,5 cm<sup>2</sup> foram coletados no quarto e no sexto dia após a suspensão da irrigação, e também no terceiro dia após a reidratação. Primeiramente, foi medido a condutividade elétrica (CE1) com condutivímetro, nos segmentos coletados e lavados em água destiladas, imersos em 50 mL de água destilada e deionizada, e em seguida acondicionados em B.O.D. a 25°C por 24 horas. Após realizada os beckers foram vedados com papel alumínio e foram levados para banho maria a 100°C por 1 hora, deixado esfriar em temperatura ambiente até alcançar 25°C, procedeu-se assim avaliação de uma nova leitura de condutividade elétrica (CE2). A partir destes dados foi determinado a porcentagem de integridade absoluta (PIA) e relativa (PIR) (BLUM; EBERCON, 1981). Sendo a PIA e PIR calculado pela equação:

$$\text{PIA (\%)} = 1 - \frac{\text{CE1}}{\text{CE2}} \quad \text{PIR (\%)} = \frac{\text{PIA de plantas irrigadas}}{\text{PIA de plantas estressadas}}$$

### 2.7 Trocas gasosas

Para verificar o estresse imposto as trocas gasosas foram determinadas diariamente utilizando-se o equipamento IRGA (*Infra Red Gas Analyser*) modelo LI-6400XT (*Licor Inc. Lincoln, NE*). As leituras foram efetuadas pela manhã entre 09h00min e 11h00min utilizando teor de CO<sub>2</sub> de 380 μmol mol<sup>-1</sup>, sendo a avaliação realizadas em folhas completamente desenvolvidas, fotossinteticamente ativas e sem lesões, localizadas no terço médio.

Determinou-se a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*), taxa de transpiração da folha (*E*); condutância estomática (*gs*), concentração interna de CO<sub>2</sub> (*Ci*), além das seguintes relações:  $WUE = A/E$ ,  $iWUE = A/gs$  (ZHANG et al., 2001), em que *WUE* corresponde à eficiência do uso de água e *iWUE* é a eficiência intrínseca do uso de água.

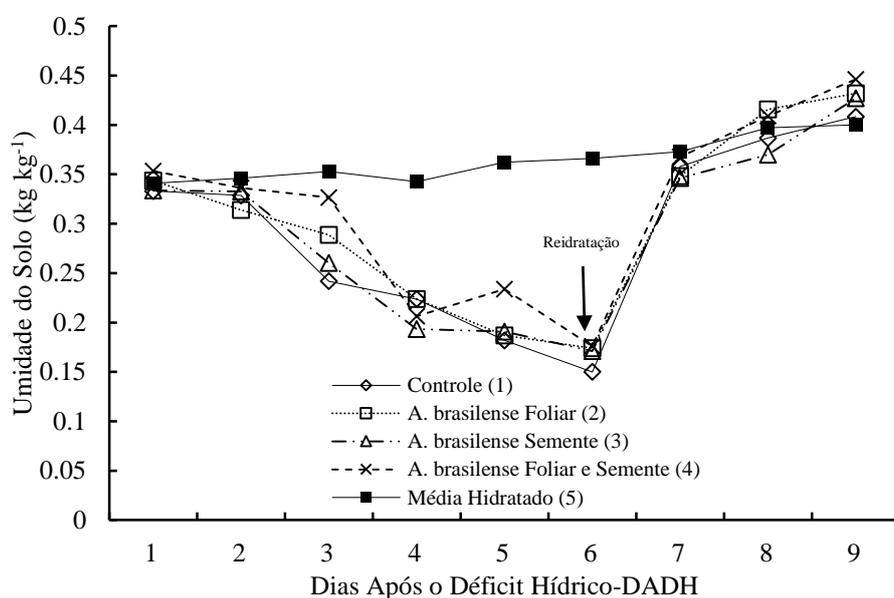
### 2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada para cada dia avaliado através do teste F, e quando pertinente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). Contudo como não ocorreram efeitos significativos dos tratamentos quando mantidos irrigados foram apenas demonstradas suas médias gerais. Para as comparações das médias foram considerados apenas os dias em que os efeitos do déficit hídrico foram pronunciados, dentro de cada tratamento.

### 3. Resultados

#### 3.1 Umidade gravimétrica do solo

Para a umidade do solo os tratamentos que foram mantidos irrigados tiveram teor de água sempre acima dos  $0,3 \text{ kg kg}^{-1}$ , não apresentado quedas nesses valores. No entanto, os tratamentos mantidos em déficit hídrico, os valores de umidade de solo começaram a decair de  $0,3 \text{ kg kg}^{-1}$  no terceiro dia após a retirada da água e teve menor valor no sexto dia para o tratamento controle com valor de  $0,15 \text{ kg kg}^{-1}$ , enquanto as plantas que receberam inoculações de *A. brasilense* tiveram valores superiores (Figura 5). Após a reidratação, a umidade rapidamente foi recuperada (Figura 5).

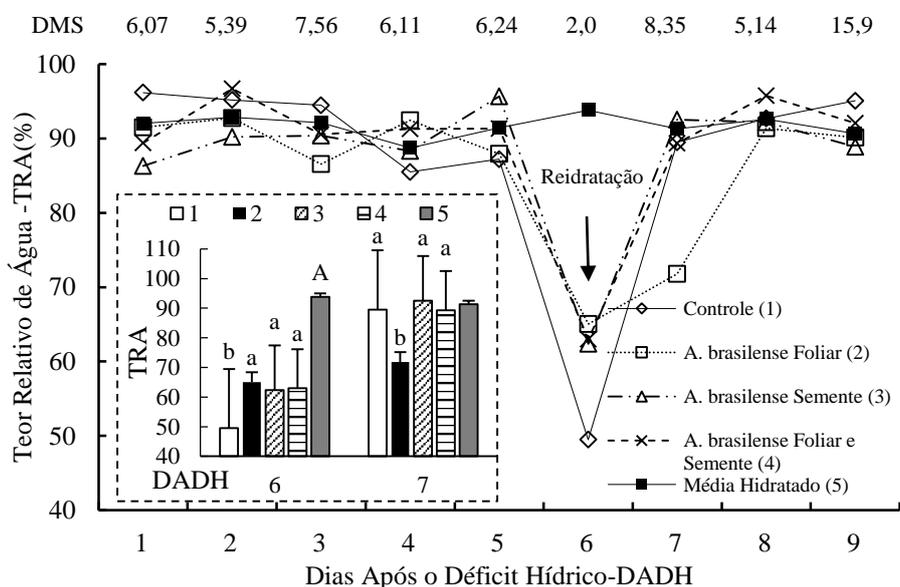


**Figura 5:** Umidade gravimétrica do solo cultivado com plantas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.

### 3.2 Teor relativo de água e tolerância protoplasmática

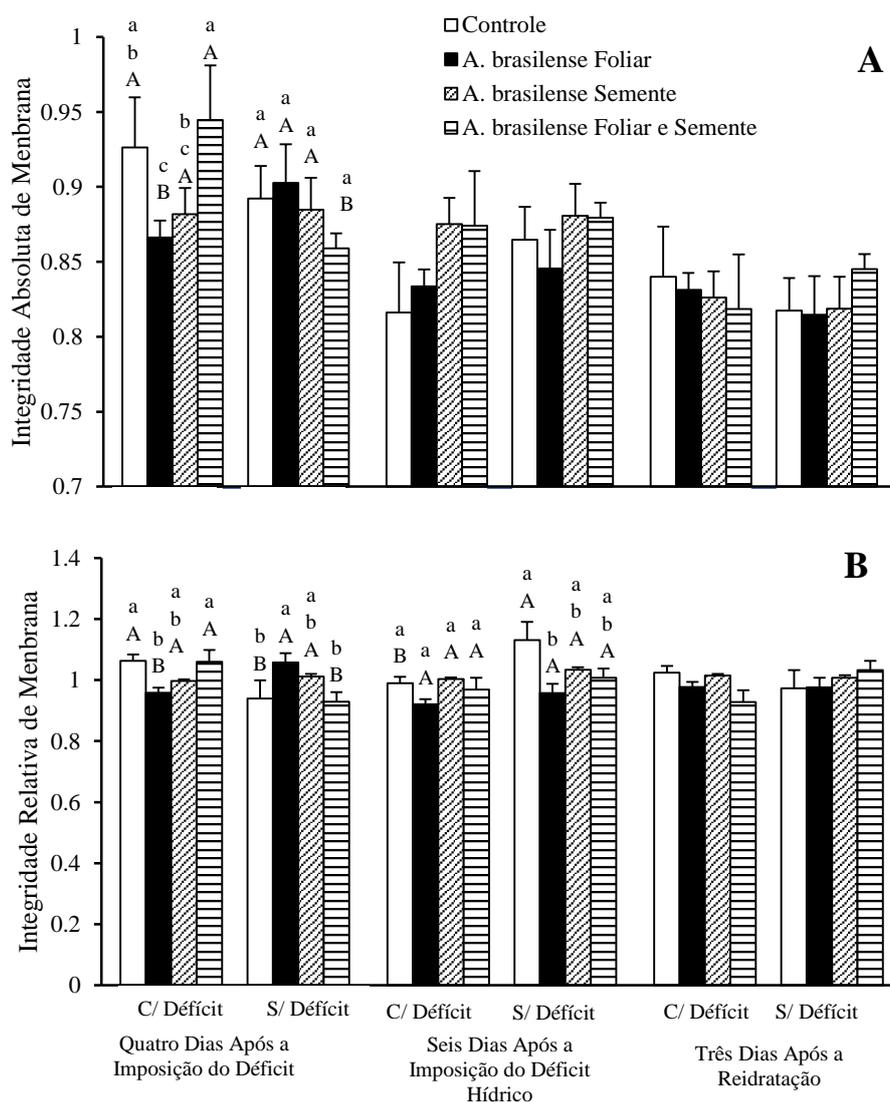
O teor relativo de água (TRA) encontrado nas plantas apresentou pequenas variações entre os tratamentos até o quinto dia, sendo em alguns momentos verificado que as plantas mantidas em déficit hídrico tiveram maiores médias quando comparadas com as irrigadas. As maiores variações foram obtidas no sexto dia e sétimo dia, momento antes da reidratação e um dia após a reidratação, respectivamente. No sexto dia as plantas do tratamento controle possuíam um teor de água de 49,47%, enquanto as que receberam a inoculação com *A. brasilense* via sementes apresentou TRA de 62,37%, via foliar de 65,05% e via semente mais foliar de 62,96%, o que representou uma superioridade de 26,07%, 27,26% e 31,49% quando comparada ao controle, respectivamente (Figura 6). Por sua vez, as plantas mantidas sobre irrigação obtiveram TRA médio de 93,79%.

Após a reidratação das plantas o TRA foi recuperado no primeiro dia para o controle, assim como para o tratamento com *A. brasilense* na semente e semente mais foliar, sendo estes semelhantes à média das plantas irrigadas. No entanto, na inoculação de *A. brasilense* foliar o TRA não foi recuperado na totalidade no primeiro dia após a reidratação, entretanto, já apresentava 71,80%, sendo que, a totalidade foi obtida no segundo dia após a reidratação, igualando os demais tratamentos.



**Figura 6:** Teor relativo de água de plantas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. \* Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos; Letras maiúsculas indicam que os tratamentos irrigados foram diferentes aos não irrigados; DMS: diferença mínima significativa para cada dia.

Para a integridade absoluta de membrana (PIA) foram obtidos efeitos significativos da interação dos fatores no quarto dia após a imposição do déficit hídrico, não sendo verificado efeitos significativo no sexto dia após a imposição do déficit hídrico e três dias após a reidratação (Figura 7A). Foi observado que a inoculação via semente mais foliar tiveram maiores médias quando mantidas sobre restrição hídrica, mas sem diferenciar do controle, visto que, a inoculação nas sementes e foliar diminuíram a PIA, em 4,34% e 6,52%, quando comparado ao controle, respectivamente.



**Figura 7:** Integridade Absoluta de Membrana – PIA (A) e Integridade Relativa de Membrana – PIR (B) de plantas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. \*Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos dentro do mesmo fator; Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos nos diferentes fatores.

Os tratamentos aplicados não causaram variação na PIA dentro das plantas irrigadas. Quando se observa a presença e ausência do déficit hídrico foi obtido superioridade do controle e da inoculação semente mais foliar mantidas em déficit hídrico de 10,86% e 9,57% quando comparados a seus respectivos na condição sem déficit hídrico. Por sua vez, a inoculação foliar com *A. brasilense* com déficit hídrico promoveram menores valores de PIA.

Embora não encontrado efeito significativos no sexto dia após a imposição do déficit hídrico, é possível verificar que o tratamento controle em déficit hídrico teve uma menor PIA, mostrando que as membranas sofreram danos devido ao severo déficit hídrico. Enquanto que as plantas inoculadas com *A. brasilense* via semente e semente mais foliar tiveram valor de PIA semelhantes que as plantas sem déficit hídrico (Figura 7A).

A integridade relativa de membrana (PIR) apresentou diferença significativa para o quarto e o sexto dia após a imposição do déficit hídrico, não sendo observado efeito três dias após a reidratação. No quarto dia, a inoculação foliar de *A. brasilense* obteve menor PIR quando comparada aos demais tratamentos em déficit hídrico e também quando comparada ao seu tratamento irrigado. Nas plantas mantidas irrigadas o controle e a inoculação via semente mais foliar promoveram menor PIR (Figura 7B).

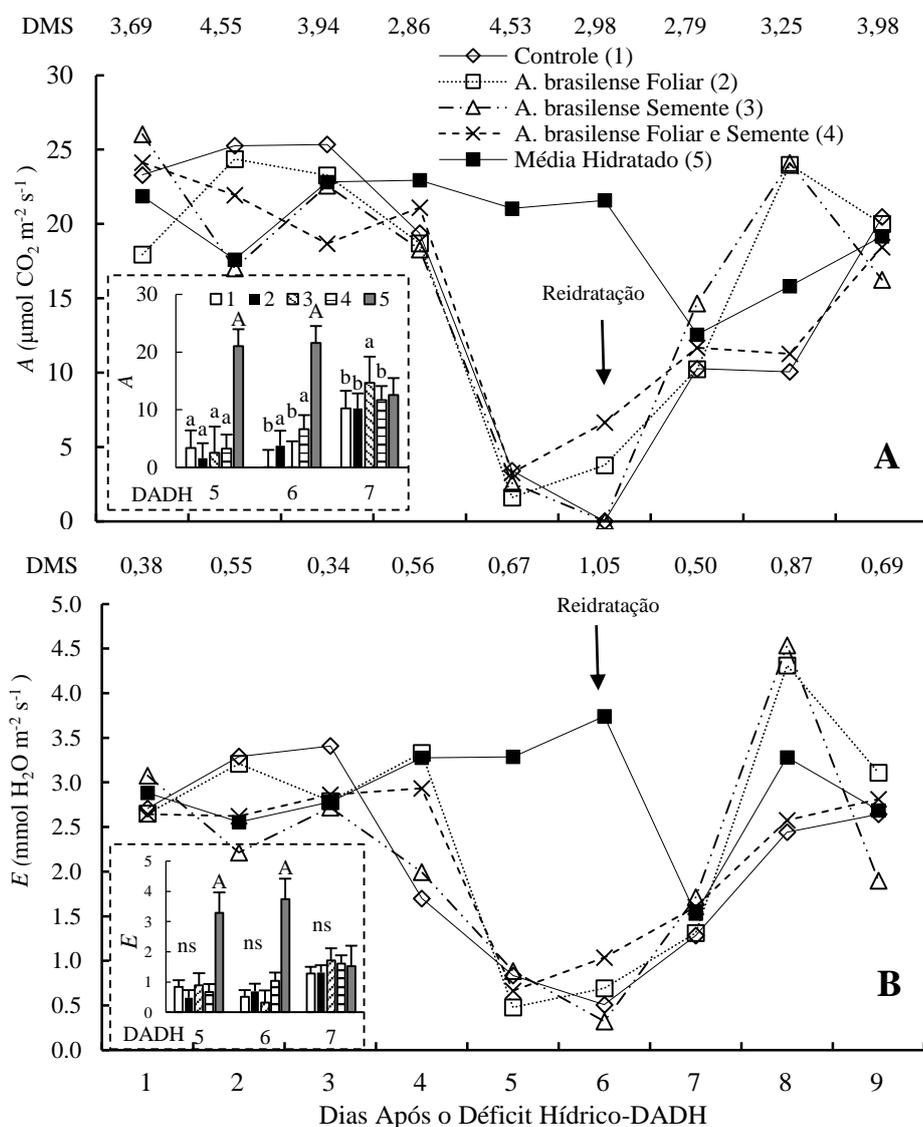
No sexto dia não foi observada diferença dos tratamentos sobre a PIR das plantas mantidas em déficit hídrico. Nas plantas mantidas irrigadas foi observado maior valor de PIR para o controle, contudo sem diferenciar da inoculação via semente e sementes mais foliar. O controle promoveu maior PIR quando mantido irrigado, enquanto os demais tratamentos não variaram entre si.

### 3.3 Trocas gasosas

As trocas gasosas da *U. ruziziensis* sofreram alterações pelos tratamentos empregados. A taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*), sofreu variações ocasionadas pelas condições climáticas nos quatro primeiros dias, sendo verificado diferenças diárias, contudo, os resultados foram variados.

As plantas apresentaram os primeiros sintomas da falta de água no quinto dia após a imposição do déficit hídrico, onde *A* apresentou queda acentuada, de aproximadamente 18 μmol CO<sub>3</sub> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, para cerca de 3 μmol CO<sub>3</sub> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> não sendo obtida diferença entre os tratamentos em ambos os dias. No sexto dia após a imposição do déficit hídrico, as plantas do tratamento controle e inoculação na semente com *A. brasilense* tiveram sua *A* praticamente zerada, apresentando 0,015 μmol CO<sub>3</sub> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> e μmol CO<sub>3</sub> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente. Por sua vez, as plantas

que foram inoculadas com *A. brasilense* foliar ou na semente mais foliar tiveram valores de  $A$  de  $3,77 \pm 3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $6,65 \pm 3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente (Figura 8A). Do ponto de vista fotossintético, isso remete que o *A. brasilense* aplicado de forma foliar é mais eficiente quando as plantas estão em deficiência hídrica.



**Figura 8:** Taxa de Assimilação Líquida de CO<sub>2</sub> –  $A$  (A) e Transpiração Foliar –  $E$  (B) de plantas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015 \*Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos; Letras maiúsculas indicam que os tratamentos irrigados foram diferentes aos não irrigados; DMS: diferença mínima significativa para cada dia.

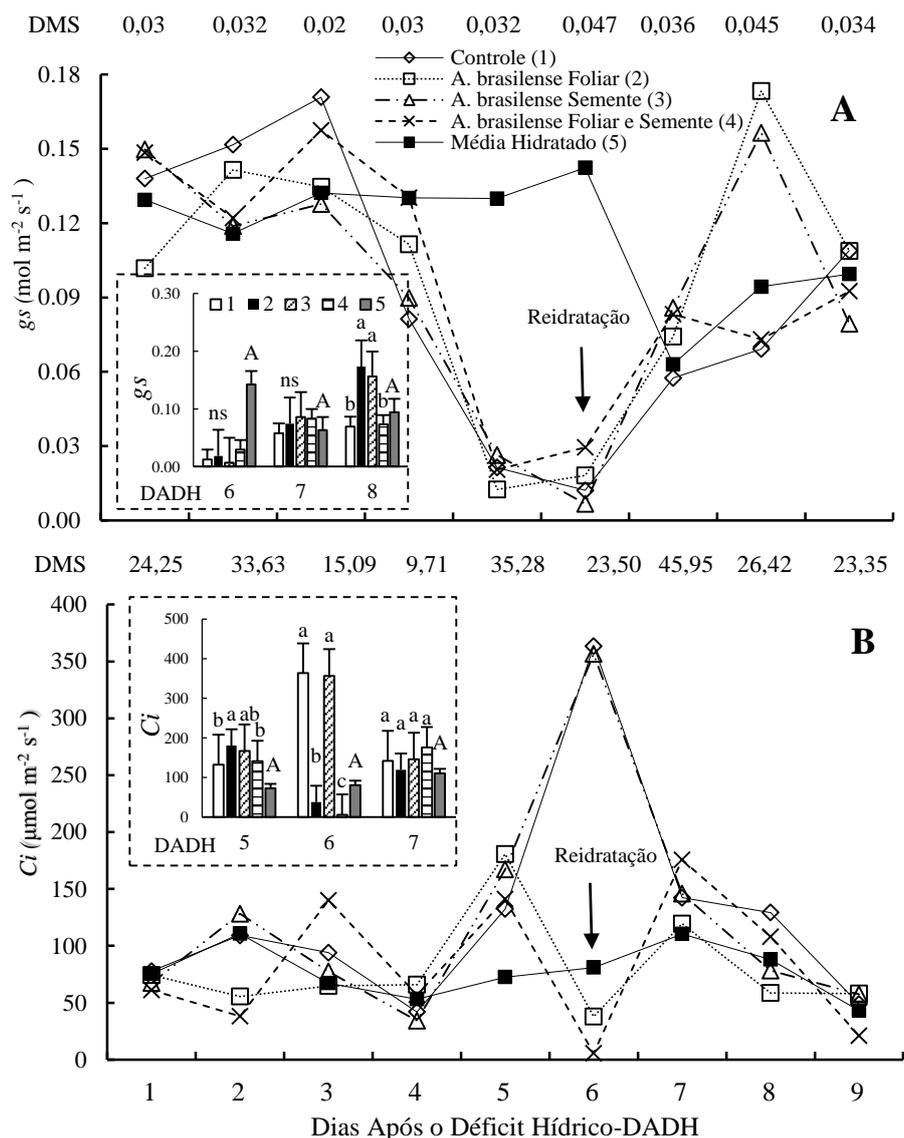
No primeiro dia após a reidratação, os valores obtidos para  $A$  foram baixos, inclusive para as plantas constantemente irrigadas, este fato pode estar relacionado a uma menor luminosidade no dia em questão ( $437,22 \pm 87,99 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) o qual pode ter provocado essa

redução. No segundo dia após a reidratação, ocorreu um grande incremento na  $A$  para  $A. brasilense$  aplicado na semente e para o foliar. Enquanto o controle e o  $A. brasilense$  semente mais foliar mantiveram menor  $A$ , em relação a média das plantas irrigadas. Apenas no terceiro dia após a reidratação  $A$  foi completamente normalizada nas plantas mantidas sobre déficit hídrico.

Para a transpiração foliar ( $E$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ) foram obtidas diferenças relacionadas ao déficit hídrico no quarto dia após a imposição do déficit hídrico, vale ressaltar que nesse dia iniciou-se a maior queda da umidade do solo (Figura 5). Nesse dia as plantas controle e as com  $A. brasilense$  via semente já apresentavam queda, enquanto as com  $A. brasilense$  foliar e semente mais foliar mantiveram maior  $E$  e abertura estomática (Figura 9A). Esses resultados mostram que o controle e  $A. brasilense$  sentiram a falta de água antecipadamente e iniciaram o fechando dos estômatos visando evitar maiores perdas de água. Enquanto as plantas que receberam  $A. brasilense$  foliar e as mantidas sob irrigação mantiveram seus estômatos abertos, e com maior transpiração.

No quinto dia após a imposição do déficit hídrico todos os tratamentos com restrição hídrica passaram a restringir a perda de água por transpiração, não sendo obtidas diferença entre os tratamentos esses apresentaram uma  $E$  média de  $0,8 \text{ mmol H}_2\text{O m}^2 \text{ s}^{-1}$  com  $g_s$  média de  $0,0123 \text{ mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ , enquanto as plantas mantidas irrigadas tiveram uma  $E$  média de  $3,74 \text{ mmol H}_2\text{O m}^2 \text{ s}^{-1}$  e  $g_s$  de  $0,14 \text{ mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ . No sexto dia após a imposição do déficit hídrico as plantas em restrição hídrica continuaram a restringir  $E$  e manter seus estômatos fechados, mesmo naqueles tratamentos que possuíam maior TRA (Figura 6).

Após a reidratação devido a menor luminosidade no dia ( $437,22_{\pm 87,99} \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ ), foram obtidos menores valores de  $E$  assim como  $g_s$  para as plantas mantidas irrigadas (Figura 8B e 9A). Mesmo nessa condição os tratamentos mantidos sobre restrição hídrica passaram a ter maior  $E$  e  $g_s$ , mostrando que a capacidade de reidratação foi semelhante em todos os tratamentos testados, não sendo observado diferença significativa para  $E$  e  $g_s$ . No segundo dia após a reidratação semelhante ao mostrado para  $A$  o tratamento  $A. brasilense$  inoculado na semente e via foliar apresentou elevação dos valores de  $E$  e  $g_s$  inclusive superando a média das plantas irrigadas. Sendo que, no terceiro dia após a reidratação as taxas de  $E$  e  $g_s$  se normalizaram.

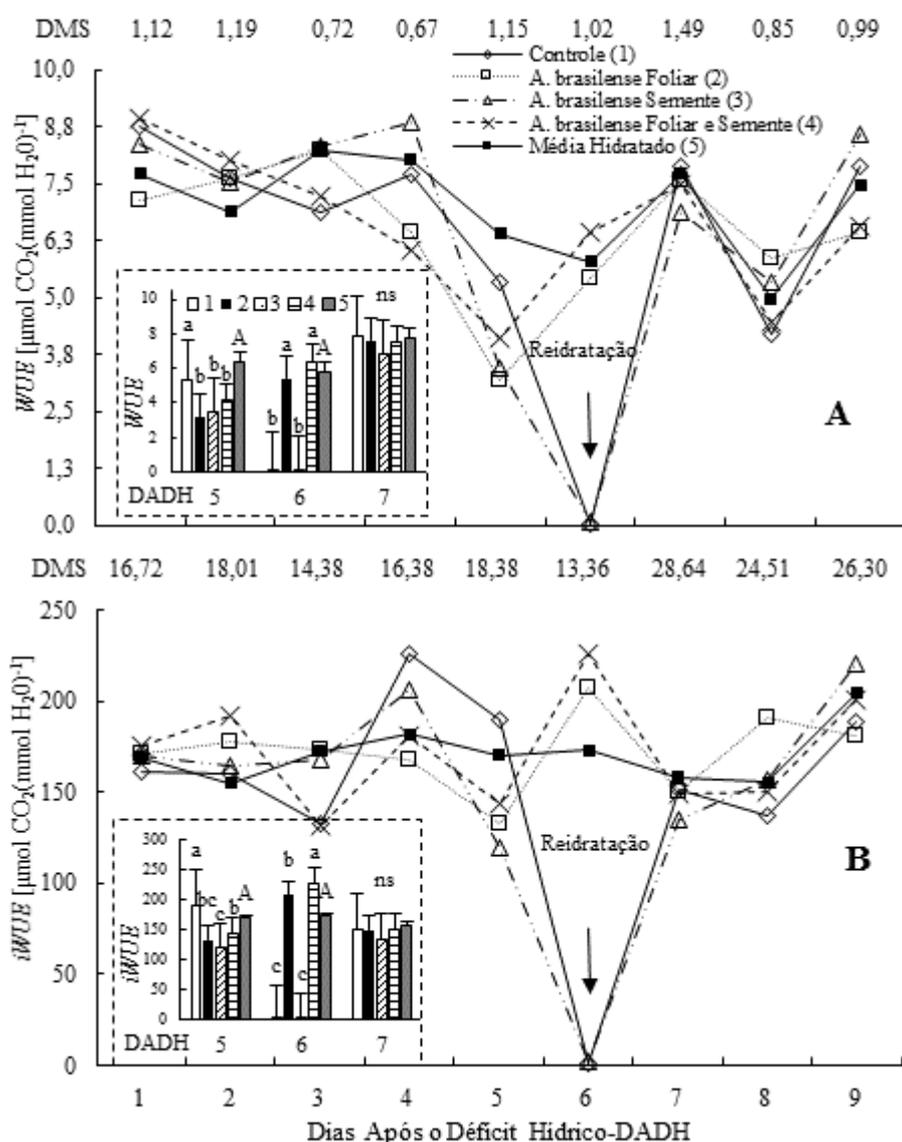


**Figura 9:** Condutância Estomática –  $g_s$  (A) e Concentração Interna de  $CO_2$  –  $C_i$  (B) de plantas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. \*Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos; Letras maiúsculas indicam que os tratamentos irrigados foram diferentes aos não irrigados; DMS: diferença mínima significativa para cada dia.

Quando avaliou-se a concentração interna de  $CO_2$  ( $C_i$ ) os resultados seguiram os padrões das demais variáveis fotossintéticas avaliadas, sendo verificados efeitos da deficiência hídrica no quinto dia após a imposição do déficit hídrico, onde todos os tratamentos com restrição hídrica passaram a elevar a  $C_i$ , sendo neste dia encontrado o maior valor de  $C_i$  para a aplicação foliar de *A. brasilense*, enquanto as plantas mantidas irrigadas mantiveram seu  $C_i$  semelhante ao dia anterior. No sexto dia os tratamentos controle e inoculação de *A. brasilense* na semente promoveram maiores  $C_i$ , enquanto as aplicações foliares promoveram menores valores, inclusive menores que os das plantas irrigadas.

No primeiro dia após a reidratação as plantas já apresentavam indícios de normalização da  $C_i$  não apresentando diferença estatística entre os tratamentos, entretanto, ainda superavam as plantas irrigadas. Sendo a normalização completa ocorrida no segundo dia após a reidratação.

A eficiência do uso da água ( $WUE$ ) e a eficiência intrínseca do uso da água ( $iWUE$ ) apresentaram comportamento semelhante no decorrer dos dias avaliados, assim como as demais variáveis até o quarto dia após a imposição do déficit hídrico, onde as variações encontradas foram providas pelas variações ambientais (Figura 10).



**Figura 10:** Eficiência no Uso da Água –  $WUE$  (A) e Eficiência Intrínseca no Uso da Água –  $iWUE$  (B) de plantas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. \*Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos; Letras maiúsculas indicam que os tratamentos irrigados foram diferentes aos não irrigados; DMS: diferença mínima significativa para cada dia.

A partir do quinto dia os tratamentos com *A. brasilense* independente da forma aplicada tiveram seus valores de  $WUE$  e  $iWUE$  diminuídos, enquanto o controle apresentou maiores valores, a queda nos tratamentos com *A. brasilense* está associado aos menores valores de transpiração (Figura 8B) e condutância estomática (9A), indicando que a inoculação possibilita as plantas um maior período de manutenção da sua máxima atividade fotossintética quando em falta de água, o que não acontece para as plantas não inoculadas. Já no sexto dia o controle e o uso de *A. brasilense* via semente tiveram seus valores de  $WUE$  e  $iWUE$  próximos a zero, enquanto o uso de *A. brasilense* foliar elevou suas taxas, superando até mesmo a média das plantas irrigadas (Figura 10A e 10B). No primeiro da reidratação as plantas estabilizaram suas taxas de  $WUE$  e  $iWUE$  sendo mantidos semelhante até o último dia avaliado.

## 4. Discussões

### 4.1 Umidade do solo

É conhecido que o uso de *A. brasilense* aplicado via semente ocasiona maior desenvolvimento radicular (BULEGON et al., 2014; DARTORA et al., 2013), tal fato é desejado em condições de campo, pois garante maior exploração do solo e dos recursos produtivos, mas como esse estudo foi desenvolvido em vasos, este é rapidamente preenchido pelas raízes das plantas sendo a água consumida, independente do tratamento aplicado, desta forma não foram obtidas diferenças na umidade do solo (Figura 5). Neste sentido, Pimentel et al. (2002) evidencia tal condição, onde em campo maiores sistemas radiculares exerceram função direta na manutenção do teor de água na planta, sendo que em vasos a manutenção do teor de água se relaciona mais com a capacidade de utilização da água.

A umidade do solo é rapidamente recuperada quando ocorre a reidratação, mas na planta essa recuperação pode não ocorrer na mesma velocidade, devido a porosidade do solo, que armazena à água, enquanto as plantas utilizam à água disponível do solo, presente em menor quantidade (SILVA et al., 2014). Desta forma, comportamento da umidade do solo no decorrer das avaliações semelhantes ao do presente estudo, foram demonstradas no trabalho de Santos et al. (2012) na cultura do trigo, e na cultura da soja (FIOREZE et al., 2013), ambos estudos realizados em condições de casa de vegetação.

### 4.2 Teor relativo de água e tolerância protoplasmática

O menor TRA obtido nas plantas controle liga-se ao fato desse terem promovido um maior acúmulo de massa no momento da imposição do déficit hídrico, nesse momento as

plantas controle possuíam uma massa da matéria seca de parte aérea de  $6,79 \text{ g}^{-1}$  planta, enquanto as plantas com inoculação de *A. brasilense* na semente, foliar e semente mais foliar possuíam 5,41; 4,59 e  $4,95 \text{ g}^{-1}$  planta, respectivamente.

Como já mencionado, o teor de água nas plantas não exerce relação direta com a umidade do solo (PIMENTEL et al., 2002), tal condição ocorreu nesse estudo, onde a umidade do solo reduziu gradativamente, enquanto o TRA decresceu bruscamente (Figura 6).

Embora os capins do gênero *Urochloa* possuam resistência a seca (SOUZA et al., 2014), estes possuem uma taxa evapotranspiratória diária considerada elevada sendo constatado valor médio de  $1,2 \text{ mm dia}^{-1} \text{ planta}^{-1}$  em Neossolo Regolítico eutrófico típico, chegando a  $3,0 \text{ mm dia}^{-1} \text{ planta}^{-1}$  quando a planta possuía maior área foliar (SILVA et al., 2014) e  $2,6 \text{ mm dia}^{-1} \text{ planta}^{-1}$  em solo do cerrado (MEIRELLES et al., 2011), sendo esses valores próximo ao da soja (CASAROLI et al., 2007) e feijão (FERNANDES et al., 2015), antes da chegada na fase de formação de estruturas reprodutivas.

Uma das causas para o TRA ter decrescido de forma brusca relaciona-se ao processo adaptativo das gramíneas forrageiras, quando essas detectam a falta de água pela elevação no teor de ácido abscísico (TAIZ; ZEIGER, 2013), iniciam um processo de senescência foliar, na parte mais baixa do dossel (HU et al., 2010), passando a priorizar a água para as folhas superiores. Esse fato ocorreu de forma condizente nesse estudo, onde o controle apresentou senescência de  $1,20 \text{ g}^{-1}$  folhas, enquanto, o tratamento com aplicação de *A. brasilense* foliar promoveu  $0,96 \text{ g}^{-1}$  folhas, para os tratamentos mantido irrigados a média foi de  $0,84 \text{ g}^{-1}$  folhas representando que a aplicação foliar eleva a capacidade da planta em tolerar o déficit hídrico. Contudo, quando a água disponível esgotou-se no substrato, rapidamente o TRA decresceu, juntamente com a taxa fotossintética, sendo necessário realizar a reidratação.

Essa condição também foi observada em capim bermuda, que em solo raso de 40 cm, foi constatado que as cultivares que possuíam essa características resistiram por até 20 dias a falta de água (ZHOU et al., 2013). Os mesmos autores relatam ainda que a  $gs$  é reduzida de forma diferenciada na planta, sendo que enquanto o dossel apresenta os estômatos fechados, na parte superior eles estão parcialmente abertos. A restrição hídrica também influenciou no desenvolvimento de capins forrageiros: angola, hermathria e nilo, reduzindo a taxa de alongamento foliar, comprimento total de folha e número de folhas verdes (SILVA et al., 2005). Nas espécies *U. Humidicola*, *U. Decumbese* e *U. mutica* também são relatados efeitos do déficit hídrico, pela senescência foliar e redução da taxa de alongamento foliar (MATTOS et al., 2005).

Em outras gramíneas são relatados que o TRA decresce gradativamente, como demonstrado em trigo (SANTOS et al., 2012) e cevada (THAMEUR et al., 2012), fato esse

devido ao processo de melhoramento que visa a máxima produtividade da cultura, não possuindo um processo de abortamento foliar eficiente como as gramíneas forrageiras.

A degradação de membranas nas plantas ocorrem entre outros fatores pela formação de radicais livres, basicamente na forma de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são formados nas plantas quando sofrem algum tipo de estresse, no presente estudo o estresse hídrico (TAIZ; ZEIGER, 2013). A produção de ERO na planta ocorre de forma constante, bem como sua inativação, mantendo-se o equilíbrio. Quando a planta encontra-se sob déficit hídrico, ela perde a capacidade de inativação, devido a desregulação da atividade enzimática, fazendo com que as ERO degradem as membranas da célula, tendo o extravasamento do conteúdo celular e consequentemente a morte.

Embora as variações encontradas nesse estudo foram pequenas (Figura 7A e 7B), podemos interferir que o uso de *A. brasilense* pode interferir positivamente nas características de membranas, mantendo a integridade das mesmas, visto que essa característica em plantas estressadas é regulada pela a atividade do ácido abscísico e citocinina (FIOREZE et al., 2013; RIVERO et al., 2007), citocinina essa produzida pelo *A. brasilense* (ANDREAZZA et al., 2013; KUSS et al., 2007).

Durante a reidratação o conteúdo de água nas folhas rapidamente é recuperado (Figura 6), pois o processo de absorção de água da planta é eficiente, devido a grande diferença de potencial água entre o solo e a planta, tendo assim uma rápida entrada de água e recuperação da turgescência da planta (FIOREZE et al., 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013). Entretanto, não significando que a planta já retomou todos seus processos fotossintéticos e enzimáticos semelhante a condição inicial (DEJONGE et al., 2015).

Os resultados mostram que o uso de *A. brasilense* independente da forma que é inoculado na planta interfere diretamente na manutenção do teor de água, quando essa passa por déficit hídrico, o que pode representar ganhos significativos em produção e qualidade da forragem produzida, sendo uma opção para o manejo das pastagens, visto que a irregularidade das precipitações é um dos pontos chaves para a baixa qualidade da forragem produzida.

#### 4.3 Trocas gasosas

Dentre as adaptações das gramíneas forrageiras ao déficit hídrico estão as modificações fisiológicas, que são rápidas respostas nem sempre ligado ao fator evolutivo, mas sim ao adaptativo, relacionado ao meio onde ela se desenvolve (SHERRARD et al., 2009; SOUZA et

al., 2014), sendo a taxa fotossintética, condutância estomática e a transpiração as que primeiramente respondem a deficiência hídrica.

A condutância estomática apresenta variação mais rapidamente com diminuição da água disponível no solo, essa condição é demonstrada em vários trabalhos independente da fisiologia fotossintética das plantas, relatado em  $C_3$  (FERNANDES et al., 2015; SANTOS et al., 2012; YOUSFI et al., 2012) e em  $C_4$  (HU et al., 2010; MATTOS et al., 2005; ZHOU et al., 2013).

Nesse estudo, essa condição também ocorreu, sendo observada redução da  $g_s$  no quarto dia (Figura 9A), com essa redução na  $g_s$  simultaneamente se tem variação nas variáveis  $A$  e  $E$ , porém, em menores proporções, sendo verificado maiores quedas com a continuidade do déficit hídrico.

Os valores de  $A$  encontrados antes do quarto dia, são condizentes com os descritos na literatura para espécies forrageiras, visto que para espécies de *Urochloa* são demonstrados valores entre 15 a 20  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (MATTOS et al., 2005).

A queda de  $A$  obtida no quinto e sexto dia (Figura 8A) associa-se a falta de água, visto que essa é uma acceptora inicial de elétrons para o fotossistema II, conjuntamente se tem aumento no teor de ácido abscísico produzido na raiz pela falta de água que é transportado para a parte aérea, levando a inibição da atividade do fotossistema II, não tendo a formação de  $\text{NADPH}_2$  e a continuidade do processo fotossintético (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A redução da transpiração é outra das variáveis interferidas pelo fechamento estomático da planta, reduzindo  $E$  evita-se perda excessiva de água para a atmosfera, ocasionada pela diferença de pressão entre a câmara estomática e a atmosfera (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A elevação na  $C_i$  remete duas condições sendo benéfica ou indesejada, relacionado com  $A$ . Quando observa-se a manutenção da fotossíntese o aumento na  $C_i$  é desejada, mostrando que o aparato fotossintético está funcional. Porém, quando a fotossíntese está próxima a zero como obtido para o controle e a inoculação de *A. brasilense* na semente (Figura 8A), representa uma deficiência no aparato fotossintético da planta, pois com o fechamento estomático pela falta de água eleva-se o teor de  $\text{CO}_2$  na câmara subestomática, contudo a Rubisco não está em plena atividade, pela falta de água, assim o  $\text{CO}_2$  não é carboxilado e incorporado no ciclo de Krebs, desta forma elevando a  $C_i$ .

A avaliação da  $WUE$  e  $iWUE$  são realizadas para a confirmação das relações diretas entre as variáveis  $A$ ,  $g_s$  e  $E$ , e mostram comportamento semelhante as encontradas para cada variável isolada. Mesmo em condições de déficit hídrico essa variável pode se manter elevada, o que ocorreu nesse estudo para os tratamentos inoculação foliar de *A. brasilense* e foliar mais semente (Figura 10A e 10B), esse fato também foi demonstrada na cultura da soja (HOSSAIN

et al., 2014), ainda segundo o autor está condição representar uma resistência ao déficit hídrico pela planta.

Também utilizou-se a *WUE* e *iWUE* para diferenciar cultivares de *Cynodon* spp. (ZHOU et al., 2013) e de cevada (THAMEUR et al., 2012) resistentes e suscetíveis a seca. A partir dessas colocações, podemos considerar que o *A. brasilense* aplicado via foliar torna a planta mais resistente ao déficit hídrico, contudo, quando não se inocula ou apenas inocula-se na semente a planta não possui resistência.

Como mencionado, quando ocorre a reidratação a planta rapidamente recupera seu teor de água nas folhas, entretanto, o processo fotossintético não é recuperado na mesma velocidade (SLAMA et al., 2015). Fato esse ligado ao nível hormonal que atuava restringindo a fotossíntese. Durante a recuperação a planta pode responder de duas formas. Elevando gradativamente suas trocas gasosas, até restabelecê-la, o que é desejável, do ponto de visto de gasto energético e aproveitamento da água, o que ocorreu no controle e inoculação na semente. Ou ainda, pode ocorrer de forma desregulada, com grandes aumentos e posteriores reduções, condição gerida pelo descontrole hormonal do ácido abscísico que ainda atua na planta, como nos tratamentos que receberam *A. brasilense* foliar. Nas condições desse estudo as trocas gasosas de *U. ruziziensis* apresentaram normalização no terceiro dia após a reidratação.

O trabalho clássico de Mansfield e Davies (1985), demonstra que o efeito do déficit hídrico pode se manter na planta por um longo período, o que eles denominaram de “efeito residual do déficit hídrico”, interferindo nas trocas gasosas das culturas, sendo representado principalmente pela limitação na entrada de CO<sub>2</sub>. Assim, quando avaliamos a *Ci* (Figura 9B), observa-se que ela retomou sua concentração próxima a condição inicial, desta forma, concluindo que a *U. ruziziensis* após três dias da reidratação não apresentava mais descontrole no seu aparato fotossintético.

Durante o processo de reidratação algumas alterações fisiológicas ocorrem na planta visando a proteção e a estabilização do aparato fotossintético, sendo demonstrado em *Sesuvium portulacastrum* elevação nos teores de carotenóides e antocianinas nas folhas, tendo relação positiva, com a recuperação da planta (SLAMA et al., 2015). Diferentemente dos resultados desses estudo, Mattos et al. (2005), também em condições de casa de vegetação, citam que mesmo após nove dias após a reidratação as espécies *U. Brizantha* e *U. Mutica* não conseguiram retomar suas trocas gasosas.

## 5. Conclusões

O uso de *A. brasilense* aplicado via foliar aumenta a tolerância das plantas de *U. ruziziensis* ao déficit hídrico.

Quando as plantas foram mantidas constantemente irrigadas, a inoculação de *A. brasilense*, via semente e foliar, não interferiram no teor relativo de água, e nas trocas gasosas de *U. ruziziensis*.

As plantas de *U. ruziziensis* inoculadas com *A. brasilense* via pulverização foliar mantiveram suas taxas fotossintéticas mais elevadas mesmo em condição de déficit hídrico severo.

Plantas de *U. ruziziensis* inoculadas com *A. brasilense* uma única vez, independente da forma utilizada, antecipam o fechamento estomático quando comparadas às não inoculadas, reduzindo a perda de água por transpiração.

## 6. Referências Bibliográficas

ANDREAZZA, R.; KUSS, A. V.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S.; SANTOS, M. L.; PAZZINI, D.; DAHMER, S. F. B. Bactérias diazotróficas e vermicomposto como fontes alternativas de N para o arroz irrigado. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 15–23, 2013.

AZEVEDO, B. M.; BASTOS, F. G. C.; VIANA, T. V. A.; RÊGO, J. L.; D'ÁVILA, J. H. T. Efeitos de níveis de irrigação na cultura da melancia. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n. 1, p. 9–15, 2005.

BLUM, A.; EBERCON, A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. **Crop Science**, v. 21, n. 1, p. 43-47, 1981.

BULEGON, L. G.; KLEIN, J.; RAMPIM, L.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; KESTRING, D. Desenvolvimento inicial de plântulas de soja inoculadas e co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Jornal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 3, n. 1, p. 26–37, 2014.

CARVALHO, A. J.; CARNEIRO, J. E. S.; FERREIRA, L. R.; CECON, P. R.; SANTOS, M. V. efeito da época de semeadura de *Brachiaria decumbens* e de dessencantes em pré-colheita sobre o rendimento de grãos do feijoeiro e a biomassa forrageira em cultivo consorciado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 893–899, 2011.

CASAROLI, D.; FAGAN, E. B.; SIMON, J.; MEDEIROS, S. P.; MANFRON, P. A.; DOURADO NETO, D.; LIER, Q. J. V.; MÜLLER, L.; MARTIN, T. N. Radiação solar e aspectos fisiológicos na cultura de soja - uma revisão. **Revista FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 2, p. 102–120, 2007.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; PINTO Jr, A. S.; CRUZ, L. M.; MENSCH, R. Influência do tratamento de sementes no desenvolvimento inicial de plântulas de milho e trigo inoculados com *Azospirillum brasilense*. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 12, n. 3, p. 175–181, 2013.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 10, p. 1023–1029, 2013.

DEJONGE, K. C.; TAGHVAEIAN, S.; TROUT, T. J.; COMAS, L. H. Comparison of canopy temperature-based water stress indices for maize. **Agricultural Water Management**, v. 156, n. 1, p. 51–62, 2015.

FERNANDES, F. B. P.; LACERDA, C. F.; ANDRADE, E. M.; NEVES, A. L. R.; SOUSA, C. H. C. Effect of soil management on water deficit, gas exchange and cowpea yield in the semi-arid region. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 3, p. 506–515, 2015.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.

FIGUEIREDO, S. L.; RODRIGUES, J. D.; CARNEIRO, J. P. C.; SILVA, A. D. A.; LIMA, M. B. Fisiologia e produção da soja tratada com cinetina e cálcio sob déficit hídrico e sombreamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 11, p. 1432–1439, 2013.

HOSSAIN, M. M.; LIU, X.; QI, X.; LAM, H. M.; ZHANG, J. Differences between soybean genotypes in physiological response to sequential soil drying and rewetting. **The Crop Journal**, v. 15, n. 5, p. 1–15, 2014.

HU, L.; WANG, Z.; HUANG, B. Diffusion limitations and metabolic factors associated with inhibition and recovery of photosynthesis from drought stress in a C3 perennial grass species. **Physiologia Plantarum**, v. 139, n. 1, p. 93–106, 2010.

KASCHUK, G.; YIN, X.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P. A.; GILLER, K. Photosynthetic adaptation of soybean due to varying effectiveness of N<sub>2</sub> fixation by two distinct *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Environmental and Experimental Botany**, v. 76, p. 1–6, 2012.

- KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459–1465, 2007.
- LIMA, M. D. B.; CARRIJO, M. S.; COSTA, K. A. P.; DAN, H. A.; SIMON, G. A. Water use efficiency in alfafa production under different irrigation managements. **Brazilian Journal of Irrigation and Drainage**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 448–455, 2012.
- MANSFIELD, T. A.; DAVIES, W. J. Mechanisms for Leaf Control of Gas Exchange. **BioScience**, v. 35, n. 3, p. 158–164, 1985.
- MARANHÃO, C. M. A.; BONOMO, P.; PIRES, A. J. V.; COSTA, A. C. P. R.; MARTINS, G. C. F.; CARDOSO, E. O. Características produtivas do capim-braquiária submetido a intervalos de cortes e adubação nitrogenada durante três estações. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 375–384, 2010.
- MATTOS, J. L. S.; GOMIDE, J. A.; HUAMAN, C. A. M. Effect of water deficit on the growth of *Brachiaria* species in greenhouse. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 746–754, 2005.
- MEIRELLES, M. L.; FRANCO, A. C.; FARIAS, S. E. M.; BRACHO, R. Evapotranspiration and plant-atmospheric coupling in a *Brachiaria brizantha* pasture in the Brazilian savannah region. **Grass and Forage Science**, v. 66, n. 2, p. 206–213, 2011.
- PIMENTEL, C.; SARR, B.; DIOUF, O.; ABBOUD, A. C. DE S.; ROY-MACAULEY, H. Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivados em campo. **Revista da Universidade Rural**, Seropédica, v. 22, n. 1, p. 7–14, 2002.
- QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRSS, D. D.; CAMARGO, F. A. O. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014.
- RIVERO, R. M.; KOJIMA, M.; GEPSTEIN, A.; SAKIBARA, H.; MITTLER, R.; GEPSTEIN, S. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19631–19636, 2007.
- SANTOS, D.; GUIMARÃES, V. F.; KLEIN, J.; FIOREZE, S. L.; MACEDO Jr, E. K. Cultivares de trigo submetidas a déficit hídrico no início do florescimento, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 8, p. 836–842, 2012.

- SHERRARD, M. E.; MAHERALI, H.; LATTA, R. G. Water stress alters the genetic architecture of functional traits associated with drought adaptation in *Avena barbata*. **Evolution**, v. 63, n. 3, p. 702–715, 2009.
- SILVA, B.; SILVA, É.; OLIVEIRA, G.; FERREIRA, M. M.; SERAFIM, M. E. Plant-Available Soil Water Capacity: Estimation Methods and Implications. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 38, n. 1, p. 464–475, 2014.
- SILVA, M. M. P.; VASQUEZ, H. M.; BRESSAN-SMITH, R. E.; SILVA, J. F. C.; ERBERSDOLER, E. D.; ANDRADE Jr, P. S. C. Respostas morfogênicas de gramíneas forrageiras tropicais sob diferentes condições hídricas do solo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 5, p. 1493–1504, 2005.
- SILVA, R. A. B.; LIMA, J. R. D. S.; ANTONINO, A. C. D.; GONDIM, S. S.; SOUZA, E. S.; BARROS Jr, G. Balanço hídrico em neossolo regolítico cultivado com braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, viçosa, v. 38, n. 1, p. 147–157, 2014.
- SLAMA, I.; M'RABET, R.; KSOURI, R.; TALBI, O.; DEBEZ, A.; ABDELLEY, C. Water deficit stress applied only or combined with salinity affects physiological parameters and antioxidant capacity in *Sesuvium portulacastrum*. **Flora**, v. 213, n. 1, p. 69–76, 2015.
- SLAVIK, B. **Methods of studying plant water relations**. Berlin: Springer, 1974. 452p.
- SOUZA, F. H. D.; MATTA, F. P.; FÁVERO, A. P. **Construção de ideótipos de gramíneas para usos diversos**. Brasília: Embrapa, 2014. 381p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artemed, 2013. 954p.
- THAMEUR, A.; LACHIHEB, B.; FERCHICHI, A. Drought effect on growth, gas exchange and yield, in two strains of local barley Ardhaoui, under water deficit conditions in southern Tunisia. **Journal of Environmental Management**, v. 113, n. 3, p. 495–500, 2012.
- YOUSFI, N.; SLAMA, I.; ABDELLEY, C. Phenology, leaf gas exchange, growth, and seed yield in contrasting *Medicago truncatula* and *Medicago laciniata* populations during prolonged water deficit and recovery. **Botany-Botanique**, v. 90, n. 2, p. 79–91, 2012.
- ZHANG, S.; LI, Q.; MA, K.; CHEN, L. Temperature-dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to co<sub>2</sub> assimilation of quercus liaotungensis under midday high irradiance. **Photosynthetica**, Olomouc, v. 39, n. 3, p. 383–388, 2001.
- ZHOU, Y.; LAMBRIDES, C. J.; FUKAI, S. Drought resistance of bermudagrass (*Cynodon* spp.) ecotypes collected from different climatic zones. **Environmental and Experimental Botany**, v. 85, n. 1, p. 22–29, 2013.

**CAPÍTULO IV**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE PIGMENTOS FOLIARES EM *Urochloa ruziziensis* INOCULADA COM *Azospirillum brasilense* SOB DÉFICIT HÍDRICO**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY AND LEAF PIGMENT CONTENT IN *Urochloa ruziziensis* INOCULATED WITH *Azospirillum brasilense* UNDER DROUGHT**

**Resumo:** O déficit hídrico leva a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's), que podem resultar em degradação dos pigmentos foliares e danos irreversíveis, resultando na morte celular, caso estes não sejam eliminados pelo sistema de enzimas antioxidativas. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a atividade de enzimas oxidativas e o teor de pigmentos fotossintéticos em *U. ruziziensis*, inoculado com *A. brasilense*, via sementes e foliar, submetido a déficit hídrico severo. Para isso utilizou-se um delineamento em blocos casualizados, com cinco tratamentos: controle irrigado, controle com déficit hídrico, e inoculação via semente, via pulverização foliar e combinada de *A. brasilense*, submetido ao déficit hídrico. As avaliações se estenderam por sete dias, sendo seis sob déficit hídrico e um dia referente a reidratação. Avaliou-se o teor de proteínas solúveis, a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT), teor de clorofilas *a* e *b* e carotenóides. Os resultados mostram que as plantas sob restrição hídrica apresentaram a formação de ERO's, elevando a atividade antioxidativa. A POD apresentou-se mais importante na remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, entretanto teve sua atividade reduzida com déficit severo; a CAT apresentou maior atividade nessa condição. A clorofila *a* foi pouco degradada, mantendo os níveis do controle irrigado, mostrando a eficiência do sistema, com elevação da atividade antioxidante, clorofila *b* e carotenóides quando as plantas foram inoculadas com *A. brasilense* foliar. Conclui-se que a inoculação de *U. ruziziensis* com *A. brasilense* foliar torna a planta mais eficiente na remoção de ERO's e na proteção da clorofila *a*.

**Palavras chaves:** Superóxido dismutase; catalase; peroxidase; clorofila, aplicação foliar

**Abstract:** The water deficit leads to the formation of reactive oxygen species (ROS's), which can result in degradation of leaf pigments and irreversible damage, resulting in cell death, if they are not eliminated by the antioxidant enzyme system. In this context, this study aimed to evaluate the activity of oxidative enzymes and the photosynthetic pigment content in *U. ruziziensis* inoculated with *A. brasilense*, via seeds and leaf subjected to severe water deficit. For this we used a randomized block design, with five treatments: irrigation control, control with drought, and seed inoculation, foliar spray and combined *A. brasilense*, subjected to water deficit. Evaluations are extended for seven days, six under drought and a day related to rehydration. Evaluated the content of soluble protein, the activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT), chlorophylls *a* and *b* and carotenoids. The results show that the plants under water restriction showed the ROS's formation, increasing the antioxidative activity. The POD had become more important in removing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, however reduced its activity with severe deficit; CAT showed greater activity in this condition. The

chlorophyll *a* was little degraded, maintaining the levels of irrigated control, showing the efficiency of the system, with increased antioxidant activity, chlorophyll *b* and catotenóides when the plants were inoculated with *A. brasilense* leaf. It follows that the inoculation of leaf *U. ruziziensis* with *A. brasilense* makes the plant more efficient in the removal of ROS's and in the protection of chlorophyll.

**Key words:** Superoxide dismutase; catalase; peroxidase; chlorophyll, foliar spray application

## 1. Introdução

As plantas necessitam de água para o seu desenvolvimento e manutenção das atividades vitais (TAIZ; ZEIGER, 2013), tendo seu metabolismo alterado em condições de déficit hídrico. O déficit hídrico é um dos maiores problemas da agricultura, principalmente para as culturas perenes que ficam constantemente predispostas a ação do clima.

Quando as plantas passam por algum tipo de estresse ambiental como o déficit hídrico ocorre a formação de radicais livres. Nessa condição tem-se fechamento estomático, que leva a formação de  $O_2^{\bullet-}$  dando início a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BARBOSA et al., 2014). As plantas possuem mecanismos de remoção desses radicais, através de um sistema enzimático ligados ao estresse oxidativo. A superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima responsável pela desintoxicação da planta, sendo que essa tem por função dismutar o  $O_2^{\bullet-}$  transformando em  $H_2O_2$  e  $O_2$  (ESTEVES; SUZUKI, 2008). Contudo o  $H_2O_2$  também é prejudicial as plantas, sendo necessário a ação das peroxidases (POD) e catalases (CAT), para sua degradação. A produção de ERO's ocorre em maior escala nos peroxissomos e nos cloroplastos levando à degradação das clorofilas nas plantas (BARBOSA et al., 2014).

O aumento na atividade das enzimas ligadas ao estresse oxidativo sob condições de déficit hídrico são relatadas em uma ampla gama de culturas como milho (TALAAT; SHAWKY; IBRAHIM, 2015), arroz (KUMAR et al., 2015), trigo (HUSEYNOVA, 2012), pastagens do gênero *Cynodon* (LIU; CHAN, 2015) e em outras  $C_4$  (FARFAN-VIGNOLO; ASARD, 2012; AIMAR et al., 2014). Contudo, quando o déficit hídrico é considerado severo a atividade das enzimas passa a ser limitada, em *Cynodon dactylon* foi observado que após sete dias da retirada da irrigação a SOD apresentava atividade elevada, contudo aos 14 dias, ela passou a ser limitada (LIU; CHAN, 2015), associado a limitação na produção da enzima pela limitação hídrica. Desta forma, busca-se tratamentos que possibilitam a planta manter o metabolismo de desintoxificação ativo por um maior período de tempo, evitando a morte celular.

Visto que produção das ERO's e a manutenção da atividade do complexo de enzimas antioxidativas, são em grande parte moduladas pelo teor de água na planta, técnicas que elevam a capacidade da planta em maximizar o uso de água podem ser vantajosas. O uso de reguladores vegetais e bactérias promotoras de crescimento vegetal são opções para elevar a eficiência no uso da água (FIOREZE et al., 2013; ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade das enzimas oxidativas e o teor de pigmentos fotossintéticos em *U. ruziziensis* sob formas de aplicação de *A. brasilense*, em condições de déficit hídrico severo.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Descrição da área experimental

O experimento foi conduzido em ambiente protegido, do tipo teto em forma de arco, coberto com filme de polietileno difusor de baixa densidade, com 150  $\mu$  espessura e proteção anti-UV, com laterais protegida com tela branca de 40% sombreamento, na estação experimental Professor Dr. Mário César Lopes, localizada nas coordenadas - 24°558'S e - 54°045'O, situada na Universidade Estadual do oeste do Paraná – UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, - Paraná, no período de 02 de fevereiro a 26 de abril de 2015. Foram utilizados vasos plásticos com capacidade nominal de 8,7 litros (altura: 23 cm; diâmetro superior: 26 cm; diâmetro inferior: 19 cm), que recebeu como substrato solo proveniente do horizonte A de LATOSSOLO VERMELHO Eutróferrico. O solo apresentava as seguintes características químicas: saturação de bases de 60,2%, pH de 5,5 e teor de matéria orgânica de 24,61 g dm<sup>-3</sup>, teor de P de 3,08 mg dm<sup>-3</sup> e K de 0,28 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, não sendo necessária a correção, com uma população natural de bactérias diazotróficas, determinada pelo método do número mais provável de 4 x 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> solo (DÖBEREINER, BALDANI, BALDANI, 1995).

### 2.2 Delineamento experimental

O experimento foi avaliado sob o delineamento de blocos casualizados, com cinco tratamentos sendo: **T1**: controle irrigado; **T2**: controle com déficit hídrico; **T3**: inoculação das sementes com *A. brasilense* com déficit hídrico; **T4**: aplicação foliar de *A. brasilense* com déficit hídrico; **T5**: inoculação das sementes e aplicação foliar de *A. brasilense* com déficit hídrico.

### 2.3 Condução

Para a realização do experimento foram utilizadas sementes da espécie *U. ruziziensis*, sendo conduzidas duas plantas por vasos. A aplicação de *A. brasilense* estirpes AbV5 e AbV6 (produto comercial) nas sementes foi realizada na dose de 1 mL de inoculante ( $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) para cada 1000 sementes de *U. ruziziensis*, as quais foram homogeneizadas e mantidas a sombra por cerca de 30 minutos. Após a semeadura os vasos foram mantidos em capacidade de campo, com reposição diária de água. A aplicação de *A. brasilense* estirpes AbV5 e AbV6 foliar foi realizada quando as plantas se encontravam no início do perfilhamento, o que representou 20 dias após a semeadura, fazendo o uso de uma dose de 300 mL de inoculante por hectare e um volume de calda de 300 L ha<sup>-1</sup>, com auxílio de um pulverizador costal de CO<sub>2</sub> com pressão constante, equipado com pontas Magno 11002 ADGA, espaçadas em 0,5 m, a pressão de 40 kgf cm<sup>-2</sup>.

Após as aplicações as plantas foram constantemente monitoradas, para garantir um adequado desenvolvimento, não sendo realizada a aplicação de nutrientes minerais durante o experimento.

Quando as plantas alcançaram um adequado desenvolvimento foliar, recomendado para o pastejo (45 dias após a semeadura), foi realizada a imposição do déficit hídrico, para isso todos os vasos foram previamente irrigados até alcançarem a capacidade de campo. Os tratamentos destinados ao déficit hídrico tiveram sua irrigação suspensa sendo mantidos em restrição hídrica por seis dias, momento em que as plantas apresentavam taxa fotossintética próxima a zero (condições monitorada diariamente). A partir desse momento as plantas foram reidratadas, para isso os vasos foram irrigados até alcançarem a capacidade de campo.

### 2.4 Determinação do teor de proteína solúveis e atividade das enzimas antioxidativas

Amostras frescas coletadas diariamente no pré-dawn durante os sete dias de avaliação de folhas de *U. ruziziensis* foram maceradas em solução tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) acrescentando-se polivinil pirrolidona (PVP) posteriormente centrifugado a 20.000 g durante 20 min para homogeneização. A determinação do teor de proteínas solúveis foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), em leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

A determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD), foi realizada pela capacidade da enzima em inibir a redução do NBT (nitroblue tetrazolium) por radicais superóxido, com leitura a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A atividade da peroxidase (POD) foi determinada a 30°C, através do método do espectrofotométrico direto, baseado na

oxidação do guaiacol (HAMMERSCHMIDT; NUCKLES; KUĆ, 1982), com leituras a 470 nm durante dois minutos, com intervalo de leitura de 15 segundos. Para a determinação da catalase (CAT) utilizou-se o monitoramento da variação da absorção do peróxido de hidrogênio, com leitura a 240 nm (HAVIR; MCHALE, 1987).

### *2.5 Determinação do teor de pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores*

Segmentos foliares com massa fresca de 0,5 g, coletados previamente ao início do déficit hídrico, no sexto dia após a imposição do déficit hídrico e após a completa reidratação das plantas foram acondicionados em frascos recobertos para evitar a entrada de luz e receberam 20 mL de solução de acetona 80%, após foram acondicionados sob refrigeração e ausência de luz por 72 horas. Após procedeu-se a leitura em espectrofotômetro utilizando-se para clorofila *a* 665 nm, clorofila *b* 649 nm e carotenoides 480 nm (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001).

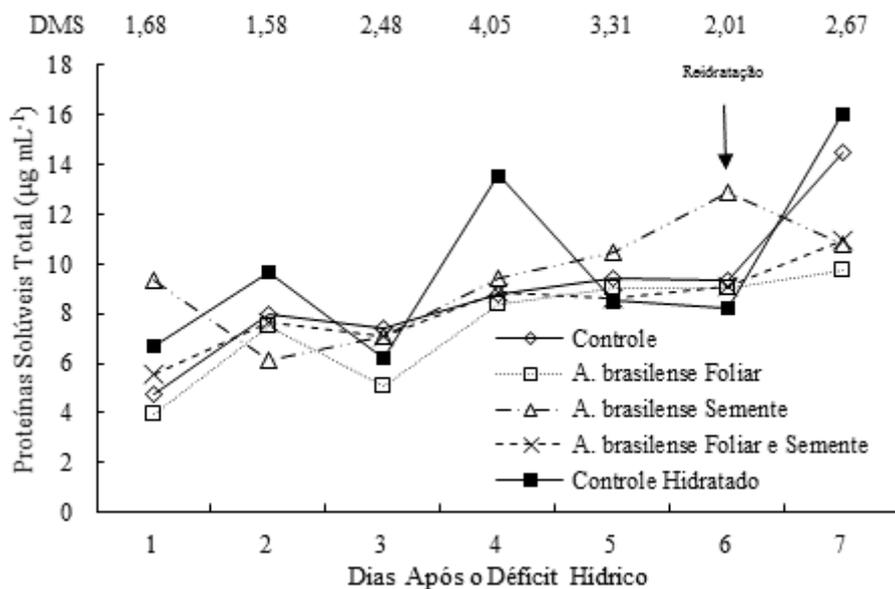
### *2.6 Análise estatística*

A análise estatística foi realizada para cada dia avaliado através do teste F, e quando pertinente as médias foram comparadas pelos teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

## **3. Resultados**

### *3.1 Proteínas Solúveis*

As proteínas solúveis contidas nas folhas de *U. ruziziensis* não apresentaram diferenças significativa para as avaliações realizadas aos três e cinco dias após a imposição do déficit hídrico (Figura 11). Para os demais dias foram verificadas diferenças entre pelo menos um dos tratamentos. Contudo ao se avaliar as variações ocasionadas pelo déficit hídrico as plantas mantidas nessas condições não tiveram grandes variações em relação ao controle hidratado. No sexto dia (estresse severo), a inoculação de *A. brasilense* nas sementes promoveu maior teor de proteínas, entretanto após a reidratação tal condição não foi continuada, onde ambos os tratamentos controle tiveram maior teor de proteína (Figura 11).

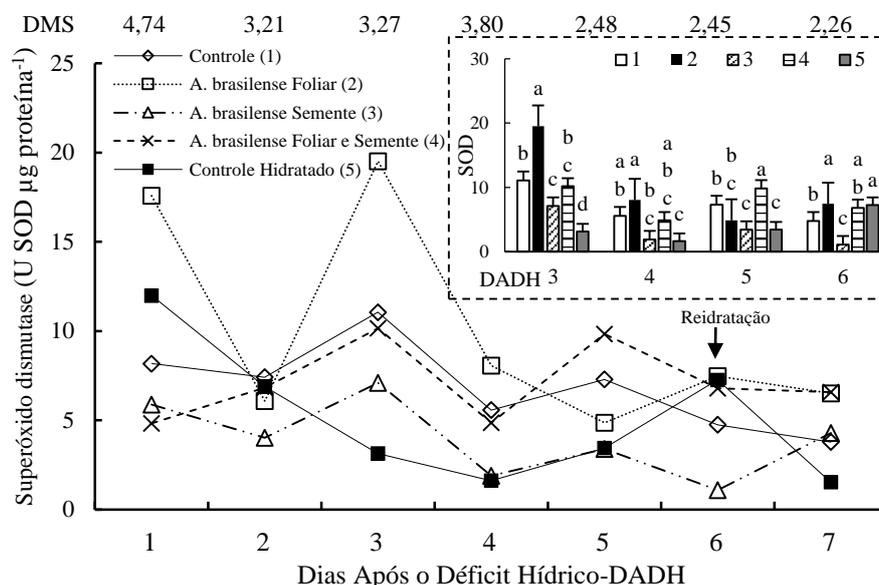


**Figura 11:** Teor de proteínas solúveis totais em folhas de plantas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.

### 3.2 Enzimas relacionados ao estresse oxidativo

A atividade da superóxido dismutase (SOD), apresentou variações significativas entre os tratamentos em todos os dias avaliados. Nos dois primeiros dias as variações encontradas na SOD podem se dever a fatores não relacionados ao déficit hídrico, devido ao tratamento hidratado também ter apresentado maiores atividade em ambos os dias. Foi verificado aumento na atividade da SOD no terceiro dia para os tratamentos mantidos sob déficit hídrico (Figura 2), aplicação de *A. brasilense* via foliar apresentou maior atividade com 19,50 U SOD  $\mu\text{g}$  proteína<sup>-1</sup>, 6,2 vezes mais atividade que o controle hidratado, os demais tratamentos sob déficit hídrico também elevaram a atividade da SOD superando o controle hidratado. No quarto dia a aplicação de *A. brasilense* foliar manteve maior atividade, contudo superou apenas a inoculação nas sementes e o controle hidratado. No quinto dia menor atividade da SOD foi verificada para as folhas de plantas que receberam inoculação na semente e o controle hidratado, enquanto o tratamento combinando inoculação na semente e aplicação foliar de *A. brasilense* apresentou

maiores valores de SOD. Para o sexto dia (déficit severo) foi verificado que apenas a inoculação de *A. brasilense* via semente apresentou menor atividade da SOD no tecido foliar.



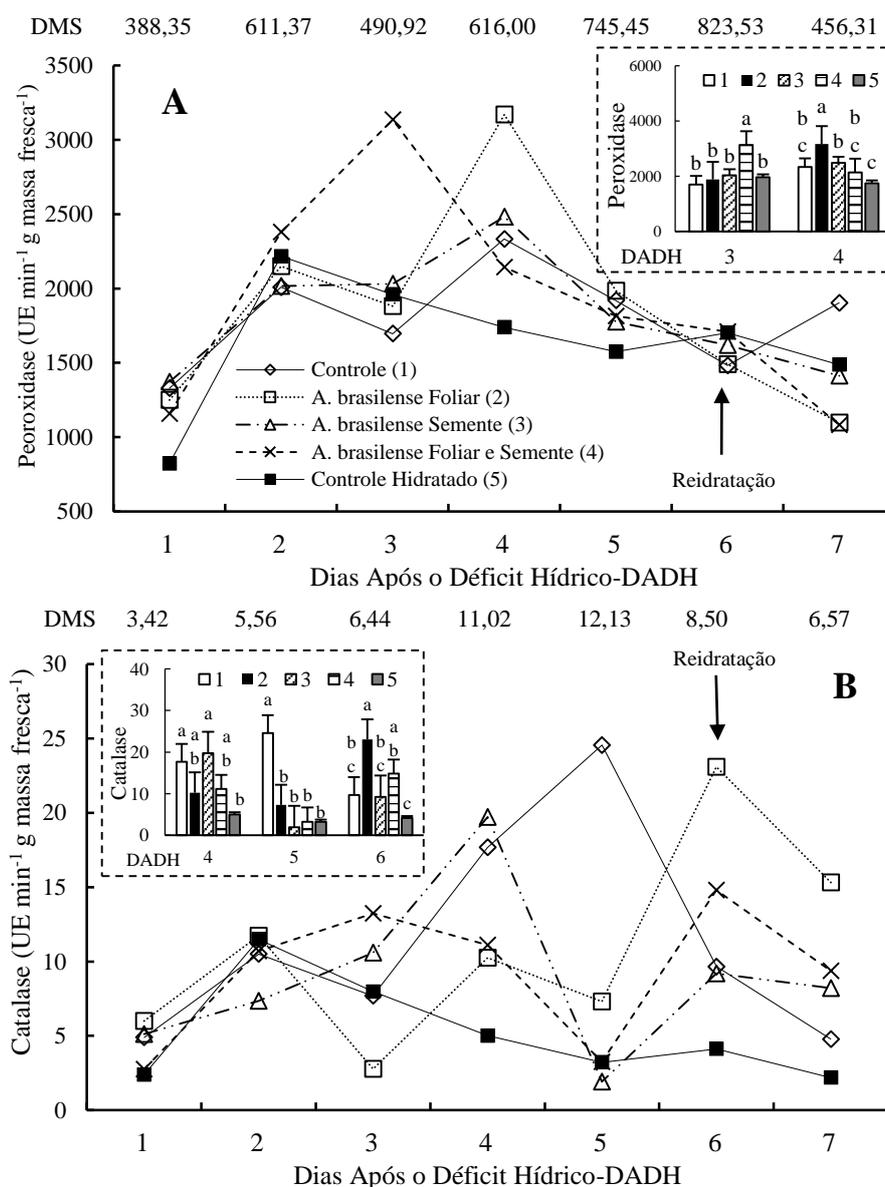
**Figura 12:** Atividade da enzima superóxido dismutase em folhas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. \*Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos. DMS: diferença mínima significativa para cada dia.

Após a ação da SOD, a cadeia de enzimas ligadas ao estresse oxidativo tem continuidade com as peroxidases (POD) e catalases (CAT). Ao verificar a ação das POD não foram encontradas diferenças significativas no segundo, quinto e sexto dia após a imposição do déficit hídrico (Figura 13A). No terceiro dia de déficit hídrico culminando com maior atividade da SOD, foi verificado aumento na POD, com maior atividade em plantas inoculadas com *A. brasilense* via semente ou pulverização foliar, não sendo observado diferença entre os demais tratamentos. No quarto dia, maior atividade da POD foi observada para a aplicação foliar de *A. brasilense*. O comportamento no decorrer do tempo mostra que o aumento da SOD (Figura 2) no terceiro e quarto dia culmina em aumento do POD.

A atividade da CAT em folhas de *U. ruziziensis* apresentou diferenças significativas em todos os dias avaliados, exceto no segundo dia (Figura 3b). Seguindo o comportamento da POD, a CAT apresentou maior atividade a partir do quarto dia. No quarto dia o controle hidratado apresentou menor média, sem diferenciar dos tratamentos com inoculação na semente e a combinação semente e foliar de *A. brasilense*. No quinto dia, o controle em déficit hídrico apresentou maior atividade, superando os demais tratamentos. Sob déficit severo (sexto dia), o controle hidratado manteve menor atividade da CAT, por sua vez aplicação foliar de *A. brasilense* apresentou grande elevação, superando os demais tratamentos, com exceção da

combinação de inoculação na semente e aplicação foliar. Seguindo o padrão da SOD e POD, na CAT o controle mantido irrigado apresentou tendência de manter atividade reduzida em relação aos tratamentos mantidos em restrição hídrica.

Desta forma, é possível observar que quando o déficit hídrico passa a exercer efeito na planta, desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio, que levam a ativação das enzimas ligadas à desintoxicação vegetal. Contudo com o avanço do déficit hídrico a atividade dessas enzimas é prejudicada, reduzindo a atividade de desintoxicação, desencadeando respostas negativas na planta.

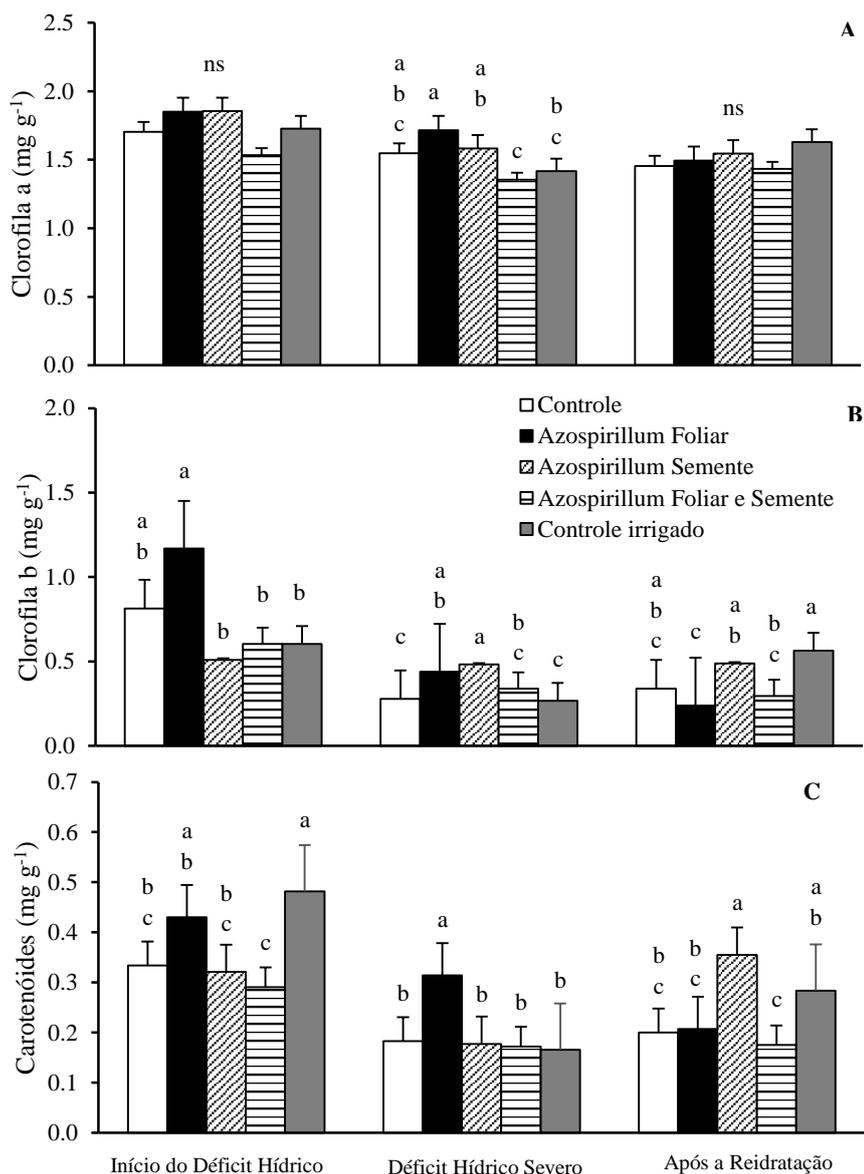


**Figura 13:** Atividade da enzima peroxidase (A) e catalase (B) em folhas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. \*Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos. DMS: diferença mínima significativa para cada dia.

### 3.3 Pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores

Ao se avaliar o teor de clorofila *a* em folhas de *U. ruziziensis* não foram obtidas diferenças significativas antes da imposição do déficit hídrico entre os tratamentos. Em condição de déficit severo foi verificado redução no teor de clorofila *a* quando se utilizou a combinação de *A. brasilense* na semente e foliar. Após a reidratação não foram observadas variações significativas entre os tratamentos (Figura 14A).

Para o teor de clorofila *b* nas folhas antes da imposição do déficit hídrico o tratamento com aplicação de *A. brasilense* via foliar apresentava maior média, não diferenciando do controle. Em condições de déficit severo, o uso de inoculação via semente promoveu maior valor de clorofila *b*, sem diferenciar da aplicação foliar (Figura 4b). Para os teores de carotenóides previamente à imposição do déficit hídrico o controle irrigado apresentava teores mais elevados, não diferenciando da aplicação foliar de *A. brasilense*. Em déficit hídrico severo a aplicação foliar isolada promoveu maior média. Enquanto após a reidratação a inoculação na semente obteve maior média, sem diferenciar do controle mantido hidratado



**Figura 14:** Concentração de clorofila a (A), clorofila b (B), e carotenóides (C) em folhas de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar, submetidas ao déficit hídrico controlado, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. \*Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos. ns: não significativo pelo teste de F a 5% de probabilidade

## 4. Discussões

### 4.1 Proteínas Solúveis

A redução no teor de proteínas solúveis observado no quarto dia após a imposição do déficit hídrico (Figura 11), está relacionado com menor produção de proteínas totais em condições de estresse hídrico, sendo priorizado os mecanismos de defesa, limitando a síntese de proteínas para a divisão celular e crescimento (ZHAO et al., 2011). Os mesmos autores citam queda significativa no teor de proteínas do grupo das glicinas, as dependentes do grupo fosfato

e as ligadas a cadeia da desidrogenases e redutases. Sendo que as últimas atuam no ciclo de produção do ácido abscísico, e também na manutenção do fornecimento de elétrons para evitar a fotoinibição (WINGLER et al., 2000). Desta forma, com a redução na síntese dessas proteínas, além da queda modulada por essa deficiência, temos a oxidação das demais proteínas pelas ERO's (ESTEVES; SUZUKI, 2008; BARBOSA et al., 2014) produzidas na fotoinibição devido a sobra de elétrons no transporte eletrônico (UZILDAY et al., 2012).

A estabilização no teor de proteínas no dia anterior e no dia do déficit severo, relaciona-se com o aumento da atividade das enzimas antioxidativas (Figura 12 e 13) que aturam sobre as ERO's, evitando assim a oxidação das proteínas. Tal proteção foi evidenciada em trabalhos com feijão-caupi cultivado em condições de salinidade, em resposta ao aumento da atividade da POD (MAIA et al., 2012). Em hipocótilos de plântulas de milho, foram relatados que as proteínas foram protegidas pelo aumento na atividade da CAT, e em menor escala da POD e SOD (ROSA et al., 2005). Também são relatados em *Ipomoea grandifolia* que o déficit hídrico não ocasionou variações significativas no teor de proteínas (VITORINO; MARTINS, 2012).

#### 4.2 Enzimas relacionados ao estresse oxidativo

O aumento na atividade da SOD a partir do terceiro dia de avaliação mantendo-se até o quinto dia, para todos os tratamentos mantidos sob restrição hídrica, exceto a inoculação das sementes (Figura 12), mostra que as plantas embora ainda não sofrendo variações no teor relativo de água e nas trocas gasosas (dados não mostrados), já apresentavam a formação de radicais  $O_2^{\bullet-}$ , tal condição relacionada a entrada da planta em déficit hídrico temporário durante o dia, devido as altas temperaturas (temperatura máxima  $37^{\circ}C$ ), corroborando com o demonstrado com o aumento da radiação de 7,5 para 15  $kJ\ m^2$  (AGARWAL, 2007), desta forma durante a noite na recuperação as plantas ativaram a SOD para a dismutase do  $O_2^{\bullet-}$ . A menor atividade da SOD está relacionado com o nível de auxina modulada pela bactéria (CROZIER et al., 1988; KUSS et al., 2007), visto que elevações no conteúdo desse hormônio eleva a tolerância das plantas ao déficit hídrico, e a um melhor desempenho do sistema antioxidante, como demonstrado em *Arabidopsis* (SHI et al., 2014).

A queda da SOD em déficit hídrico moderado (quarto dia) (Figura 12), liga-se a menor capacidade de recuperação da planta pela menor disponibilidade hídrica do solo. Queda na atividade da SOD foram descritas quando se aumentou a deficiência hídrica do substrato (CAMPOS et al., 2011). Verificando que tal decréscimo está associado ao aumento na concentração de  $H_2O_2$  que reduz a atividade da SOD (GILL; TUTEJA, 2010). Oposto ao

presente é relatado que o aumento do teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elevou a atividade da SOD (LIU; CHAN, 2015).

A POD se mostrou como a principal enzima na remoção dos radicais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em todos os dias avaliados (Figura 13A), contudo mostrando queda na sua atividade com o aumento do déficit hídrico (CAO et al., 2015; LIU; CHAN, 2015), enquanto a CAT apresentou um incremento sob déficit severo (Figura 13B), como relatado em plantas conduzidas sob déficit hídrico (CAMPOS et al., 2011; HENDGES et al., 2015). O comportamento antagônico dessas enzimas liga-se ao mecanismo de oxidação utilizada por cada enzima, a POD é uma enzima dependente de um agente redutor como o guaiacol, um composto fenólico, sendo que esses tem sua formação reduzida com a falta de água (ANINBON et al., 2016). Ainda em déficit moderado a formação de ERO's, predomina nos cloroplastos, originário da fotoinibição (UZILDAY et al., 2012), onde se tem nessa maior atividade da POD (HUSEYNOVA, 2012). Por sua vez a CAT atua sem a necessidade de um agente redutor o que resultou no seu incremento, podendo permanecer ativa em condições mais adversas, déficit severo (ESTEVES; SUZUKI, 2008; BARBOSA et al., 2014). Outro ponto que favorece a CAT está na sua capacidade de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aproximadamente 6 milhões de moléculas por minuto e sua ação ocorrer principalmente nos peroxissomos (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012), sendo que esses são o principal ponto de formação das ERO's em condições adversas severas, sendo até 100 vezes mais rápido que nas mitocôndrias (SHARMA et al., 2012; BARBOSA et al., 2014).

Durante a recuperação das plantas, foram observadas quedas na atividade de enzimas do sistema antioxidante ou atividade semelhante ao observado no dia anterior (Figura 12 e 13). Essa é uma resposta padrão, visto que as plantas buscam o equilíbrio do seu aparato fisiológico e bioquímico, considerado um momento crítico devido ao estresse imposto (CAMPOS et al., 2011). Tal condição é demonstrada em *Panicum virgatum* onde foi verificado 12 horas após a reidratação pequena variação na atividade enzimática, sendo incrementada após 24 horas (AIMAR et al., 2014).

Assim é relatado que o aumento a atividade das enzimas antioxidantes representa um mecanismo de tolerância das plantas ao déficit hídrico (ASHRAF, 2009; YANG et al., 2009; SHI et al., 2014; CAO et al., 2015; JIN et al., 2015; TALAAT; SHAWKY; IBRAHIM, 2015), desta forma conclui-se que o uso de *A. brasilense* aplicado via foliar pode ser utilizado como uma prática para elevar a tolerância da *U. ruziziensis* ao déficit hídrico, pois elevam a atividade da POD e da CAT em condições de déficit hídrico moderado e severo, respectivamente.

### 4.3 Pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores

As clorofilas estão localizadas em grande parte nos cloroplastos (STREIT et al., 2005), sendo dividido em classes, sendo as principais as clorofilas *a*, responsáveis pela realização da fotoquímica, enquanto as clorofilas *b* auxiliam na captação da energia luminosa (TAIZ; ZEIGER, 2013), estando desta forma predispostas a ação dos radicais livres que são formados dentro dessas estruturas celulares (UZILDAY et al., 2012). Entretanto, em condições de déficit moderado e severo a clorofila *a* não sofreu maiores degradações (Figura 14A), fato ligado ao aumento no sistema de enzimas oxidativas (Figura 12 e 13) que evitaram eficientemente a degradação das clorofilas. Esse resultado diverge aos citados em *Boehmeria nivea* (HUANG et al., 2013), *Chrysanthemum morifolium* (SUN et al., 2013) e *Lotus corniculatus* (ABDELGAWAD et al., 2015), cultivadas sob restrição hídrica, contudo essas plantas são C<sub>3</sub> e possuem menor eficiência fotossintética, o que leva a maior degradação das clorofilas. Em plantas C<sub>4</sub> como a *U. ruziziensis* também são relatados ausência da degradação das clorofilas (ABDELGAWAD et al., 2015; KOWITCHAROEN et al., 2015). A baixa degradação da clorofila *a* entre o déficit moderado e o severo é desejado, visto que a restrição hídrica leva a inibição da síntese de clorofila (JIN et al., 2015), deixando a planta dependente da preservação, para que a partir da reidratação a taxa fotossintética seja retomada, o que justifica a ausência de síntese de novas clorofilas após a reidratação (Figura 14A), visto que a planta ainda estava equilibrando seu aparato fotossintético (dados não mostrados).

A elevação do teor de clorofila *b* no déficit moderado e severo para a aplicação de *A. brasilense* foliar (Figura 14B) está relacionado com o efeito verde proporcionado pela bactéria (QUADROS et al., 2014). Também representa uma resposta a fotoproteção juntamente com os carotenóides que teve seu conteúdo aumentado em ambos os níveis de déficit (Figura 14C), Sendo os carotenoides pigmentos que sequestram o O<sub>2</sub><sup>-</sup> evitando a degradação da clorofila (GILL; TUTEJA, 2010).

Os resultados demonstram que a clorofila *a* foi preservada quando em condições de estresse, sendo condizente com a atividade das enzimas antioxidativas e a elevação no teor de carotenóides, o que foi maximizado quando se realizou a aplicação de *A. brasilense* foliar, sendo tratamento que se destacou na capacidade de promover a proteção da *U. ruziziensis* das ERO's.

## 5. Conclusões

O déficit hídrico causou grandes variações no sistema antioxidativo, sendo que a POD apresentou maior importância na remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas de *U. ruziziensis*. Contudo, com o aumento da restrição hídrica a atividade da POD é reduzida, enquanto CAT eleva sua atividade.

A inoculação de *A. brasilense* via foliar se mostrou eficiente em elevar a atividade da SOD e da CAT em plantas de *U. ruziziensis*, em condições de déficit severo, reduzindo a morte dos tecidos foliares.

Plantas de *U. ruziziensis* inoculadas com *A. brasilense* via sementes, submetidas ao déficit hídrico, apresentam maior atividade da SOD, representando um mecanismo de tolerância ao déficit hídrico.

Não foi constatado redução nos teores de clorofilas em folhas de plantas de *U. ruziziensis*, submetidas ao déficit hídrico moderado e severo, com aumento no teor de clorofila *a* e *b* quando se inoculou *A. brasilense* via pulverização foliar, sendo que o mesmo apresentou incremento no teor de carotenóides em condições de déficit severo.

## 6. Referências Bibliográficas

ABDELGAWAD, H.; FARFAN-VIGNOLO, E. R.; VOS, D.; ASARD, H. Elevated CO<sub>2</sub> mitigates drought and temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes. **Plant Science**, v. 231, p. 1–10, 2015.

AGARWAL, S. Increased antioxidant activity in Cassia seedlings under UV-B radiation. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, p. 157–160, 2007.

AIMAR, D.; CALAFAT, M.; ANDRADE, A. M.; CARASSAY, L.; BOUTEAU, F.; ABDALA, G.; MOLAS, M. L. Drought effects on the early development stages of *Panicum virgatum* L.: Cultivar differences. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 49–59, 2014.

ANINBON, C.; JOGLOY, S.; VORASOOT, N.; PATANOTHAI, A.; NUCHADOMRONG, S.; SENAWONG, T. Effect of end of season water deficit on phenolic compounds in peanut genotypes with different levels of resistance to drought. **Food Chemistry**, v. 196, p. 123–129, 2016.

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 84–93, 2009.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência**

**Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.

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

CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, K.; SOUZA, F. S.; MARUR, C. J.; PEREIRA, L. F. P.; FILHO, J. C. B.; VIEIRA, L. G. E. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic “Swingle” citrumelo plants over-accumulating proline. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 242–250, 2011.

CAO, B.; MA, Q.; ZHAO, Q.; WANG, L.; XU, K. Effects of silicon on absorbed light allocation, antioxidant enzymes and ultrastructure of chloroplasts in tomato leaves under simulated drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 53–62, 2015..

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2833–2837, 1988.

ESTEVEZ, S.; SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 662–679, 2008.

FARFAN-VIGNOLO, E. R.; ASARD, H. Effect of elevated CO<sub>2</sub> and temperature on the oxidative stress response to drought in *Lolium perenne* L. and *Medicago sativa* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 59, p. 55–62, 2012.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.

FIGUEIREDO, S. L.; RODRIGUES, J. D.; CARNEIRO, J. P. C.; SILVA, A. D. A.; LIMA, M. B. Fisiologia e produção da soja tratada com cinetina e cálcio sob déficit hídrico e sombreamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 11, p. 1432–1439, 2013.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 73–82, 1982.

- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant physiology**, v. 84, n. 2, p. 450–5, jun. 1987.
- HENDGES, F. B.; RAMBO, C. R.; ALCASSA, L. P.; LIEBL, J.; VENDRUSCOLO, E. C. G.; COSTA, A. C. T. Avaliação enzimática e fisiológica de plântulas de milho submetidas à seca. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 2, p. 52–63, 2015.
- HUANG, C.; ZHAO, S.; WANG, L.; ANJUM, S. A.; CHEN, M.; ZHOU, H.; ZOU, C. Alteration in chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in hybrid ramie (*Boehmeria nivea* L.) under drought stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 5, p. 594–599, 2013.
- HUSEYNOVA, I. M. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1817, n. 8, p. 1516–1523, 2012.
- JIN, R.; SHI, H.; HAN, C.; ZHONG, B.; WANG, Q.; CHAN, Z. Physiological changes of purslane (*Portulaca oleracea* L.) after progressive drought stress and rehydration. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 215–221, 2015..
- KOWITCHAROEN, L.; WONGS-AREE, C.; SETHA, S.; KOMKHUNTOD, R.; SRILAONG, V.; KONDO, S. Changes in abscisic acid and antioxidant activity in sugar apples under drought conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 1–6, 2015.
- KUMAR, M. S. S.; ALI, K.; DAHUJA, A.; TYAGI, A. Plant physiology and biochemistry role of phytosterols in drought stress tolerance in rice. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 96, p. 83–89, 2015.
- KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459–1465, 2007.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-vis spectroscopy. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- LIU, X.; CHAN, Z. Application of potassium polyacrylate increases soil water status and improves growth of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) under drought stress condition. **Scientia Horticulturae**, 2015.
- MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; ELIZABETH, C.; MACÊDO, C. De; PONTE, L. F. A. P.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica**

**Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 342–349, 2012.

QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; OLIVEIRA CAMARGO, F. A. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014.

ROSA, S. D. V. F.; VON PINHO, É. V. R.; VIEIRA, E. S. N.; VEIGA, R. D.; VEIGA, A. D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas lea associadas à tolerância de sementes milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 91–101, 2005.

SANTOS, O. O.; FALCÃO, H.; ANTONINO, A. C. D; LIMA, J. R. S.; LUSTOSA, B. M.; SANTOS, M. G. Desempenho ecofisiológico de milho , sorgo e braquiária sob déficit hídrico e reidratação. **Bragantia**, v. 73, n. 2, p. 203–212, 2014.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

SHI, H.; CHEN, L.; YE, T.; LIU, X.; DING, K.; CHAN, Z. Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 82, p. 209–217, 2014.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.

SUN, J.; GU, J.; ZENG, J.; HAN, S.; SONG, A.; CHEN, F.; FANG, W.; JIANG, J.; CHEN, S. Changes in leaf morphology, antioxidant activity and photosynthesis capacity in two different drought-tolerant cultivars of chrysanthemum during and after water stress. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 249–258, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artemed, 2013.

TALAAAT, N. B.; SHAWKY, B. T.; IBRAHIM, A. S. Alleviation of drought-induced oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants by dual application of 24-epibrassinolide and spermine. **Environmental and Experimental Botany**, v. 113, p. 47–58, 2015.

UZILDAY, B.; TURKAN, I.; SEKMEN, A. H.; OZGUR, R.; KARAKAYA, H. C. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. **Plant Science**, v. 182, p. 59–70, 2012.

VITORINO, H. S.; MARTINS, D. Efeito do déficit hídrico na eficiência de herbicidas e nas características bioquímicas de *Ipomoea grandifolia*. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 185–191, 2012.

WINGLER, A.; LEA, P. J.; QUICK, W. P.; LEEGOOD, R. C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 355, n. 1402, p. 1517–29, 2000.

YANG, Z.; WU, Y.; LI, Y.; LING, H. Q.; CHU, C. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. **Plant molecular biology**, v. 70, n. 1-2, p. 219–29, 2009.

ZHAO, Y.; DU, H.; WANG, Z.; HUANG, B. Identification of proteins associated with water-deficit tolerance in C4 perennial grass species, *Cynodon dactylon*×*Cynodon transvaalensis* and *Cynodon dactylon*. **Physiologia plantarum**, v. 141, n. 1, p. 40–55, 2011.

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

**CAPÍTULO V**

*Azospirillum brasilense* MANTÉM ASSIMILAÇÃO DE CO<sub>2</sub> EM *Urochloa ruziziensis*  
DURANTE DÉFICIT HÍDRICO

*Azospirillum brasilense* KEEPS CO<sub>2</sub> ASSIMILATION IN *Urochloa ruziziensis* DURING  
DROUGHT

**Resumo:** Objetivou-se identificar quais as variáveis estão diretamente envolvidas com a tolerância ao déficit hídrico, em *U. ruziziensis*, inoculada com *A. brasilense*, bem como qual dessas apresentam maior importância na atividade fotossintética durante o déficit hídrico moderado, severo e na reidratação. As variáveis envolvidas sob déficit moderado e na reidratação foram: teor relativo de água (TRA), umidade gravimétrica do solo (US), taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*), transpiração foliar (*E*), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*), concentração interna de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*), eficiência no uso da água (*WUE*), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidases (POD) e catalase (CAT). No déficit severo também se utilizou a massa seca total de parte aérea e de folhas mortas, o teor de clorofilas *a* e *b* e carotenoides. As análises de correlação simples, análise de trilha e de componentes principais, foram realizadas para as plantas mantidas irrigadas e sob déficit hídrico. Em déficit moderado, observa-se tendência de agrupamento das variáveis, sendo que a *g<sub>s</sub>* exerceu influência sobre *A*. Quando em déficit severo as correlações mostram que as trocas gasosas foram drasticamente influenciadas, sendo que *A* passou a ser influenciada pela *g<sub>s</sub>* e SOD. Na reidratação foi observado que o TRA e a SOD exercem influência na retomada da *A*, sendo que essas variáveis foram positivamente influenciadas pela inoculação de *A. brasilense*. Assim, ao estudar a taxa fotossintética, para analisar a tolerância ao déficit hídrico moderado deve-se considerar a *g<sub>s</sub>*, para o déficit severo a *g<sub>s</sub>* e a SOD, e quando na reidratação o TRA e a SOD.

**Palavras-chaves:** correlações simples, análise de trilha, componentes principais, trocas gasosas, enzimas do estresse oxidativo

**Abstract:** The objective was to identify which variables are directly involved with tolerance to drought, in *U. ruziziensis*, inoculated with *A. brasilense* and which of these are more important in photosynthetic activity during moderate drought, severe and rehydration. The variables involved in moderate deficit and rehydration were relative water content (RWC), gravimetric soil moisture (SM), net assimilation rate of CO<sub>2</sub> (*A*), leaf transpiration (*E*), stomatal conductance (*g<sub>s</sub>*), internal concentration CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*), water use efficiency (*WUE*), activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), peroxidases (POD) and catalase (CAT). In severe deficit also used the total dry weight of shoot and dead leaves, the chlorophylls *a* and *b* and carotenoids. The simple correlation analysis, path analysis and principal components were taken to the retained plants irrigated and under water deficit. In moderate deficit, there is grouping trend of variables, and the *g<sub>s</sub>*

exerted influence on  $A$ . When in severe deficit correlations show that gas exchange were drastically affected, and the  $A$  came to be influenced, in addition to  $g_s$  and SOD. In rehydration it was observed that the RWC and SOD began to exert influence on the resumption of  $A$ , and these variables were positively influenced by the inoculation of *A. brasilense*. Thus, to study the photosynthetic rate, to analyze tolerance to moderate water deficit should be considered  $g_s$ , for severe deficit in gas and SOD, and when rehydration in the RWC and SOD

**Keywords:** simple correlations, path analysis, principal components, gas exchange, oxidative stress enzymes

## 1. Introdução

A busca por plantas tolerantes ao déficit hídrico é um dos desafios atuais do melhoramento genético. São relatados grandes avanços em culturas como o milho, onde são conhecidas as principais características que conferem a resistência ao déficit hídrico, inclusive a fase fenológica onde a seleção deve ser realizada (MAKUMBI et al., 2011; TALAAT; SHAWKY; IBRAHIM, 2015).

Para o conhecimento das variáveis a serem utilizadas durante a seleção de plantas, são utilizadas técnicas estatísticas e multivariadas que exemplificam quais as características exercem maior importância na condição a ser melhorada (BERTINI et al., 2010; DALLASTRA; FERRAUDO, 2014). Dentre as técnicas utilizadas estão as correlações simples, a análise de trilha e a análise de componentes principais (ACP). As correlações simples medem a intensidade das associações entre duas variáveis (KAVALCO et al., 2014), por sua vez a análise de trilha tem como foco a avaliação no efeito direto e indireto das variáveis dependentes em relação a uma independente (KUREK et al., 2001). A ACP tem como foco identificar tratamentos com maior representatividade para explicar a variação total (MOITA NETO; MOITA, 1998; SILVA et al., 2010).

Em estudos com deficiência hídrica são relatados que as variáveis mais importantes na seleção de plantas para a tolerância a falta de água são a manutenção da taxa fotossintética (ZHANG et al., 2010; MEIRELLES et al., 2011), a taxa de transpiração (KISSEL et al., 2015) e pôr fim a relação entre essas representadas pela eficiência no uso da água (THAMEUR; LACHIHEB; FERCHICHI, 2012; ZHOU; LAMBRIDES; FUKAI, 2013). Os estudos de déficit hídrico mostram uma série de

resultados associando a manutenção da taxa fotossintética, com a abertura estomática, demonstrado em cana-de-açúcar (SILVA et al., 2012), arroz (LAUTERI et al., 2014) e bananeira, interferindo na taxa transpiratória (KISSEL et al., 2015), a qual influencia no desenvolvimento da planta. São demonstrados também que as enzimas ligadas a remoção de espécies reativas de oxigênio possuem importância para as plantas que sofrem com o déficit hídrico, evitando a degradação das células vegetais (BAODI et al., 2008; SHI et al., 2012).

O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), como o *Azospirillum brasilense* mostra-se efetivo no desenvolvimento das plantas (DARTORA et al., 2013; REPKE et al., 2013; QUADROS et al., 2014), influenciam também na arquitetura radicular (CASSÁN et al., 2009), incrementam os níveis de auxinas (FERREIRA; KNUPP; MARTIN-DIDONET, 2014) e podem auxiliar no teor de ácido abscísico (KOLB; MARTIN, 1985), além de interferir na produção de etileno pela ação na ACC diaminase, atuando diretamente no aumento da tolerância hídrica das plantas (AROCA, 2012).

Desta forma, o seguinte trabalho buscou identificar dentre as variáveis teor relativo de água, umidade do solo, condutância estomática e atividade da superóxido dismutase, quais estão diretamente envolvidas com a tolerância ao déficit hídrico, em *Urochloa ruziziensis*, bem como qual dessas apresentam maior importância na atividade fotossintética durante o déficit hídrico moderado, severo e na reidratação das plantas.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Descrição da área experimental*

O experimento foi conduzido em ambiente protegido, do tipo teto em forma de arco, coberto com filme de polietileno difusor de baixa densidade, com 150  $\mu$  espessura e proteção anti-UV, com laterais protegida com tela branca de 40% sombreamento, na estação experimental Professor Dr. Mário César Lopes, localizada nas coordenadas - 24°558'S e - 54°045'O, situada na Universidade Estadual do oeste do Paraná – UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, - Paraná, no período de 02 de fevereiro a 26 de abril de 2015. Foram utilizados vasos plásticos com capacidade nominal de 8,7 litros (altura: 23 cm; diâmetro superior: 26 cm; diâmetro inferior: 19 cm), que recebeu como substrato solo proveniente do horizonte A de LATOSSOLO VERMELHO Eutrófico. O solo apresentava as seguintes características químicas: saturação de bases de 60,2%,

pH de 5,5 e teor de matéria orgânica de 24,61 g dm<sup>-3</sup>, teor de P de 3,08 mg dm<sup>-3</sup> e K de 0,28 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, não sendo necessária a correção, com uma população natural de bactérias diazotróficas, determinada pelo método do número mais provável de 4 x 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> solo (DÖBEREINER, BALDANI, BALDANI, 1995).

## 2.2 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido sob o delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial 4x2, totalizando oito tratamentos, onde o primeiro fator foi representado pelas formas de aplicação de *A. brasilense* sendo elas: sementes, aplicação foliar e semente mais aplicação foliar, com um tratamento controle. O segundo fator foi representado pela presença ou ausência do déficit hídrico, com quatro repetições, totalizando 32 parcelas experimentais.

## 2.3 Condução

Para a realização do experimento foram utilizadas sementes da espécie *U. ruziziensis*, sendo conduzidas duas plantas por vasos. A aplicação de *A. brasilense* estirpes AbV5 e AbV6 (produto comercial) nas sementes foi realizada na dose de 1 mL de inoculante (2x10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) para cada 1000 sementes, as quais foram homogeneizadas e mantidas a sombra por cerca de 30 minutos. Após a semeadura os vasos foram mantidos em capacidade de campo, com reposição diária de água. A aplicação de *A. brasilense* estirpes AbV5 e AbV6 foliar foi realizada quando as plantas se encontravam no início do perfilhamento, o que representou 20 dias após a semeadura, fazendo o uso de dose de 300 mL de inoculante por hectare e volume de calda de 300 L ha<sup>-1</sup>, com auxílio de um pulverizador costal de CO<sub>2</sub> com pressão constante, equipado com pontas Magno 11002 ADGA, espaçadas em 0,5 m, a pressão de 40 kgf cm<sup>-2</sup>, realizada de forma noturna.

Após as aplicações as plantas foram constantemente monitoradas, não sendo realizada a aplicação de nutrientes minerais durante o experimento.

Quando as plantas alcançaram adequado desenvolvimento foliar, recomendado para o pastejo (45 dias após a semeadura), foi realizada imposição do déficit hídrico, para isso todos os vasos foram previamente irrigados até alcançarem capacidade de campo. Os tratamentos destinados ao déficit hídrico tiveram sua irrigação suspensa, sendo mantidos em restrição hídrica até o momento em que as plantas em pelo menos um tratamento alcançou taxa fotossintética próxima a zero. A partir desse momento as plantas foram

reidratadas, para isso os vasos foram irrigados até alcançarem a capacidade de campo. A reidratação foi avaliada até o momento que as plantas recuperassem sua taxa fotossintética próxima a condição inicial.

#### 2.4 Avaliações

As avaliações foram realizadas aos quatro dias após a imposição do déficit hídrico, classificado como déficit moderado e aos seis dias após o déficit hídrico, déficit severo (PIMENTEL, 2004), e após a reidratação. Sendo determinado o teor relativo de água (TRA) (SLAVIK, 1974) e a umidade gravimétrica do solo (US) em pré dawn. As trocas gasosas foram determinadas entre as 09:00 e 11:00 horas, utilizando o IRGA modelo LI-6400XT (Licor Inc. Lincoln, NE) determinando-se a taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), transpiração foliar ( $E$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração interna de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) e a eficiência no uso da água ( $WUE$ ) (ZHANG et al., 2001).

Amostras foliares foram coletadas para determinação da atividade das enzimas Superóxido dismutase (SOD) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), Catalase (CAT) (HAVIR; MCHALE, 1987) e Peroxidase (HAMMERSCHMIDT; NUCKLES; KUĆ, 1982), sendo essas variáveis avaliadas em todos os níveis de déficit e reidratação. Para o déficit severo ainda foi avaliada a massa seca total de parte aérea (MST), a massa seca de folhas mortas (MSFM) e os teores foliares de clorofila  $a$  (Clo  $a$ ), clorofila  $b$  (Clo  $b$ ) e carotenóides (Car) (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001).

#### 2.5 Análise estatística

As análises de correlações, trilha e componentes principais foram realizadas para as plantas mantidas sob restrição hídrica e para as plantas mantidas irrigadas, para identificar as variações ocorridas nas plantas. Para as análises de correlações simples foi utilizado o método de Pearson, através do programa Genes-UFV (CRUZ, 2013). A análise de trilha foi realizada para as características que não apresentaram elevada correlação dentro da condição de déficit hídrico, sendo realizada com TRA, US,  $g_s$  e SOD, com variável resposta  $A$ , realizado sob o método de multicolinearidade, com o uso do programa Genes-UFV (CRUZ, 2013). Para a análise de componentes principais foi utilizado o programa XLSTAT, utilizando-se a média geral padronizadas, obtida pela divisão da média pelo desvio padrão da respectiva variável, sendo os valores expostos em coeficiente de correlação, e expressos em tamanho unitário.

### 3. Resultados

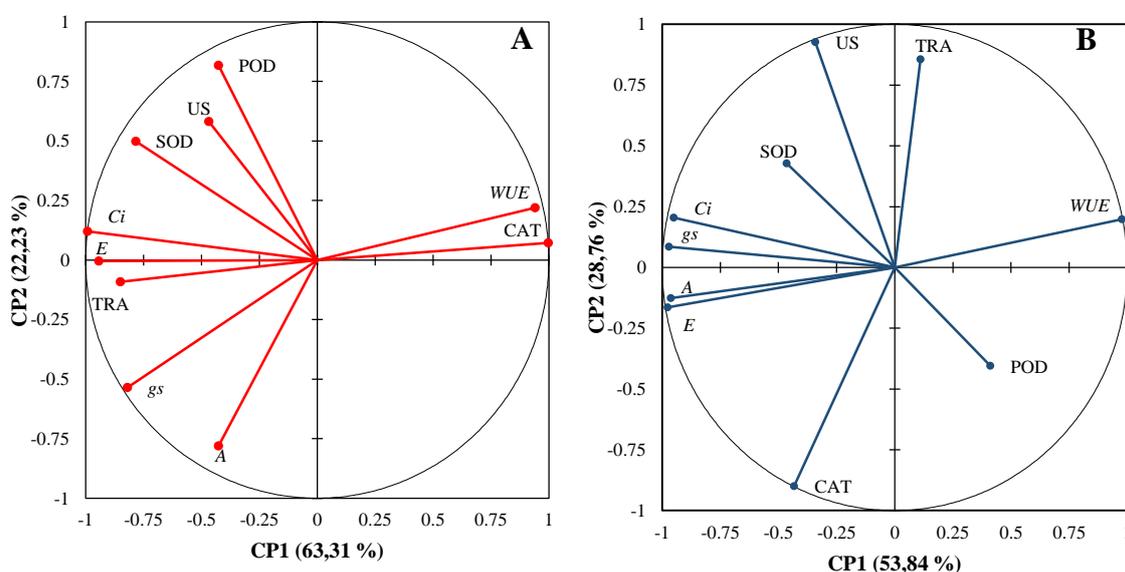
Os resultados das análises de componentes principais, correlações simples e trilha mostraram que as condições hídricas que as plantas estão submetidas causam grande influência na relação exercida entre os sistemas fisiológicos e bioquímicos da planta.

A partir da análise de componentes principais realizadas para as plantas cultivadas sob déficit hídrico e mantidas irrigadas foi observado que as em restrição hídrica apresentaram tendência a aumentar o agrupamento das variáveis em um menor número de quadrantes.

**Tabela 2:** Variância de cada componente principal (CP) e sua importância em relação à variância total em planta de *Urochloa ruziziensis* inoculadas com *Azospirillum brasilense* em condições de déficit hídrico, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11	CP12	CP13	CP14	CP15
Plantas em déficit hídrico moderado															
Autovetor	6,33	2,22	1,42	0,01	0,00002	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0001	-	-	-	-	-
Variância (%)	63,31	22,23	14,25	0,18	0,0002	0,0	0,0	0,0	0,0	0,001	-	-	-	-	-
Variância Acumulada (%)	63,31	85,55	99,81	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	100	-	-	-	-	-
Plantas mantidas irrigadas no momento de déficit moderado															
Autovetor	5,38	2,87	1,73	0,0001	0,00002	0,00001	0,0	0,000006	0,00001	0,0048	-	-	-	-	-
Variância (%)	53,82	28,76	17,35	0,001	0,0002	0,0001	0,0	0,00006	0,0001	0,048	-	-	-	-	-
Variância Acumulada (%)	53,84	82,59	99,94	99,95	99,95	99,95	99,95	99,95	99,95	100	-	-	-	-	-
Plantas em déficit hídrico severo															
Autovetor	8,80	3,90	2,65	0,0009	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,366
Variância (%)	55,95	24,84	16,85	0,006	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,33
Variância Acumulada (%)	55,95	80,80	97,65	97,66	97,66	97,66	97,66	97,66	97,66	97,66	97,66	97,66	97,66	97,66	100
Plantas mantidas irrigadas no momento de déficit severo															
Autovetor	6,67	4,92	3,39	0,00003	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000001	0,00004	0,00005
Variância (%)	44,47	32,84	22,61	0,0002	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00001	0,0003	0,0003
Variância Acumulada (%)	44,47	77,31	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	100
Plantas em déficit hídrico após a reidratação															
Autovetor	4,21	3,59	2,17	0,025	0,0001	0,0	0,0	0,0	0,0	0,004	-	-	-	-	-
Variância (%)	42,06	35,88	21,74	0,255	0,001	0,0	0,0	0,0	0,0	0,044	-	-	-	-	-
Variância Acumulada (%)	42,06	77,95	99,69	99,95	99,95	99,95	99,95	99,95	99,95	100	-	-	-	-	-
Plantas mantidas irrigadas após a reidratação															
Autovetor	5,09	2,79	2,09	0,005	0,0005	0,00004	0,0	0,000006	0,00002	0,0008	-	-	-	-	-
Variância (%)	50,96	27,9	20,98	0,054	0,005	0,0004	0,0	0,00006	0,0002	0,008	-	-	-	-	-
Variância Acumulada (%)	50,96	78,95	99,93	99,98	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	100	-	-	-	-	-

Ao se observar a condição de déficit moderado para as plantas mantidas sob restrição hídrica, os componentes principais 1 (CP1) e 2 (CP2) explicam 85,55% da variação, sendo observado maior agrupamento entre as variáveis, e maiores vetores por parte das variáveis SOD e POD (Figura 15A), quando comprado a condição irrigada (Figura 15B). Esses resultados evidenciam que o sistema fisiológico e bioquímico da planta passa a atuar conjuntamente de forma mais pronunciada buscando manter o desenvolvimento da planta de forma adequada. As plantas hidratadas tiveram os CP1 e CP2 explicando 82,59% da variação, sendo que as variáveis estudadas se mantiveram mais distantes entre si, exceto para aquelas ligadas as trocas gasosas (Figura 15B).

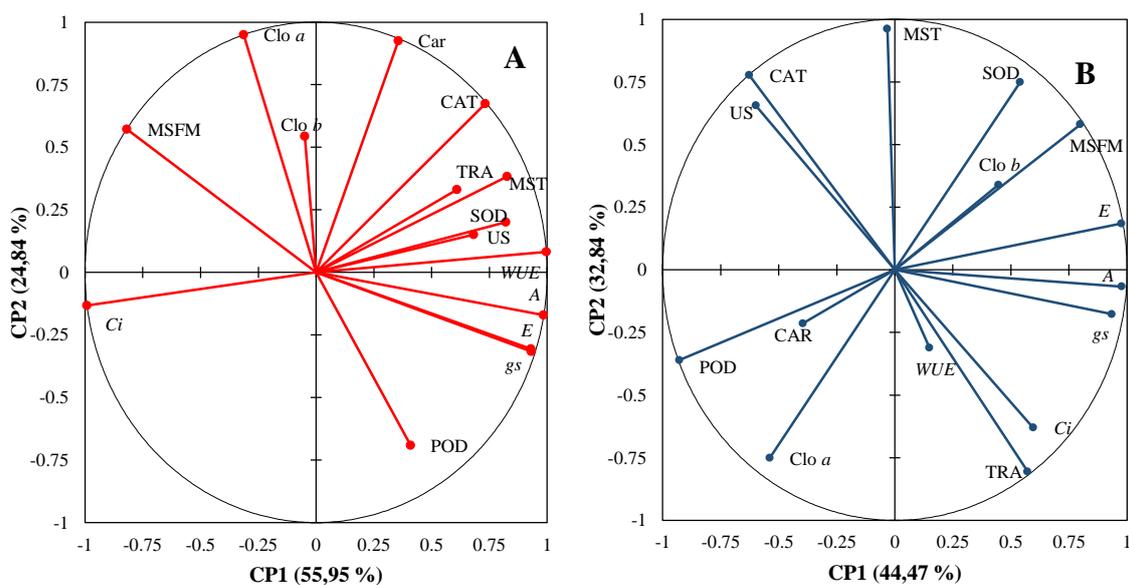


**Figura 15:** Análise de componentes principais de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar em condições de déficit hídrico moderado, para plantas mantidas sob restrição hídrica (A) e mantidas irrigadas (B), em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. \*\*TRA: Teor relativo de água; US: Umidade gravimétrica do solo; A: Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; E: transpiração foliar; gs: condutância estomática; Ci: concentração interna de CO<sub>2</sub>; WUE: eficiência no uso da água; SOD: atividade da enzima Superóxido dismutase; POD: Peroxidase; CAT: catalase.

No déficit severo, os CP1 e CP2 explicam 80,79% da variação, sendo que as plantas apresentaram maior agrupamento entre suas variáveis, ocupando principalmente dois quadrantes (Figura 16A). Esse fato evidencia que mesmo sendo obtidas baixo número de correlações significativas (Tabela 3), as variáveis apresentam dependência entre si. Por sua vez as plantas mantidas irrigadas tiveram uma distribuição homogênea das variáveis nos quatro quadrantes, mostrando menor dependência das variáveis entre si (Figura 16B). Comprovando as correlações negativas entre a MSFM com as variáveis,

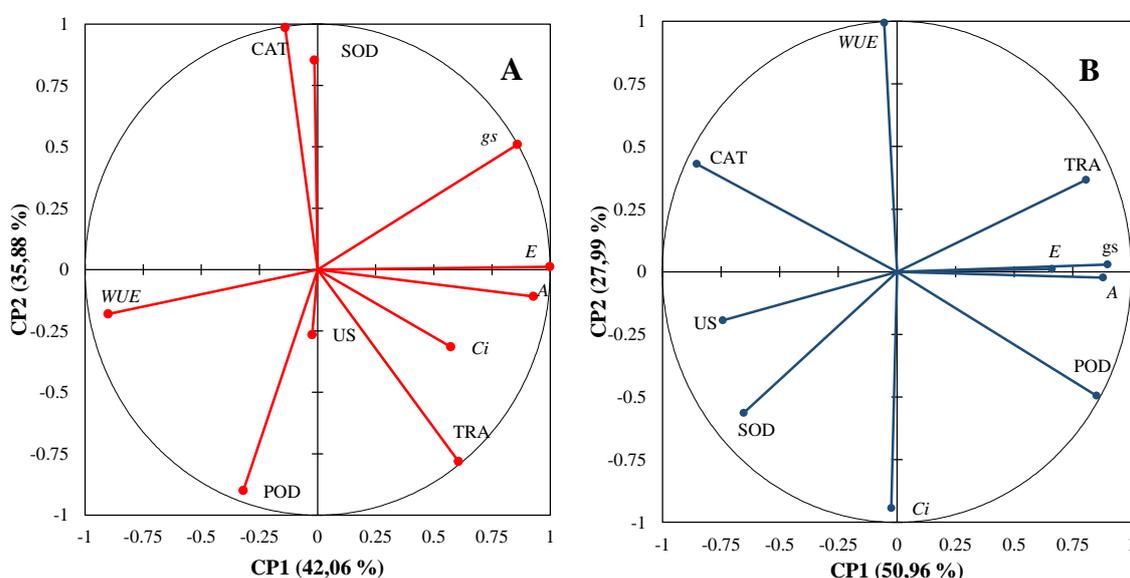
foi observado que essa característica se afastou das demais avaliadas, ficando próximo apenas da *Ci* (Figura 16A).

Observando as enzimas do estresse oxidativo é possível verificar um vetor de maior importância para a CAT em relação a POD nas plantas sob déficit severo (Figura 16A), enquanto nas plantas irrigadas ambas apresentam vetores de igual importância. Outro fator que pode ser observado é a menor representatividade do TRA e da US sob déficit em relação aos CP1 e CP2. Observa-se também que a MST nessa condição se associou principalmente com as trocas gasosas das plantas, ao TRA, US e a SOD.



**Figura 16:** Análise de componentes principais de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar em condições de déficit hídrico severo, para plantas mantidas sob restrição hídrica (A) e mantidas irrigadas (B), em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. \*\*TRA: Teor relativo de água; US: Umidade gravimétrica do solo; A: Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; E: transpiração foliar; gs: condutância estomática; Ci: concentração interna de CO<sub>2</sub>; WUE: eficiência no uso da água; SOD: atividade da enzima Superóxido dismutase; POD: Peroxidasas; CAT: catalases; MST: massa seca total de parte aérea; MSFM: massa seca de folhas mortas; Clo a e b: clorofila a e b; Car: carotenóides.

Após a reidratação das plantas foi observado distribuição das variáveis em todos os quadrantes, sendo que a US apresentou menor importância em relação ao CP1 e CP2, que explicaram 77,94% da variação (Figura 17A), contudo pode-se observar ainda que a A, E e gs apresentavam maior distância entre si, quando comparado as plantas constantemente irrigadas (Figura 17B), nessa condição os CP 1 e CP2 explicaram 79% da variação total.



**Figura 17:** Análise de componentes principais de *U. ruziziensis* inoculada com *A. brasilense*, via semente e foliar em condições de déficit hídrico após a reidratação, para plantas mantidas sob restrição hídrica (A) e mantidas irrigadas (B), em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015. \*\*TRA: Teor relativo de água; US: Umidade gravimétrica do solo; A: Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; E: transpiração foliar; gs: condutância estomática; Ci: concentração interna de CO<sub>2</sub>; WUE: eficiência no uso da água; SOD: atividade da enzima Superóxido dismutase; POD: Peroxidase; CAT: catalase.

Quando se avaliou as correlações simples para a condição de déficit hídrico moderado nas plantas mantidas irrigadas foram observadas correlação positivas para  $A \times E$ ,  $A \times gs$ ,  $E \times gs$ , e negativas para  $E \times WUE$  e  $SOD \times POD$  (Tabela 2), sendo que nessa condição não foram encontradas correlações significativas do TRA nas folhas com nenhuma das variáveis. Quando avaliou-se a análise de trilha é verificado que o TRA também não exerceu efeito sobre A (Tabela 5). A partir da trilha verificou-se que a  $gs$  tem maior influência na manutenção da taxa fotossintética da planta, o que é evidenciado pela elevada correlação entre as variáveis.

Contudo, ao observar as correlações para as plantas mantidas sob déficit hídrico moderado, as dependências entre as variáveis passam a ser limitadas, com maior dependência ao TRA, de forma significativa para  $TRA \times E$ , embora não fosse significativa a correlação entre  $TRA \times gs$  foi alta, tendo o TRA maior influência na manutenção da abertura estomática. A restrição hídrica elevou a atividade das enzimas do estresse oxidativo, ocorrendo correlação negativa entre  $CAT \times Ci$  e positiva entre  $CAT \times WUE$ , também é possível verificar que a CAT tem comportamento oposto ao TRA, E e gs

(Tabela 3). A *gs* apresentou maior efeito direto sobre *A*, superando a condição irrigada, enquanto o TRA teve sua importância reduzida, sendo seu efeito indireto via a *gs* pronunciado (Tabela 4), confirmando a forte correlação positiva entre ambas as variáveis.

**Tabela 3:** Correlações entre variáveis avaliadas em *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense* em condições de déficit hídrico moderado, para plantas mantidas em restrição hídrica e irrigadas, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015

	TRA	US	A	E	<i>gs</i>	<i>Ci</i>	WUE	SOD	POD	CAT
TRA		0,8357	-0,0945	-0,1784	0,0770	0,1879	0,3185	-0,0759	0,1113	-0,8477
US	0,0000		0,2490	0,2027	0,4457	0,5514	-0,1371	0,4320	-0,3853	-0,6951
A	0,1961	0,0505		0,9943*	0,9772**	0,9448	-0,9461	0,2082	-0,1499	0,5166
E	0,9743**	0,2188	0,2535		0,9654**	0,9269	-0,9749**	0,2747	-0,2207	0,5625
<i>gs</i>	0,8510	-0,0619	0,6745	0,8429		0,9925*	-0,9142	0,3172	-0,2542	0,3306
<i>Ci</i>	0,8187	0,5525	0,3413	0,9268	0,7439		-0,8691	0,3494	-0,2841	0,2131
WUE	-0,6847	-0,4857	-0,6910	-0,8019	-0,8360	-0,9138		-0,4324	0,3884	-0,6054
SOD	0,4288	0,9032	0,1145	0,6147	0,3009	0,8478	-0,7239		-0,9974*	-0,1384
POD	0,4882	0,4186	-0,6330	0,5271	-0,0099	0,5115	-0,1214	0,5994		0,1378
CAT	-0,8440	-0,4386	-0,4899	-0,9345	-0,8520	-0,9815**	0,9586**	-0,7534	-0,3594	

Valores acima da diagonal principal indicam as correlações para as plantas irrigada, valores abaixo da diagonal principal indicam as correlações para as plantas sob restrição hídrica. \* significativo a 1%, \*\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. TRA: Teor relativo de água; US: Umidade gravimétrica do solo; A: Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; E: transpiração foliar; *gs*: condutância estomática; *Ci*: concentração interna de CO<sub>2</sub>; WUE: eficiência no uso da água; SOD: atividade da enzima Superóxido dismutase; POD: Peroxidasas; CAT: catalases.

Com o aumento na intensidade do déficit hídrico foi observado maior número de correlações significativas entre as variáveis, principalmente para aquelas envolvidas nas trocas gasosas da planta, sendo observado correlação positiva da *A* com *E*, *gs* e WUE, de *E* x *gs*, bem como relação negativa entre *A* x *Ci* e WUE x *Ci*, diferentemente da condição de déficit moderado, em déficit severo o TRA x US apresentaram uma alta correlação entre si, bem como a MST x SOD (Tabela 5). A relação encontrada entre as variáveis ligadas com as trocas gasosas das plantas nessa condição, mostra que a restrição hídrica interfere nas relações entre as mesmas, visto que na mesma condição as plantas que foram mantidas hidratadas não apresentaram nenhuma correlação significativa para as variáveis relacionadas as trocas gasosas. Ainda nessa foi observado alta correlação negativa entre a MSFM x POD, ou seja, quando o sistema de enzimas oxidativas está atuando eficientemente na remoção dos radicais livres, se tem menor morte celular e conseqüentemente senescência das folhas (Tabela 5).

**Tabela 4:** Análise de trilha das características ligadas a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, em plantas de *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense*, na presença ou ausência do déficit hídrico em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.

Análise de trilha	Déficit Moderado		Déficit Severo		Reidratação	
	Com DH	Sem DH	Com DH	Sem DH	Com DH	Sem DH
<b>A x TRA</b>						
Efeito Direto	-0,965	-0,195	0,057	0,168	1,068	0,867
Efeito Indireto via US	0,000	0,021	0,251	0,276	-0,261	0,013
via SOD	-0,086	0,009	0,023	-0,171	-0,252	-0,317
via <i>gs</i>	1,287	0,076	0,235	0,301	0,040	0,358
Total	0,196	-0,094	0,569	0,582	0,595	0,921
<b>A x US</b>						
Efeito Direto	0,313	0,026	0,256	-0,345	-0,775	-0,035
Efeito Indireto via TRA	0,000	-0,163	0,056	-0,134	0,359	-0,322
via SOD	-0,182	-0,054	0,026	-0,003	0,116	-0,607
via <i>gs</i>	-0,093	0,440	0,322	-0,222	-0,033	0,622
Total	0,050	0,249	0,671	-0,720	-0,333	-0,342
<b>A x SOD</b>						
Efeito Direto	-0,201	-0,127	0,128	0,484	0,421	0,636
Efeito Indireto via TRA	-0,413	0,014	0,010	-0,597	-0,638	-0,432
via US	0,282	0,011	0,053	0,002	-0,213	0,033
via <i>gs</i>	0,455	0,313	0,558	0,105	0,140	-0,558
Total	0,114	0,208	0,755	0,554	-0,290	-0,320
<b>A x <i>gs</i></b>						
Efeito Direto	1,512	0,987	0,700	0,416	0,314	0,677
Efeito Indireto via TRA	-0,821	-0,015	0,192	0,122	0,139	0,458
via US	-0,019	0,011	0,118	0,184	0,083	-0,032
via SOD	-0,060	-0,040	0,102	0,123	0,188	-0,524
Total	0,674	0,977	0,965	0,864	0,725	0,578
Coefficiente de determinação	0,823	0,963	0,978	0,975	0,9999	0,998
Efeito Residual	0,419	0,189	0,147	0,157	2,380	3,721

DH: déficit hídrico; A: Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; TRA: Teor relativo de água; US: Umidade gravimétrica do solo; SOD: atividade da enzima Superóxido dismutase; *gs*: condutância estomática. Valor de  $k = 0$ .

Para as plantas mantidas em restrição hídrica embora não fosse observada correlações significativa para a MSFM, todas as obtidas com exceção da *Ci* se mostraram negativas, evidenciando que o rompimento do equilíbrio fisiológico e enzimático da planta causa a morte celular e culmina em um maior senescência das folhas. A dependência das plantas em relação ao sistema oxidante na manutenção das trocas gasosas sob déficit severo é comprovada através da análise de trilha onde a SOD teve

efeito total de 0,755 na *A*, sendo esse em grande parte de forma indireta pela *gs*, a qual possui maior efeito total 0,965 sob *A*. Ainda pode-se evidenciar que o conteúdo de água no solo possui maior importância na manutenção da *A* visto que o efeito total passou a ser pronunciado nas plantas sob déficit hídrico (Tabela 4).

**Tabela 5:** Correlações entre variáveis avaliadas em *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense* durante o déficit hídrico severo, para plantas mantidas em restrição hídrica e irrigadas, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.

	TRA	US	A	E	gs	Ci	WUE	SOD	POD	CAT	MST	MSFM	Clo a	Clo b	Car
TRA		-0,7994	0,5821	0,4270	0,7250	0,9257	0,1910	-0,3542	-0,2551	-0,9920*	-0,7512	0,0134	0,3557	0,1101	0,0841
US	0,9812**		-0,7207	-0,4132	-0,5337	-0,5414	-0,7254	-0,0072	0,2770	0,8650	0,7749	-0,0268	0,0054	0,3366	0,5074
A	0,5698	0,6717		0,9207	0,8641	0,5258	0,3543	0,5542	-0,8651	-0,6566	-0,1496	0,7121	-0,5529	0,2481	-0,5511
E	0,3209	0,4442	0,9612**		0,9140	0,5205	-0,0139	0,6242	-0,9832**	-0,4744	0,1759	0,9048	-0,6234	0,5888	-0,3288
gs	0,3357	0,4609	0,9652**	0,9996*		0,8222	-0,0943	0,2544	-0,8323	-0,7379	-0,1166	0,6919	-0,2533	0,6122	-0,0571
Ci	-0,6593	-0,7073	-0,9537**	-0,8786	-0,8788		-0,1814	-0,3404	-0,3723	-0,8861	-0,4905	0,1873	0,3415	0,4641	0,3428
WUE	0,6426	0,7000	0,9675**	0,9001	0,9007	-0,9987*		0,2060	0,0596	-0,2941	-0,5587	-0,2055	-0,2047	-0,8162	-0,8305
SOD	0,1831	0,2092	0,7552	0,8108	0,7966	-0,8325	0,8294		-0,7364	0,2608	0,6005	0,8085	-0,9999	0,1788	-0,7157
POD	0,4495	0,6004	0,5424	0,4714	0,4941	-0,3228	0,3571	-0,1209		0,3067	-0,3418	-0,9655**	0,7358	-0,6124	0,3628
CAT	0,6027	0,5353	0,6027	0,4947	0,4859	-0,8140	0,7846	0,7871	-0,2221		0,7558	-0,0572	-0,2625	-0,0531	0,0425
MST	0,3341	0,3273	0,7337	0,7357	0,7224	-0,8638	0,8510	0,9761**	-0,1721	0,9023		0,5748	-0,6019	0,5366	0,0488
MSFM	-0,3567	-0,5182	-0,9057	-0,9228	-0,9317	0,7362	-0,7692	-0,5227	-0,7682	-0,2083	-0,4311		-0,8084	0,6810	-0,3037
Clo a	0,1108	-0,0823	-0,4717	-0,5783	-0,5896	0,1851	-0,2345	-0,0576	-0,7948	0,4120	0,1113	0,7999		-0,1793	0,7148
Clo b	0,7536	0,6482	-0,1108	-0,3807	-0,3662	-0,0369	0,0053	-0,3773	0,1024	0,2535	-0,1768	0,2964	0,5180		0,4902
Car	0,4260	0,2864	0,1871	0,0757	0,0626	-0,4730	0,4290	0,5498	-0,5741	0,8967	0,7036	0,2460	0,7689	0,3737	

Valores acima da diagonal principal indicam as correlações para as plantas irrigada, valores abaixo da diagonal principal indicam as correlações para as plantas sob restrição hídrica. \* significativo a 1% de probabilidade; \*\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. TRA: Teor relativo de água; US: Umidade gravimétrica do solo; A: Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; E: transpiração foliar; gs: condutância estomática; Ci: concentração interna de CO<sub>2</sub>; WUE: eficiência no uso da água; SOD: atividade da enzima Superóxido dismutase; POD: Peroxidases; CAT: catalases; MST: massa seca total de parte aérea; MSFM: massa seca de folhas mortas; Clo a e b: clorifila a e b; Car: carotenóides.

Após a reidratação das plantas foi observado correlação significativa entre *A* x *WUE*, sendo observado menor dependência entre as variáveis. Nas plantas mantidas hidratadas foi observado correlação negativa entre *gs* x *US* (Tabela 6). A análise de trilha mostra que a recuperação da taxa fotossintética está diretamente ligada com a capacidade de recuperação da turgescência do tecido foliar, com efeito direto do TRA sob *A* de 1,068, e pela eliminação das espécies reativas de oxigênio representada pela SOD, com efeito direto de 0,421 em relação a *A*. Também pode-se observar que após a reidratação das plantas a *gs* não possui efeito pronunciado sobre *A*, o mesmo ocorreu com a umidade do solo. Enquanto as plantas mantidas constantemente hidratadas continuam com seus efeitos diretos e indiretos próximos as avaliações anteriores (Tabela 4).

**Tabela 6:** Correlações entre variáveis avaliadas em *Urochloa ruziziensis* inoculada com *Azospirillum brasilense* após a reidratação, para plantas mantidas em restrição hídrica e irrigadas, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, 2015.

	TRA	US	A	E	gs	Ci	WUE	SOD	POD	CAT
TRA		-0,3714	0,9214	0,8856	0,5289	-0,5191	0,2749	-0,4985	0,5851	-0,3956
US	0,3370		-0,3427	-0,0117	-0,9542**	-0,0117	-0,2163	0,9186	-0,4248	0,7371
A	0,5956	-0,3332		0,9381	0,5782	-0,1573	-0,1172	-0,3209	0,8421	-0,6224
E	0,6028	0,0143	0,9122		0,2629	-0,2749	-0,0988	-0,0591	0,6872	-0,3419
gs	0,1301	-0,1079	0,7254	0,8662		0,0975	0,0237	-0,8251	0,6734	-0,8824
Ci	0,7060	0,7995	0,2994	0,6007	0,3692		-0,9031	0,3797	0,3894	-0,4821
WUE	-0,3460	0,4502	-0,9569**	-0,8851	-0,8460	-0,1599		-0,5747	-0,5550	0,4452
SOD	-0,5980	0,2754	-0,2901	0,0174	0,4482	0,1170	0,0650		-0,1898	0,4626
POD	0,4657	-0,0389	-0,0940	-0,3417	-0,7474	-0,1236	0,3326	-0,9181		-0,8903
CAT	-0,8688	-0,3496	-0,2037	-0,1322	0,3775	-0,4618	-0,0893	0,7943	-0,8148	

Valores acima da diagonal principal indicam as correlações para as plantas irrigada, valores abaixo da diagonal principal indicam as correlações para as plantas sob restrição hídrica. \*\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. TRA: Teor relativo de água; US: Umidade gravimétrica do solo; A: Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; E: transpiração foliar; gs: condutância estomática; Ci: concentração interna de CO<sub>2</sub>; WUE: eficiência no uso da água; SOD: atividade da enzima Superóxido dismutase; POD: Peroxidases; CAT: catalases.

#### 4. Discussões

O déficit hídrico leva a série de respostas nas plantas que iniciam-se por respostas fisiológicas e podem culminar na morte da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013). Para superar essa condição, as plantas possuem uma série de defesas que são desencadeadas de forma gradativa, causando respostas a longo e a curto prazo (SOUZA; MATTA; FÁVERO, 2014). Para avaliar essas condições a literatura classifica o déficit hídrico em momentos distintos (PIMENTEL, 2004), sendo o déficit moderado e o severo os mais recomendados para se realizar as avaliações de tolerância a seca. A reidratação também é um ponto crucial para se identificar a capacidade da planta em eliminar o efeito residual do déficit hídrico.

Quando a planta está em condições de água disponíveis, mantém seu sistema fisiológico ativo, sendo observado correlações entre as variáveis ligadas essa condição,  $A \times E$ ,  $A \times gs$  e  $E \times gs$  (Tabela 3). Essa correlação exercida entra as trocas gasosas é relatada como positiva, visto que a abertura estomática regula a entrada de CO<sub>2</sub> e a saída de água via transpiração foliar.

Contudo, mesmo sem apresentar correlação, a *gs* apresentou maior peso sob a manutenção da *A* em déficit moderado (Tabela 4), o que é reforçado pela proximidade dos seus vetores dentro dos componentes principais (Figura 15A). Os resultados são

semelhantes aos encontrados na cultura da cana-de-açúcar, onde através da análise trilha foi demonstrado que a  $g_s$  foi a principal variável relacionada a manutenção da taxa fotossintética (SILVA et al., 2012). Tal pode estar associado ao fato que algumas plantas  $C_4$ , principalmente aquelas mais adaptadas a condição de déficit hídrico, podem manter seus estômatos parcialmente abertos mesmo em déficit hídrico, mantendo assim o fluxo de  $CO_2$  na câmara subestomática, e a atividade fotossintética (ENDRES et al., 2010). Nessa condição as enzimas ligadas a remoção de ERO's não interferiram na fotossíntese (Tabela 3 e 4). Outra condição a ser observado foi a existência de correlação negativa entre a CAT x TRA (Tabela 3). Houve elevação de 53,24% da atividade da CAT em condições de déficit hídrico severo, enquanto a POD apresentou queda de 15,92% na sua atividade (dados não mostrados). Essa condição ocorre, visto que a POD necessita agente redutor para a quebra dos radicais  $H_2O_2$  (ANINBON et al., 2016), que tem sua disponibilidade reduzida em condições de déficit hídrico. Ainda para as plantas irrigadas pode ser observado que a US e a  $g_s$  apresentam correlações negativas entre si (Tabela 4), o que era esperado visto que o fechamento estomático é citado como uma das primeiras defesas das plantas ao déficit hídrico (SOUZA; MATTA; FÁVERO, 2014), ou ainda, pela falta de água no solo desencadear a síntese de ácido abscísico levando ao fechamento estomático (TAIZ; ZEIGER, 2013; KOWITCHAROEN et al., 2015).

Contudo, quando a planta entra numa condição de déficit hídrico moderado observa-se que a relação entre as variáveis é modificada, como pode ser observado pela correlação entre TRA x  $E$  que passou a ser importante, evidenciando que a manutenção da transpiração foliar passa ser dependente do teor de água nas folhas, e menos dependente da abertura estomática. Essa relação mostra que a planta tentava manter seu crescimento mesmo nas condições adversas (KISSEL et al., 2015), sendo essa condição possibilitada pela manutenção da nutrição das regiões mais apicais da planta. A menor importância da  $g_s$  nessa situação ocorre, pois, os estômatos estão parcialmente fechados e outros fatores passaram a influenciar as trocas gasosas. A relação entre CAT x  $C_i$  é explicado pela redução de  $CO_2$ , associado a falta de água e altas temperaturas, acarretando na fotoinibição e culminando na formação de ERO's e conseqüentemente maior atividade da CAT. A ação dessas enzimas faz com que a planta mantenha seu sistema fisiológico funcional o que foi representado pela sua relação positiva com a  $WUE$ , confirmado pela ACP (Figura 15A). A relação entre a SOD e POD na manutenção da  $WUE$ , foi demonstrada em trigo (BAODI et al., 2008).

Assim destaca-se que a  $g_s$  é a principal variável para as plantas tolerar o déficit hídrico moderado. Desta forma, tratamentos que favorecem maior eficiência na regulação estomática elevam a tolerância ao déficit hídrico. O uso de *A. brasilense* é uma opção, principalmente via foliar, visto que as plantas que receberam esse tratamento tiveram melhor regulação estomática em déficit moderado, evitando a perda excessiva de água (dados não mostrados).

Em condições de déficit hídrico severo, além da  $g_s$ , outras variáveis passam a atuar de forma significativa na manutenção da  $A$  (Tabela 6) e produção de matéria seca, principalmente aquelas ligadas a remoção de ERO's (Tabela 5). A ausência de respostas por parte do TRA e da US sob  $A$  se deu devido a água disponível as plantas estar extremamente limitada e a importância dessas se deram de forma indireta via  $g_s$ , assim como demonstrado em trigo (BAODI et al., 2008).

Uma possível elevação da MST pela maior atividade da SOD pela correlação exercida, ocorre devido a dismutase do radical  $O_2^{\bullet-}$  que é tóxico a planta e leva a morte celular (BARBOSA et al., 2014). Dessa forma, menor senescência foliar pode ser observada sendo que a MSFM se aproximou apenas da  $C_i$  (Figura 16A), devido ao aumento de  $CO_2$  em condições de fotossíntese próxima a zero (valor médio de  $2,61 \mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$ ) levar a formação de radicais livres, pelo aumento no pH na célula vegetal.

Na condição de déficit hídrico severo a planta tende a apresentar maior relação entre as variáveis ligadas ao sistema fisiológico e bioquímico, sendo que esses estão diretamente ligado com a manutenção da MST (Figura 16A). Esses resultados são opostos aos encontrados em folhas de trigo, onde o aumento do déficit hídrico levou a menores correlações entre as  $A$ ,  $E$ ,  $g_s$  e  $C_i$ , contudo sempre verificando-se elevada correlação entre  $A$  x  $E$ , assim como os presentes resultados (HUI et al., 2008). Essa relação ocorre devido a planta tentar superar a condição adversa, assim todos os sistemas de tolerância a seca estão ativos (PIMENTEL, 2004; AROCA, 2012; SOUZA; MATTA; FÁVERO, 2014) e atuando simultaneamente para evitar a senescência foliar que foi de  $1,20 g^{-1}$  de folhas para o controle, enquanto o tratamento com aplicação de *A. brasilense* foliar promoveu  $0,96 g^{-1}$  de folhas e para os tratamentos mantido irrigados a média foi de  $0,84 g^{-1}$  de folhas.

Diferentemente do déficit moderado onde a  $g_s$  é a principal variável na manutenção da  $A$ , em condições de déficit severo, as enzimas ligadas ao estresse oxidativo ganham importância, atuando conjuntamente com a  $g_s$  na manutenção da  $A$  evitando senescência foliar. Concordando com a condição anterior onde o uso de *A. brasilense* via foliar mostrou-se efetivo sob  $g_s$ , nessa o mesmo também apresentou resultados

satisfatórios sob as enzimas, principalmente SOD e CAT. Também foi evidenciado que a MSFM se distanciou das demais características, devido essa ocorrer em associação com o nível de etileno sob déficit hídrico (BALDO et al., 2009), que é limitado pelo do *A. brasilense*, devido a ação sobre a enzima ACC diaminase, precursora do etileno (FIGUEIREDO et al., 2008).

A correlação negativa entre  $A$  x  $WUE$ , bem como o não agrupamento (Tabela 5, Figura 17A), quando se realizou a reidratação das plantas é resultado da abertura dos estômatos, para que a taxa de absorção de água pelas raízes seja retomada, recuperando assim a turgescência. Desta forma maiores perdas via transpiração levaram ao efeito negativo em relação a  $A$  (Tabela 4). Contudo, a taxa fotossintética não é recuperada na sua totalidade rapidamente (MANSFIELD; DAVIES, 1985; MATTOS; GOMIDE; HUAMAN, 2005; CERQUEIRA et al., 2015; SLAMA et al., 2015), exercendo balanço negativo em relação a eficiência na utilização da água (WU; BAO, 2012).

A planta rapidamente recupera seu teor de água, passando a ser determinante em relação a recuperação da taxa fotossintética (Tabela 4). Essa condição ocorreu devido a planta necessitar da água para todo o funcionamento do seu mecanismo fisiológico (TAIZ; ZEIGER, 2013). As enzimas ligadas ao estresse oxidativo representada pela SOD, continuam a ser importante na recuperação das plantas, mesmo quando não aumentam sua atividade (AIMAR et al., 2014; JIN et al., 2015), visto que as ERO's formadas ainda estão a ser eliminadas, agindo negativamente sobre a fotossíntese (CERQUEIRA et al., 2015).

Desta forma, a recuperação do TRA é fundamental para a recuperação da atividade fotossintética, juntamente com a ação das enzimas antioxidativas. Uma planta que possui maior sistema radicular, possui maior área de exploração e absorção de água do solo, sendo essa condição influenciada pelo *A. brasilense* (AROCA, 2012; DARTORA et al., 2013; BULEGON et al., 2014).

O uso da bactéria promotora de crescimento vegetal *A. brasilense* interfere positivamente em todas as variáveis que modulam a tolerância das plantas de *U. ruziziensis* em relação ao déficit hídrico moderado ( $gs$ ), déficit hídrico severo ( $gs$  e enzimas antioxidativas) e durante a reidratação maximiza a área radicular favorecendo a principal variável ligado a retomada da taxa fotossintética, o TRA, além das enzimas antioxidativas. Desta forma, a utilização do *A. brasilense* principalmente de forma foliar, eleva a tolerância das plantas de *U. ruziziensis* ao déficit hídrico, e auxiliam na reidratação das plantas.

## 5. Conclusões

O equilíbrio fisiológico e bioquímico de *U. ruziziensis* é afetado pelo déficit hídrico, sendo observado uma maior associação das variáveis com a elevação da intensidade do déficit hídrico.

A principal variável envolvida na manutenção da taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> em plantas de *U. ruziziensis*, em condições de déficit moderado, é a condutância estomática. Em déficit hídrico severo deve-se observar além da condutância estomática a atividade da superóxido dismutase, e na reidratação o teor relativo de água das folhas e a atividade da superóxido dismutase.

A senescência foliar de *U. ruziziensis* se distancia e exerce correlações negativas com basicamente todas as variáveis do sistema fisiológico e bioquímico, enquanto a manutenção da massa seca total é dependente desses sistemas.

## 6. Referências Bibliográficas

- AIMAR, D.; CALAFAT, M.; ANDRADE, A. M.; CARASSAY, L.; BOUTEAU, F.; ABDALA, G.; MOLAS, M. L. Drought effects on the early development stages of *Panicum virgatum* L.: Cultivar differences. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 49–59, 2014.
- ANINBON, C.; JOGLOY, S.; VORASOOT, N.; PATANOTHAI, A.; NUHADOMRONG, S.; SENAWONG, T. Effect of end of season water deficit on phenolic compounds in peanut genotypes with different levels of resistance to drought. **Food Chemistry**, v. 196, p. 123–129, 2016.
- AROCA, R. **Plant responses to drought stress. from morphological to molecular features**. Granada: Springer, 2012.
- BALDO, R.; SCALON, S. P. Q.; ROSA, T. B. C. J.; MUSSURY, R. M.; BETONI, R.; BARRETO, W. S. Cotton plant cultivar delta opal behavior under water stress with or without bioestimulant. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. Suplement especial, p. 1804–1812, 2009.
- BAODI, D.; MENGYU, L.; HONGBO, S.; QUANQI, L.; LEI, S.; FENG, D.; ZHENGBIN, Z. Investigation on the relationship between leaf water use efficiency and physio-biochemical traits of winter wheat under rained condition. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 62, n. 2, p. 280–7, 2008.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.

- R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.
- BERTINI, C. H. C. M.; ALMEIDA, W. S.; SILVA, A. P. M. da; SILVA, J. W. L. E; TEÓFILO, E. M. Multivariate analysis and selection index for identification of cowpea genotypes. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 613–619, 2010.
- BULEGON, L. G.; KLEIN, J.; RAMPIM, L.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; KESTRING, D. Desenvolvimento inicial de plântulas de soja inoculadas e co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Jornal of Agronomic Sciences**, v. 3, n. 1, p. 26–37, 2014.
- CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28–35, 2009.
- CERQUEIRA, R. C.; COSTA, J. M.; CHAVES, M. M.; RODRIGUES, J. D. Fisiologia e metabolismo foliar em duas variedades de videira sujeitas a um ciclo de déficit hídrico e reidratação. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 10, n. 2, p. 211–217, 2015.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271–276, 2013.
- DALLASTRA, A.; FERRAUDO, A. S. Multivariate approach in the selection of superior soybean progeny which carry the RR gene. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 3, p. 588–597, 2014.
- DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1023–1029, 2013.
- ENDRES, L.; SILVA, J. V.; FERREIRA, V. M.; BARBOSA, G. V. S. Photosynthesis and water relations in brazilian sugarcane. **The Open Agriculture Journal**, v. 4, n. 1, p. 31–37, 2010.
- FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience journal**, v. 30, n. 3, p. 655–665, 2014.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; MARTÍNEZ, C. R.; CHANWAY, C. P.

- Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 1, p. 182–188, 2008.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977.
- HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 73–82, jan. 1982.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant physiology**, v. 84, n. 2, p. 450–5, jun. 1987.
- HUI, Z.; ZHENGBIN, Z.; HONGBO, S.; PING, X.; FOULKES, M. J. Genetic correlation and path analysis of transpiration efficiency for wheat flag leaves. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 128–134, 2008. D
- JIN, R.; SHI, H.; HAN, C.; ZHONG, B.; WANG, Q.; CHAN, Z. Physiological changes of purslane (*Portulaca oleracea* L.) after progressive drought stress and rehydration. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 215–221, 2015.
- KAVALCO, S. A. F.; FIGUEIREDO, R.; GROLI, E. L.; ZIMMER, C. M.; BARETTA, D.; TESSMANN, E. W.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Análise de trilha em genótipos de trigo submetidos ao estresse por encharcamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1683, 27 ago. 2014.
- KISSEL, E.; VAN ASTEN, P.; SWENNEN, R.; LORENZEN, J.; CARPENTIER, S. C. Transpiration efficiency versus growth: Exploring the banana biodiversity for drought tolerance. **Scientia Horticulturae**, v. 185, p. 175–182, 2015.
- KOLB, W.; MARTIN, P. Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of Indole Acetic Acid. In: **Azospirillum III**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1985. p. 215–221.
- KOWITCHAROEN, L.; WONGS-AREE, C.; SETHA, S.; KOMKHUNTOD, R.; SRILAONG, V.; KONDO, S. Changes in abscisic acid and antioxidant activity in sugar apples under drought conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 1–6, 2015.
- KUREK, A. J.; CARVALHO, F. I. F.; ASSMANN, I. C.; MARCHIORO, V. S.; CRUZ, P. J. Análise de trilha como critério de seleção indireta para rendimento de grãos em feijão. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7, n. 1, p. 29–32, 2001.
- LAUTERI, M.; HAWORTH, M.; SERRAJ, R.; MONTEVERDI, M. C.; CENTRITTO,

- M. Photosynthetic diffusional constraints affect yield in drought stressed rice cultivars during flowering. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109054, 2014.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- MAKUMBI, D.; BETRÁN, J. F.; BÄNZIGER, M.; RIBAUT, J.-M. Combining ability, heterosis and genetic diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) under stress and non-stress conditions. **Euphytica**, v. 180, n. 2, p. 143–162, 2011.
- MANSFIELD, T. A.; DAVIES, W. J. Mechanisms for leaf control of gas exchange. **BioScience**, v. 35, n. 3, p. 158–164, 1985.
- MATTOS, J. L. S.; GOMIDE, J. A.; HUAMAN, C. A. M. Effect of water deficit on the growth of *Brachiaria* species in greenhouse. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 746–754, 2005.
- MEIRELLES, M. L.; FRANCO, A. C.; FARIAS, S. E. M.; BRACHO, R. Evapotranspiration and plant-atmospheric coupling in a *Brachiaria brizantha* pasture in the Brazilian savannah region. **Grass and Forage Science**, v. 66, n. 2, p. 206–213, 2011.
- MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467–469, 1998.
- PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropedica: Edur, 2004.
- QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; OLIVEIRA CAMARGO, F. A. Desempenho agrônomo a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014.
- REPKE, R. A.; JÚLIO, S.; CRUZ, S.; JORGE, C.; SILVA, D. A.; GONZALES, P.; JOSÉ, S. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 3, p. 214–226, 2013.
- SHI, H.; WANG, Y.; CHENG, Z.; YE, T.; CHAN, Z. Analysis of natural variation in Bermudagrass (*Cynodon dactylon*) reveals physiological responses underlying drought tolerance. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.
- SILVA, P. P.; SOARES, L.; COSTA, J. G.; SILVA VIANA, L.; DE ANDRADE, J. C. F.; GONÇALVES, E. R.; DOS SANTOS, J. M.; SOUZA BARBOSA, G. V.; NASCIMENTO, V. X.; TODARO, A. R.; RIFFEL, A.; GROSSI-DE-SA, M. F.; BARBOSA, M. H. P.; SANT’ANA, A. E. G.; NETO, C. E. R. Path analysis for selection of drought tolerant sugarcane genotypes through physiological components. **Industrial**

**Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 11–19, 2012.

SILVA, W. L.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U.; FRAGOSO, W. D.; VERAS, G. Classificação periódica: Um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1594–1597, 2010.

SLAMA, I.; M'RABET, R.; KSOURI, R.; TALBI, O.; DEBEZ, A.; ABDELLY, C. Water deficit stress applied only or combined with salinity affects physiological parameters and antioxidant capacity in *Sesuvium portulacastrum*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 213, n. 1, p. 69–76, 2015.

SLAVIK, B. **Methods of studying plant water relations**. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1974.

SOUZA, F. H. D.; MATTA, F. P.; FÁVERO, A. P. **Construção de ideótipos de gramíneas para usos diversos**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artemed, 2013.

TALAAT, N. B.; SHAWKY, B. T.; IBRAHIM, A. S. Alleviation of drought-induced oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants by dual application of 24-epibrassinolide and spermine. **Environmental and Experimental Botany**, v. 113, p. 47–58, 2015.

THAMEUR, A.; LACHIHEB, B.; FERCHICHI, A. Drought effect on growth, gas exchange and yield, in two strains of local barley Ardhaoui, under water deficit conditions in southern Tunisia. **Journal of Environmental Management**, v. 113, n. 3, p. 495–500, 2012.

WU, X.; BAO, W. Statistical analysis of leaf water use efficiency and physiology traits of winter wheat under drought condition. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, n. 1, p. 82–89, 2012.

ZHANG, B.; LIU, W.; CHANG, S. X.; ANYIA, A. O. Water-deficit and high temperature affected water use efficiency and arabinoxylan concentration in spring wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 52, n. 2, p. 263–269, 2010.

ZHANG, S.; LI, Q.; MA, K.; CHEN, L. Temperature-dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO<sub>2</sub> assimilation of quercus liaotungensis under midday high irradiance. **Photosynthetica**, v. 39, n. 3, p. 383–388, 2001.

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

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de *A. brasilense* em *U. ruziziensis* mantida constantemente irrigadas não exerce efeitos significativos nas relações hídricas, no sistema fisiológico e bioquímico.

Os resultados obtidos no presente estudos para as plantas mantidas em restrição hídrica mostram que o uso da inoculação de *A. brasilense* atual na regulação estomática das plantas de *U. ruziziensis* em condições de déficit hídrico moderado, possibilitando uma maior abertura em condições de déficit severo, em relação aos diferentes níveis de luminosidade empregados. O fato do *A. brasilense* atuar significativamente na regulação estomática, por algum motivo ainda desconhecido, possibilita a planta uma maior tolerância ao déficit hídrico, visto que as respostas estomáticas são as primeiras desencadeadas quando se tem o início da restrição hídrica, chamada de respostas fisiológicas de curto prazo, a planta conseguindo identificar essa falta de água antecipadamente possibilita que ela ative suas defesas contra a seca conseguindo manter uma taxa fotossintética mais elevada com  $A_{\max}$  de  $4,45 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , alcançando fotossíntese líquida positiva com menor luminosidade  $26,40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Embora o uso de *A. brasilense* inoculado nas sementes se mostrou eficiente em relação as curvas de respostas fotossintéticas, a aplicação via foliar apresentou os melhores resultados quando observa-se as relações hídricas, trocas gasosas e atividade enzimática das plantas de *U. ruziziensis* ao déficit hídrico, sendo que as plantas que receberam *A. brasilense* aplicado via foliar mantiveram suas taxas fotossintéticas mais elevadas mesmo em condição de severo déficit hídrico.

Além do sistema fisiológico o sistema bioquímico da planta também foi afetado positivamente pela aplicação de *A. brasilense* via foliar elevando a atividade da SOD e da CAT em condições de déficit severo, enquanto o uso de *A. brasilense* via semente atuou apenas na SOD, representando um mecanismo de tolerância ao déficit hídrico. Maiores atividades dessas enzimas são importantes pois, a presença do déficit hídrico faz com que a planta apresente maior necessidade na remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A ação do sistema antioxidativo foi eficiente evitando a degradação da clorofila *a* e *b*, sendo que a aplicação de *A. brasilense* via foliar incrementa o teor de carotenóides em condições de déficit severo, um mecanismo de defesa vegetal que auxiliou na manutenção das taxas fotossintéticas dentro desse tratamento.

A maior eficiência da inoculação foliar de *A. brasilense* em relação a tolerância ao déficit hídrico é comprovada quando se avaliou as principais variáveis envolvidas na manutenção da taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> em condições de déficit moderado, a condutância estomática, enquanto no déficit severo deve-se observar além da condutância estomática a superóxido dismutase (enzimas antioxidativas), também é constatado que a manutenção do sistema fisiológico e bioquímico evita a senescência foliar em déficit severo, e conseqüentemente atua na manutenção da massa seca total.

Na reidratação das plantas o *A. brasilense* continua a atuar na regulação estomática da planta, sendo que a abertura estomática após a reidratação das plantas foi elevada favorecendo a recuperação da taxa fotossintética líquida de CO<sub>2</sub> em plantas mantidas em déficit, contudo, ainda restringiam a perda de água pela transpiração, culminando em eficiência do uso da água semelhante as das plantas mantidas irrigadas. Nessa condição as variáveis que influenciaram mais na taxa fotossintética são o teor relativo de água e a superóxido dismutase, embora não avaliado o desenvolvimento radicular da planta, é amplamente relatado na literatura incremento radicular por parte do *A. brasilense*, favorecendo assim a absorção da água e retomada do TRA.

Assim, plantas de *U. ruziziensis* inoculadas uma única vez independente da forma utilizada conseguem identificar o déficit hídrico com maior antecedência que as não inoculadas, antecipando o fechamento dos estômatos e diminuindo a perda de água por transpiração. Contudo, cabe ressaltar que no Brasil o sistema de cultivo de pastagem é perenizado, e com baixa taxa de renovação, ou seja, o uso da inoculação via semente é dificultado, em contrapartida o uso da aplicação de *A. brasilense* via foliar é passível de ser empregada em pastagens implantadas, para elevar a tolerância ao déficit hídrico, auxiliando no desenvolvimento das pastagens e amenizando um dos principais entraves na produção de pastagens de elevada qualidade, o déficit hídrico. Entretanto, tem que se ressaltar que esse estudo considerou apenas um ciclo de pastejo da cultura, assim, devemos observar se essa ação de regulação estomática prolonga-se por um maior número de ciclo de pastejo, buscando identificar o intervalo de aplicação a ser utilizado e o momento que a aplicação deve ser realizada após o corte, visto que nesse estudo se utilizou a inoculação no perfilhamento.