

Influência Da Inoculação de *Azospirillum brasilense* em Milho Submetido a Condições de Déficit Hídrico

Edilaine Della Valentina Gonçalves¹, Luan Fernando O S Rodrigues¹, Mônica Bartira da Silva¹, Vanessa Daniele Matiello¹, Luiz Neri Berté¹, Cristiane Cláudia Meinerz¹ e Vandeir Francisco Guimarães¹

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, PR.

edilainevalentina@gmail.com,

luanf_rodrigues@hotmail.com,

monica.bartira@hotmail.com,

vdmatiello@yahoo.com.br, luiz.n.berte@hotmail.com, crismeinerz@hotmail.com, vandeirfg@yahoo.com.br

RESUMO - O objetivo do trabalho foi verificar o comportamento de plantas de milho na fase vegetativa submetidas ao déficit hídrico quando inoculadas com *A. brasilense*. O experimento foi conduzido em três etapas, de outubro a novembro de 2011. O delineamento foi de blocos casualizados em esquema fatorial 2x2 com cinco repetições. O primeiro fator referiu-se a combinação do sistema de cultivo (convencional e com inoculação de *A. brasilense*); o segundo a dois regimes de irrigação (com irrigação e com déficit hídrico). Quando 50% do milho atingiram o estágio V6 de ontogênese, suspendeu-se a irrigação dos tratamentos com déficit hídrico até que as plantas atingissem taxa de fotossíntese líquida média igual a zero. Nesse período e por mais quatro dias foram medidas umidade gravimétrica, tolerância protoplasmática e conteúdo relativo de água na folha, e no último dia foram colhidas amostras para avaliação de variáveis biométricas. Os resultados demonstraram não haver interações significativas entre inoculação e regime hídrico para nenhuma das variáveis, com exceção da matéria seca de colmo, pois quando inoculado com a estirpe AbV5 sem restrição, apresentou média superior ao tratamento submetido ao déficit. É necessário realizar mais estudos visando obter benefícios da associação bactéria-planta quando estas são submetidas à restrição hídrica.

Palavras-chave: *Zea mays* L., bactérias diazotróficas, regime hídrico.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande importância econômica para o Brasil, sendo um dos principais produtos em destaque na exportação (PEDRINHO et al., 2010). Essa cultura é influenciada constantemente pelo ambiente, pois, além de o nitrogênio ser um fator limitante para o seu desenvolvimento, o déficit hídrico durante a fase vegetativa reduz o crescimento da cultura, em função de decréscimos da área foliar e da biomassa (REIS JUNIOR et al., 2008).

Em busca de novas alternativas a fim de minimizar o efeito adverso do ambiente sobre o desempenho da cultura, novas pesquisas vêm se desdobrando na busca por genótipos de plantas mais promissoras. Porém, para isso, a associação de gramíneas com bactérias promotoras de crescimento (BPC) vem se destacando como uma das possibilidades de proporcionar à planta

maior tolerância às adversidades do ambiente.

As BPC são micro-organismos que vivem em associação simbiótica com as plantas. Essas, além de propiciarem maior eficiência na fixação de N, estão associadas à produção de fitohormônios, aumento da área de absorção radicular, melhoria dos parâmetros fotossintéticos das folhas, dentre eles, o teor de clorofila e condutância estomática, maior teor de prolina na parte aérea e raízes, melhoria no potencial hídrico, incremento no teor de água do apoplasto, maior elasticidade da parede celular, maior altura de planta e maior produção de biomassa (BARASSI et al., 2008).

Vários trabalhos têm demonstrado resultados eficientes da inoculação de BPC em gramíneas, as quais destaca-se o gênero *Azospirillum*, que apresenta capacidade de induzir respostas à planta em melhorar o aproveitamento dos recursos disponíveis no ambiente (BERGAMASCHI et al., 2006). É importante ressaltar que muitas vezes a ausência de resposta à inoculação de bactérias promotoras de crescimento em gramíneas tem sido atribuída ao uso de materiais inadequados. Para isso a escolha certa de bactérias eficientes associadas a genótipos de plantas promissoras constitui uma estratégia importante na obtenção de resultados satisfatórios (REIS JUNIOR et al., 2008).

O objetivo do trabalho foi verificar o comportamento de plantas de milho na fase vegetativa submetidas ao déficit hídrico quando inoculadas com a bactéria *A. brasilense*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em três etapas no período de outubro a novembro de 2011, na UNIOESTE de Marechal Cândido Rondon-PR. O município está localizado a uma longitude de 54° 22' W, latitude de 24° 46'S e altitude média de 420 m. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados em esquema fatorial 2x2 com cinco repetições. O primeiro fator referiu-se à combinação de dois sistemas de cultivo (convencional e com inoculação de *A. brasilense*); o segundo fator a dois regimes de irrigação (com irrigação e com déficit hídrico).

O experimento foi conduzido em vasos de polietileno de 8,5 litros preenchidos com Latossolo Vermelho eutroférico de textura argilosa. A adubação foi realizada conforme as necessidades da cultura, seguindo as recomendações de Raij et al. (1997). Para cada vaso foram semeadas seis sementes, com posterior desbaste das plantas, deixando somente três plantas por

vaso. Para os tratamentos que possuíam a inoculação das sementes com *A. brasilense*, foram utilizados 2 mL de solução contendo 2×10^8 UFC mL⁻¹ para 1000 sementes.

A 1ª etapa constituiu-se da condução dos experimentos até que o milho estivesse com seis folhas completamente expandidas (estágio V6).

A 2ª etapa correspondeu à suspensão da irrigação nos tratamentos com déficit hídrico até a obtenção da fotossíntese líquida menor ou igual a zero com o auxílio de um medidor de trocas gasosas, sendo que, posteriormente, foi realizada a re-hidratação correspondente à quantidade de água perdida por evapotranspiração. Nesta fase foram realizadas medidas do conteúdo relativo de água nas folhas, umidade gravimétrica e tolerância protoplasmática.

O conteúdo relativo de águas nas folhas (CRA) foi determinado segundo a metodologia proposta por Barrs (1968). Para a variável umidade gravimétrica do solo (Ug), coletaram-se diariamente, no período da manhã, amostras de solo de todos os vasos, sendo pesadas e em seguida colocadas em estufa à temperatura de 105°C. Posteriormente, realizou-se novamente a pesagem para o cálculo da umidade gravimétrica.

A tolerância protoplasmática foi realizada a cada dois dias sendo que, para o presente trabalho, são apresentadas apenas os resultados do sexto dia após indução do déficit hídrico, utilizando-se a metodologia descrita por Leopold et al. (1981). As análises de CRA, de tolerância protoplasmática e de Ug foram realizadas nas duas etapas do experimento no total de 40 vasos. A 3ª etapa correspondeu à realização das análises biométricas de área foliar, massa seca das folhas, massa seca do colmo e massa seca radicular.

Para a quantificação da área foliar utilizou-se o método de amostragens proposto por Benincasa (2003) e, para determinação da massa seca das folhas e do colmo, as plantas após coletadas, foram seccionadas em diferentes partes de interesse e levadas à estufa de circulação à 65 ± 3 °C. Após tabulados, os dados foram submetidos à análise de variância pela estimativa F de Snedecor e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando-se o SOFTWARE GENES V.7.0 (CRUZ, 2009).

Resultados e Discussão

Os resultados da análise de variância demonstraram não haver existência de interações

significativas entre inoculação e regime hídrico para nenhuma das variáveis determinadas, com exceção da matéria seca de colmo para a tolerância protoplasmática.

As relações hídricas no milho em estágio V6 encontram-se na Tabela 1. Para valores de umidade gravimétrica, os tratamentos submetidos à inoculação com a estirpe AbV5 apresentaram efeito significativo para a maioria dos dias após a indução do déficit hídrico (DAI), exceto no 1 e no 8 DAI. Para a fonte de variação do regime hídrico, houve respostas significativas apenas para os 7, 8 e 10 DAI.

Na Figura 1a é possível observar o comportamento da Ug do solo no período de déficit hídrico, bem como a recuperação das plantas de milho que foram submetidas à restrição hídrica ao serem reidratadas no sétimo dia após o início de déficit hídrico.

Na Figura 1b, o conteúdo relativo de água na folha (CRA) para o tratamento que não sofreu a indução de déficit hídrico apresentou comportamento constante, não havendo alterações no CRA, ao contrário dos tratamentos com déficit hídrico e inoculação com *Azospirillum brasilense* (C/ AbV5) e com déficit hídrico sem inoculação (S/ AbV5). Observa-se que do 1º ao 6º dia após o início do déficit hídrico, houve uma pequena variação entre C/ AbV5 e S/ AbV5, porém, uma queda brusca do CRA foi registrado no 7º dia para ambos os tratamentos, havendo a necessidade de se realizar a re-hidratação. Os resultados mostraram que as plantas inoculadas com *A. brasilense* se recuperaram mais rapidamente quando comparadas com as que não foram inoculadas. Dessa forma, é evidente que a bactéria contribui positivamente para que a planta pudesse elevar o seu CRA com mais eficiência, gastando menos tempo e menos energia.

Os resultados de tolerância protoplasmática mostraram não haver efeito significativo de horas após as coletas de folhas para nenhuma das fontes de variação. Entretanto para eletrólitos livres totais na solução houve efeito significativo apenas para o tratamento de regime hídrico.

A Figura 1c mostra que a liberação de eletrólitos em regime hídrico pode estar relacionado com o nível de deficiência hídrica que influencia a liberação de eletrólitos. Esses resultados são condizentes com os obtidos por Alonso et al. (1997) que observaram que em condições de restrição hídrica os eletrólitos livres são liberados, aumentando a quantidade de oxigênio (peróxido), radicais livres e de enzimas de lise, resultando na ruptura e aumento da permeabilidade seletiva da membrana plasmática, causando danos irreversíveis às células, devido à danificação da sua estrutura, tais como organelas e moléculas.

Na Tabela 2, os resultados mostram que a inoculação da estirpe AbV5 respondeu significativamente apenas para a matéria seca das raízes (MSR), enquanto que no regime hídrico o efeito foi registrado na área foliar (AF). Já para a interação inoculação e regime hídrico não houve diferença, exceto para a matéria seca do colmo (MSC). Os resultados mostram que os valores de AF foram mais influenciados pelo regime hídrico adotado do que pela utilização da AbV5, não havendo interação para esses fatores.

Na Tabela 3, observa-se que a imposição do regime hídrico, bem como para as sementes com e sem inoculação de *A. brasilense* ao longo da fase vegetativa, para as variáveis: tolerância protoplasmática (ELT), MSR, matéria seca das folhas (MSF) e AF, as médias não diferiram estatisticamente. Entretanto, a MSC quando inoculado com a estirpe AbV5 e sem a restrição apresentou média superior quando comparado ao tratamento submetido ao déficit.

Os resultados demonstraram não haver diferença significativa para os valores de AF. No entanto Cirilo e Andrade (1996) e Gerik et al. (1996) observaram que plantas de milho submetidas a déficit hídrico apresentaram menor área foliar. Tais resultados demonstram que em condições de restrição hídrica o equilíbrio entre a produção de fotoassimilados e a demanda desses para o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos é severamente afetado pela redução na área foliar fotossinteticamente ativa.

Há variabilidade quanto às diferentes respostas da cultura do milho associado à bactéria estando aliados com os fatores de crescimento, sendo necessário realizar mais estudos visando obter benefícios da associação bactéria-planta quando estas são submetidas a restrição hídrica.

Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que para este trabalho o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas para os dados de tolerância protoplasmática não apresentaram dados satisfatórios para as variáveis avaliadas, com exceção da matéria seca da raiz (MSR) e da matéria seca de colmo.

O conteúdo relativo de água na folha (CRA) para o tratamento submetido ao déficit hídrico e inoculação com *A. brasilense* apresentaram variações, confirmando a influência da bactéria na recuperação da planta

Literatura Citada

ALONSO, A.; QUEIROZ, C.G.S.; MAGALHÃES, A.C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1323, p.75-84, 1997.

BENINCASA, M.M.P. Análise de Crescimento de Plantas: Noções Básicas. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 42p.

BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.; CASANOVAS, E.M.; PEREYRA, M.A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p.49-59, 2008.

BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G.A.; COMIRAN, F.; BERGONCI, J.I.; MÜLLER, A.G.; FRANÇA, S.; SANTOS, A.O.; RADIN, B.; BIANCHI, C.A.M.; PEREIRA, P.G. Deficit hídrico e produtividade na cultura do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.243-249, 2006.

CIRILO, A.G.; ANDRADE, F.H. Sowing date and kernel weight in maize. *Crop Science*, Madison, v.36, p.325-331, 1996.

CRUZ, C.D. Programa Genes: Diversidade Genética. Editora UFV. Viçosa (MG), 2009, p.278.

GERIK, T.J.; FAVER, K.L.; THAXTON, P.M. et al. Late season water stress in cotton: I. Plant growth, water uses, and yield. *Crop Science*, Madison, v.36, p.914-921, 1996.

LEOPOLD, A.C.; MUSGRAVE, M.E.; WILLIAMS, K.M. Solute leakage resulting from leaf desiccation. *Plant Physiology*, v.68, p.1222-1225, 1981.

PEDRINHO, E.A.N, GALDIANO JÚNIOR, R.F, CAMPANHARO, J.C, ALVES, L.M.C, LEMOS, E.G.de.M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. *Bragantia*, v.69, p.905-911, 2010.

RAIJ, B. VAN; CANTARELA, H.; QUAGGIO, J.A; FURLANI, A. M. C. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2 ed. Campinas: Instituto Agrônômico & Fundação IAC, 1997, p. 180 (Boletim Técnico 100).

REIS JUNIOR, F.B.dos.; MACHADO, C.T.de.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, v32, p.1139-1146, 2008.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para relações hídricas no milho em estágio V6, relacionando inoculação com *Azospirillum brasilense* estirpe AbV5, e indução de déficit hídrico (Unioeste, Marechal Cândido Rondon-PR, 2012).

FV ¹	Quadrados médios									
	Umidade gravimétrica									
	1 DAI ²	2 DAI	3 DAI	4 DAI	5 DAI	6 DAI	7 DAI	8 DAI	9 DAI	10 DAI
Inoculação	34,32 ^{NS}	190,49 ^{**}	194,77 [*]	502,32 ^{**}	851,33 ^{**}	1159,3 ^{**}	1467,3 ^{**}	5,90 ^{NS}	296,30 [*]	467,97 ^{**}
Regime	105,94 ^{NS}	3,77 ^{NS}	36,95 ^{NS}	27,96 ^{NS}	20,45 ^{NS}	1,16 ^{NS}	59,16 ^{**}	206,81 ^{**}	99,60 ^{NS}	126,28 ^{**}
I x R	39,69 ^{NS}	1,48 ^{NS}	27,61 ^{NS}	9,03 ^{NS}	10,97 ^{NS}	1,29 ^{NS}	0,52 ^{NS}	9,07 ^{NS}	49,94 ^{NS}	0,62 ^{NS}
CV (%)	17,26	28,64	24,42	22,80	30,27	37,17	31,23	35,04	21,51	26,44
FV	Conteúdo relativo de água na folha									
	1 DAI	2 DAI	3 DAI	4 DAI	5 DAI	6 DAI	7 DAI	8 DAI	9 DAI	10 DAI
Inoculação	0,24 ^{NS}	32,14 ^{NS}	1130,2 ^{NS}	16,25 ^{NS}	121,38 ^{**}	951,09 [*]	199,28 ^{**}	13,19 ^{NS}	2,55 ^{NS}	180,79 [*]
Regime	41,24 ^{**}	296,10 ^{NS}	0,20 ^{NS}	36,77 ^{NS}	28,01 ^{NS}	6,17 ^{NS}	610,48 ^{**}	556,61 ^{NS}	53,83 ^{NS}	6,13 ^{NS}
I x R	2,30 ^{NS}	223,38 ^{NS}	295,28 ^{NS}	738,85 ^{NS}	12,63 ^{NS}	134,18 ^{NS}	3,07 ^{NS}	221,86 ^{NS}	280,24 ^{NS}	31,66 ^{NS}
CV (%)	11,31	14,68	22,76	29,32	10,21	15,81	18,82	15,66	18,94	12,56
FV	Tolerância protoplasmática									
	1 HAC ³	2 HAC	3 HAC	4 HAC	ELT ⁴					
Inoculação	1,30 ^{NS}	0,15 ^{NS}	1,54 ^{NS}	0,21 ^{NS}	3,44 ^{NS}					
Regime	18,16 ^{NS}	12,18 ^{NS}	36,15 ^{NS}	20,93 ^{NS}	479,22 ^{**}					
I x R	5,18 ^{NS}	11,69 ^{NS}	16,65 ^{NS}	23,16 ^{NS}	9,11 ^{NS}					
CV (%)	33,92	33,21	29,90	30,42	10,98					

¹FV: Fonte de variação; ²DAI: Dias após a indução do déficit hídrico; ³HAC: Horas após a coleta; ⁴ELT: Eletrólitos livres totais na solução; ^{NS}Não significativo; * e ** significativo pelo estimativa F de Snedecor ao nível de 1% e 5%, respectivamente.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para variáveis biométricas no milho em estágio V6, relacionando inoculação com *Azospirillum brasilense* estirpe AbV5, e indução de déficit hídrico (Unioeste, Marechal Cândido Rondon-PR, 2012).

FV ¹	Quadrados médios			
	Tolerância protoplasmática			
	MSR ²	MSC ³	MSF ⁴	AF ⁵
Inoculação	47,20 ^{**}	1,08 ^{NS}	0,19 ^{NS}	8,89 ^{NS}
Regime	1,27 ^{NS}	0,01 ^{NS}	0,06 ^{NS}	770,28 ^{**}
I x R	0,21 ^{NS}	0,58 [*]	0,21 ^{NS}	12,66 ^{NS}
CV (%)	51,65	12,52	11,18	20,38

¹FV: Fonte de variação; ²MSR: Matéria seca das raízes; ³MSC: Matéria seca do colmo; ⁴MSF: Matéria seca das

folhas; ⁵AF: Área foliar; ^{NS}Não significativo; * e ** significativo pelo estimativa F de Snedecor ao nível de 1% e 5%, respectivamente.

Tabela 3. Tolerância protoplasmática (ELT), matéria seca de raízes (MSR), matéria seca do colmo (MSC), matéria seca das folhas (MSF) e área foliar (AF) de milho em estágio V6 com (CI) ou sem (SI) inoculação com *Azospirillum brasilense* estirpe AbV5, e com (CD) ou sem (SD) indução de déficit hídrico (Unioeste, Marechal Cândido Rondon-PR, 2012).

Regime hídrico	ELT ($\mu\text{s cm}^{-1}$)			MSR (g plt^{-1})			MSC (g plt^{-1})			MSF (g plt^{-1})			AF ($\text{cm}^2 \text{plt}^{-1}$)		
	SI	CI	m	SI	CI	m	SI	CI	m	SI	CI	m	SI	CI	m
SD	88,12	96,56	92,34 a	6,97	6,67	6,81 a	2,45 aA	2,82 aA	2,63	3,33	3,43	3,38	138,93	128,10	134,85 a
CD	85,94	97,08	91,51 a	4,10	3,39	3,74 a	2,32 aA	2,02 bA	2,17	3,35	3,03	3,19	141,85	127,85	133,51 a
Média dms ¹	87,03 A	96,82 A		5,53 A	5,03 A		2,39	2,42		3,34	3,23		140,39 A	127,98 A	
	13,90			3,76			0,41			0,51			37,67		

¹dms:diferença mínima significativa por Tukey a $p \cdot 0,05$; *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na LINHA e minúsculas na COLUNA não diferem estatisticamente entre si por Tukey a $p \cdot 0,05$.

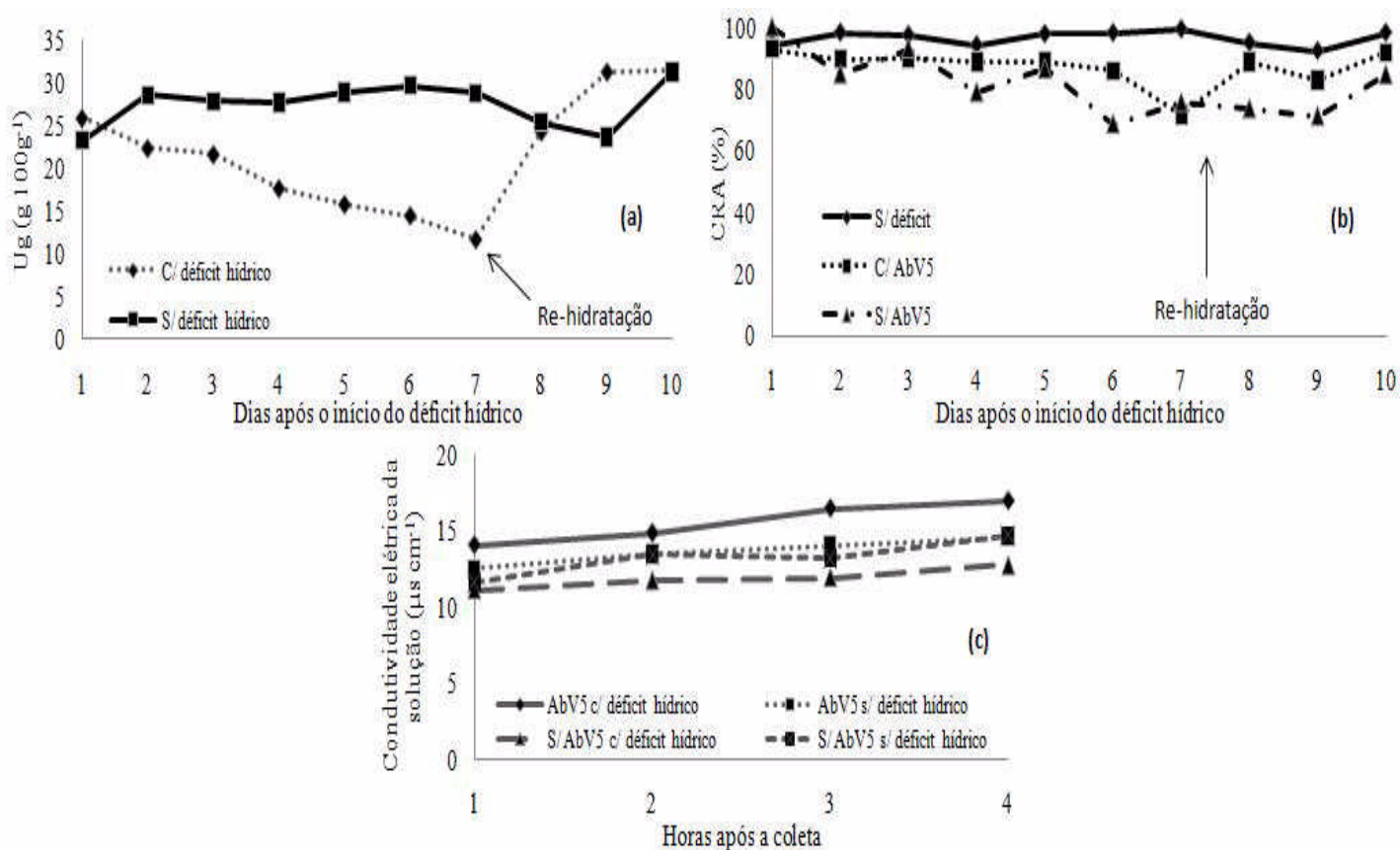


Figura 1. Umidade gravimétrica (a), conteúdo relativo de água nas folhas (b) e liberação de eltrólitos totais (c) por plantas de milho submetidas à inoculação com AbV5 na semente e ao déficit hídrico na fase inicial (Unioeste, Marechal Cândido Rondon-PR, 2012).