

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**Charleston dos Santos Lima**

**IMPACTO DA TEMPERATURA SOBRE A EFICIÊNCIA DE  
INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense*  
NA CULTURA DO MILHO**

Santa Maria, RS

2021



**Charleston dos Santos Lima**

**IMPACTO DA TEMPERATURA SOBRE A EFICIÊNCIA DE INOCULAÇÃO COM**  
*Azospirillum brasilense* **NA CULTURA DO MILHO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Agrobiologia**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Luciane Almeri Tabaldi

Santa Maria, RS

2021

Lima, Charleston dos Santos  
IMPACTO DA TEMPERATURA SOBRE A EFICIÊNCIA DE  
INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DO  
MILHO / Charleston dos Santos Lima.- 2021.  
118 p.; 30 cm

Orientadora: Luciane Almeri Tabaldi  
Coorientador: Thomas Newton Martin  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2021

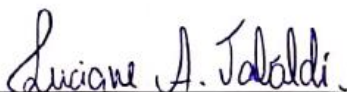
1. Milho 2. *Azospirillum brasilense* 3. Eficiência de  
inoculação 4. Temperatura 5. Interação planta-bactéria I.  
Tabaldi, Luciane Almeri II. Martin, Thomas Newton III.  
Título.

**Charleston dos Santos Lima**

**IMPACTO DA TEMPERATURA SOBRE A EFICIÊNCIA DE INOCULAÇÃO COM  
*Azospirillum brasilense* NA CULTURA DO MILHO**

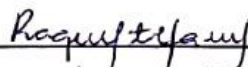
Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Agrobiologia**.

**Aprovado em 05 de março de 2021:**



---

**Luciane Almeri Tabaldi, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



---

**Raquel Stefanello, Dra. (UFSM)**



---

**Gerusa Massuquini Conceição, Dra. (Unijuí)**

Santa Maria, RS

2021



## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha família.  
em especial a minha esposa pela paciência  
companheirismo e incentivo.  
Amo você.*





## AGRADECIMENTOS

Sou grato a Deus pela dádiva da vida e oportunidade de evoluir em conhecimento para auxiliar na construção de uma agricultura cada vez mais baseada em processos e menos em produtos. Neste sentido, minhas palavras de gratidão e carinho pela UFSM, a qual foi minha segunda casa durante estes dois anos de grandes desafios e muito aprendizado, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia e à CAPES pela concessão da bolsa.

A orientação por vezes ultrapassa os limites da relação aluno-professor, fazendo com que grandes amizades sejam geradas neste processo. Saliento aqui a Prof<sup>a</sup> Luciane Almeri Tabaldi, a qual não mede esforços para motivar seus alunos, tornando-se uma referência de trabalho e dedicação a todos que estão a sua volta. Além disso, compartilhamos de uma personalidade muito parecida, “ansiosos”, mas sempre me acalmou e mostrou o melhor caminho. Muito obrigado prof<sup>a</sup> Lu. Adicionalmente, meus mais sinceros agradecimentos ao prof. Thomas Newton Martin que além de seu tempo e conhecimento compartilhado, disponibilizou toda a estrutura do grupo Coxilha-UFSM para a realização do trabalho, e em seu nome agradeço a cada integrante deste lindo grupo de pesquisa em grandes culturas. Em especial ao Dr. Joanei Cechin, Ezequiel da Rosa, Dr. Jéssica, Rosana, Eduardo M., Eduarda e Arícia, que auxiliaram diretamente na instalação do experimento e coleta de dados.

Aos colegas de laboratório 3110 e de Pós-Graduação Jover, Gerâne, Carol, Daiane, Marcos e Jéssica, meu muito obrigado pela amizade e experiências compartilhadas, as quais com certeza vou levar para o resto da vida. Vocês todos são merecedores do maior sucesso do mundo. Aos ICs do laboratório de Fisiologia Vegetal que participaram da pesquisa no início ou final, Thalía, Franco, Luana, Flaiane, Izadora e Letícia, foi um prazer inenarrável trabalhar com cada um de vocês, conhece-los melhor e aprender um pouco mais sobre ciência e humanidade. Sou eternamente grato.

A minha família a qual dediquei este trabalho, muito obrigado pelo incentivo e carinho aplicado neste período, sem dúvida foram essenciais para que os obstáculos fossem superados. Destaco aqui minha esposa Maria F. Lima, a qual suportou bons e maus momentos ao meu lado, auxiliando em trabalhos de campo e laboratório muitas vezes. Sou grato a Deus todos os dias pela sua vida.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa de mestrado só resta agradecer, e que Deus abençoe a todos.



## RESUMO

### IMPACTO DA TEMPERATURA SOBRE A EFICIÊNCIA DE INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DO MILHO

AUTOR: Charleston dos Santos Lima  
ORIENTADORA: Luciane Almeri Tabaldi

Bactérias promotoras de crescimento de plantas têm ganhado destaque atualmente, com aumento significativo de inoculantes comerciais para culturas não leguminosas, com o propósito de reduzir custos com adubações nitrogenadas, aumento da tolerância a fatores promotores de estresse e incremento de produtividade. Entretanto, o sucesso no uso da tecnologia pode ser afetado por inúmeros fatores relacionados ao genótipo, estirpe bacteriana e condição ambiental, colocando em dúvida o uso da tecnologia no campo. Desta forma, o objetivo da pesquisa foi avaliar a influência da temperatura em condições de laboratório e a campo na eficiência do processo de inoculação com *Azospirillum brasilense*, determinada a partir de variáveis de crescimento, bioquímicas, nutricionais e produtividade de grãos. O experimento I foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal de Plantas de Interesse Agrobiológico – UFSM Santa Maria. Sementes de dois híbridos de milho Syn 488 e Syn 505, inoculados ou não, foram dispostas em papel germitest umedecido com 2,5 vezes o peso do substrato e colocadas para germinar em equipamento do tipo B.O.D pelo período de sete dias. Após este período, as plântulas foram coletadas e as variáveis germinação, primeira contagem, comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, massa seca de plântulas, variáveis bioquímicas (enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD), conteúdo de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica), e pigmentos fotossintéticos (clorofilas totais e carotenoides) foram determinados. Adicionalmente, no experimento II, os híbridos de milho (inoculados ou não) foram testados a campo em três horários de semeadura (8, 15 e 18 horas), sendo determinada a temperatura e umidade relativa do solo no momento da semeadura. Posteriormente, avaliou-se no estágio fenológico de florescimento as respostas da interação (inoculação x horários) para variáveis bioquímicas, pigmentos fotossintéticos, concentração de nutrientes nos tecidos, produtividade e proteína bruta dos grãos. Evidenciou-se que sob condições controladas, o híbrido Syn488 demonstrou efeito negativo a inoculação, com alta peroxidação lipídica em plantas expostas a bactéria *A. brasilense*, o que não foi verificado a campo. Já Syn505 apresentou incremento para os parâmetros de crescimento e intensa modulação de pigmentos fotossintéticos e enzimas POD e SOD, principalmente sob temperaturas de 25 e 30 °C. Quando os híbridos foram semeados no campo, ambos os genótipos responderam positivamente a inoculação, contudo, o horário de semeadura alterou as respostas da bactéria, obtendo-se resultados satisfatórios da interação planta-bactéria quando a semeadura foi realizada às 15 e 18 horas na primeira época, com maior atividade de POD e SOD, concentração de N e produtividade de grãos. Conclui-se que inoculação de sementes pode ser influenciada pela temperatura a qual a semente e microrganismo são expostos, mesmo que por um curto período de tempo, o qual pode limitar as respostas da bactéria via incremento do sistema enzimático, fixação biológica do nitrogênio e absorção de nutrientes.

**Palavras-chave:** Fixação biológica do nitrogênio. Interação planta-bactéria. Temperatura.



## ABSTRACT

### IMPACT OF TEMPERATURE ON THE EFFICIENCY OF INOCULATION WITH *Azospirillum brasilense* IN CORN CULTURE

AUTHOR: Charleston dos Santos Lima

ADVISOR: Luciane Almeri Tabaldi

Growth promote bacteria of plants have currently gaining prominence, with significant increase in commercial inoculants for non-leguminous crops, with the purpose of reducing costs with nitrogen fertilizers, increasing tolerance to factors that promote stress and increasing productivity. However, success in the use of technology can be affected by numerous factors related to genotype, bacterial strain and environmental condition, putting the use of technology in the field in doubt. Thus, the objective of the research was to evaluate the influence of temperature in laboratory conditions and field in the efficiency of the inoculation process with *Azospirillum brasilense*, based on growth, biochemical, nutritional and grain yield variables. The first experiment was developed at the Laboratory of Plant Physiology of Plants of Agrobiological Interest - UFSM Santa Maria. Seeds of two corn hybrids Syn 488 and Syn 505, inoculated or not, were placed on germitest paper moistened 2.5 times the weight of the substrate and placed to germinate in B.O.D type equipment for a period of seven days. After this period, the seedlings were collected and the variables germination, first count, root length, shoot length, dry seedling weight, biochemical variables (superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) enzymes, hydrogen peroxide content and lipid peroxidation), and photosynthetic pigments (total chlorophylls and carotenoids) were determined. Additionally, in second experiment, the corn hybrids (inoculated or not) were tested in the field at three sowing time (8, 15 and 18 hours), being determined the temperature and relative humidity of the soil at the time of sowing. Subsequently, in the flowering, were evaluated the responses of the interaction (inoculation x time) for biochemical variables, photosynthetic pigments, concentration of nutrients in the tissues, productivity and crude protein of the grains. It was evidenced that under controlled conditions, the hybrid Syn488 demonstrated a negative effect of inoculation, with high lipid peroxidation in plants exposed to the bacteria *A. brasilense*, which was not verified in the field. On the other hand, Syn505 showed an increase in growth parameters and intense modulation of photosynthetic pigments and POD and SOD enzymes, mainly under temperatures of 25 and 30 °C. When the hybrids were sown in the field, both genotypes responded positively to the inoculation, however, the sowing time changed the responses of the bacterium, obtaining satisfactory results from the plant-bacterial interaction when the sowing was carried out at 15 and 18 hours in first season, with higher POD and SOD activity, nitrogen concentration and grain yield. It is concluded that seed inoculation can be influenced by the temperature to which seeds and microorganisms are exposed, even for a short period of time, which can limit the responses of the bacteria via an increase in the enzymatic system, biological nitrogen fixation and nutrient absorption.

**Keywords:** Biological nitrogen fixation. plant-bacterial interactions. Temperature



## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO I:

- Figura 1 - Teor de clorofilas totais, carotenoides, conteúdo de  $H_2O_2$  e atividade da guaiacol peroxidase (POD) obtidos a partir de plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas e sistema de inoculação..... 54
- Figura 2 - Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) determinada em plantas submetidas a diferentes temperaturas e sistema de inoculação. .... 55
- Figura 3 - Peroxidação lipídica (Tbars), determinada a partir de plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas e sistema de inoculação. .... 56
- Figura 4 - Teor de clorofilas totais, carotenoides e  $H_2O_2$  obtidos a partir de plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas e sistema de inoculação..... 59
- Figura 5 - Atividade enzimática da guaiacol peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) obtidas a partir de plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas e sistema de inoculação. .... 60
- Figura 6 - Peroxidação lipídica (Tbars), determinada a partir de plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas e sistema de inoculação. .... 61

### ARTIGO II:

- Figura 1 - Dados de temperatura do ar e precipitação durante o ciclo da cultura, no município de Santa Maria/RS, na primeira (A) e segunda época (B), na safra 2019/2020..... 75
- Figura 2 - Temperatura do solo na primeira época (A) e segunda época (B) de semeadura da cultura do milho no município de Santa Maria/RS, em três horários distintos..... 80
- Figura 3 - Teor de clorofilas totais de plantas submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo..... 82
- Figura 4 - Teor de carotenoides em plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo..... 83
- Figura 5 - Teor de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo..... 84
- Figura 6 - Atividade de guaiacol peroxidase (POD) em plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo..... 85
- Figura 7 - Atividade superóxido dismutase (SOD) em plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo..... 86
- Figura 8 - Porcentagem de N no tecido foliar em plantas submetidas a inoculação e horários de semeadura em duas épocas de cultivo..... 88
- Figura 9 - Porcentagem de P no tecido foliar em plantas submetidas a inoculação e horários de semeadura em duas épocas de cultivo..... 89
- Figura 10 - Porcentagem de K no tecido foliar em plantas submetidas a inoculação e horários de semeadura em duas épocas de cultivo..... 90

Figura 11 -	Concentração de Cu no tecido foliar em plantas submetidas a inoculação e horários de semeadura em duas épocas de cultivo.....	91
Figura 12 -	Concentração de Zn no tecido foliar em plantas submetidas a inoculação e horários de semeadura em duas épocas de cultivo.....	92
Figura 13 -	Concentração de Mn no tecido foliar em plantas submetidas a inoculação e horários de semeadura em duas épocas de cultivo.....	94
Figura 14 -	Concentração de Fe no tecido foliar em plantas submetidas a inoculação e horários de semeadura em duas épocas de cultivo.....	95
Figura 15 -	Produtividade de grãos de plantas submetidas a inoculação e horários de semeadura em duas épocas de cultivo.....	97
Figura 16 -	Porcentagem de PB nos grãos de plantas submetidas a inoculação e horários de semeadura em duas épocas de cultivo.....	98



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição de espécies reativas de oxigênio e locais de produção na célula.....31

### ARTIGO I:

Tabela 1 - Primeira contagem de germinação (PC), germinação (G), comprimento de raiz (CR), parte aérea (CPA), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA) obtidos após quatro (PC) e sete dias (G, CR, CPA, CT, MSR e MSPA), cultivar Syn 488, com e sem inoculação com *Azospirillum brasilense* (Azo) .....52

Tabela 2 - Primeira contagem da germinação (PC), germinação (G), comprimento de raiz (CR), parte aérea (CPA), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA) obtidos após quatro (PC) e sete dias (G, CR, CPA, CT, MSR e MSPA), cultivar Syn 505, com e sem inoculação com *Azospirillum brasilense* (Azo) .....57

### ARTIGO II:

Tabela 1 - Propriedades químicas do solo da área experimental.....74

Tabela 2 - Contagem do número de bactérias (UFC grama de raiz<sup>-1</sup>) de *Azospirillum brasilense* para cada horário de semeadura na primeira e segunda época de semeadura, Santa Maria/ RS, 2020.....81

Tabela 3 - Valores de referência para macro e micronutrientes no tecido foliar considerados adequados para a cultura do milho.....87

Tabela 4 - Estimativas dos efeitos diretos e indiretos das variáveis consideradas primárias sobre a produtividade de grãos.....99



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
2.1	OBJETIVO GERAL .....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	23
3.1	A CULTURA DO MILHO .....	23
3.2	O NITROGÊNIO NA CULTURA DO MILHO .....	24
3.3	RIZOBACTÉRIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO <i>Azospirillum brasilense</i> ...	25
3.4	INTERAÇÃO GENÓTIPO - <i>Azospirillum brasilense</i> .....	28
3.5	<i>Azospirillum brasilense</i> X ESPÉCIES REATIVAS X SISTEMA ANTIOXIDANTE .....	30
3.6	TEMPERATURA x INOCULAÇÃO COM <i>Azospirillum brasilense</i> .....	33
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>6</b>	<b>ARTIGO I - INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO COM <i>Azospirillum brasilense</i> em DIFERENTES TEMPERATURAS</b> .....	45
6.1	INTRODUÇÃO .....	47
6.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	48
<b>6.2.1</b>	<b>Local do experimento e material vegetal</b> .....	48
<b>6.2.2</b>	<b>Inoculação com bactérias <i>Azospirillum brasilense</i></b> .....	48
<b>6.2.3</b>	<b>Germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de milho</b> .....	49
<b>6.2.4</b>	<b>Variáveis Bioquímicas</b> .....	49
<b>6.2.5</b>	<b>Análise estatística</b> .....	51
6.3	RESULTADOS .....	51
<b>6.3.1</b>	<b>Germinação e crescimento inicial das plântulas do Genótipo Syn 488</b> .....	51
<b>6.3.2</b>	<b>Dados bioquímicos do genótipo Syn 488</b> .....	53
<b>6.3.3</b>	<b>Germinação e crescimento inicial das plântulas do Genótipo Syn 505</b> .....	56
<b>6.3.4</b>	<b>Dados bioquímicos do genótipo Syn 505</b> .....	58
6.4	DISCUSSÃO .....	61
6.5	CONCLUSÕES .....	65
6.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
<b>7</b>	<b>ARTIGO II – TEMPERATURA DO SOLO EM TRÊS HORÁRIOS DE SEMEADURA AFETA A INOCULAÇÃO COM <i>Azospirillum brasilense</i> NA CULTURA DO MILHO</b> .....	71
7.1	INTRODUÇÃO .....	73
7.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	74
<b>7.2.3</b>	<b>Semeadura e delineamento experimental</b> .....	76
<b>7.2.4</b>	<b>Variáveis analisadas</b> .....	76
7.2.4.1	<i>Quantificação de <i>Azospirillum brasilense</i> (Método do número mais provável)</i> .....	76
7.2.4.3	<i>Variáveis bioquímicas</i> .....	77
7.3	RESULTADOS .....	79
<b>7.3.1</b>	<b>Temperatura do solo na semeadura x quantificação bacteriana</b> .....	79
<b>7.3.2</b>	<b>Dados Bioquímicos</b> .....	81
<b>7.3.3</b>	<b>Macronutrientes</b> .....	87
<b>7.3.4</b>	<b>Micronutrientes</b> .....	90
<b>7.3.5</b>	<b>Produtividade de grãos e proteína bruta</b> .....	95
7.4	DISCUSSÃO .....	102

<b>7.4.1</b>	<b>Efeito da interação <i>Azospirillum brasilense</i> x temperatura nos parâmetros bioquímicos.....</b>	<b>102</b>
<b>7.4.2</b>	<b>Efeito da interação <i>A. brasilense</i> x temperatura na nutrição de plantas, PG e PB.....</b>	<b>104</b>
<b>7.4.3</b>	<b>Análise de trilha para produtividade de grãos.....</b>	<b>106</b>
7.5	CONCLUSÕES.....	108
7.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
	ANEXO A – ANÁLISE DE SOLO.....	117

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda mundial por alimentos tem exigido do sistema produtivo um incremento significativo da produção em áreas cada vez mais limitadas (BENARDI et al., 2015). A intensificação das atividades de cultivo, de maneira sustentável, requer maior produção no mesmo espaço disponível, com menor dependência de recursos do ambiente. Desta forma, aspectos relacionados ao nível tecnológico empregado ao longo dos anos, com investimentos expressivos em máquinas e equipamentos, fertilizantes, melhoramento genético de cultivares, além do sistema de plantio direto (SPD), foram fatores importantes que proporcionaram aumento na produtividade e tornaram o Brasil uma referência na produção mundial de alimentos (SIMIONI et al., 2017).

Uma das culturas fundamentais que deve integrar o SPD é a cultura do milho, a qual se destaca pela elevada produção de biomassa, sistema radicular profundo, degradação lenta dos resíduos culturais pela elevada relação C/N, podendo promover a cobertura da área por mais tempo, evitar processos erosivos e auxiliar na manutenção da umidade no solo (CORTEZ et al., 2018). Além disso, o milho está presente na composição de rações, produção de fármacos e alimentação humana, com cerca de 72% de amido, 10% de proteína, 4% de gordura e fonte de vitaminas B12 e C, considerado um dos alimentos estratégicos no combate a anemia em países subdesenvolvidos (NUSS; TANUMIHARDJO, 2010; DA ROCHA; MARIN, 2011).

No Brasil, a região sul destaca-se como a maior produtora do cereal na primeira safra, com 8,99 milhões de hectares semeados e uma produção de 26,26 milhões de toneladas (CONAB, 2020). Entretanto, elevados custos de produção e riscos climáticos acabam limitando o uso da espécie no cenário agrícola. Logo, mecanismos que possam aumentar a tolerância da cultura a fatores promotores de estresses e reduzir custos são imprescindíveis, dos quais grande parte ocorrem em função da aplicação de fertilizantes nitrogenados.

Dentre as estratégias criadas, a inoculação de plantas de milho com rizobactérias promotoras de crescimento (RBPC) tem aumentado nos últimos anos, como resposta aos benefícios gerados a partir desta interação planta-bactéria com foco na redução de custos, tolerância a fatores promotores de estresses, alterações morfológicas e bioquímicas das plantas, incremento de produtividade e redução de impacto ambiental (SPOLAOR et al., 2016; DE LIMA et al., 2020; BULEGON et al., 2019). Pesquisas já têm caracterizado os múltiplos mecanismos que a bactéria pode influenciar o desenvolvimento do vegetal,

principalmente na produção de fitormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, aliado a alterações sobre a arquitetura do sistema radicular e fixação biológica de nitrogênio (FBN) (FUKAMI et al., 2016; MEHNAZ, 2015; REVOLTI et al., 2018; BARNAWAL et al., 2019), com impacto direto sobre o surgimento de plantas vigorosas e hábeis para competir por recursos do ambiente. Neste sentido, Zeffa et al. (2019) constataram que a inoculação com rizobactérias *Azospirillum brasilense* promoveu incrementos significativos para matéria seca de raiz e parte aérea em diferentes híbridos de milho testados, aliado a maior eficiência de uso do nitrogênio aplicado. Adicionalmente, Marques et al. (2020) destacaram que a inoculação de plantas de milho com bactérias do gênero *Azospirillum* resultou em maior acúmulo de biomassa e *status* nutricional das plantas inoculadas, mesmo sob condições de estresse, o que pode resultar em maiores índices produtivos da cultura, com incremento médio de 9,5% na produtividade de cereais de verão (CASSÁN; DIAS-ZORITA, 2016).

RBPC ainda podem alterar a atividade de enzimas relacionadas ao sistema de defesa do vegetal contra espécies reativas de oxigênio (ERO), geradas em diferentes processos do metabolismo vegetal, as quais podem ser prejudiciais sob altas concentrações (FOYER, 2018). Neste sentido, Fukami et al. (2018) constataram que *Azospirillum brasilense* aumentou a atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase em plantas de milho submetidas a fatores de estresse. Adicionalmente, Bulegon et al. (2016) evidenciaram incremento significativo na atividade da SOD, conteúdo de clorofilas e carotenoides em plantas de milho inoculadas, mesmo sob restrição hídrica severa.

Embora várias pesquisas tenham demonstrado os efeitos benéficos da inoculação em gramíneas, 30 a 40% dos estudos já reportaram inconsistência nos resultados, colocando em dúvida o uso desta tecnologia (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016). Dentre as possíveis causas para a obtenção de dados incipientes, a temperatura a que semente-bactéria estão expostas pode afetar consideravelmente a sobrevivência de bactérias, conseqüentemente a eficiência do processo de inoculação. Neste sentido, pesquisadores têm caracterizado o impacto de extremos térmicos sobre o crescimento de *Azospirillum brasilense* em condições de laboratório, os quais evidenciaram efeito letal sobre a comunidade bacteriana, redução da expressão de genes ligados a FBN e produção de fitormônios quando expostas a temperaturas próximas a 40 °C, embora possam existir variações dependendo da estirpe testada (ROMERO-PERDOMO et al., 2015; MOLINA et al., 2018; TRIPATHI; KLINGMULLER, 1992). Além disso, o aumento da temperatura pode, em determinadas situações, promover um crescimento microbiano acelerado, contudo, a funcionalidade da população pode ser alterada, sem a obtenção dos benefícios da interação planta-microrganismos (HEINZE et al., 2017;

GILLIAM et al., 2015; MUJAHID et al., 2015). Com isso, percebe-se a necessidade da realização de estudos que possam elucidar a influência de diferentes condições de temperaturas na eficiência de inoculação com rizobactérias na cultura do milho, bem como seu potencial efeito no desenvolvimento de plantas e atividade enzimática.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Gerar informações sobre a eficiência de inoculação de sementes de milho em diferentes temperaturas em laboratório e condições de campo, no desenvolvimento inicial de plantas, sistema antioxidante, concentração de nutrientes e produtividade de grãos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se diferentes temperaturas em B.O.D. afetam o desenvolvimento inicial de plântulas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense*;
- Determinar se diferentes temperaturas em B.O.D. afetam a atividade de enzimas antioxidantes das plântulas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense*;
- Avaliar a influência da semeadura em diferentes temperaturas do solo as 8, 15 e 18 horas na atividade antioxidante de plantas de milho submetidas à inoculação com *Azospirillum brasilense*.
- Verificar se a semeadura em diferentes horários do dia impacta na absorção/acúmulo de nutrientes no tecido vegetal de plantas inoculadas.
- Avaliar a influência dos diferentes horários de semeadura sobre a produtividade de grão de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A CULTURA DO MILHO

O milho cultivado (*Zea mays* L.) possui seu centro de origem nos planaltos do México entre 7.000 e 10.000 anos atrás. Evidências arqueológicas enfatizam que a cultura do milho é o resultado da interação de três ancestrais selvagens comuns: teosinto, parviglumis e da subespécie mexicana (*Zea mays* spp. *parviglumis*). Entretanto, a teoria mais aceita remete à origem da cultura estritamente ligada a evolução do ancestral teosinto, dado as similaridades existentes entre eles como: possibilidade de hibridização natural entre ambas as espécies, o mesmo número de cromossomos ( $n=10$ ) e estrutura idêntica, aliado as características anatômicas que ambas as espécies compartilham, por exemplo a morfologia do pólen (GARCÍA-LARA; SERNA-SALDINAR, 2019).

O milho constitui um dos alimentos mais importantes dentro da cadeia do agronegócio, sendo o cereal mais produzido no mundo e o segundo mais consumido (FAOSTAT, 2018), dado a sua importância na composição de rações, produção de fármacos e alimentação humana, com cerca de 72% de amido, 10% de proteína, 4% de gordura e fonte de vitaminas B12 e C, considerado um dos alimentos estratégicos no combate a anemia em países subdesenvolvidos (NUSS; TANUMIHARDJO, 2010; DA ROCHA; MARIN, 2011). Atualmente, o Brasil ocupa o terceiro lugar entre os principais países produtores do cereal, com uma área semeada de 18,50 milhões de hectares e produtividade média de 5.510 Kg ha<sup>-1</sup> (USDA, 2020). Ou seja, aproximadamente 28% de toda a área semeada no país é destinada a cultura do milho (CONAB, 2020).

Sementes de milho são classificadas como ortodoxas, ou seja, capazes de suportar a dessecação a níveis extremamente baixos de umidade como estratégia de conservação e manutenção da qualidade fisiológica (TIMÓTEO; MARCOS FILHO, 2013). Após a semeadura, as sementes rapidamente absorvem água do solo iniciando seu processo de germinação; contudo, a temperatura e disponibilidade hídrica do solo podem modificar tal processo, tendo melhores resultados em temperaturas próximas a 30 °C e umidade acima de 30% (SÁNCHEZ et al., 2014). O máximo acúmulo de matéria seca é obtido quando as plantas atingem o estágio fenológico de florescimento, seguido por uma intensa mobilização de fotoassimilados para enchimento dos grãos (MARTINS et al., 2017).



Em sistemas agrícolas, a elevada resposta do milho a fertilizantes nitrogenados pode acarretar em diversos problemas ao ambiente. A adição de nitrogênio (N) mineral na cultura é um dos fatores responsáveis pelo aumento dos custos e impactos negativos ao ambiente, principalmente ligados a contaminação da água subterrânea pelo aumento da concentração de nitratos, eutrofização de lagos e rios, além dos problemas de ordem pública gerados no abastecimento de água e emissão de gases de efeito estufa no sistema agrícola, em especial ao óxido nítrico, decorrente do sistema de manejo do solo e condições ambientais no momento da aplicação (SANTI et al., 2017). Estudos reportam que menos de 60% da quantidade de N aplicado no sistema agrícola é absorvido pelas plantas, devido as perdas do nutriente por mineralização e imobilização, nitrificação e desnitrificação, lixiviação e volatilização (BROCH; RANNO, 2008).

### 3.2 O NITROGÊNIO NA CULTURA DO MILHO

O nitrogênio (N) é um macronutriente para todos os organismos e necessário na formação de proteínas, DNA e outras moléculas biológicas importantes, sendo separado em duas categorias: orgânico (resíduos vegetais, biomassa microbiana e dejetos) e mineral (sintéticos), dos quais a ureia representa aproximadamente 55% do mercado de fertilizantes nitrogenados (SIGURDARSON et al., 2018), obtendo-se 46% de N em sua composição e formato granulométrico para facilitar a operação agrícola. No solo, a ureia rapidamente é hidrolisada a íons amônio e gás carbônico pela enzima urease, seguido por um aumento do pH local após a quebra da molécula, podendo ocorrer perdas de amônia para atmosfera via volatilização (LLOYD; SHEAFFE, 1973). Atualmente, 50% da produção de alimentos no mundo depende exclusivamente da aplicação de fertilizantes nitrogenados em cultivos agrícolas, porém problemas relacionados a perdas do nutriente e baixa eficiência de uso do N acabam limitando a expressão do máximo potencial produtivo das culturas, além de impactos negativos via contaminação de recursos hídricos e geração de gases de efeito estufa como óxido nítrico (DIMKPA et al., 2020).

Em espécies gramíneas, o fornecimento de N de forma adequada é importante para o desenvolvimento e expressão do potencial produtivo (MORAIS et al., 2018). Em plantas, o N é um elemento que apresenta elevada mobilidade, sendo constituinte de clorofilas, aminoácidos, ATP, fitormônios, ácidos nucleicos e proteínas (TAIZ et al., 2017). Além de estar envolvido em processos fisiológicos como crescimento, expansão de área foliar,

acúmulo de biomassa e produtividade (ANAS et al., 2020). Além disso, N pode aumentar o volume, área, diâmetro e comprimento total de raízes, com incremento na absorção de nutrientes e produção de matéria seca (STITT; KRAPP, 1999; DIAZ et al., 2006). Adicionalmente, parâmetros fisiológicos também podem ser afetados pela aplicação de N, principalmente ligados ao aumento de pigmentos fotossintéticos, taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> e resistência a estresse hídrico ou salino, com aumento significativo de enzimas antioxidantes em plantas submetidas ao estresse e adição de N (SONG et al., 2019; LI et al., 2020)

Na cultura do milho, as adubações nitrogenadas são indispensáveis na obtenção de elevadas produtividades, uma vez que o mesmo é considerado o elemento exigido em grande quantidade pela cultura, limitando frequentemente a produtividade de grãos quando o aporte do mesmo é insuficiente, além de exercer importante função nos processos bioquímicos da planta (KANEKO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018). Neste sentido, limitação no fornecimento de N em plantas de milho pode ocasionar regulação transcricional negativa em função do estresse nutricional, com redução de genes ligados a fotossíntese, nitrato redutase, aminoácidos e ácidos orgânicos (KANT et al., 2011; SCHLUTER et al., 2012). Adicionalmente, Lyra et al. (2014) reportaram que a deficiência de N na cultura do milho acarretou em redução da taxa de crescimento das plantas e decréscimo significativo na produtividade de grãos. Logo, ajustes corretos quanto a dose e momento de aplicação tornam-se imprescindíveis para a obtenção de elevadas produtividades.

Resultados obtidos por Portugal et al. (2017) demonstraram que a massa de mil grãos e produtividade foram influenciadas pelo aumento das doses de N aplicadas, com comportamento linear e quadrático, respectivamente. Além disso, Skonieski et al. (2019) relataram que a fertilização de plantas de milho de alto potencial produtivo com aproximadamente 345 kg ha<sup>-1</sup> de N promoveram ganhos acima de 10.000 kg ha<sup>-1</sup> no rendimento de grãos, em virtude do maior número de grãos por espiga, massa de mil grãos, diâmetro de colmo e altura de plantas. Logo, plantas com adequado fornecimento de fertilizantes podem apresentar reflexos diretos sobre a maior produção de fotoassimilados e translocação dos mesmos para os grãos (HAMMAD et al., 2018), resultando em incremento de biomassa verde e produtividade.

### 3.3 RIZOBACTÉRIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO (RBPC) *Azospirillum brasilense*

Embora a demanda nutricional da cultura apresente elevada dependência aos fertilizantes nitrogenados, bactérias do gênero *Azospirillum* podem suprir parte desta exigência através da fixação biológica de N, além de promover o crescimento de plantas pela produção de fitohormônios, visto que são consideradas bactérias endofíticas capazes de penetrar nos tecidos da planta e ocupar espaços internos, principalmente no sistema radicular (CADORE et al., 2016; FUKAMI et al., 2016; SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013). Assim, o aporte de N na planta via FBN possibilita aumento da área de superfície das raízes, maior capacidade de absorção de nutrientes do solo bem como aumento na eficiência de uso dos fertilizantes nitrogenados, além de promover aumento da concentração total de N na biomassa e grãos (MORAIS et al., 2018; MILLÉO; CRISTÓFOLI, 2016).

O gênero *Azospirillum* abrange uma diversidade de espécies consideradas bactérias promotoras de crescimento, com potencial de fixação de N atmosférico. Cada espécie pode ser classificada quanto a estratégia de colonização em plantas, desde bactérias que estão presentes em maior quantidade na superfície radicular, até microrganismos que podem penetrar e ser encontrados nos tecidos dos vegetais (KASCHUK; UNGRIA, 2017). As espécies mais conhecidas e estudadas na atualidade são *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense* (alterado para *Nitrospirillum amazonense*), *A. halopraeferens*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. rugosum*, *A. irakense* (alterado para *Niveispirillum irakense*), compondo este gênero um total de 17 espécies identificadas e publicadas (LIN et al., 2015; ECKERT et al., 2001; TARRAND et al., 1978). Dentre estas espécies, o *Azospirillum brasilense* tem se destacado pelo volume de pesquisas realizadas e comprovada capacidade em promover a fixação de N, influenciar o crescimento dos vegetais pela produção de fitohormônios como o ácido indol-acético, aumentar o percentual de germinação de sementes inoculadas, além da indução a respostas de defesa da planta a estresses bióticos e abióticos, através da produção de fitoalexinas contra patógenos bem como ativação do sistema antioxidante dos vegetais contra as espécies reativas de oxigênio (ERO) (FUKAMI et al., 2018; COHEN et al., 2015; HUNGRIA et al., 2016).

Em geral, os membros do gênero *Azospirillum* são caracterizados como bactérias de vida livre ou diazotróficas, gram-negativas em forma de espiral, sem formação de nódulos no processo de simbiose (LIN et al., 2016), utilizando em seu metabolismo fontes de N como amônia, nitrito, nitrato e nitrogênio molecular (TRENTINI, 2010). Parte deste N utilizado para o metabolismo é oriundo da fixação biológica de N atmosférico, processo caracterizado pela quebra da ligação covalente existente no N<sub>2</sub> da atmosfera seguido da conversão do mesmo a NH<sub>3</sub>, forma intimamente ligada ao complexo enzimático da nitrogenase.

As pesquisas realizadas até o presente momento dão ênfase aos benefícios das bactérias promotoras de crescimento em vegetais, em especial do gênero *Azospirillum*. Os benefícios da interação em uma ampla diversidade de plantas, e sob diferentes condições edafoclimáticas reportam aumentos percentuais sobre a produção de grãos de 14% para cereais de inverno, 9,5% em cereais de verão e 6,6% em plantas leguminosas, com sucesso em aproximadamente 70% dos casos (CASSÁN; DIAS-ZORITA, 2016). Além disso, o desempenho de plantas forrageiras inoculadas foi 24,7% superior em relação às plantas não inoculadas, podendo ocorrer aumento na concentração de N nos tecidos da planta, em resposta ao maior desenvolvimento do sistema radicular, aumentando a eficiência de uso do nutriente (HUNGRIA et al., 2016).

Entretanto, bactérias do gênero *Azospirillum* não apresentam uma especificidade de interação com uma única família de plantas, fator que a caracteriza como bactéria de vida livre com capacidade de se associar a uma grande diversidade de plantas, podendo chegar a um total de 113 espécies diferentes, com colonização tanto na rizosfera como endofiticamente, sem apresentar efeito patogênico ao vegetal (PEREG et al., 2016). Além disso, pode se adaptar rapidamente a diferentes condições de solo e clima, em resposta a um sistema de proteínas específico (histidinas quinases), as quais conferem a habilidade competitiva e alta adaptabilidade ao ambiente, via transferência horizontal de genes (BORLAND et al., 2015). A colonização inicial, embora seja rápida, é considerada fraca (fase de adsorção), mediada por proteínas flagelinas, proteínas de membrana externa da bactéria e exopolissacarídeos (WHEATLEY; POOLE, 2018), podendo ser reversível em até duas horas, o que reforça a necessidade da presença de células bacterianas viáveis no processo, uma vez que células mortas não se ligam. Porém, após a fase de ancoragem bacteriana na superfície radicular, o processo torna-se irreversível, formando uma malha de microfibrilas, como estrutura de fixação (fase de adesão – ancoragem) (PEREG et al., 2016).

Cada cepa do gênero *Azospirillum* se associa ao sistema radicular com estratégias diferentes, algumas ou grande parte delas colonizam preferencialmente a rizosfera das plantas, enquanto outras podem infectar o interior da raiz e, assim, atuar como endofíticos (MISHRA, 2012). Estudos evidenciam que bactérias promotoras de crescimento do gênero *Azospirillum* possuem maior atividade na superfície das raízes, devido a presença de exsudados liberados (BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017). No entanto, a mesma pode penetrar nos tecidos epidérmicos através de aberturas naturais e em regiões de crescimento de raízes laterais, capazes de estabelecer colonização bacteriana junto aos tecidos vasculares no córtex da raiz, e serem translocados para a parte aérea (DOS SANTOS et al., 2018).

Para que ocorra o processo de reconhecimento entre bactéria e planta, a motilidade no solo é regulada pela quimiotaxia, ou seja, a percepção aos exsudados liberados pelo hospedeiro, substâncias ricas em fontes de carbono e essenciais para o processo inicial de infecção e colonização (RENGEL, 2002). As lectinas liberadas pela *Azospirillum* são as principais substâncias envolvidas no reconhecimento da planta hospedeira, além de provocar alterações com relação ao sistema de defesa do vegetal nos primeiros momentos, sem causar efeito deletério (ALEN'KINA et al., 2014). Embora a associação ocorra, a manutenção da mesma não depende unicamente do microrganismo, mas também de fatores associados ao genótipo com foco na capacidade de expressar comportamento fenotípico ao desenvolvimento de compostos que facilitam a sua adesão a superfície da raiz (DE LEÓN et al., 2015).

Pesquisas direcionadas a obtenção de estirpes eficientes para a inoculação de culturas vem sendo realizadas em ampla escala, principalmente com o propósito de melhorar a eficiência da fixação biológica de N, aliado a promoção do crescimento de plantas e as estratégias de adaptação (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016).

### 3.4 INTERAÇÃO GENÓTIPO - *Azospirillum brasilense*

A eficiência da inoculação e o processo de simbiose pode variar entre híbridos de milho, com diferenças nos teores de N, massa seca de parte aérea e produtividade de grãos (QUADROS et al., 2014). Ao avaliar híbridos de milho sob inoculação com bactérias promotoras de crescimento, Dotto et al. (2010) evidenciaram comportamento diferente entre os materiais testados, com incremento na massa de mil grãos e produtividade de grãos para o híbrido responsivo à interação, bem como redução para tais variáveis quando os genótipos não foram beneficiados pela bactéria. Neste sentido, Drogue et al. (2012) propuseram que a especificidade entre hospedeiro – bactéria se resume a três etapas do processo: atração da bactéria e deslocamento até a rizosfera, adesão a superfície radicular e, finalmente, o funcionamento da interação associativa de forma efetiva.

A liberação de exsudatos quimiotáticos é uma importante característica para a colonização de raízes e seleção de microrganismos orquestrada pelas plantas (HARTMANN et al., 2009). Considerando tais informações, Pereira et al. (2020) constataram que genótipos pouco responsivos a inoculação com *Azospirillum brasilense* apresentaram menores teores de ácido aspártico, serina, ácido glutâmico, valina, triptofano, açúcares e compostos quimiotáticos, o que resultou em um decréscimo de 60% na colonização bacteriana nos

tecidos internos, redução de 27% na atividade da nitrogenase, e menor acúmulo de biomassa de raiz e parte aérea. Adicionalmente, proteínas específicas na membrana bacteriana já foram identificadas como responsáveis pelo reconhecimento de compostos orgânicos seletivos (quimiotaxia) e diferentes concentrações de O<sub>2</sub> (aerotaxia) próximo as raízes, culminando no deslocamento microbiano via flagelos (O'NEAL et al., 2019).

Apesar da adesão e ancoragem bacteriana na superfície radicular representar um importante passo na interação efetiva entre híbridos e *Azospirillum* sp., as estirpes de diazotróficos selecionados para comercialização atualmente são hábeis para infectar e colonizar eficientemente o sistema radicular de plantas (WHEATLEY; POOLE, 2018), entretanto, os benefícios da associação podem ser limitados em função das características genéticas do hospedeiro. Neste sentido, Avenkina et al. (2021) reportaram que a associação de *Azospirillum brasilense* com plantas de *Arabidopsis thaliana* com alterações na proteína PP2, envolvida no fluxo de auxinas na planta, resultou em interação não significativa. Adicionalmente, a expressão de genes específicos ligados ao aumento do sistema radicular, rotas de sinalização hormonal e adesão bacteriana pode variar dependendo do genótipo escolhido, com redução de até 85% no comprimento total da raiz em casos de interação negativa (MASUDA et al., 2018; THOMAS et al., 2019; VARGAS et al., 2012). Tais resultados da interação ainda podem ser modulados em função da natureza da interação (contato direto, compostos bioquímicos ou voláteis liberados pela bactéria), com menor comprimento da raiz principal, aumento de auxinas e diferenciação de células quando as plântulas entraram em contato direto com o microrganismo (MÉNDEZ-GÓMES et al., 2021).

Genótipos responsivos à inoculação também podem ser beneficiados com maior absorção de água e nutrientes, o que está fortemente vinculado ao maior desenvolvimento do sistema radicular das plantas inoculadas, capazes de explorar maior volume de solo e, portanto, acessar tais insumos em camadas mais profundas (ADESEMOYE et al., 2009). No entanto, estudos já têm evidenciado que a maior absorção de minerais em plantas colonizadas por *Azospirillum brasilense* pode estar vinculada a maior atividade de proteínas específicas na membrana plasmática (PII et al., 2015; PII et al., 2019).

Bombas hidrogeniônicas (H-ATPases) na membrana plasmática são proteínas responsáveis pela extrusão de prótons H<sup>+</sup> para o meio externo, o que permite a geração de um gradiente eletroquímico, influenciando o movimento de diferentes íons através da membrana (WHITE, 2003). Desta forma, plantas inoculadas com *Azospirillum* sp. podem aumentar a concentração de macro e micronutrientes nos tecidos via maior fluxo de prótons para fora da

célula, forçando a passagem de íons de acordo com sua disponibilidade no solo (PII et al., 2019).

### 3.5 *Azospirillum brasilense* X ESPÉCIES REATIVAS X SISTEMA ANTIOXIDANTE

Espécies reativas de oxigênio (ERO) compõem um grupo de moléculas oxidativas envolvidas em inúmeros processos de ordem metabólica ou fisiológica, como resultado do metabolismo aeróbico realizado por plantas superiores e animais, em múltiplos compartimentos da célula como cloroplasto, mitocôndria, peroxissomos e retículo endoplasmático (FOYER, 2018; DAS; ROYCHOUDHURY, 2014), além de locais outrora desconsiderados como apoplasto, membrana plasmática e parede celular (QI et al., 2017; SCHMIDT et al., 2016; JANKU et al., 2019). Entretanto, espécies reativas de nitrogênio (ERN) e enxofre (ERE), embora sejam pouco consideradas dentro do sistema redox, também podem desempenhar algum papel dentro do metabolismo vegetal, principalmente na regulação de mecanismos de tolerância a fatores promotores de estresse como seca, salinidade e metais pesados (NABI et al., 2019). Além disso, ERN e ERO também podem atuar diretamente no processo inicial de simbiose planta – *Rhizobium* via aumento da concentração de óxido nítrico ou peróxido de hidrogênio, como pré-requisito para simbiose eficiente (PAULY et al., 2006; MUNOZ et al., 2016).

As ERO podem ser classificadas quanto à presença ou não de radical livre, aliado a magnitude de reação com outras estruturas (Tabela 1), entretanto, é válido salientar que naturalmente tais moléculas devem ocorrer no vegetal dentro de um nível basal, dada a importância das mesmas em processos de sinalização celular e modulação do desenvolvimento da planta (JANKU et al., 2019). Contudo, a ocorrência de estresse oxidativo, ou excesso de tais substâncias pode ser caracterizada como um dano severo e desequilíbrio prolongado do sistema redox (oxidação/redução), provocado por falta de elétrons, em resposta a uma condição ambiental (DEMIDCHIK, 2015), de modo que quando a produção de ERO excede a capacidade antioxidante, danos ou até mesmo morte celular podem ocorrer, ou eventos de sinalização indutores de morte celular ativados por ERO específicos (TRIPATHY; OELMULLER, 2012).

Tabela 1 - Descrição de espécies reativas de oxigênio e locais de produção na célula.

<b>ERO</b>	<b>Local de produção</b>	<b>Reatividade (L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>)</b>
Radical hidroxil (OH <sup>•</sup> )	Cloroplastos, mitocôndria e peroxissomos (reações de Fenton)	7 x 10 <sup>9</sup>
Oxigênio Singleto ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )	Cloroplastos (excitação da clorofila)	2 x 10 <sup>7</sup>
Radical Ânion superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )	Parede celular, citosol, cloroplastos, peroxissomos, mitocôndria, glioxissomos e retículo endoplasmático	< 0,3
Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Parede celular, citosol, cloroplastos, peroxissomos, mitocôndria, glioxissomos e retículo endoplasmático	2 x 10 <sup>-2</sup>

Fonte: (SIES et al., 2017; JANKU et al., 2019)

A formação do radical hidroxil só torna-se possível a partir da presença de Fe<sup>2+</sup> livre no sistema e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em uma rota denominada reação de Fenton (Fe<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Fe<sup>3+</sup> + OH<sup>•</sup> + OH<sup>-</sup>), desta forma, os dois compostos interagem entre si formando ao final do processo um poderoso oxidante de compostos orgânicos, com alto potencial de dano celular, incluindo a modificação de proteínas, peroxidação lipídica e desestruturação de membranas, sem qualquer linha de defesa vegetal contra a espécie (LYNGSIE et al., 2018; DEMIDCHIK, 2015). Já o oxigênio singleto é formado em membranas fotossintéticas a partir da reação da clorofila em estado tripleto e oxigênio molecular, com efeitos danosos ao aparato fotossintético (MITTLER, 2002).

O ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) é uma espécie altamente reativa, com meia vida curta (2-4 μs), sem grande potencial de dano, entretanto, a mesma é considerada precursora de outras moléculas como OH<sup>•</sup>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014), as quais podem causar estresse oxidativo quando presentes em elevadas concentrações. Adicionalmente, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresenta meia vida mais longa (1 ms), bem como elevada permeabilidade de membrana via aquaporinas (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; SIES et al., 2017), o que caracteriza a importância da molécula em diferentes processos da planta, desde seu envolvimento na expansão e sinalização celular como estratégia de tolerância a fatores promotores de estresse (FARNESE et al., 2016). Tais dados corroboram com Nurnaeimah et al. (2020) os quais



enfatazaram que baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (16 e 30 mM) aumentaram significativamente o conteúdo de clorofilas, taxa fotossintética, condutância estomática e altura de plantas. Adicionalmente, Habib et al. (2020) destacaram que sementes de trigo tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e submetidas ao estresse hídrico apresentaram melhor performance para pigmentos fotossintéticos, compostos antioxidantes e produtividade de grãos, reduzindo os efeitos deletérios da seca.

Estratégias evolutivas foram adquiridas pelas plantas ao longo do tempo, como forma de contornar cenários adversos, de modo que o estresse oxidativo fosse combatido via ajuste osmótico e maior atividade antioxidante (LAXA et al., 2019). Dentre as principais linhas de defesa antioxidante da planta destacam-se as enzimas guaiacol peroxidase (POD), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e carotenoides, compreendendo compostos de baixo peso molecular envolvidos diretamente na resposta ao estresse (HUSSAIN et al., 2016). Neste sentido, *Azospirillum brasilense* pode influenciar significativamente tanto a produção de ERO, quanto a atividade de enzimas antioxidantes e carotenoides, com regulação a nível molecular da transcrição de genes relacionados à atividade de SOD, CAT e peroxidases (FUKAMI et al., 2017), com aumento expressivo na sua atividade mesmo sob estresse hídrico severo (BULEGON et al., 2016). Agami et al. (2017) constataram que a inoculação de sementes de trigo com bactérias do gênero *Azospirillum sp.* promoveu incremento de 16,13% no conteúdo de carotenoides e 19,22 e 51,58% na atividade de SOD e POD, respectivamente. Adicionalmente, Fasciglione et al. (2015) verificaram que a inoculação inibiu a atividade oxidante em plantas de alface expostas a estresse salino, garantindo maior tempo de armazenamento, similar aos resultados encontrados por Liu et al. (2019), os quais enfatizaram que sementes armazenadas por longos períodos após inoculação com *Azospirillum brasilense* obtiveram maior atividade da SOD e comprimento radicular, garantindo a viabilidade das sementes.

O processo de interação planta – *Azospirillum sp.* também pode ser alvo da produção de espécies oxidantes, em resposta ao processo de infecção bacteriana. Neste sentido, Molina-Favero et al. (2008) constataram que, a alteração da arquitetura radicular em plântulas de tomate com maior número de raízes laterais e adventícias, foi diretamente dependente da produção de NO (120 nmol grama de bactéria<sup>-1</sup>) no processo de promoção de crescimento. Adicionalmente, experimentos para determinar a produção de ERO em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense* mostraram que, proteínas extra celulares bacterianas ao entrar em contato com células radiculares aumentam consideravelmente a produção de ânion superóxido nas primeiras horas de infecção, o qual reduziu com o passar do tempo

seguido pelo aumento significativo na atividade de SOD (MÉNDEZ-GOMEZ et al., 2015; MÉNDEZ-GOMEZ et al., 2016). Tais dados comprovam a relação direta de ERO no mecanismo de interação planta – microrganismo, sem que prejuízos ao metabolismo vegetal sejam observados.

### 3.6 TEMPERATURA x INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense*

O sucesso da inoculação no campo nem sempre é percebido, gerando dúvidas ao produtor com relação a eficiência do produto, bem como a viabilidade de utilização. Resultados da literatura evidenciam que diversos fatores podem influenciar a eficiência da inoculação, como a incompatibilidade com inseticidas (BATTISTUS et al., 2014), tipo de solo, resposta genética do híbrido e variações do ambiente (QUADROS et al., 2014), com reflexos diretos no número de unidades formadoras de colônias (UFC) por semente. Dentre os fatores que podem impactar a eficiência do processo de inoculação, a temperatura no momento de semeadura associada à restrição hídrica podem ser consideradas letais para a sobrevivência das bactérias, com redução na atividade bacteriana (HUNGRIA, 2011). Para Romero-Perdomo et al. (2015), o crescimento de bactérias *Azospirillum brasilense* em meio de cultivo submetido a diferentes temperaturas resultou na redução da multiplicação celular em temperaturas abaixo de 28 °C e efeito letal para temperaturas acima de 34 °C. Ao avaliar o processo inicial de colonização associado aos efeitos indiretos da umidade do solo e temperatura, foram observadas menor atividade bacteriana e redução da eficiência de inoculação (O'HARA et al., 1987). Para Rennie et al. (1980), as condições ideais para potencializar a fixação biológica de N por bactérias do gênero *Azospirillum* e a transferência de N para as plantas ocorreu em temperaturas próximas de 27 °C. Já Molina et al. (2018), ao avaliarem fatores promotores de estresse em plantas, destacam o efeito letal sobre a viabilidade de células de *A. brasilense* em temperaturas acima de 40 °C, além de redução nos parâmetros de biossíntese de ácido indol acético (auxinas) e expressão do gene *ipdc*, ligado a produção do fitohormônio. Dessa forma, há necessidade de compreender a relação bactéria-planta, resposta de genótipos a inoculação, comportamento bactéria-ambiente local e momento de estabelecimento, como estratégia para maximizar os benefícios da inoculação (BASHAN; DE-BASHAN, 2010).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAMI, R. A.; GHRAMH, H. A.; HASHEM, M. Seed inoculation with *Azospirillum lipoferum* alleviates the adverse effects of drought stress on wheat plants. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.90, p.165 – 173, 2017.

ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, v.58, n.4, p.921-929, 2009.

ALEN'KINA, S. A.; BOGATYREV, V. A.; MATORA, L. Y.; SOKOLOVA, M. K.; CHERNYSHOVA, M. P.; TRUTNEVA, K. A.; NIKITINA, V. E. Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial–plant root interactions. **Plant and Soil**, v.381, p.337–349, 2014.

ANAS, M.; LIAO, F.; VERMA, K. K.; SARWAR, M. A.; MAHMOOD, A.; CHEN, Z.; LI, Q.; ZENG, X.; LIU, Y.; LI, Y. Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency. **Biological Research**, v.53, n.47, 2020.

AVERKINA, I. O.; PAPONOV, I. A.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.; LILLO, C. Specific PP2A Catalytic Subunits Are a Prerequisite for Positive Growth Effects in *Arabidopsis* Co-Cultivated with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas simiae*. **Plants**, v.10, 2021.

BARNAWAL, D.; SINGH, R.; SINGH, R. P. Role of plant growth promoting rhizobacteria in drought tolerance: regulating growth hormones and osmolytes. In: **PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture**. Woodhead Publishing. p. 107-128, 2019.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum promotes* plant growth—a critical assessment. In: **Advances in Agronomy**, p.77-136, 2010.

BATTISTUS, A. G.; HACHMANN, T. L.; MIORANZA, T. M.; MULLER, M. A.; MADALOSSO, T.; FAVORITO, P. A.; GUIMARÃES, V. F.; KEIN, J.; KESTRING, D.; INAGAKI, A. M.; BULEGON, L. G. Synergistic action of *Azospirillum brasilense* combined with thiamethoxam on the physiological quality of maize seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v.13, n.49, p.4501-4507, 2014.

BENARDI, A. C. DE CAMPOS, BETTIOL, G. M.; GREGO, C. R.; ANDRADE, R. G.; RABELLO, L. M.; INAMASU, R.Y. Ferramentas de agricultura de precisão como auxílio ao manejo da fertilidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.32, p.205-221, 2015.

BORLAND, S.; OUDART, A.; PRIGENT-COMBARET, C.; BROCHIER-ARMANET, C.; WISNIEWSKI-DYÉ, F. Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*. **BMC Genomics**, v.16, 2015.

BROCH, D. L.; RANNO, S. K. Fertilidade do solo, adubação e nutrição da cultura do milho. *In*: BROCH, D. L. (Coord.) **Tecnologia e Produção**: soja milho 2008/2009. 5. ed. Maracaju: Fundação MS, p. 133-141, 2008.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C.; GILARD, F.; BRULÉ, L.; QUILLERÉ, I.; GOURION, B.; RATET, P.; DE SOUZA, E. M.; LEA, P. J.; HIREL, B. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **Plos One**, v.12, n.3, p.174-576, 2017.

BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; LAURETH, J. C. U. *Azospirillum brasilense* affects the antioxidant activity and leaf pigment content of *Urochloa ruziziensis* under water stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46, n.3, p.343-349, 2016.

BULEGON, L.G.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; INAGAKI, A. M.; DA COSTA, N. V. Mitigation of drought stress effects on soybean gas exchanges induced by *Azospirillum brasilense* and plant regulators. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.49, 2019.

CADORE, R.; NETTO, A. P. DA C.; DOS REIS, E. F.; RAGAGNIN, V. A. et al. Híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense* sob diferentes doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.15, n.3, p.398-409, 2016.

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

COHEN, A. C.; BOTTINI, R.; PONTIN, M.; BERLI, F. J.; MORENO, D. BOCCANLANDRO, H.; TRAVAGLIA, C. N.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Physiologia Plantarum**, v.153, p.79–90, 2015.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira - grãos**. Décimo levantamento, julho 2020 – safra 2019/20. Brasília, 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>, acesso em: 15 de outubro de 2020.

CORTEZ, J. W.; DA SILVA, R. P. D.; FURLANI, C. E. A.; ASCOVERDE, S. N. S.; OLSZEWSKI, N. Atributos físicos do solo em sistemas de adubação e de manejo de resíduos culturais em plantio direto. **Revista Agrarian**, v.11, n.42, p.343-351, 2018.

DA ROCHA, D. R.; MARIN, V. A. Transgênicos-Plantas produtoras de fármacos (PPF). **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, p. 3339-3347, 2011.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v.2, p.53, 2014.

DE LEÓN, J. L. D.; CASTELLANOS, T.; LING, J.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A.; RODER, M. S. Quantitative trait loci underlying the adhesion of *Azospirillum brasilense* cells to wheat roots. **Euphytica**, v.204, p.81–90, 2015.

DE LIMA, G. C.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; FILHO, M. C. M. T.; MOREIRA, A.; HEINRICHS, R.; FILHO, C. V. S. Yield, yield components and nutrients uptake in zuri guinea grass inoculated with plant growth-promoting bacteria. **International Journal for Innovation Education and Research**, v.8, n.4, 2020.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v.109, p.212-228, 2015.

DIAZ, C.; COLOMBANI, V. S.; LOUDET, O.; BELLUOMO, P.; MOREAU, L.; VEDELE, F. D.; GAUDRY, J.; DAUBRESSE, C. M. Leaf Yellowing and Anthocyanin Accumulation are Two Genetically Independent Strategies in Response to Nitrogen Limitation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v.47, n.1, p.74–83, 2006.

DIMPKA, C. O.; FUGICE, J.; SINGH, U.; LEWIS, T. D. Development of fertilizers for enhanced nitrogen use efficiency – trends and perspectives. **Science of the Total Environment**, v.731, 2020.

DOS SANTOS, M. L.; BERLITZ, D. L.; WIEST, S. L. F.; SCHÜNEMANN, R.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Benefits Associated with the Interaction of Endophytic Bacteria and Plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.61, p.1678-4324, 2018.

DOTTO, A. P.; LANA, M. DO C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n.3, p.376-382, 2010.

DROGUE, B.; DORÉ, H.; BORLAND, S.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; PRIGENT-COMBARET, C. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? **Research in Microbiology**, v.163, 2012.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogenfixing bacterium associated with the C4 -grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.51, p.17-26, 2001.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>, acessado em 24 de dezembro de 2020.

FARNESE, F. S.; MENEZES-SILVA, P. E.; GUSMAN, G. S.; OLIVEIRA, J. A. When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. **Frontiers in plant science**, v.7, 2016.

FASCIGLIONE, G.; CASANOVAS, E. M.; QUILLEHAUQUY, V.; YOMMI, A. K.; GONI, M. G.; ROURA, S. I.; BARASSI, C. A. *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v.195, p.154–162, 2015.

FOYER, Christine H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, v. 154, p. 134-142, 2018.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Assessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v.6, p.1-13, 2016.

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v.7, n.1, p.1-13, 2017.

FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v.8, n.1, p.73, 2018.

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; OSA, DE LA OSA, C.; VALDERRAMA-FERNÁNDEZ, R.; NOGUEIRA M. A.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Archives of microbiology**, v.200, n.8, p.1191-1203, 2018.

GARCÍA-LARA, S.; SERNA-SALDIVAR, S. O. Corn history and culture. In: **Corn**. AACC International Press, p. 1-18, 2019.

GILLIAM, F. S.; GALLOWAY, J. E.; SARMIENTO, J. S. Variação com aspecto de declive nos efeitos da temperatura na mineralização e nitrificação do nitrogênio em solos minerais de florestas mistas de madeira nobre. **Canadian Journal of Forest Research**, v.45, n.7, p.958-962, 2015.

HABIB, N.; ALI, Q.; ALI, S.; JAVED, M. T.; HAIDER, M. Z.; PERVEEN, R.; SHAHID, M. R.; RIZWAN, M.; ABDEL-DAIM, M. M.; ELKELISH, A.; BIN-JUMAH, M. Use of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide for Better Yield of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Water Deficit Conditions: Growth, Osmoregulation, and Antioxidative Defense Mechanism. **Plants**, v.9, 2020.

HAMMAD, H. M.; ABBAS, F.; AHMAD, A.; FARHAD, W.; WILKERSON, C. J.; HOOGENBOOM, G. Evaluation of Timing and Rates for Nitrogen Application for Optimizing Maize Growth and Development and Maximizing Yield. **Agronomy Journal**, v.110, p.565-571, 2018.

HARTMANN, A.; SCHMIDT, M.; TUINEN, D. V.; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1, p. 235-257, 2009.

HEINZE, J.; GENSCHE, S.; WEBER, E.; JOSHI, J. Soil temperature modifies effects of soil biota on plant growth. **Journal of Plant Ecology**, v. 10, n. 5, p. 808-821, 2017.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: **Embrapa Soja**, 36p, 2011.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA M. A.; ARAUJO R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture Ecosystems Environment**, v.221, p.125–131, 2016.

HUSSAIN, T.; TAN, B.; YIN, Y.; BLACHIER, F.; TOSSOU, M. C. B.; RAHU, N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

JANKU, M.; LUHOVÁ, L.; PETRIVALSKÝ, M. On the origin and fate of reactive oxygen species in plant cell compartments. **Antioxidants**, v.8, n.4, p.105, 2019.

KANEKO, F. H.; MICHELLE, T. S.; ARF, O.; LEAL, A. J. F.; CARNEIRO, L. F.; PAULINHO, H. B. Análise econômica do Milho em função da Inoculação com *Azospirillum*, fontes e doses de N em cobertura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.15, n.2, p.202-216, 2016.

KANT, S.; BI, Y.; ROTHSTEIN, S. J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.4, p.1499–1509, 2011.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Diversity and importance of diazotrophic bacteria to agricultural sustainability in the tropics. In: AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M.C. (Eds.). Diversity and benefits of microorganisms from the tropics. Part III. **Springer International Publishing**, p. 269-292, 2017.

LAXA, M.; LIEBTHAL, M.; TELMAN, W.; CHIBANI, K.; DIETZ, K. The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. **Antioxidants**, v.8, n.94, 2019.

LI, S.; ZHOU, L.; ADDO-DANSO, S. D.; DING, G.; SUN, M.; WU, S.; LIN, S. Nitrogen supply enhances the physiological resistance of Chinese fir plantlets under polyethylene glycol (PEG)-induced drought stress. **Scientific Reports**, v.10, 2020.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agriculture soil. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v.65, p.4601–4607, 2015.

LIN, S. Y.; LIU, Y. C.; HAMEED, A.; HSU, Y. H.; HUANG, H. I.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. *Azospirillum Agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.66, p.1453–1458, 2016.

LIU, X.; CHEN, Z.; GAO, Y.; LIU, Q.; ZHOU, W.; ZHAO, T.; JIANG, W.; CUI, X.; CUI, J.; WANG, Q. Combinative effects of *Azospirillum brasilense* inoculation and chemical priming on germination behavior and seedling growth in aged grass seeds. **PLoS ONE**, v.14, n.5, 2019.

LLOYD, A. B.; SHEAFEE, M. J. Urease activity in soils. **Plant and soil**, v.39, p.71-80, 1973.

LYNGSIE, G.; KRUMINA, L.; TUNLID, A.; PERSSON, P. Generation of hydroxyl radicals from reactions between a dimethoxy hydroquinone and iron oxide nanoparticles. **Scientific Reports**, v.8, n.1, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-29075-5

LYRA, G. B.; DA ROCHA, A. E. Q.; LYRA, G. B.; DE SOUZA, J. L.; TEODORO, I. Crescimento e produtividade do milho, submetido a doses de nitrogênio nos Tabuleiros Costeiros de Alagoas. **Ceres**, v.61, n.4, p.578-586, 2014.

MASUDA, S.; SASAKI, K.; KAZAMA, Y.; KISARA, C.; SHOKO, T.; HANZAWA, E.; MINAMISAWA, K.; SATO, T. Mapping of quantitative trait loci related to primary rice root growth as a response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510. **Communicative & Integrative Biology**, v.11, n.3, p.1-6, 2018.

MARQUES, D.M.; MAGALHÃES P. C.; MARRIEL, I. E.; JÚNIOR, C. C. G.; DA SILVA, A. B.; MELLO, I. G.; DE SOUZA, T. C. *Azospirillum brasilense* favors morphophysiological characteristics and nutrient accumulation in maize cultivated under two water regimes. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.19, 2020. DOI:<https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms>.

MARTINS, K. V.; DOURADO-NETO, D.; REICHARDT, K.; FAVARIN, J. L.; SARTORI, F. F.; FELISBERTO, G.; MELLO, S. C. Maize dry matter production and macronutrient extraction model as a new approach for fertilizer rate estimation. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.89, p.705-716, 2017.

MEHNAZ, S. *Azospirillum*: a biofertilizer for every crop. In: **Plant microbes symbiosis: Applied facets**. Springer, New Delhi, p.297-314, 2015.

MÉNDEZ-GÓMEZ, M.; CASTRO-MERCADO, E.; ALEXANDRE, G.; GARCÍA-PINEDA, E. Oxidative and antioxidative responses in the wheat-*Azospirillum brasilense* interaction. **Protoplasma**, 2015.

MÉNDEZ-GÓMEZ, M.; CASTRO-MERCADO, E.; ALEXANDRE, G.; GARCÍA-PINEDA, E. Superoxide anion production in the interaction of wheat roots and rhizobacteria *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v.400, p.55-65, 2016.

MÉNDEZ-GÓMEZ, M.; BARRERA-ORTIZ, S.; CASTRO-MERCADO, E.; LOPEZ-BUCIO, J. GARCÍA-PINEDA, E. The nature of the interaction *Azospirillum-Arabidopsis* determine the molecular and morphological changes in root and plant growth promotion. **Protoplasma**, v.258, n.1, p.179-189, 2021.

MILLÉO, M. V. R.; CRISTÓFOLI, I. Avaliação da eficiência agrônômica da inoculação de *Azospirillum* sp. na cultura do milho. **Revista Scientia Agraria**, v.17, n.3, p.14-23, 2016.

MISHRA, P. S. **Genetic basis of flocculation in *Azospirillum brasilense***. Master's Thesis: University of Tennessee, 2012. Disponível em: <[http://trace.tennessee.edu/utk\\_gradthes/1186](http://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/1186)>.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**. v.7, n.9, 2002.

MOLINA-FAVERO, C.; CREUS, C. M.; SIMONTACHI, M.; PUNTARULO, S.; LAMATTINA, L. Aerobic Nitric Oxide Production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato. **Molecular plant-microbe interactions**, v.21, n.7, p.1001-1009, 2008.



MOLINA, R.; RIVERA, D.; MORA, V.; LÓPEZ, G.; ROSAS, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; CASSÁN, F. Regulation of IAA Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* under environmental stress conditions. **Current Microbiology**, v.75, p.1408–1418, 2018.

MORAIS, M.; AMARAL, H. F.; NUNES, M. P. Desenvolvimento e assimilação de nutrientes da cultura de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* e diferentes doses de nitrogênio e potássio. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v.34, n. especial Ciências Agrárias, p.160-176, 2018.

MUJAHID, T. Y.; SUBHAN, S. A.; WAHAB, A.; MASNOON, J.; AHMED, N.; ABBAS, T. Effects of Different Physical and Chemical Parameters on Phosphate Solubilization Activity of Plant Growth Promoting Bacteria Isolated from Indigenous Soil. **Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences**, v.5, p.64-70, 2015.

MUNOZ, V.; IBÁÑEZ, F.; FIGUEREDO, M. S.; FABRA, A. An oxidative burst and its attenuation by bacterial peroxidase activity is required for optimal establishment of the *Arachis hypogaea-Bradyrhizobium* sp. symbiosis. **Journal of Applied Microbiology**, v.121, n.1, p.244-253, 2016.

NABI, R. B. S.; TAYADE, R.; HUSSAIN, A.; KULKARNI, K. P.; IMRAN, Q. M.; MUN, B.; YUN, B. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.161, p.120-133, 2019.

NURNAEIMAH, N.; MAT, N.; MOHD, K. S.; BADALUDDIN, N. A.; YUSOFF, N.; SAJILI, M. H.; MAHMUD, K.; ADNAN, A. F. M.; KHANDAKER, M. M. The Effects of Hydrogen Peroxide on Plant Growth, Mineral Accumulation, as Well as Biological and Chemical Properties of *Ficus deltoidea*. **Agronomy** v.10, n.4, p.599, 2020.

NUSS, E. T.; TANUMIHARDJO, S. A. Maize: A Paramount Staple Crop in the Context of Global Nutrition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, 2010. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00117.x.

O'HARA, G. W.; DAVEY, M. R.; LUCAS, J. A. Effect of nitrogen on the yield response of *Pennisetum americanum*, *Triticum aestivum* and *Zea mays* to inoculation with *Azospirillum brasilense* under temperate conditions. **Biol. Fertil. Soils**, v.4, p.67-72, 1987.

O'NEAL, L.; AKHTER, S.; ALEXANDRE, G. A PilZ-containing chemotaxis receptor mediates oxygen and wheat root sensing in *Azospirillum brasilense*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 312, 2019.

PAULY, N.; PUCCIARIELLO, C.; MANDON, K.; INNOCENTI, G.; JAMET, A.; BAUDOUIN, E.; HÉROUART, D.; FREDO, P.; PUPPO, A. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume–*Rhizobium* symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.8, p.1769-1776, 2006.

PEREIRA, L. C.; PEREIRA, C. B.; CORREIA, L. V.; MATERA, T. C.; DOS SANTOS, R. F.; DE CARVALHO, C.; OSIPI, E. A. F.; BRACCINI, A. L. Corn Responsiveness to

*Azospirillum*: Accessing the effect of Root Exudates on the Bacterial Growth and Its Ability to Fix Nitrogen. **Plants**, v.9, 2020.

PEREG, L.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant and Soil**, v.399, p.389–414, 2016.

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

PII, Y.; ALDRIGHETTI, A.; VALENTINUZZI, F.; MIMMO, T.; CESCO, S. *Azospirillum brasilense* inoculation counteracts the induction of nitrate uptake in maize plants. **Journal of Experimental Botany**, v.70, n.4, p.1313-1324, 2019.

QI, J.; WANG, J.; GONG, Z.; ZHOU, J. Apoplastic ROS signaling in plant immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v.38, p.92-100, 2017.

QUADROS, P.; ROESCH, L.; SILVA, P.; VIEIRA, V.; ROEHRS, D.; CAMARGO, F. Desempenho agronômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v.61, p.209-218, 2014.

RENGEL, Z. Breeding for better symbiosis. **Plant and Soil**, v.245, p.147–162, 2002.

RENNIE, R. J. <sup>15</sup>N-isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. **Canadian Journal of Botany**, v.58, p.21-24, 1980.

REVOLTI, L. T. M.; CAPRIO, C. H.; MINGOTTE, F. L. C.; MÔRO, G. V. *Azospirillum* spp. potencial de crescimento e rendimento do milho. **African Journal of Biotechnology**, v.17, n.18, p.574-585, 2018.

RODRIGUES, F. J.; BARCAROL, M. A.; ADAMS, C. R.; KLEIN, C.; BERWANGER, A. L. Eficiência agronômica da cultura do milho sob diferentes fontes de nitrogênio em cobertura. **Uniciências**, v.22, n.2, p.66-70, 2018.

ROMERO-PERDOMO, F.; CAMELO-RUSINQUE, M.; CRIOLLO-CAMPOS, P.; BONILLA-BUITRAGO, R. Effect of temperature and pH on the biomass production of *Azospirillum brasilense* C16 isolated from Guinea grass. **Pastos y Forrajes**, v.38, n.3, p.231-233, 2015.

SÁNCHEZ, B.; RASMUSSEN, A.; PORTER, J. R. Temperatures and the growth and development of maize and rice: a review. **Global Change Biology**, v.20, p.408–417, 2014.

SANTI, A.; DOS SANTOS, H. P.; BAYER, C.; DALMAGO, G. A.; DE BONA, F. D. Estimativa da emissão de gases de efeito estufa e da volatilização de amônia em sistemas de manejo de solo e de sucessão/rotação de culturas com trigo. Circular Técnica, Passo Fundo, RS, 2017.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v.111, n.1, p.743-767, 2013.

SCHMIDT, R.; KUNKOWSKA, A. B.; SCHIPPERS, J. H. M. Role of reactive oxygen species during cell expansion in leaves. **Plant physiology**, v.172, n.4, p.2098-2106, 2016.

SCHLUTER, U.; MASCHER, M.; COLMSEE, C.; SCHOLZ, U.; BRAUTIGAM, A.; FAHNENSTICH, H.; SONNEWALD, U. Maize source leaf adaptation to nitrogen deficiency affects not only nitrogen and carbon metabolism but also control of phosphate homeostasis. **Plant Physiology**, v.160, p.1384–1406, 2012.

SIMIONI, F. J.; BARTZ, M. L. C.; WILDNER, L. DO P. SPAGNOLLO, E.; DA VEIGA, M.; BARETTA, D. Indicadores de eficiência técnica e econômica do milho cultivado em sistema plantio direto no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Ceres**, v.64, n.3, p.232-241, 2017.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Revisão anual de bioquímica**, v.86, p.715-748, 2017.

SIGURDARSON, J. J.; SVANE, S.; KARRING, H. The molecular processes of urea hydrolysis in relation to ammonia emissions from agriculture. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.17, p.241–258, 2018.

SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; DOS SANTOS, O. J. A.; DE OLIVEIRA, A. L. M.; SCAPIM, C. A.; BERTAGNA, F. A. B.; KUKI, M. C. Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônomo de milho pipoca. **Bragantia**, v.75, n.1, p.33-40, 2016.

SONG, X.; ZHOU, G.; MA, B.; WU, W.; AHMAD, I.; ZHU, G.; YAN, W.; JIAO, X. Nitrogen application improved photosynthetic productivity, chlorophyll fluorescence, yield and yield components of two oat genotypes under saline conditions. **Agronomy**, v.9, n.3, 2019.

SKONIESKI, F. R.; VIÉGAS, J.; MARTIN, T. N.; MINGOTTI, C. C. A.; NAETZOLD, S.; TONIN, T. J.; DOTTO, L. R.; MEINERZ, G. R. Effect of nitrogen topdressing fertilization and inoculation of seeds with *Azospirillum brasilense* on corn yield and agronomic characteristics. **Agronomy**, v.9, n.12, 2019.

STITT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant, Cell and Environment**, v.22, p.583–621, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed., Porto Alegre: Artmed, 2017.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.24, n.8, p. 967-980, 1978.

THOMAS, J.; KIM, H. R.; RAHMATALLAH, Y.; WIGGINS, G.; YANG, Q.; SINGH, R.; GLAZKO, G.; MUKHERJEE, A. RNA-seq reveals differentially expressed genes in rice

(*Oryza sativa*) roots during interactions with plant-growth promoting bacteria, *Azospirillum brasilense*. **PloS One**, v.14, n.5, 2019.

TIMÓTEO, T. S.; MARCOS-FILHO, J. Seed performance of different corn genotypes during storage. **Journal of Seed Science**, v.35, n.2, p.207-215, 2013.

TRENTINI, D. B. Identificação dos alvos celulares das proteínas de transdução de sinal PII do diazotrófico de vida livre *Azospirillum amazonense*. 2010. 122p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

TRIPATHI, A. K.; KLINGMÜLLER, W. Temperature sensitivity of nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 1238-1241, 1992.

TRIPATHY, B. C.; OELMÜLLER, R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.7, n.12, p.1621-1633, 2012.

USDA. United States Department of Agriculture. World Agricultural production. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production>>, acesso em: 24 de dezembro de 2020.

VARGAS, L.; DE CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; HEMERLY, A. S. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and Soil**, v.56, n.1, p.127-137, 2012.

WHEATLEY, R. M.; POOLE, P. S. Mechanisms of bacterial attachment to roots. **FEMS microbiology reviews**, v.42, n.4, p.448-461, 2018.

WHITE P.J. **Ion transport**. In: THOMAS, B.; MURPHY, D. J.; MURRAY, B. G. (eds) Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Academic Press, London, p.625–634, 2003.

ZEFFA, D. M.; PERINI, L. J.; SILVA, M. B.; DE SOUZA, N. V.; SCAPIM, C. A.; DE OLIVEIRA, A. L. M.; JÚNIOR, A. T. A.; GONÇALVES, L. S. A. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p. e0215332, 2019.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão deste trabalho serão apresentados em dois manuscritos, como segue:

Manuscrito I: **INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO COM *Azospirillum brasilense* em DIFERENTES TEMPERATURAS**

Manuscrito II: **HORÁRIOS DE SEMEADURA INFLUENCIAM NA EFICIÊNCIA DA INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DO MILHO**

## 6 ARTIGO I - INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO COM *Azospirillum brasilense* em DIFERENTES TEMPERATURAS

**RESUMO:** Bactérias promotoras de crescimento *Azospirillum brasilense*, utilizadas como inoculante na cultura do milho podem ser severamente afetadas pela temperatura de exposição, com efeito letal acima de 35 °C, quando cultivadas isoladamente em condições de laboratório. Tais efeitos podem limitar a interação associativa entre planta – bactéria, com redução da eficiência de inoculação, resultando em menor taxa de crescimento do vegetal e incremento de estresse oxidativo. Assim, o objetivo da pesquisa foi avaliar a eficiência do processo de inoculação com *Azospirillum brasilense* em sementes de duas cultivares de milho submetidas a diferentes temperaturas. Foram utilizadas sementes dos híbridos de milho Syn 488 e Syn 505. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense* x 4 temperaturas de semeadura: 20, 25, 30 e 35 °C), com quatro repetições. A eficiência da inoculação em plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas foi avaliada através dos seguintes testes: germinação, primeira contagem, comprimento e massa seca de plântulas. Além disso, avaliou-se as respostas a nível bioquímico da interação (temperaturas x inoculação) para o conteúdo de pigmentos fotossintéticos e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica. A inoculação com *A. brasilense* alterou as respostas morfológicas e bioquímicas de plântulas de milho, sendo que o processo de inoculação foi eficiente para todas as temperaturas testadas. Os melhores resultados foram sob as temperaturas 25, 30 e 35 °C. Planta e bactéria quando expostas a condição de temperatura (30 °C inoculado), apresentaram incremento significativo para biomassa vegetal e atividade de enzimas antioxidantes.

**Palavras chave:** Temperatura, germinação, espécies reativas de oxigênio.

## **INOCULATION OF CORN SEEDS WITH *Azospirillum brasilense* at DIFFERENT TEMPERATURES**

**ABSTRACT:** Growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense*, used as an inoculant in corn culture, can be severely affected by the exposure temperature, with a lethal effect above 35° C, when cultivated alone under laboratory conditions. Such effects may limit the associative interaction between plant - bacteria, with reduced inoculation efficiency, resulting in a lower growth rate of the plant and an increase in oxidative stress. Thus, the objective of the research was to evaluate the efficiency of the inoculation process with *Azospirillum brasilense* in seeds of two corn cultivars submitted to different temperatures. Were utilized corn hybrids seed Syn 488 and Syn 505. The experimental design was completely randomized in a 2 x 4 factorial scheme (with and without inoculation of *Azospirillum brasilense* x 4 sowing temperatures: 20, 25, 30 and 35 °C), with four replications. The inoculation efficiency in corn seedlings submitted to different temperatures was evaluated through the following tests: Germination, first count, seedling length and dry weight. In addition, responses at the biochemical level of the interaction (temperatures x inoculation) for the content of photosynthetic pigments and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), antioxidant enzymes and lipid peroxidation were evaluated. The inoculation with *A. brasilense* changed the morphological and biochemical responses of corn seedlings, and the inoculation process was efficient for all temperatures tested. The best results were under temperatures 25, 30 and 35 ° C. Plant and bacteria when exposed to temperature conditions (30 ° C inoculated), showed a significant increase in plant biomass and activity of antioxidant enzymes.

**Keywords:** Temperature, germination, oxigen reactive species

## 6.1 INTRODUÇÃO

Fatores ambientais como concentração de CO<sub>2</sub>, umidade, temperatura ou seca podem influenciar plantas e microrganismos do solo, além de modular os mecanismos relacionados à interação planta – bactéria via alterações na quantidade e tipo de exsudatos radiculares, colonização rizosférica, crescimento microbiano, bem como o grau de associação realizado (NOTTINGHAM et al., 2018; CLASSEM et al., 2015; COMPANT et al., 2010). Dentre estes fatores, a temperatura do solo no momento da semeadura de culturas agrícolas assume um importante papel no desenvolvimento inicial de plântulas no campo, capaz de afetar a absorção de água e nutrientes, bem como a velocidade com que os processos fisiológicos e bioquímicos ocorrem (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Estresses térmicos podem promover a desestruturação de membranas, alterações do *status* redox e dano oxidativo em células vegetais, capaz de reduzir significativamente a produção de biomassa e produtividade de grãos (TIWARI; YADAV, 2019; NOBLET et al., 2017; NAKAGAWA et al., 2020), com melhores respostas da planta para máxima porcentagem de germinação e crescimento de plântulas expostas de 25 a 30,8 °C (SANCHEZ et al., 2014; SANTOS et al., 2018). Além disso, bactérias promotoras de crescimento *Azospirillum brasilense*, utilizadas como inoculante na cultura do milho, podem ser afetadas severamente pela temperatura de exposição, com efeito letal acima de 35 °C, e crescimento extremamente lento abaixo de 28 °C, sob condições de laboratório (ROMERO-PERDOMO et al., 2015; MOLINA et al., 2018), aliado a alterações na inserção de bases nitrogenadas, capaz de afetar a dinâmica de populações microbianas e respectiva funcionalidade (BÉRARD et al., 2015). Neste sentido, semeaduras antecipadas da cultura do milho, principalmente no sul do Brasil, podem implicar em atrasos na germinação de sementes, aliado a modificações na eficiência de inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas, as quais podem ter sua atividade restringida em função das condições ambientais.

Embora várias pesquisas tenham demonstrado os efeitos benéficos da inoculação em gramíneas via alteração da arquitetura do sistema radicular, fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitormônios e modulação do sistema antioxidante de plantas (DE LIMA et al., 2020; BULEGON et al., 2019; FUKAMI et al., 2018; MEHNAZ, 2015; REVOLTI et al., 2018; BARNAWAL et al., 2019), 30 a 40% dos experimentos reportam a ineficiência do processo (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016). Desta forma, pesquisas voltadas a influência da temperatura no período da semeadura da cultura sob inoculação devem ser ampliadas, para compreender as relações entre planta e microrganismo sob diferentes condições térmicas, uma



vez que os dados da literatura enfatizam as condições ótimas de crescimento da bactéria isolada em laboratório, sem considerar a o componente vegetal. Assim, o objetivo da pesquisa foi avaliar a influência da temperatura sobre o processo de inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense*.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Local do experimento e material vegetal

O experimento foi realizado no laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS. Foram utilizadas sementes de duas cultivares de milho, Syn 488 e Syn 505 (Syngenta). As sementes já possuíam tratamento químico com dois inseticidas, Ciantraniliprole (40 mL 60.000 sementes<sup>-1</sup>) e Tiametoxan (70 mL 60.000 sementes<sup>-1</sup>), bem como um fungicida composto por três princípios ativos Fludioxonil, matalaxil-m e thiabendazol (150 mL 100 kg sementes<sup>-1</sup>), as quais foram acondicionadas em local arejado até a sua utilização.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense* x 4 temperaturas de semeadura: 20, 25, 30 e 35 °C), com quatro repetições.

### 6.2.2 Inoculação com bactérias *Azospirillum brasilense*

A inoculação das sementes foi realizada com bactérias *Azospirillum brasilense* uma hora antes da semeadura, em sacos de plástico com capacidade para cinco litros, com inoculante comercial Azototal<sup>®</sup>, contendo as estirpes Abv5 e Abv6, com garantia mínima de  $2 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, na dose de 1,66 mL para cada 1.000 sementes, conforme as recomendações do fabricante. Para os tratamentos isentos de inoculação, foi adicionada água destilada para manter o mesmo nível de umidade das sementes. Posteriormente, os sacos foram abertos para permitir a secagem do material em temperatura ambiente.

### 6.2.3 Germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de milho

Após a realização do processo de inoculação, as sementes de ambas as cultivares de milho foram semeadas com auxílio de uma pinça em papel *germitest* umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do substrato. Para manter a umidade, os rolos foram acondicionados em sacos plásticos com capacidade para cinco litros hermeticamente fechados. Para submeter as sementes e bactérias a diferentes condições de temperatura no processo de germinação, utilizou-se câmaras de crescimento do tipo BOD (*Biological Oxygen Demand*), com luz constante e temperatura ajustada de acordo com o tratamento.

A eficiência da inoculação em plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas foi avaliada através dos seguintes testes:

*Primeira contagem da germinação e germinação:* realizada aos quatro e sete dias após a semeadura, respectivamente, através da contagem direta do número de plântulas normais emergidas no papel (BRASIL, 2009). Após as contagens, os resultados foram convertidos e expressos em porcentagem de plântulas normais, em quatro repetições de 50 sementes.

*Comprimento de raiz, parte aérea e massa seca de plântulas:* para a realização do teste, foram distribuídas 20 sementes no terço superior do papel pré-umedecido em sentido longitudinal, com quatro repetições por tratamento. As sementes foram posicionadas com a extremidade da radícula voltada para a parte inferior do papel. Em seguida, rolos de papel semelhantes ao teste de germinação foram confeccionados e colocados para germinar em BOD por sete dias. Após este período, foram escolhidas aleatoriamente 10 plântulas normais de cada repetição. Mediu-se com auxílio de régua graduada o comprimento da raiz e parte aérea destas plântulas, separando as mesmas em duas porções (raiz e parte aérea), as quais foram posteriormente acondicionadas em estufa a 60 °C até obtenção de peso constante. Os resultados finais foram expressos em cm plântula<sup>-1</sup> (para comprimento da raiz e parte aérea) e massa seca plântula<sup>-1</sup> (para biomassa seca) (SBRUSSI; ZUCARELI, 2014; NAKAGAWA, 1999).

### 6.2.4 Variáveis Bioquímicas

Para a avaliação das alterações bioquímicas das plântulas de milho, oito repetições de 50 sementes de cada tratamento foram dispostas em papel *germitest*, seguindo a mesma metodologia utilizada para a germinação. Após sete dias em câmara do tipo BOD, 40 plântulas normais de cada repetição foram coletadas, separadas em raiz e parte aérea e congeladas em nitrogênio líquido, para posterior armazenagem em ultra freezer a -80 °C. As

amostras congeladas foram maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida, determinadas as seguintes variáveis:

*Concentração de pigmentos:* clorofilas totais (*a* e *b*) e carotenoides foram avaliados a partir da metodologia descrita por Hiscox e Israelstam (1979) e a equação de Lichtenthaler (1987), onde 50 mg de peso fresco do tecido vegetal de cada amostra (parte aérea) foram incubados em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 45 minutos a 65 °C para remoção total dos pigmentos. Após este período, 4 mL do líquido sobrenadante foram pipetados em tubos de vidro (2 mL para cada replicata) e os valores de absorvância determinados em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 663, 645 e 470 nm, para clorofila *a*, *b*, e carotenoides, respectivamente. O conteúdo de clorofilas totais foi obtido pela soma dos valores de clorofila *a* e *b*.

*Enzima guaiacol peroxidase (POD):* 0,5 g de tecido fresco foi homogeneizado em 3 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,8), contendo 1 mM de EDTA e 2% (M/V) de polyvinylpyrrolidona (PVP). A amostra homogeneizada foi centrifugada a 13.000 g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante armazenado em eppendorf para determinação da atividade enzimática. A atividade da POD foi determinada em espectrofotômetro digital UV/VIS (Fentoscan) a 470 nm, conforme Zeraik et al. (2008).

*Enzima Superóxido dismutase (SOD):* 0,5 g de tecido vegetal foram homogeneizados seguindo o mesmo protocolo descrito para a POD. Para a avaliação da atividade enzimática da SOD, um Mix com tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 13 mM de metionina, 0,1 µM EDTA, 75 µM NBT e 2 µM de riboflavina foi utilizado 300 µL de amostra e 2,5 mL de mix foram incubados sobre lâmpada fluorescente (15 watts) por 5 minutos (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Após, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brazil) a 560 nm. Os resultados foram expressos em U mg<sup>-1</sup> proteína.

*Conteúdo de Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):* 0,3 g de massa fresca de plantas foram homogeneizadas em 3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%, de acordo com a metodologia descrita por Loreto et al. (2001). O líquido homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Para determinação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tecido vegetal, 0,5 mL do sobrenadante foram adicionados em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) com 1 mL de Iodeto de potássio (KI), realizando-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brazil) a 390 nm. Os valores foram expressos em µmol g<sup>-1</sup> de massa fresca.

*Peroxidação lipídica (TBARS):* O nível de peroxidação lipídica foi avaliado a partir da acumulação de malondialdeído (MDA), como produto da peroxidação de ácidos graxos insaturados, determinado pela reação ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (EL-MONSHATY et al.,

1993). Adicionalmente, 0,5 g de massa fresca de tecido vegetal foram homogeneizadas em 3 mL de tampão fosfato de citrato (pH 6,5), e centrifugadas a 20.000 g por 15 minutos. A fração sobrenadante foi adicionada em tubos de vidro contendo TCA + TBA, e os mesmos foram agitados e incubados a 95 °C por 40 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas no gelo por 15 minutos e, posteriormente, centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brasil) a 532 e 600 nm, com resultados expressos em nmol MDA g<sup>-1</sup> peso fresco.

### **6.2.5 Análise estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade por Shapiro Wilk e análise de variância ANOVA pelo teste F ( $p < 0,05$ ). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Para a análise dos dados foi utilizado o software SISVAR (FERREIRA, 2014).

## **6.3 RESULTADOS**

### **6.3.1 Germinação e crescimento inicial das plântulas do Genótipo Syn 488**

Efeito significativo para os parâmetros de germinação e vigor foram encontrados para a interação inoculação x temperatura de semeadura, exceto para comprimento de parte aérea (CPA) e massa seca de raiz (MSR), os quais demonstraram efeitos isolados para cada fator (Tabela 1). Não houve efeito significativo da inoculação para germinação de sementes (G) para a maioria das temperaturas, exceto 35 °C, onde uma redução de 9,30% foi observada nas sementes sem inoculação com a bactéria. Tal comportamento diferiu para a primeira contagem da germinação, com respostas à inoculação de sementes a partir de 25 °C.

Quando se avaliaram os parâmetros relacionados ao desenvolvimento inicial de plântulas, impactos negativos da inoculação foram verificados para comprimento de raiz (CR) e comprimento total na temperatura de 20 °C, em média 20% menor em relação às plântulas não inoculadas, sem diferenças para as demais temperaturas testadas. Além disso, as variáveis CPA, MSR e MSPA (massa seca de parte aérea) demonstraram efeitos isolados para os fatores (temperatura x inoculação), onde constatou-se que a interação plântula-bactéria reduziu o CPA (9,31%), a MSR (6,6%) e a MSPA (5,8%) para o genótipo Syn 488 (Tabela 1).

A temperatura de 30 °C proporcionou as maiores médias para a maioria das variáveis de crescimento, seguida por 25, 20 e 35 °C, exceto para a MSPA, que demonstrou um comportamento similar à temperatura de 35 °C.

Tabela 1 - Primeira contagem de germinação (PC), germinação (G), comprimento de raiz (CR), parte aérea (CPA), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA) da cultivar Syn 488, com e sem inoculação com *Azospirillum brasilense* (Azo).

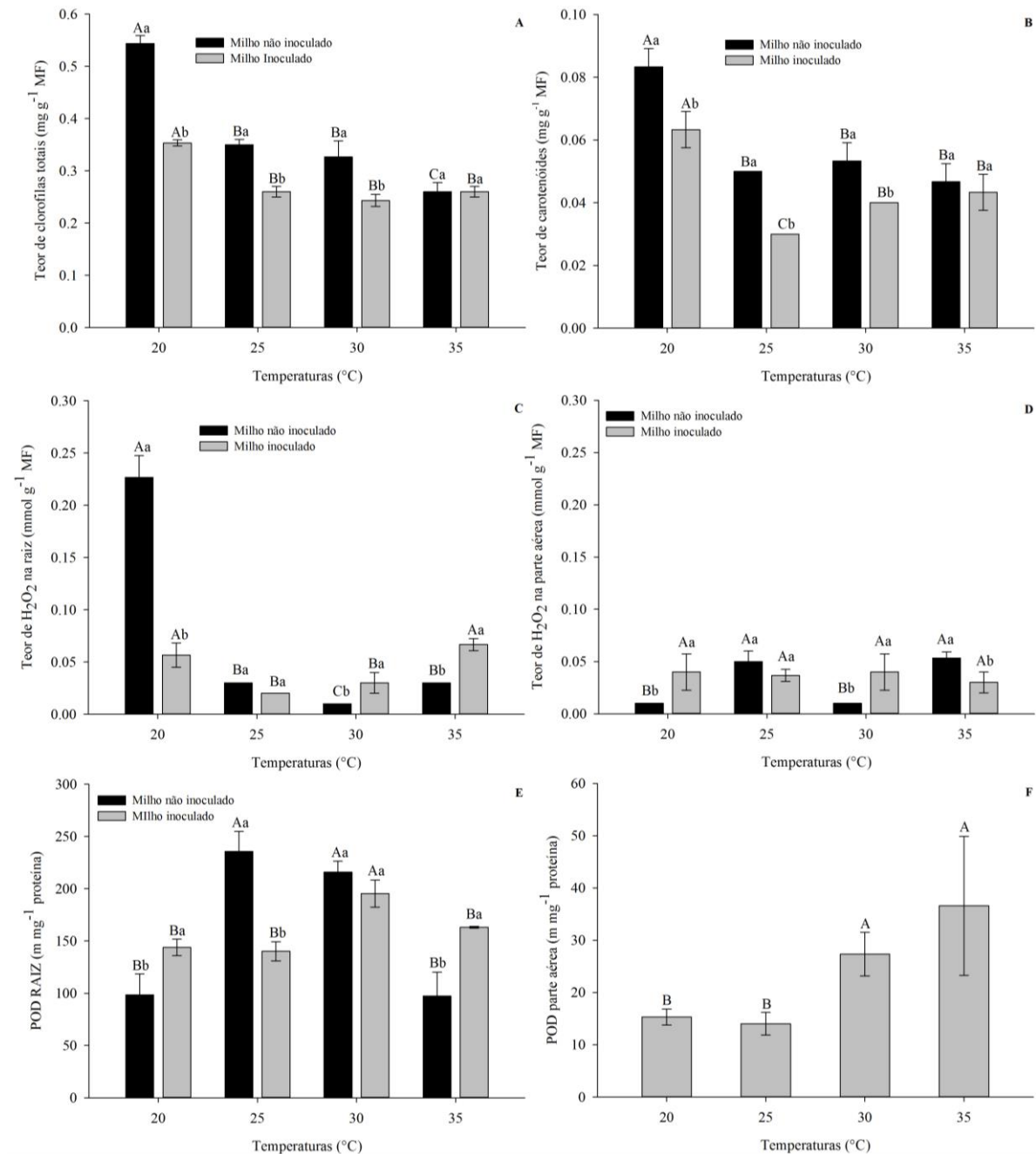
Inoculação	Temperaturas de Semeadura				Média
	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	
	-----PC (%)-----				Média
Sem Azo	94 Aa*	82 Cb	88 Bb	60 Db	81
Com Azo	97 Aa	93 Aa	94 Aa	73 Ba	89
Média	95	87	91	66	
	-----G (%)-----				Média
Sem Azo	100 Aa	96 Aa	97 Aa	78 Bb	93
Com Azo	98 Aa	99 Aa	98 Aa	86 Ba	95
Média	99	97	98	82	
	-----CR (cm)-----				Média
Sem Azo	14,02 Ba	15,53 Aa	15,75 Aa	4,08 Ca	12,34
Com Azo	11,03 Bb	16,48 Aa	15,07 Aa	3,79 Ca	11,59
Média	12,52	16,00	15,41	3,93	
	-----CPA (cm)-----				Média
Sem Azo	7,12	9,80	10,24	6,34	8,38 a
Com Azo	5,98	8,75	9,37	6,31	7,60 b
Média	6,55 B	9,28 A	9,80 A	6,33 B	
	-----CT (cm)-----				Média
Sem Azo	21,14 Ba	25,33 Aa	25,99 Aa	10,42 Ca	20,72
Com Azo	17,00 Bb	25,23 Aa	24,43 Aa	10,09 Ca	19,19
Média	19,07	25,28	25,21	10,26	
	-----MSR (g plântula <sup>-1</sup> )-----				Média
Sem Azo	25,63	25,41	36,93	20,83	27,20 a
Com Azo	21,85	26,20	35,75	17,80	25,40 b
Média	23,74 B	25,80 B	36,34 A	19,32 C	
	-----MSPA (g plântula <sup>-1</sup> )-----				Média
Sem Azo	21,50	25,59	28,30	28,17	25,89 a
Com Azo	17,17	24,62	28,48	26,67	24,37 b
Média	19,61 C	25,10 B	28,38 A	27,42 A	

\*Letras maiúsculas na linha comparam as temperaturas dentro de cada sistema de inoculação (com ou sem Azo), e letras minúsculas na coluna comparam os sistemas de inoculação dentro de cada temperatura pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

### 6.3.2 Dados bioquímicos do genótipo Syn 488

As variáveis bioquímicas das plântulas de milho também foram avaliadas, para verificar possíveis alterações no processo de interação planta-bactéria, quando submetidas a diferentes temperaturas. Efeitos da interação (temperaturas x inoculação) foram identificados para o teor de clorofilas totais, carotenoides, conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e atividade das enzimas guaiacol peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD). Ainda foram identificados efeitos isolados da temperatura na POD da parte aérea. Neste sentido, constatou-se que para a maioria das temperaturas de semeadura, a inoculação reduziu os teores de clorofilas totais e carotenoides, em média 30%, exceto em 35 °C (Figura 1). Alterações foram evidenciadas quanto ao teor de  $H_2O_2$  (ERO) para ambas as estruturas (raiz e parte aérea). Conforme os resultados (Figura 1C), a temperatura de 20 °C promoveu as maiores concentrações de  $H_2O_2$  nas raízes (77% maior), em relação às plantas inoculadas. Para as demais temperaturas não foram verificadas variações expressivas dos resultados, exceto para 35 °C, em que plantas inoculadas demonstraram um aumento de 54% para  $H_2O_2$  no tecido radicular (Figura 1C). Tais constatações estão de acordo com os valores identificados para a enzima guaiacol peroxidase na raiz (POD) (Figura 1E). Embora a interação planta-bactéria tende a promover um aumento na produção de ERO sob maiores temperaturas, o sistema de defesa do vegetal também foi estimulado, com incremento de 33% em média na atividade da POD (Figura 1E).

Figura 1 - Teor de clorofilas totais, carotenoides, conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e atividade da guaiacol peroxidase (POD) em sementes submetidas a diferentes temperaturas e inoculação.

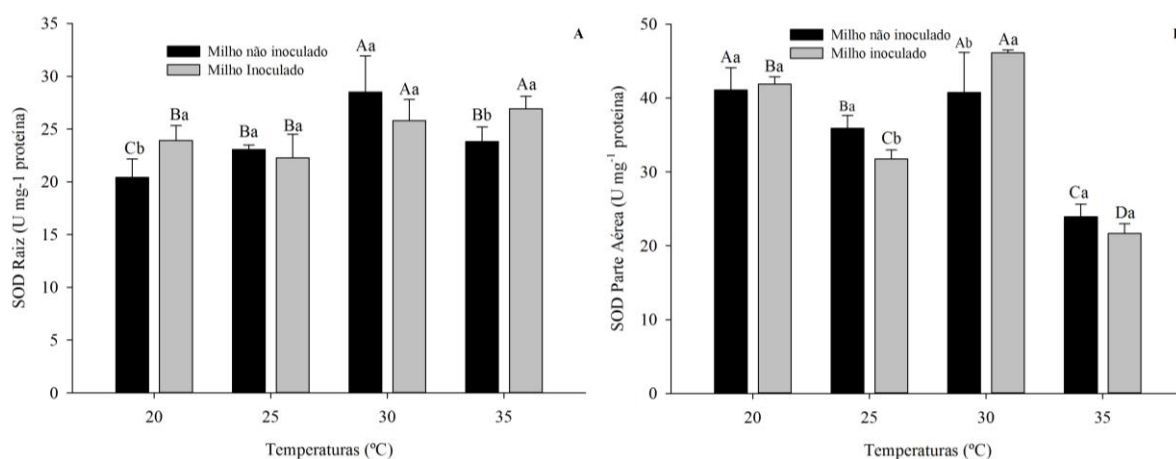


Letras maiúsculas comparam os efeitos das temperaturas em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Tais observações diferem para o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na parte aérea, com maior produção em plântulas inoculadas a 20 e 30 °C (Figura 1D). Entretanto, a POD na parte aérea demonstrou efeito isolado para temperatura, sem correlação direta com os dados anteriores, porém à

medida que a temperatura aumentou, maior atividade foi verificada. A atividade da SOD apresentou comportamento similar aos resultados já apresentados para  $H_2O_2$  e POD na raiz de plântulas inoculadas, com maior atividade a 20 e 35 °C (Figura 2A), como resposta a produção de ERO nestas condições. A SOD na parte aérea demonstrou ausência de efeitos para inoculação independente da temperatura, exceto em 25 °C. Entretanto, nesta temperatura foi constatado menor conteúdo de carotenoides nos tecidos, o que pode estar ligado à condição de menor estresse ao vegetal, sem a necessidade de incremento do sistema enzimático.

Figura 2 - Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) determinada a partir de plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas e sistema de inoculação.



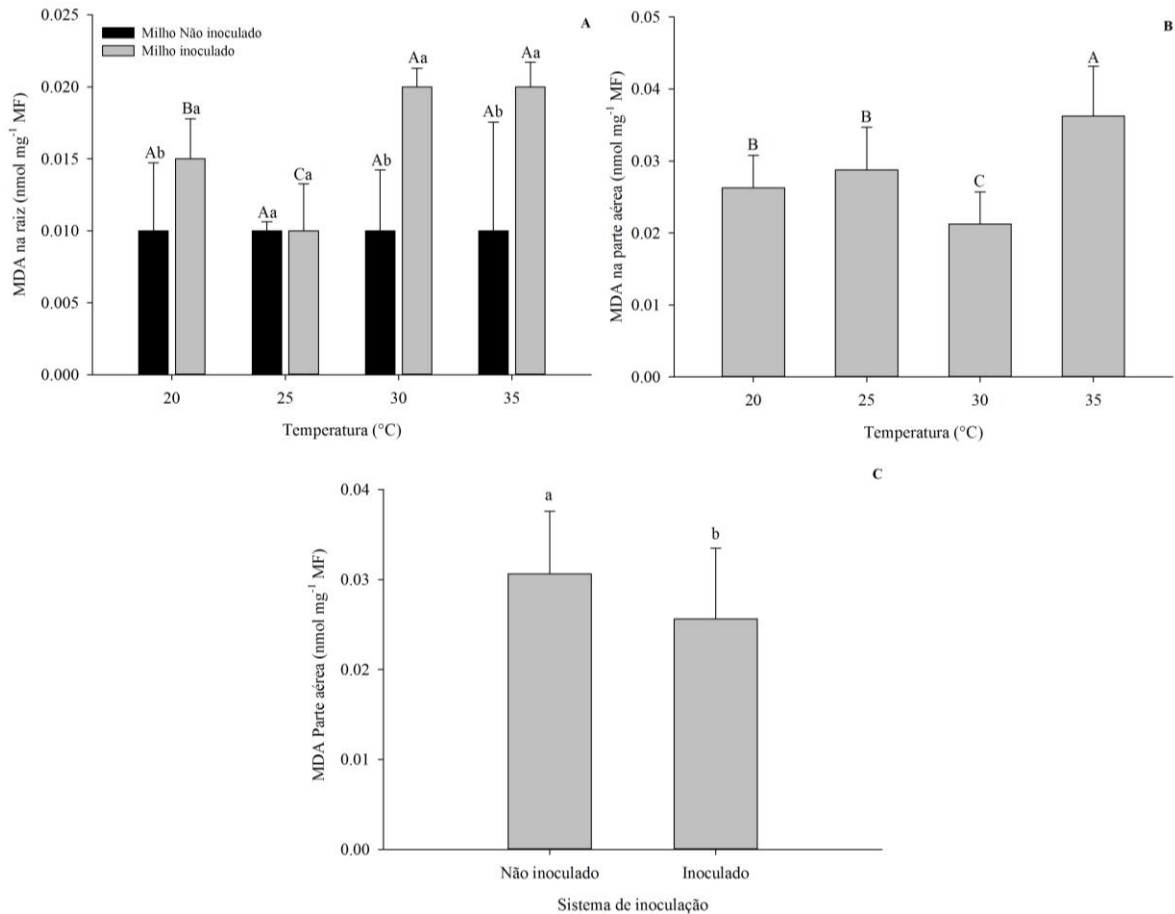
Letras maiúsculas comparam os efeitos das temperaturas em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

O nível de dano oxidativo determinado pela peroxidação lipídica (Tbars) (Figura 3) demonstrou que a interação das plântulas de milho Syn 488 com a bactéria *Azospirillum brasilense* promoveu um incremento médio de 42% na peroxidação lipídica na raiz, para as diferentes temperaturas testadas, exceto 25 °C, a qual manteve-se baixa e sem diferença significativa da condição controle. Tal impacto negativo da inoculação corrobora com os dados de crescimento (Tabela 1) e pigmentos (Figuras 1A, 1B) com redução do CPA, conteúdo de clorofilas e carotenoides, o que pode indicar a produção excessiva de ERO no processo de infecção/colonização radicular, reduzindo o desempenho do vegetal. Por outro lado, foram verificados efeitos isolados para a peroxidação lipídica na parte aérea, obtendo-se maiores valores de malondialdeído-MDA (um dos produtos da peroxidação lipídica) nas



amostras expostas a 35 °C, além de a inoculação reduzir em 12% o nível de dano em amostras de sementes inoculadas.

Figura 3 - Peroxidação lipídica (Tbars), determinada a partir de plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas e sistema de inoculação.



Letras maiúsculas comparam os efeitos das temperaturas em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

### 6.3.3 Germinação e crescimento inicial das plântulas do Genótipo Syn 505

Efeito significativo para os parâmetros de germinação e vigor foram encontrados para a interação (inoculação x temperatura de semeadura), exceto para a primeira contagem (PC), comprimento de raiz (CR), parte aérea (CPA) e massa seca de parte aérea (MSPA), os quais demonstraram efeitos isolados para cada fator (Tabela 2). As temperaturas não influenciaram a emergência de plântulas normais na PC, contudo, foi constatado que sementes inoculadas com a bactéria aumentaram 6% o número total de plântulas emergidas aos quatro dias.

Adicionalmente, aos sete dias após a instalação do experimento, a germinação de sementes foi afetada em função dos tratamentos. Os resultados mostraram que, independente da temperatura exposta, sementes inoculadas atingiram percentuais de germinação superiores a 98%, comparado a ausência da bactéria, com efeito significativo de *Azospirillum brasilense* para as temperaturas de 25 e 35 °C.

Tabela 2 - Primeira contagem da germinação (PC), germinação (G), comprimento de raiz (CR), parte aérea (CPA), comprimento total (CT), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA) na cultivar Syn 505, com e sem inoculação com *Azospirillum brasilense* (Azo).

Inoculação	Temperaturas de Semeadura				Média
	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	
	-----PC (%)-----				Média
Sem Azo	90	83	86	82	85 b
Com Azo	90	85	92	93	90 a
Média	90	84	89	87	
	-----G (%)-----				Média
Sem Azo	99 Aa*	94 Bb	97 Aa	91 Cb	95
Com Azo	98 Aa	98 Aa	99 Aa	96 Aa	98
Média	98	96	98	94	
	-----CR (cm)-----				Média
Sem Azo	16,14	17,11	19,93	5,75	14,73 b
Com Azo	17,53	18,48	19,59	6,87	15,62 a
Média	16,83 C	17,80 B	19,76 A	6,31 D	
	-----CPA (cm)-----				Média
Sem Azo	10,02	9,61	11,76	5,07	9,11 b
Com Azo	10,66	10,18	11,96	6,60	9,85 a
Média	10,34 B	9,89 B	11,86 A	5,84 C	
	-----CT (cm)-----				Média
Sem Azo	26,15 Bb	26,72 Bb	31,69 Aa	10,81 Cb	23,84
Com Azo	28,18 Ba	28,67 Ba	31,54 Aa	13,48 Ca	25,47
Média	27,17	27,69	31,61	12,14	
	-----MSR (g plântula <sup>-1</sup> )-----				Média
Sem Azo	32,90 Ca	36,20 Ba	44,50 Aa	20,78 Db	33,59
Com Azo	34,07 Ca	37,47 Ba	42,25 Aa	26,25 Da	35,01
Média	33,49	36,83	43,38	23,51	
	-----MSPA (g plântula <sup>-1</sup> )-----				Média
Sem Azo	25,90	25,33	30,35	30,80	28,09
Com Azo	25,95	25,38	29,70	32,35	28,34
Média	25,93 B	25,35 B	30,03 A	31,58 A	

\*Letras maiúsculas na linha comparam as temperaturas dentro de cada sistema de inoculação (com ou sem Azo), e letras minúsculas na coluna comparam os sistemas de inoculação dentro de cada temperatura pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

O comprimento de raízes e parte aérea foi afetado isoladamente pelos fatores (inoculação x temperaturas), ou seja, a inoculação de sementes não foi afetada em função da condição ambiental exposta. Neste sentido, verificou-se incremento linear para os parâmetros analisados de acordo com o aumento da temperatura, sendo que 30 °C promoveu o maior crescimento das estruturas do vegetal, como resultado da condição ideal para atividade de enzimas ligadas a degradação-mobilização de substâncias de reservas nas sementes. Além disso, tanto CR e CPA foram aumentados em média 7% na presença da bactéria *Azospirillum brasilense*. Contudo, para o comprimento total de plântulas, a inoculação de sementes mostrou-se superior em todas as temperaturas, sem diferença estatística em 30 °C.

Embora a MSR e a MSPA apresentaram efeitos diferentes frente aos tratamentos, percebe-se que a melhor temperatura para acúmulo máximo de matéria seca situa-se em torno de 30 °C, independente da inoculação. No entanto, mesmo sob altas temperaturas (35 °C), a bactéria contribuiu para a formação de um sistema radicular 20% maior, em relação à condição não inoculada.

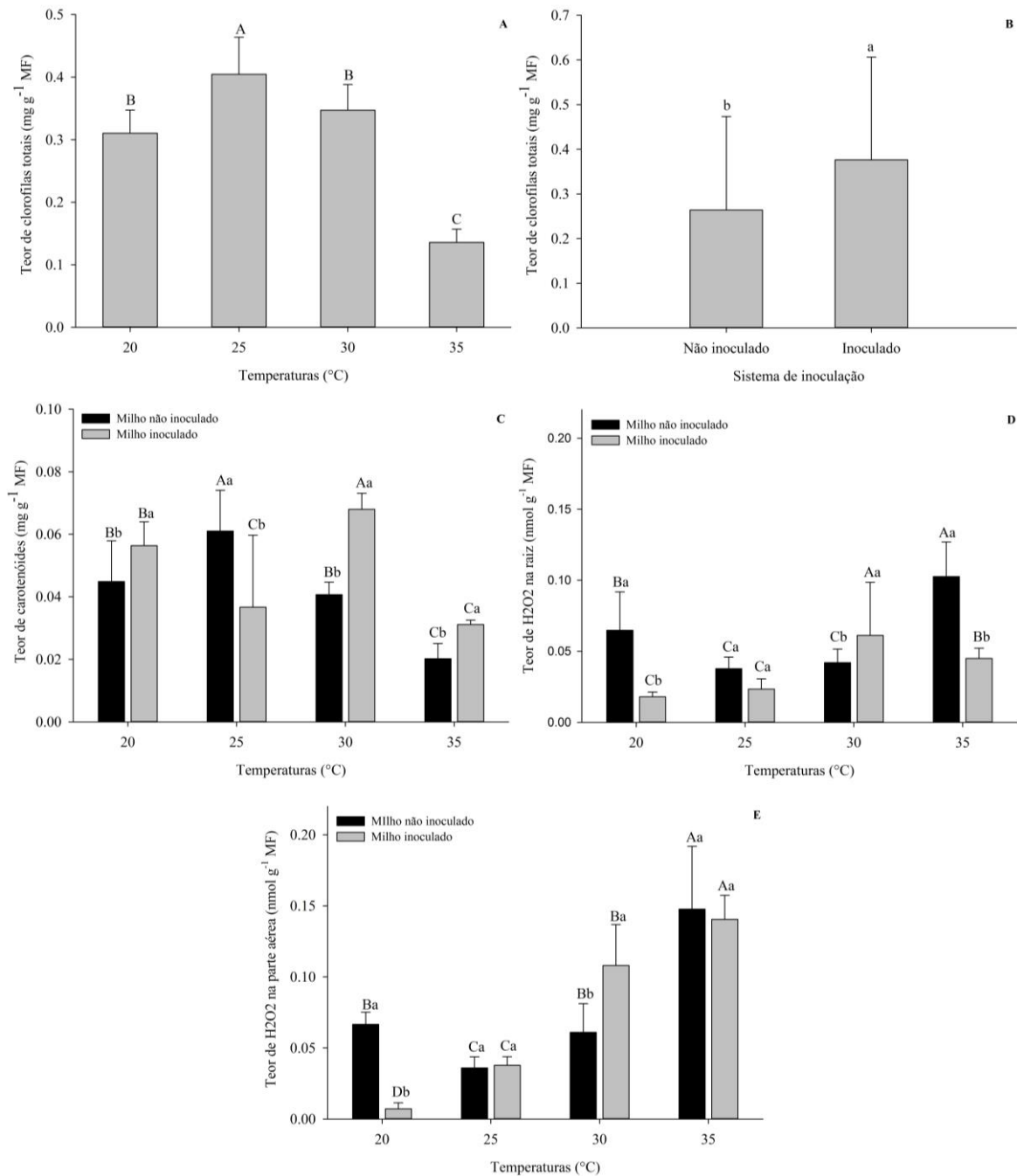
#### **6.3.4 Dados bioquímicos do genótipo Syn 505**

Efeitos da interação (temperatura x inoculação) foram verificados para a maioria das variáveis bioquímicas avaliadas, exceto para clorofilas totais e peroxidação lipídica (Tbars) na parte aérea, os quais demonstraram efeitos isolados para cada fator. Neste sentido, independente da condição a qual as plântulas foram expostas, constatou-se a contribuição da bactéria *Azospirillum brasilense* sobre o teor de clorofilas totais e carotenoides (Figura 4), com 26% de incremento sobre o teor de clorofilas e 18, 41 e 32% para o teor de carotenoides nas temperaturas de 20, 30 e 35 °C, respectivamente. Embora a inoculação de sementes em 25 °C apresentou redução de 30% para este pigmento (Figura 4C), tais resultados podem ser explicados pela menor condição de estresse ao vegetal, com menor concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos e incremento da atividade da POD pela bactéria (Figuras 4D, 4E, 5A e 5B), sem a necessidade de incremento de outras moléculas do sistema antioxidante.

Quando avaliada a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos, plântulas inoculadas demonstraram em geral menor acúmulo para esta ERO nos tecidos radiculares e parte aérea (Figuras 4D, 4E). Entretanto, quando submetidas a 30 °C, constatou-se um aumento de 37% na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ambas as estruturas do vegetal (Figuras 4D e 4E), o que poderia sinalizar a ocorrência de estresse oxidativo. Adicionalmente, a atividade enzimática da POD

em plântulas inoculadas aumentou cerca de 50% tanto na raiz quanto na parte aérea sob 25 °C (Figura 5), o que comprova a menor quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tecido vegetal nesta condição.

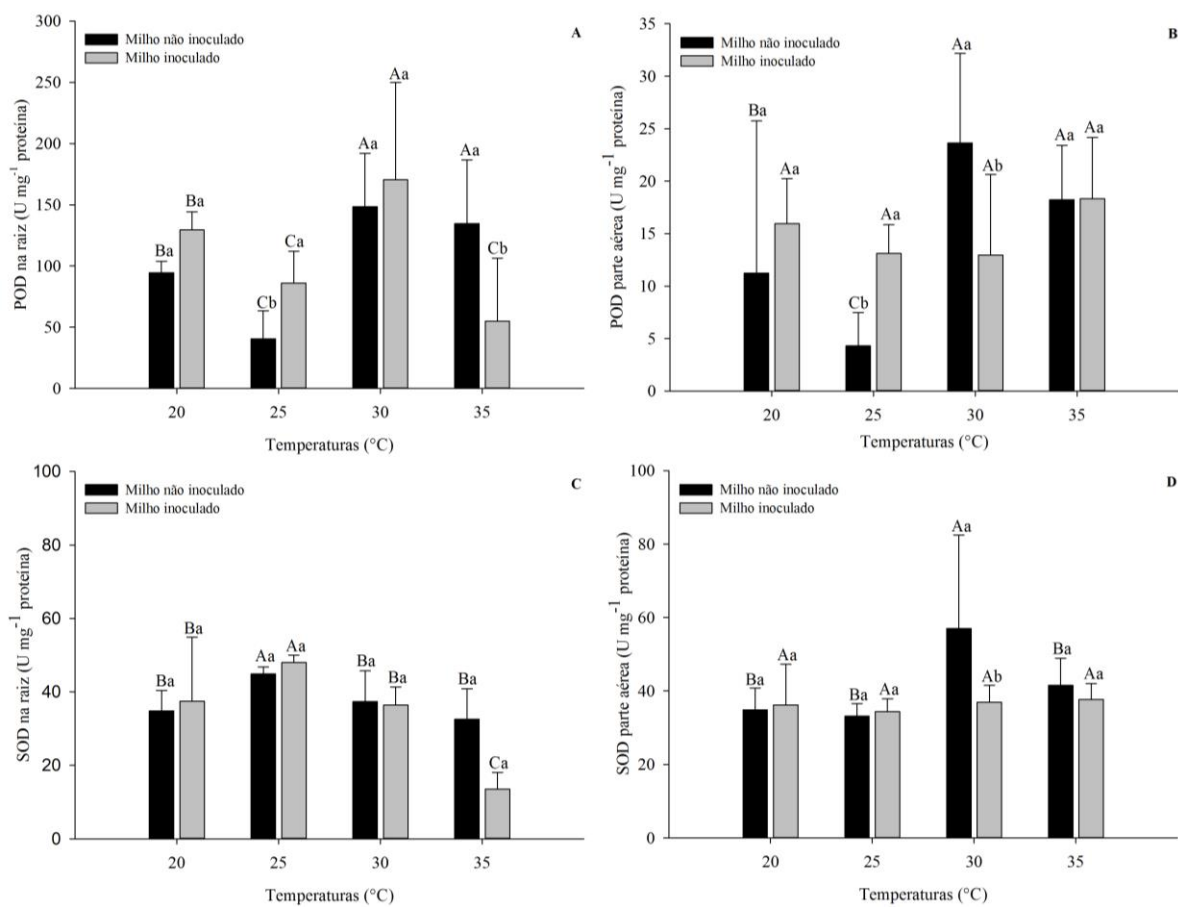
Figura 4 - Teor de clorofilas totais, carotenóides e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtidos a partir de plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas e sistema de inoculação.



Letras maiúsculas comparam os efeitos das temperaturas em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Percebe-se que a atividade da POD e SOD foi reduzida quando as sementes foram inoculadas e expostas a temperaturas mais altas, 30 e 35 °C (Figura 5). Embora tal comportamento sinalize um possível prejuízo ao metabolismo vegetal, o teor de carotenoides foi estatisticamente superior a condição não inoculada para as respectivas temperaturas (Figura 4C), sendo possivelmente eficiente no combate a moléculas danosas ao sistema.

Figura 5 - Atividade enzimática da guaiacol peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) obtidas a partir de plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas e sistema de inoculação.

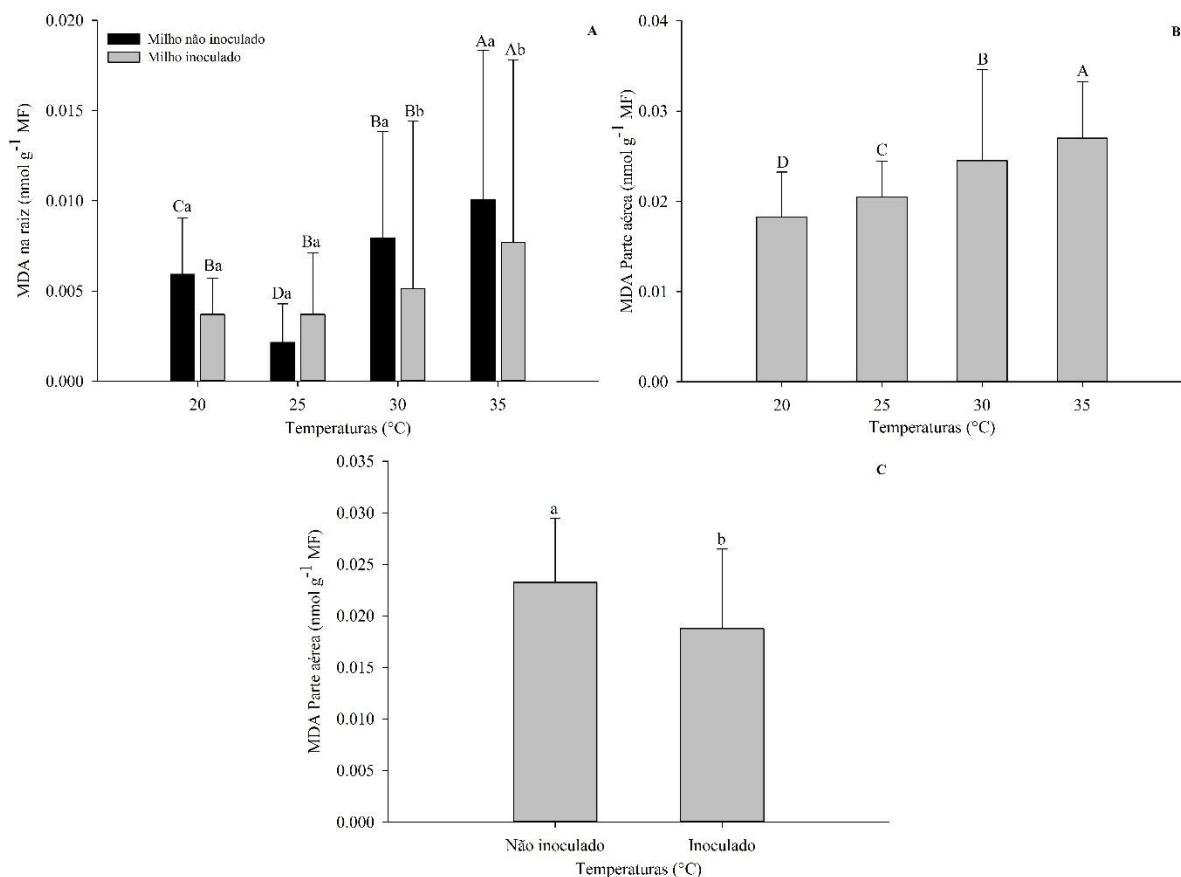


Letras maiúsculas comparam os efeitos das temperaturas em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott Knott ( $p < 0,05$ ).

O nível de peroxidação lipídica determinado pelo Tbars (Figura 6) mostrou que a interação planta-bactéria promoveu redução significativa do dano oxidativo em plantas inoculadas, independente da temperatura a qual foram expostas, exceto em 25 °C, em que não houve diferença estatística para a ausência da bactéria (Figura 6A). Contudo, de maneira geral, a inoculação de sementes reduziu 22% o dano oxidativo pelas ERO, as quais são

geradas em grandes quantidades quando as plantas estão expostas a temperaturas mais elevadas (Figuras 6B, 6C).

Figura 6 - Peroxidação lipídica (Tbars), determinada a partir de plântulas de milho submetidas a diferentes temperaturas e sistema de inoculação.



Letras maiúsculas comparam os efeitos das temperaturas em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

## 6.4 DISCUSSÃO

Várias pesquisas já têm caracterizado o potencial de uso de bactérias do gênero *Azospirillum* na promoção do crescimento de plantas, o qual está diretamente relacionado à produção de fitormônios como auxinas e giberelinas e fixação biológica de nitrogênio (FBN) (CASSÁN et al., 2009; FUKAMI et al., 2018). Além disso, efeitos secundários são relatados na literatura como a alteração do sistema de defesa da planta, com incremento de enzimas e pigmentos antioxidantes (ALEN'KINA et al., 2018), com resposta extremamente ligada a

modulação da expressão de genes relacionados ao crescimento e desenvolvimento da planta (THOMAS et al., 2019; MASUDA et al., 2018). Neste sentido, *Azospirillum brasilense* pode promover alterações na germinação de sementes mesmo em curto período de tempo, com efeitos diretos sobre o número de plântulas normais emergidas e a velocidade de germinação das mesmas, em função da maior síntese de giberelina, o qual possivelmente desencadeia maior atividade de enzimas ligadas a degradação de carboidratos e translocação até o embrião (DE MORAIS et al., 2016; DARTORA et al., 2013). Estes resultados corroboram com os dados obtidos neste estudo, em que a primeira contagem da germinação foi estatisticamente superior para as sementes inoculadas, independente da temperatura testada em ambos os genótipos (Tabelas 1 e 2). Embora a germinação de sementes não diferiu da condição não inoculada para a maioria das temperaturas, verificou-se que quando as sementes foram expostas a 35 °C houve redução para a variável em sementes não inoculadas, demonstrando que mesmo sob altas temperaturas a bactéria possivelmente manteve-se ativa. Isso difere de estudos conduzidos por Romero-Perdomo et al. (2015), os quais constataram efeito letal de altas temperaturas (34 e 36 °C) em *Azospirillum brasilense* cultivado em meio de cultura específico. Tais dados deixam claro que a interação planta-microrganismo permite maior tolerância a fatores de estresse para ambos os envolvidos.

Para os parâmetros relacionados aos pigmentos fotossintéticos e enzimas antioxidantes, os genótipos responderam diferentemente quanto à inoculação. Assim, verificou-se correlação direta entre a alteração do crescimento e as variáveis bioquímicas da planta, principalmente para o sistema de defesa antioxidante. Para Syn 488, a inoculação de sementes aumentou significativamente a peroxidação lipídica nas plântulas, principalmente em raízes (Figura 3), com maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em raízes de plantas inoculadas a 30 e 35 °C (Figura 1C). Naturalmente, as ERO podem ser produzidas em plantas, independente da condição ambiental que estão expostas, as quais podem ser consideradas moléculas sinalizadoras em baixas concentrações (FOYER, 2018). Entretanto, excesso de radiação, temperatura ou interações desenvolvidas pelo vegetal com microrganismos do solo (simbióticos ou patogênicos) podem modificar a formação destas moléculas (AWASTHI et al., 2015; NANDA et al., 2010). Desta forma, os resultados obtidos neste experimento comprovam que o processo de interação planta-microrganismo promoveu um incremento de ERO em algumas situações, porém, ao contrário do que se esperava, o mesmo resultou em dano oxidativo, reduzindo o conteúdo de clorofilas e carotenoides para Syn 488 (Figuras 1A, 1B). Conseqüentemente, menores valores para CPA, MSR e MSPA foram observados (Tabela 1). Esses dados podem ser explicados pela relação intrínseca que os pigmentos fotossintéticos

possuem com a captação de energia luminosa para posterior conversão em fotoassimilados pelo vegetal. Logo, qualquer redução do conteúdo de pigmentos pode configurar algum tipo de estresse oxidativo, com reflexos na produção e acúmulo de biomassa (TAIBI et al., 2016).

A interação inicial é extremamente dependente da comunicação estabelecida entre a bactéria e o indivíduo hospedeiro, a qual é mediada por lectinas presentes na parede celular da bactéria, com domínios ligantes de carboidratos capazes de aderir a superfície radicular e iniciar o processo de infecção, desencadeando uma série de eventos a nível de sinalização celular, com alteração no conteúdo de ERO (ALEN'KINA et al., 2014; ALEN'KINA; NIKITINA, 2009). Estes autores ainda reforçam a alteração do sistema enzimático de plantas de trigo expostas a diferentes concentrações de lectinas produzidas por *Azospirillum*, com incremento da atividade de SOD nos momentos iniciais da interação. Tais dados corroboram com os resultados encontrados por Méndez-Gómez et al. (2015) que evidenciaram maior produção de ânion superóxido em plântulas de trigo expostas a enzimas extracelulares de *Azospirillum brasilense* nas primeiras horas de infecção. Adicionalmente, Méndez-Gómez et al. (2016) constataram redução no comprimento de raízes, menor conteúdo de ERO e incremento da atividade de SOD e peroxidases em raízes de trigo inoculadas com a bactéria. Além disso, esses autores reforçam que embora a interação com a bactéria promoveu uma redução significativa do sistema radicular, o número de células na região meristemática foi superior a condição controle, além da maior proliferação de pelos radiculares.

Por outro lado, a inoculação de sementes da cultivar Syn 505 demonstrou redução para o conteúdo de MDA nas amostras, tanto na raiz como parte aérea (Figuras 6A, 6C), como resposta a menor concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, principalmente em raízes (Figura 4C). Adicionalmente, pigmentos fotossintéticos e POD também aumentaram na presença da bactéria, o que resultou em efeito supressor de ERO danosas ao metabolismo da planta (Figuras 4 e 5). Desta forma, CR, CPA e CT aumentaram significativamente com a inoculação, comprovando a relação direta entre o sistema enzimático e o desenvolvimento da planta. Neste sentido, vários estudos comprovam que o aumento de biomassa e alteração na arquitetura da planta é resultante da capacidade de *Azospirillum brasilense* produzir fitormônios (auxinas), influenciando o processo de divisão, proliferação e diferenciação celular (SPAEPEN et al., 2014; DUCA et al., 2014; ÇAKMAKÇI et al., 2020). Entretanto, estudos recentes comprovam que auxinas podem atuar como moléculas sinalizadoras na célula, estimulando a atividade de NADH-oxidases, as quais irão aumentar a produção de ânion superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na parede celular, fazendo com que ocorra um afrouxamento das fibras de celulose e hemicelulose, permitindo o aumento de tamanho da célula (MAJDA;



ROBERT, 2018; SCHMIDT et al., 2016; MANGANO et al., 2017). Embora o conteúdo de auxinas não foi avaliado no presente estudo, percebe-se que para as situações em que foram obtidos os melhores resultados (30 °C inoculado), o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plântulas inoculadas foi maior (Figuras 4C, 4D), o que resultou em maior desenvolvimento da plântula (Tabela 2).

Tais adaptações da espécie hospedeira a maior concentração de ERO no período inicial de infecção e colonização celular, associado a modulação do sistema antioxidante e arquitetura do sistema radicular, podem determinar o sucesso da interação, a qual pode ser prejudicial a partir do momento em que o sistema antioxidante não é capaz de manter a homeostase de ERO na planta. Neste sentido, Alquères et al. (2013) relataram o papel fundamental de enzimas antioxidantes na eficiência do processo de inoculação em plantas de arroz, as quais aumentaram consideravelmente a produção de ERO após entrarem em contato com a bactéria. Logo, tais afirmações podem explicar o desempenho negativo da cultivar Syn 488, uma vez que o conteúdo de carotenoides foi reduzido e a atividade da POD e SOD manteve-se muito próxima à condição controle. Tais dados reforçam a ideia de que as características genéticas dos híbridos podem influenciar no processo de inoculação, em resposta a maior ou menor exsudação radicular e tipo de metabólito liberado (PEREIRA et al., 2020), aliado ao papel genético dos híbridos quanto a adesão radicular as células bacterianas (DE LEÓN et al., 2015; ROJAS et al., 2013), bem como a presença e regulação transcricional de genes ligados a sinalização molecular e crescimento do vegetal (VARGAS et al., 2012; MASUDA et al., 2018). Além disso, rotas metabólicas ligadas a defesa do vegetal também devem ser alteradas, de maneira que o processo de infecção/inoculação seja eficiente, sem danos a planta hospedeira (THOMAS et al., 2019).

Considerando os efeitos da temperatura sobre a inoculação das plântulas de milho compatíveis (Cultivar Syn 505), para parâmetros de germinação e crescimento (Tabela 2), a inoculação não foi afetada negativamente pela temperatura, no entanto, a maior taxa de crescimento vegetal foi identificada quando as plântulas foram expostas a 30 °C. Neste sentido, Riley (1981) e Rilkey (1981) constataram que sob temperaturas próximas a 28 °C, sementes de milho apresentaram maior atividade de enzimas ligadas a degradação e mobilização de reservas, aliada a síntese de novas proteínas, as quais foram reduzidas quando expostas a temperaturas acima de 30 °C, como resultado na inibição da síntese de mRNA em detrimento de altas temperaturas. Liu et al. (2019) constataram impacto negativo do estresse térmico (38 °C) na germinação e estabelecimento inicial de plântulas de arroz, em resposta ao acúmulo de ácido abscísico (ABA) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas sementes, nos estádios iniciais de

desenvolvimento. Adicionalmente, experimentos de modelagem e dados históricos de safra reforçam que o aumento da temperatura pode impactar o desenvolvimento da cultura do milho significativamente, com redução do período de duração de estádios fenológicos, baixa viabilidade do pólen com prejuízos de até 80% na produtividade de grãos (LIZASO et al., 2018; HATFIELD, 2016).

Pesquisas já têm caracterizado amplamente a influência da temperatura sobre a atividade de bactérias diazotróficas, dado o impacto negativo exercido sobre a população bacteriana, produção de auxina e fixação biológica de nitrogênio, quando expostas a temperaturas acima de 30 °C (ROMERO-PERDOMO et al., 2015; MOLINA et al., 2018). Tais autores relataram que sob estresse térmico, bactérias do gênero *Azospirillum* sofreram decréscimo significativo na expressão de genes ligados a síntese de fitormônios, o que impacta diretamente nas respostas da inoculação em plantas, concluindo que a condição ótima para a bactéria está situada em torno de 30 °C, similar aos resultados obtidos neste estudo. Entretanto, os resultados deste experimento deixam claro que, a partir do momento em que o processo de inoculação torna-se eficiente, ambos os organismos podem aumentar sua capacidade de tolerância a fatores de estresse (por exemplo, 35 °C), o que não seria possível em condições isoladas. Isto está em acordo com Trolldenier (1982), que avaliou a atividade de bactérias diazotróficas em plantas de arroz submetidas a 35 °C, em que os resultados demonstraram respostas positivas da associação, mesmo sob estresse térmico.

## 6.5 CONCLUSÕES

A inoculação com *Azospirillum brasilense* altera o desenvolvimento inicial e atividade enzimática de plântulas de milho.

O processo de inoculação foi eficiente para todas as temperaturas testadas, porém com melhores resultados sob 25, 30 e 35 °C.

A resposta da inoculação foi benéfica em todas as temperaturas testadas, entretanto, quando a plântula e bactéria são expostas a uma condição de temperatura (30 °C inoculado), as respostas quanto ao incremento de biomassa vegetal e atividade de enzimas antioxidantes tende a ser maior.

## 6.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEN'KINA, S. A.; ROMANOV, N. I.; NIKITINA, V. E. Regulation by *Azospirillum* lectins of the activity of antioxidant enzymes in wheat seedling roots under short-term stresses. **Brazilian Journal of Botany**, v.41, n.3, p.579-587, 2018.

ALEN'KINA, S. A.; BOGATYREV, V. A.; MATORA, L. Y.; SOKOLOVA, M. K.; CHERNYSHOVA, M. P.; TRUTNEVA, K. A.; NIKITINA, V. E. Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial–plant root interactions. **Plant and Soil**, v.381, n.1-2, p.337-349, 2014.

ALEN'KINA, S. A.; NIKITINA, V. E. Study of *Azospirillum* lectins influence on Hydrogen peroxide production in wheat-roots. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v.5, n.4, p.4-10, 2009.

ALQUÉRES, S.; MENESES, C.; ROUWS, L.; ROTHBALLER, M.; BALDANI, I.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Molecular plant-microbe interactions**, v.26, n.8, p.937-945, 2013.

AWASTHI, R.; BHANDARI, K.; NAYYAR, H. Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. **Frontiers in Environmental Science**, v.3, 2015.

BARNAWAL, D.; SINGH, R.; SINGH, R. P. Role of plant growth promoting rhizobacteria in drought tolerance: regulating growth hormones and osmolytes. In: **PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture**. Woodhead Publishing, p.107-128, 2019.

BÉRARD, A.; SASSI, M. B.; KAISERMANN, A.; RENAULT, P. Soil microbial community responses to heat wave components: drought and high temperature. **Climate Research**, v.66, n.3, p.243-264, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, p.399, 2009.

BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; LAURETH, J. C. U. *Azospirillum brasilense* affects the antioxidant activity and leaf pigment content of *Urochloa ruziziensis* under water stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46, n.3, p.343-349, 2016.

BULEGON, L.G.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; INAGAKI, A. M.; DA COSTA, N. V. Mitigation of drought stress effects on soybean gas exchanges induced by *Azospirillum brasilense* and plant regulators. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.49, 2019.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5 ed. Jaboticabal: Funep, 2012.

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.

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

CLASSEN, A. T.; SUNDQVIST, M. K.; HENNING, J. A.; NEWMAN, G. S.; MOORE, J. A. M.; CREGGER, M. A.; MOORHEAD, L. C.; PATTERSON, C. M. Direct and indirect effects of climate change on soil microbial and soil microbial-plant interactions: What lies ahead? *Ecosphere*, v.6, n.8, 2015.

COMPANT, S.; HEIJDEN, M. G. A. V.; SESSITSCH, A. Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiology Ecology*, v.73, p.197-214, 2010.

ÇAKMAKÇI, R.; MOSBER, G.; MILTON, A. H.; ALATURK, F.; ALI, B. The Effect of Auxin and Auxin-Producing Bacteria on the Growth, Essential Oil Yield, and Composition in Medicinal and Aromatic Plants. *Current Microbiology*, v.77, p.564-577, 2020.

DARTORA, J.; MARINI, D.; GUIMARÃES, V. F.; PAULETTI, D. R.; SANDER, G. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de milho e trigo inoculadas com estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. *Global Science and Technology*, v.6, n.3, 2013.

DE LEÓN, J. L.; CASTELLANOS, T.; LING, J.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A.; RODER, M. S. Quantitative trait loci underlying the adhesion of *Azospirillum brasilense* cells to wheat roots. *Euphytica*, v.204, n.1, p.81-90, 2015.

DE LIMA, G. C.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; FILHO, M. C. M. T.; MOREIRA, A.; HEINRICH, R.; FILHO, C. V. S. Yield, yield components and nutrients uptake in zuri guinea grass inoculated with plant growth-promoting bacteria. *International Journal for Innovation Education and Research*, v.8, n.4, p.103-124, 2020.

DE MORAIS, T. P.; DE BRITO, C. H.; BRANDÃO, A. M.; REZENDE, W. S. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. *Revista Ciência Agronômica*, v.47, n.2, p.290-298, 2016.

DUCA, D.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.106, p. 85-125, 2014.

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

EL-MONSHATY, F. I. B.; PIKE, S. M.; NOVACKYA, J.; SEGHAL, O. P. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.39, n.43, p.109-119, 1993.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, v.38, p.109-112, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>

FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, v.154, p.134-142, 2018.

FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v.8, 2018.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v.48, n.59, p.315-318, 1977.

HATFIELD, J. L. Increased temperatures have dramatic effects on growth and grain yield of three maize hybrids. **Agricultural & Environmental Letters**, v.1, n.1, p.1-5, 2016.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v.57, p.1332-1334, 1979.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p.350-382, 1987.

LIU, J.; HASANUZZAMAN, M.; WEN, H.; ZHANG, J.; PENG, T.; SUN, H.; ZHAO, Q. High temperature and drought stress cause abscisic acid and reactive oxygen species accumulation and suppress seed germination growth in rice. **Protoplasma**, v.256, n.5, p.1217-1227, 2019.

LIZASO, J. I.; RUIZ-RAMOS, M.; RODRÍGUEZ, L.; GABALDON-LEAL, C.; OLIVEIRA, J.A.; LORITE, I. J.; SÁNCHEZ, D.; GARCÍA, E.; RODRÍGUEZ, A. Impact of high temperatures in maize: Phenology and yield components. **Field Crops Research**, v.216, p.129-140, 2018.

LORETO, F.; MANNOZZI, M.; MARIS, C.; NASCETTI, P.; FERRANTI, F.; PASQUALINI, S. Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in plants. **Plant Physiology**, v.126, p.1-8, 2001.

MAJDA, M.; ROBERT, S. The role of auxin in cell wall expansion. **International journal of Molecular Sciences**, v.19, n.4, p.951, 2018.

MANGANO, S.; DENITA-JUAREZ, S. P.; CHOI, H.; MARZOL, E.; HWANG, Y.; RANOCHA, P.; VELASQUEZ, S. M.; BORASSI, C.; BARBERINI, M .L. et al. Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.114, n.20, p.5289-5294, 2017.

MASUDA, S.; SASAKI, K.; KAZAMA, Y.; KISARA, C.; TAKEDA, S.; HANZAWA, E.; MINAMISAWA, K.; SATO, T. Mapping of quantitative trait loci related to primary rice root growth as a response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510. **Communicative & Integrative Biology**, v.11, n.3, 2018.

MEHNAZ, S. *Azospirillum*: a biofertilizer for every crop. In: **Plant microbes symbiosis: Applied facets**. Springer, New Delhi, p.297-314, 2015.

MÉNDEZ-GÓMEZ, M.; CASTRO-MERCADO, E.; ALEXANDRE, G.; GARCÍA-PINEDA, E. Oxidative and antioxidative responses in the wheat-*Azospirillum brasilense* interaction. **Protoplasma**, 2015.

MÉNDEZ-GÓMEZ, M.; CASTRO-MERCADO, E.; ALEXANDRE, G.; GARCÍA-PINEDA, E. Superoxide anion production in the interaction of wheat roots and rhizobacteria *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v.400, p.55-65, 2016.

MOLINA, R.; RIVERA, D.; MORA, V.; LÓPEZ, G.; ROSAS, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; CASSÁN, F. Regulation of IAA Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* under environmental stress conditions. **Current Microbiology**, v.75, p.1408–1418, 2018.

NAKAGAWA, A. C. S.; ARIO, N.; TOMITA, Y.; TANAKA, S.; MURAYAMA, N.; MIZUTA, C.; IWAYA-INOUE, M.; ISHIBASHI, Y. High temperature during soybean seed development differentially alters lipid and protein metabolism. **Plant Production Science**, 2020.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap.2, p.1-24.

NANDA, A. K.; ANDRIO, E.; MARINO, D.; PAULY, N.; DUNAND, C. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.52, n.2, p.195-204, 2010.

NOBLET, A.; LEYMARIE, J.; BAILLY, C. Chilling temperature remodels phospholipidome of *Zea mays* seeds during imbibition. **Scientific Reports**, v.7, 2017.

NOTTINGHAM, A. T.; BAATH, E.; REISCHKE, S.; SALINAS, N.; MEIR, P. Adaptation of soil microbial growth to temperature: Using a tropical elevation gradient to predict future changes. **Global change biology**, v.25, p.827-838, 2019.

PEREIRA, L. C.; PEREIRA, C. B.; CORREIA, L. V.; MATERA, T. C.; DOS SANTOS, R. F.; DE CARVALHO, C.; OSIPI, E. A. F.; BRACCINI, A. L. Corn Responsiveness to *Azospirillum*: Accessing the Effect of Root Exudates on the Bacterial Growth and Its Ability to Fix Nitrogen. **Plants**, v. 9, n. 7, p. 923, 2020.

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

ROJAS, A.; CASTELLANOS, T.; DÍAZ DE LEÓN, J. Genetic variation in wheat for *Azospirillum brasilense* to adhere to the seedling root. **Cereal Research Communications**, v.41, n.2, p.275-283, 2013.

ROMERO-PERDOMO, F. et al. Effect of temperature and pH on the biomass production of *Azospirillum brasilense* C16 isolated from Guinea grass. **Pastures and Forages**, v.8, n.3, p.231-233, 2015.

RILEY, G. J. P. Effects of high temperature on the germination of maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v.151, p.68-74, 1981.

- RILKEY, G. J. P. Effects of high temperature on protein synthesis during germination of maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v.151, p.75-80, 1981.
- SÁNCHEZ, B.; RASMUSSEN, A.; PORTER, J. R. Temperatures and the growth and development of maize and rice: a review. **Global Change Biology**, v.20, p.408-417, 2014.
- SANTOS, H. O.; VASCONCELLOS, R. C. C.; DE PAULI, B.; PIRES, R. M. O.; PEREIRA, E. M.; TIRELLI, G. V.; PINHO, E. V. R. V. Effect of Soil Temperature in the Emergence of Maize Seeds. **Journal of Agricultural Science**, v.11, n.1, 2019.
- SBRUSSI, C. A. G.; ZUCARELI, C. Germinação de sementes de milho com diferentes níveis de vigor em resposta à diferentes temperaturas. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, p.215-226, 2014.
- SCHMIDT, R.; KUNKOWSKA, A. B.; SCHIPPERS, J. H. M. Role of reactive oxygen species during cell expansion in leaves. **Plant Physiology**, v.172, n.4, p.2098-2106, 2016.
- SPAEPEN, S.; BOSSUYT, S.; ENGELEN, K.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J. Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. **New Phytologist**, v.201, n.3, p.850-861, 2014.
- TAIBI, K.; TAIBI, F.; ABDERRAHIM, L. A.; ENNAJAH, A.; BELKHODJA, M.; MULET, J. M. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. **South African Journal of Botany**, v.105, p.306-312, 2016.
- THOMAS, J.; KIM, H. R.; RAHMATALLAH, Y.; WIGGINS, G.; YANG, Q.; SINGH, R.; GLAZKO, G.; MUKHERJEE, A. RNA-seq reveals differentially expressed genes in rice (*Oryza sativa*) roots during interactions with plant-growth promoting bacteria, *Azospirillum brasilense*. **PloS One**, v.14, n.5, 2019.
- TIWARI, Y. K.; YADAV, S. K. High temperature stress tolerance in maize (*Zea mays* L.): physiological and molecular mechanisms. **Journal of Plant Biology**, v. 62, n. 2, p. 93-102, 2019.
- TROLLDENIER, G. Effect of soil temperature on nitrogen fixation on roots of rice and reed. **Plant and Soil**, v.68, n.2, p.217-222, 1982.
- VARGAS, L.; DE CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; HEMERLY, A. S. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and Soil**, v.356, p.127-137, 2012.
- ZERAIK, A. E.; DE SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v.31, n.4, p.731-734, 2008.

## 7 ARTIGO II – TEMPERATURA DO SOLO EM TRÊS HORÁRIOS DE SEMEADURA AFETA A INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DO MILHO

**Resumo:** O processo de interação planta-microrganismos promotores de crescimento pode ser afetado por vários fatores ligados ao genótipo utilizado, incompatibilidade com produtos químicos e condições ambientais restritivas. Dentre os fatores abióticos de maior influência sobre o crescimento e colonização bacteriana, destaca-se a temperatura do solo no momento da sementeira, uma vez que, temperaturas elevadas podem promover alterações genéticas e mortalidade de bactérias. Desta forma, o objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito da temperatura do solo em diferentes horários de sementeira sobre a inoculação com *Azospirillum brasilense* nas variáveis bioquímicas, nutricionais e produtividade de grãos na cultura do milho. Um experimento de campo foi realizado com dois híbridos de milho Syn 488 e Syn 505 semeados em duas épocas de cultivo (outubro de 2019 e janeiro de 2020), em delineamento de blocos casualizados e esquema fatorial 2 x 3 + 1 (com e sem inoculação x três horários de sementeira: 8, 15 e 18 horas) e uma testemunha adicional com aplicação de nitrogênio (N), com quatro repetições. Para avaliar a influência dos fatores sobre os híbridos de milho determinou-se: concentração de macro e micronutrientes no tecido, variáveis bioquímicas, produtividade (PG) e proteína bruta (PB) dos grãos. Melhores resultados da inoculação foram observados para sementeiras realizadas às 15 e 18 horas na primeira época, com alteração significativa para atividade de enzimas peroxidase e superóxido dismutase, além de maior acúmulo de N nos tecidos e PG. Além disso, na segunda época de cultivo, a inoculação com *Azospirillum brasilense* promoveu um incremento significativo para o teor de clorofilas, carotenoides, concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, N e PB quando a sementeira foi realizada às 18 horas. Conclui-se que a temperatura no momento da sementeira pode modular as respostas da interação planta-bactéria, com incremento significativo para os parâmetros avaliados quando *Azospirillum brasilense* foi exposta a condições de temperatura similar a condições de crescimento em laboratório (30 °C).

**Palavras chave:** Temperatura, inoculante, interação planta-bactéria



**SOIL TEMPERATURE IN THREE SOWING TIMES AFFECTS INOCULATION  
WITH *Azospirillum brasilense* IN MAIZE CULTURE**

**Abstract:** The process of plant-microorganism interaction can be affected by several factors linked to the genotype used, incompatibility with chemicals and restrictive environmental conditions. Among the abiotic factors with the greatest influence on bacterial growth and colonization, soil temperature at the time of sowing stands out, since high temperatures can promote genetic changes and bacterial mortality. Thus, the objective of the research was to evaluate the effect of soil temperature at different sowing times on inoculation with *Azospirillum brasilense* on biochemical, nutritional and grain yield variables in maize. A field experiment was carried out with two corn hybrids Syn 488 and Syn 505 sown in two growing seasons (October 2019 and January 2020), in a randomized block design and factorial scheme  $2 \times 3 + 1$  (with and without inoculation x three sowing times: 8, 15 and 18 hours) and an additional control with nitrogen (N) application, with four repetitions. To determine the efficiency of the inoculation process in corn plants, the variables were determined: macro and micronutrient concentration in the tissue, biochemical variables, productivity (PG) and crude protein (CP) of the grains. Better inoculation results were observed for sowing carried out at 3 pm and 6 pm in the first season, with significant changes in the activity of peroxidase and superoxide dismutase enzymes, in addition to greater accumulation of N in tissues and PG. In addition, in the second growing season, inoculation with *A. brasilense* promoted a significant increase in the content of chlorophylls, carotenoids, concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, N and P when sowing was carried out at 6 pm. It was concluded that the temperature at the moment of sowing can modulate the responses of the plant-bacterial interaction, with a significant increase for the parameters evaluated when *A. brasilense* was exposed to temperature conditions similar to growth conditions in the laboratory (30 ° C).

**Keywords:** Temperature, inoculant, plant-bacterial interaction

## 7.1 INTRODUÇÃO

O uso de rizobactérias promotoras de crescimento como inoculante de gramíneas tem se intensificado nos últimos anos, aliado aos benefícios que a tecnologia pode oferecer as culturas como aumento do sistema radicular, produção de fitormônios, principalmente auxinas, redução de estresse oxidativo, fixação biológica de nitrogênio, maior absorção de nutrientes e produtividade de grãos (DE LIMA et al., 2020; BULEGON et al., 2016; FUKAMI et al., 2018; MARQUES et al., 2020). Dentre tais microrganismos benéficos, bactérias do gênero *Azospirillum sp.* têm ganhado destaque pelo volume de pesquisas realizadas até o momento, com capacidade de se associar a uma grande diversidade de plantas, podendo chegar a um total de 113 espécies, com colonização tanto na rizosfera como endofiticamente, sem apresentar efeito patogênico ao vegetal (PEREG et al., 2016; LIN et al., 2015). Contudo, a maioria dos estudos com este gênero foca na espécie *Azospirillum brasilense*, a qual destaca-se como importante bactéria fixadora de nitrogênio em gramíneas, especialmente na cultura do milho (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; FUKAMI et al., 2018).

Dado a importância do cereal na composição de rações, produção de fármacos e alimentação humana (NUSS; TANUMIHARDJO, 2010; DA ROCHA; MARIN, 2011), a inoculação com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho torna-se uma importante ferramenta de manejo, em resposta a reduções de adubações nitrogenadas devido a maior eficiência de uso do nitrogênio (SKONIESKI et al., 2019) e menor impacto ambiental via contaminação de cursos hídricos e formação de gases de efeito estufa (CHAI et al., 2019), aumento da tolerância do vegetal a fatores promotores de estresse via controle osmótico e enzimas do sistema antioxidante (FUKAMI et al., 2018), além de maior produtividade e qualidade nutricional dos grãos (HUNGRIA et al., 2010). Entretanto, fatores ambientais no momento da semeadura como temperatura e umidade relativa do solo podem afetar tanto a planta como os microrganismos benéficos (DEAK et al., 2019; RODRÍGUEZ-SALAZAR et al., 2009), o que poderia gerar alterações com relação a eficiência do processo de inoculação, sem obtenção dos resultados esperados.

Pesquisas recentes têm demonstrado que além da incompatibilidade genética que pode existir entre híbridos de milho, em resposta a facilidade de adesão radicular e tipo de exsudato liberado (PEREIRA et al., 2020; DE LEÓN et al., 2015), a manutenção de células vivas e metabolicamente ativas no campo, independentemente do método de inoculação utilizado pode determinar o sucesso da interação planta-bactéria (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Neste sentido, Kaushik et al. (2002) destacaram que condições de

clima e solo frio podem limitar a atividade metabólica e a colonização rizosférica por estirpes de *A. brasilense*, com ausência de resultados para a inoculação de culturas. Além disso, estudos de laboratório demonstraram que bactérias do gênero *Azospirillum* tendem a apresentar maiores taxas de crescimento e produção de fitormônios quando expostas a condições térmicas próximas a 30 °C, com efeito letal sob temperaturas acima de 35 °C (ROMERO-PERDOMO et al., 2015; MOLINA et al., 2018; MORENO-GALVÁN et al., 2012). Com isso, verifica-se a necessidade de mais informações sobre o efeito das condições edáficas do solo (temperatura e umidade) no momento da semeadura, com intuito de potencializar os benefícios da inoculação, além de desenvolver manejos cada vez mais sustentáveis nos sistemas de produção. Desta forma, o objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito da temperatura do solo em diferentes horários de semeadura sobre a inoculação com *Azospirillum brasilense* nas variáveis bioquímicas, nutricionais e produtividade de grãos na cultura do milho.

## 7.2 MATERIAL E MÉTODOS

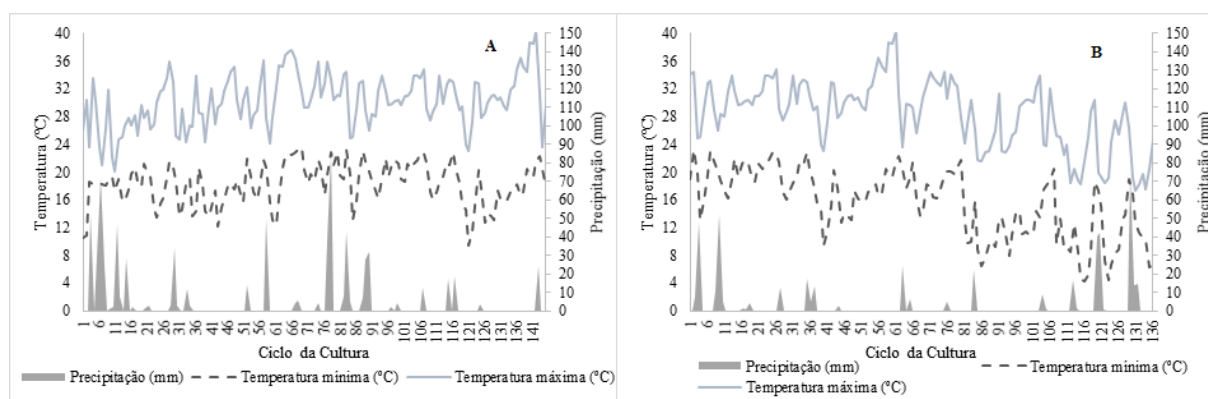
### 7.2.1 Local do experimento e material vegetal

A pesquisa foi realizada na área experimental do Departamento de Fitotecnia na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS (Brasil), nas coordenadas 29° 43' 2,81" S, longitude 53° 43'58,28" W e altitude de 116 metros. O clima local, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cfa, com chuvas em todas as estações e verões quentes (PEEL; FINLAYSON; MCMAHON, 2007). O solo da área é classificado como Argissolo Vermelho distrófico (EMBRAPA, 2013), com características químicas determinadas a partir da análise de solo (Tabela 1). Os valores diários de precipitação, temperatura máxima e mínima durante o ciclo da cultura estão apresentados abaixo (Figura 1).

Tabela 1. Propriedades químicas do solo da área experimental.

Área	pH	MO	Argila	P	K	Ca	Mg
Norte	Água 1:1	(%)	(%)	(mg dm <sup>-3</sup> )	-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----		
0-20cm	5,2	2,2	27	7,5	0,102	5,0	2,1

Figura 1 - Dados de temperatura do ar e precipitação durante o ciclo da cultura, no município de Santa Maria/RS, na primeira (A) e segunda época (B), na safra 2019/2020.



Fonte: INMET

A dessecação da área para a semeadura do experimento foi realizada a partir da aplicação da mistura de tanque do glyphosate+2,4-d amina+saflufenacil, aplicados na dose de 1200, 1209, e 50 g i.a. ha<sup>-1</sup>, respectivamente. O controle de plantas daninhas em pós emergência foi realizado a partir da aplicação de atrazina, na dose de 2500 g i.a ha<sup>-1</sup>.

Foram utilizadas sementes de duas cultivares de milho, Syn 488 e Syn 505, obtidas por doação da obtentora Syngenta. As sementes já possuíam tratamento químico com dois inseticidas, ciantranilprole (40 mL 60.000 sementes<sup>-1</sup>) e tiametoxan (70 mL 60.000 sementes<sup>-1</sup>), bem como um fungicida composto por três princípios ativos fludioxonil, matalaxil-m e thiabendazol (150 mL 100 kg sementes<sup>-1</sup>). As sementes foram acondicionadas em local arejado até a sua utilização.

### 7.2.2 Inoculação com Bactérias *Azospirillum brasilense*

A inoculação das sementes foi realizada com bactérias *Azospirillum brasilense* uma hora antes da semeadura, em sacos de plástico com capacidade para cinco litros, com inoculante comercial Azototal<sup>®</sup>, contendo as estirpes Abv5 e Abv6, com garantia mínima de 2x10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, na dose de 1,66 mL para cada 1.000 sementes, conforme as recomendações do produto. Para os tratamentos isentos de inoculação, foi adicionada água destilada para manter o mesmo nível de umidade das sementes. Posteriormente, os sacos foram abertos para permitir a secagem do material em temperatura ambiente.

### 7.2.3 Semeadura e delineamento experimental

A semeadura de ambas as cultivares de milho foi realizada no dia 25/10/2019 (primeira época – 1<sup>a</sup>EP) e 14/01/2020 (segunda época - 2<sup>a</sup>EP), com densidade de 4 sementes metro linear<sup>-1</sup>. A unidade experimental foi composta por 7,75 m de comprimento e 2,25 m de largura, com cinco linhas de 0,45 m de espaçamento, totalizando 17,4 m<sup>2</sup> de área total e 6,75 m<sup>2</sup> de área útil. A adubação de base foi composta pela aplicação de 243 kg ha<sup>-1</sup> de Superfosfato triplo (00-46-00) e 122 kg ha<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (00-00-58). Adicionalmente, aplicou-se em cobertura logo após a emergência das plântulas 150 kg ha<sup>-1</sup> de cloreto de potássio e 300 kg ha<sup>-1</sup> de calcário Filler (Prnt 100%), de modo que as exigências da cultura fossem atendidas.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 3 + 1 (com e sem inoculação x três horários de semeadura: 8, 15 e 18 horas + testemunha com aplicação de nitrogênio em cobertura), com quatro repetições. A adubação nitrogenada foi realizada exclusivamente nas parcelas do tratamento testemunha, através da aplicação fracionada de 300 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio mineral (N) na forma de ureia granulada, nos estádios fenológicos v4, v7 e v9. O manejo de pragas e doenças foi realizado de acordo com o monitoramento da área, com aplicação de lambda-cialotrina+clorantraniliprole e beta-ciflutrina+imidacloprido, no controle de *Spodoptera frugiperda* e *Dichelops* spp., na dosagem de 150 e 1000 mL ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

### 7.2.4 Variáveis analisadas

#### 7.2.4.1 Quantificação de *Azospirillum brasilense* (Método do número mais provável)

Logo após a instalação do experimento a campo, um *bulk* de plântulas de cada tratamento foi coletado para quantificação bacteriana, vinte e um dias (21) após a semeadura. As amostras foram acondicionadas em caixas de isopor e levadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Maria, as quais foram colocadas em ambiente refrigerado a 5 °C. Para a realização da análise, 10 gramas de material fresco da raiz foram triturados em 90 mL de solução salina a 0,85%. Posteriormente, diluições sequenciais foram realizadas (10<sup>-2</sup>a 10<sup>-5</sup>), e 1 mL de cada diluição foi inoculada em triplicata em meio de cultura NFb. Após 21 dias de incubação a 28 °C, as amostras foram analisadas quanto à

presença de turbidez, sendo determinado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) pelo método do número mais provável (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

#### 7.2.4.2 *Determinação de nutrientes nos tecidos*

Quando cerca de 50% das plantas de milho estavam no estágio fenológico de florescimento, 10 folhas da área útil de cada parcela foram coletadas e secas em estufa a 60 °C até obtenção de peso constante. As amostras secas foram moídas em moinho do tipo Wiley e armazenadas em sacos plásticos hermeticamente fechados até a realização das análises.

*Determinação de nitrogênio (N) e fósforo (P):* 0,200 gramas do material seco foram colocadas em tubos de digestão. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,7 gramas de mistura catalítica (100 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O e 1 g de selênio em pó). Em seguida, os tubos foram colocados em bloco digestor com temperatura máxima de 330 °C para oxidação total da matéria orgânica, sendo o produto desta digestão diluído em 50 mL de água destilada, e armazenado em frascos âmbar para posterior determinação de N total da amostra em destilador do tipo Kjeldahl e titulação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (TEDESCO et al., 1995). O conteúdo de P na amostra digerida foi determinado por calorimetria do metavanadato em espectrofotômetro (TEDESCO et al., 1995).

*Determinação de potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe):* 0,500 gramas do material seco e moído foram colocadas em tubos de digestão. Adicionou-se 6 mL de uma mistura com HNO<sub>3</sub> e HClO<sub>4</sub>, na proporção 2:1 e, posteriormente, os tubos foram levados para bloco digestor a 160 °C por 40 minutos. Após este período, a temperatura foi elevada para 210 °C por cerca de 20 minutos, até obtenção de extrato incolor. O produto da digestão foi resfriado e diluído em 50 mL de água destilada. A solução foi analisada em espectrofotômetro de absorção atômica com lâmpada de cátodo oco correspondente para cada nutriente específico (MALAVOLTA et al., 1997).

#### 7.2.4.3 *Variáveis bioquímicas*

No período de florescimento da cultura, cinco folhas da área útil de cada parcela foram coletadas para determinação de pigmentos fotossintéticos e enzimas relacionadas ao sistema antioxidante do vegetal. Adicionalmente, analisou-se o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas plantas de milho em condição de campo, como resultado do metabolismo redox do vegetal.

*Concentração de pigmentos:* clorofilas totais (*a* e *b*) e carotenoides foram avaliados a partir da metodologia descrita por Hiscox e Israelstam (1979) e a equação de Lichtenthaler (1987). 50 mg de peso fresco do tecido vegetal de cada amostra (parte aérea) foram incubadas em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 45 minutos a 65 °C para remoção total dos pigmentos. Após este período, 4 mL do líquido sobrenadante foram pipetados em tubos de vidro (2 mL para cada replicata) e os valores de absorvância determinados em um espectrofotômetro nos comprimentos de onda 663, 645 e 470 nm, para clorofila *a*, *b*, e carotenoides, respectivamente. O conteúdo de clorofilas totais foi obtido pela soma dos valores de clorofila *a* e *b*.

*Enzima guaiacol peroxidase (POD):* 0,5 g de tecido fresco foram homogeneizados em 3 mL de tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,8), contendo 1 mM de EDTA e 2% (M/V) de polyvinylpyrrolidona (PVP). A amostra homogeneizada foi centrifugada a 13.000 g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante armazenado em eppendorf para determinação da atividade enzimática. A atividade da POD foi determinada em espectrofotômetro digital UV/VIS (Fentoscan) a 470 nm, conforme Zeraik et al. (2008).

*Enzima Superóxido dismutase (SOD):* 0,5 g de tecido vegetal foram homogeneizados seguindo o mesmo protocolo descrito para a POD. Para a avaliação da atividade enzimática da SOD, um Mix com tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 13 mM de metionina, 0,1 µM EDTA, 75 µM NBT e 2 µM de riboflavina foi utilizado. 300 µL de amostra e 2,5 mL de mix foram incubados sobre lâmpada fluorescente (15 watts) por 5 minutos (GIANNOPOLITIS; RIES 1977). Em seguida, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brazil) a 560 nm. Os resultados foram expressos em U mg<sup>-1</sup>proteína.

*Conteúdo de Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):* 0,3 g de massa fresca de plantas foram homogeneizados em 3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%, de acordo com a metodologia descrita por Loreto e Velikova (2001). O líquido homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Para determinação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tecido vegetal, 0,5 mL do sobrenadante foram adicionados em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) com 1 mL de Iodeto de potássio (KI), realizando-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brazil) a 390 nm. Os valores foram expressos em µmol g<sup>-1</sup> de massa fresca.

#### 7.2.4.4 Variáveis de campo

Em cada horário de semeadura foram efetuadas medições da temperatura do solo (T) em quatro pontos da parcela a cinco centímetros de profundidade, com auxílio de termômetro digital. Concomitantemente, amostras deformadas de solo foram coletadas para determinação da umidade gravimétrica do solo (UG%), obtida por diferença da massa de solo úmido e seco pela fórmula:  $(UG = \text{amostra de solo úmido} - \text{amostra de solo seco}) / \text{amostra de solo seco}$ .

Quando as plantas atingiram a maturidade fisiológica (30% de umidade), determinou-se a produtividade de grãos ( $\text{Kg ha}^{-1}$ ) a partir da colheita de todas as espigas da área útil (3 linhas centrais x 5 metros de comprimento). Posteriormente, os grãos foram pesados e a umidade corrigida para 13%.

### 7.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA pelo teste F ( $p < 0,05$ ). Além disso, aplicou-se um contraste entre (fatorial x testemunha) para avaliação de diferença significativa entre os tratamentos testados e a testemunha padrão, através da aplicação do teste F da ANOVA. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), sendo considerado que houve diferença significativa entre os tratamentos quando o contraste (fatorial x testemunha) foi significativo.

Para observar a correlação das variáveis analisadas com a produtividade de grãos, uma matriz de correlação foi estabelecida, sendo retirados da análise parâmetros que apresentaram multicolinearidade pelo número de condição (MONTGOMERY; PECK, 1981). Desta forma, determinou-se a produtividade de grãos como variável (dependente) e as demais como secundárias, as quais foram desdobradas em efeitos diretos e indiretos pela análise de trilha (CRUZ et al., 2004).

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software GENES (CRUZ, 2013).

## 7.3 RESULTADOS

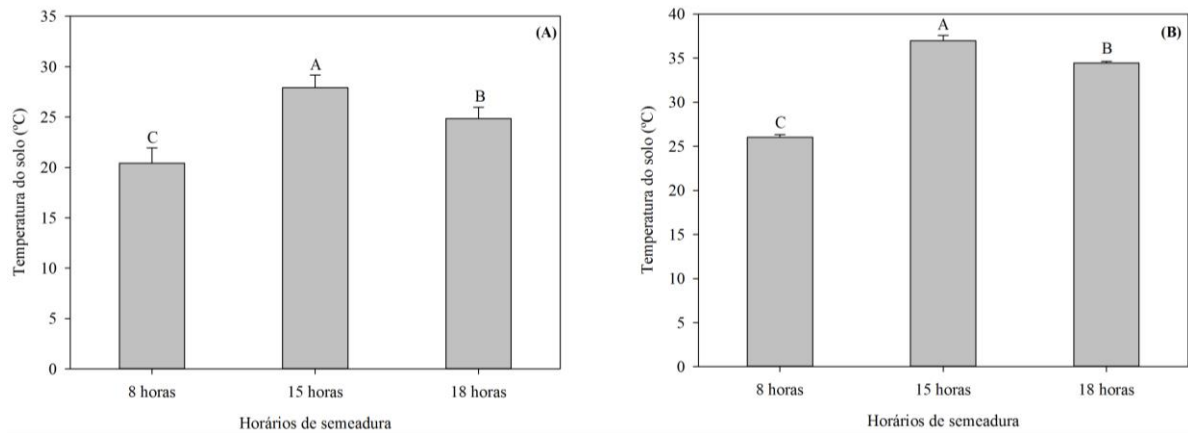
### 7.3.1 Temperatura do solo na semeadura x quantificação bacteriana

Houve efeito significativo para os diferentes horários de semeadura (Figura 2), com comportamento similar para ambas as épocas de semeadura. Destaca-se a semeadura realizada às 15 horas, a qual demonstrou as maiores médias (28 e 37 °C), respectivamente. Adicionalmente, evidenciou-se que o número de UFC de *Azospirillum brasilense* não foi



drasticamente afetado pelos diferentes horários de semeadura (Tabela 2), mantendo-se níveis populacionais de  $10^5$  e  $10^6$  UFC grama<sup>-1</sup> de raiz. Além disso, tais resultados indicaram a presença de uma alta população de bactérias nativas do solo, com valores muito próximos da condição inoculada.

Figura 2 – Temperatura do solo no momento da semeadura.



\*Temperatura do solo na primeira época (A) e segunda época (B) de semeadura da cultura do milho no município de Santa Maria/RS, em três horários distintos.

A partir dos resultados de quantificação bacteriana ficou claro que a segunda época (2<sup>a</sup>EP) de semeadura proporcionou os valores mais altos para o número de UFC grama de raiz<sup>-1</sup>, com incremento médio de 20% para a cultivar Syn 488 e 35% para Syn 505. Além disso, percebe-se que embora as sementes inoculadas apresentassem uma concentração de bactérias elevada ( $10^7$ ), a manutenção de células viáveis, bem como a multiplicação e colonização das mesmas em torno das raízes foi afetada pela condição ambiental de cultivo, com melhores respostas sob temperaturas mais elevadas, 37 °C, conforme observado na 2<sup>a</sup>EP (Tabela 2).

Tabela 2 - Contagem do número de bactérias (UFC grama de raiz<sup>-1</sup>) de *Azospirillum brasilense* para cada horário de semeadura na primeira e segunda época de semeadura, Santa Maria/ RS, 2020.

-----Semeadura 25/10/2019-----				
Syn 488			Syn 505	
Horários de semeadura	Não inoculado	Inoculado	Não Inoculado	Inoculado
8 horas	1,40 x 10 <sup>6*</sup>	4,50 x 10 <sup>5</sup>	1,50 x 10 <sup>5</sup>	2,0 x 10 <sup>5</sup>
15 horas	4,50 x 10 <sup>5</sup>	1,10 x 10 <sup>6</sup>	4,50 x 10 <sup>5</sup>	4,50 x 10 <sup>5</sup>
18 horas	1,10 x 10 <sup>6</sup>	3,0 x 10 <sup>5</sup>	2,0 x 10 <sup>5</sup>	4,50 x 10 <sup>5</sup>
Testemunha (N)		4,50 x 10 <sup>5</sup>		7,0 x 10 <sup>5</sup>
-----Semeadura 14/01/2020-----				
Syn 488			Syn 505	
Horários de semeadura	Não inoculado	Inoculado	Não Inoculado	Inoculado
8 horas	2,50 x 10 <sup>7</sup>	1,10 x 10 <sup>8</sup>	1,15 x 10 <sup>7</sup>	1,15 x 10 <sup>7</sup>
15 horas	1,40 x 10 <sup>9</sup>	2,00 x 10 <sup>7</sup>	1,40 x 10 <sup>9</sup>	1,10 x 10 <sup>8</sup>
18 horas	1,10 x 10 <sup>8</sup>	2,00 x 10 <sup>7</sup>	1,50 x 10 <sup>7</sup>	1,10 x 10 <sup>8</sup>
Testemunha (N)		4,82 x 10 <sup>8</sup>		4,82 x 10 <sup>8</sup>
<b>Inoculante</b>		1,65 x 10 <sup>10</sup>		1,65 x 10 <sup>10</sup>
<b>Semente Ino.</b>		2,56 x 10 <sup>7</sup>		2,13 x 10 <sup>7</sup>
<b>Solo</b>		4,50 x 10 <sup>4</sup>		4,50 x 10 <sup>4</sup>

\*NMP- Método do número mais provável.

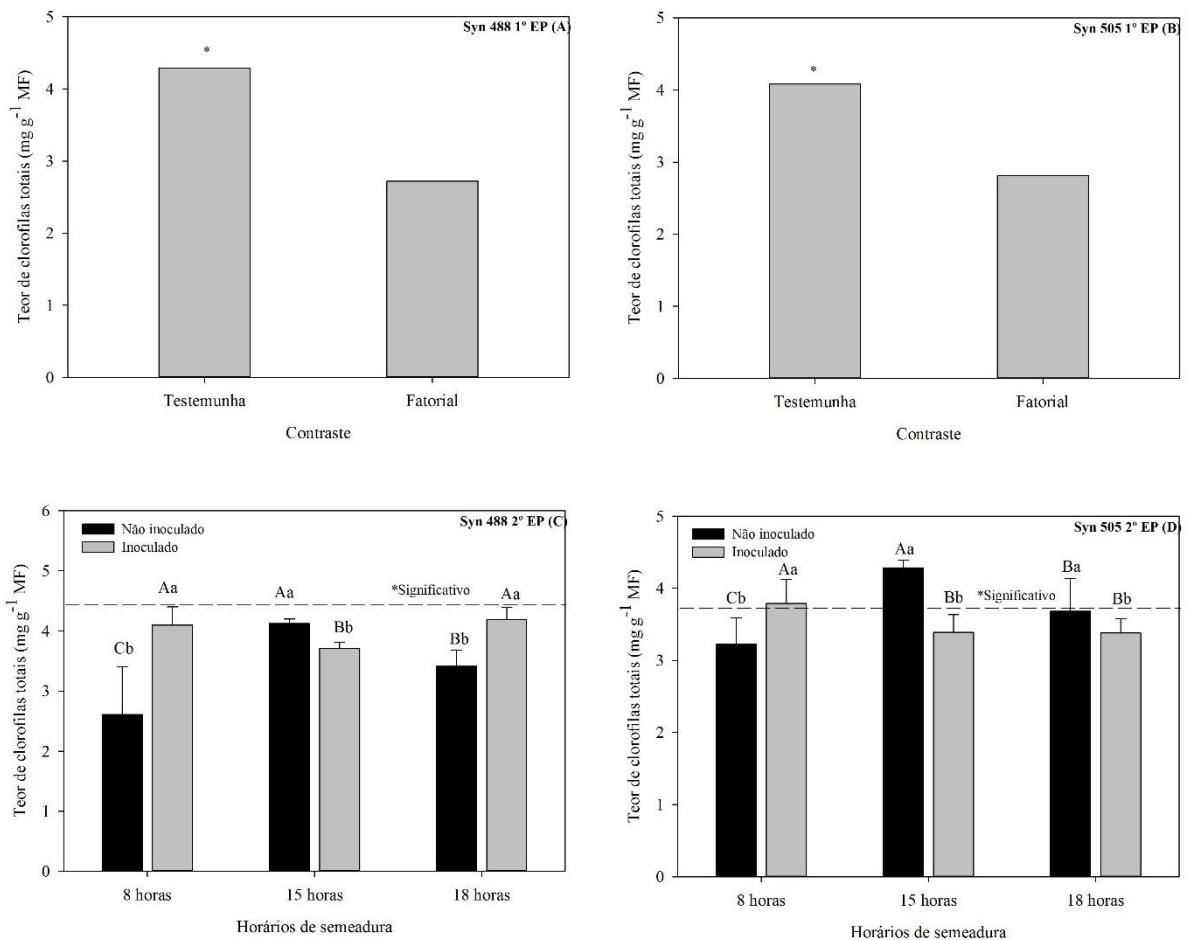
\*UFC- Unidade formadora de colônia.

### 7.3.2 Dados Bioquímicos

Efeitos da interação (horários de semeadura x inoculação) foram evidenciados para todas as variáveis bioquímicas. Entretanto, de acordo com a cultivar utilizada e época de semeadura, as respostas para cada variável apresentaram comportamento distinto. Neste sentido, os pigmentos fotossintéticos apresentaram mesma tendência para ambas as cultivares na primeira época de semeadura, com efeito significativo apenas para o contraste entre a testemunha nitrogenada e os tratamentos fatoriais (Figuras 3 e 4). Destaca-se o elevado teor de clorofilas totais e carotenoides nas parcelas que receberam nitrogênio, com 35 % de incremento sobre o teor de clorofilas totais e 14% para o teor de carotenoides (Figuras 3A, 3B, 4A, 4B). Contudo, na segunda época de semeadura, ambas as cultivares de milho foram afetadas pela interação (horários de semeadura x inoculação), com aumento significativo do conteúdo de clorofilas e carotenoides em parcelas inoculadas semeadas às 08 e 18 horas, em média 26% e 6% superior a condição não inoculada, respectivamente (Figuras 3C, 3D, 4C,

4D), exceto Syn 505 2ª EP que apresentou os melhores resultados para clorofilas totais apenas quando foi semeada às 08 horas, sem efeito significativo no conteúdo de carotenoides na 2ª EP.

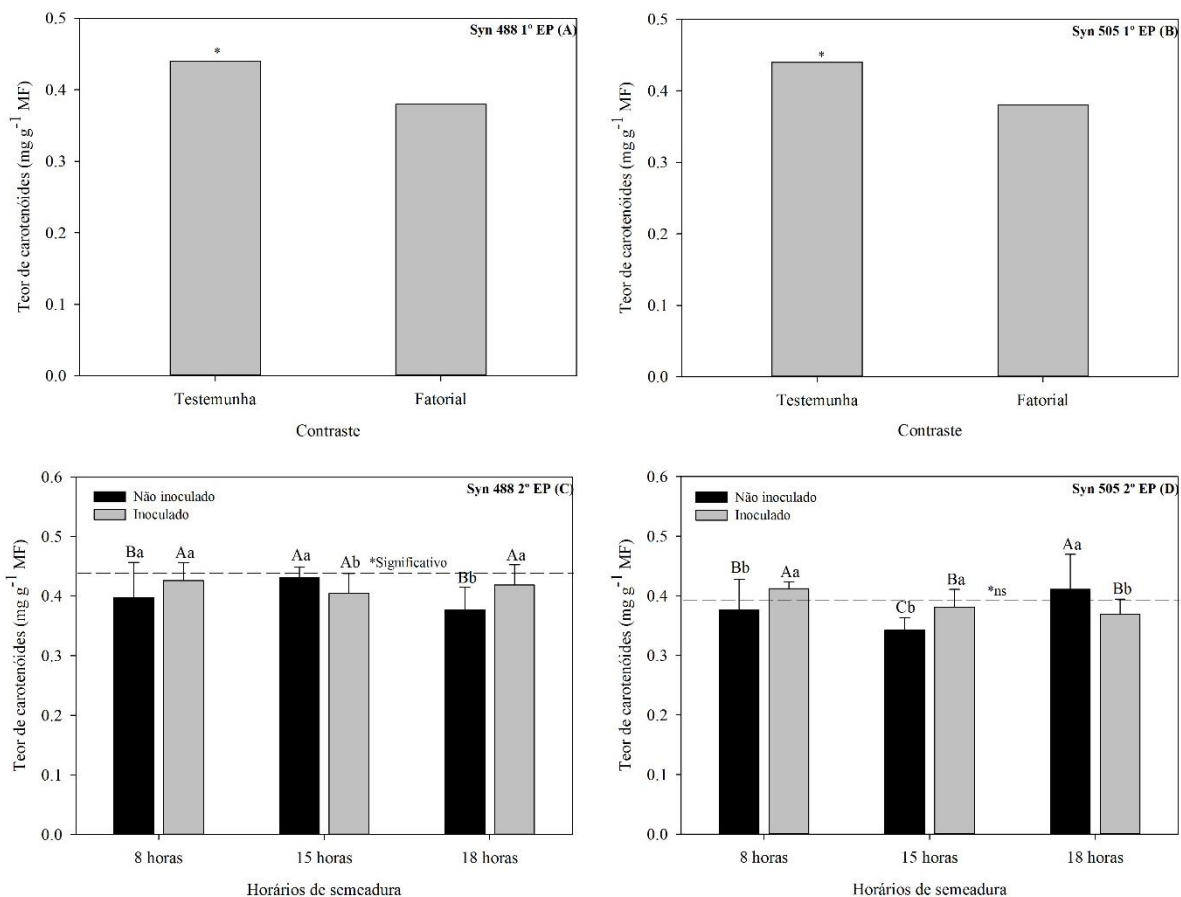
Figura 3 - Teor de clorofilas totais obtidas a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Em contrapartida, independente do genótipo avaliado houve uma redução significativa para o conteúdo de pigmentos em parcelas inoculadas na 2ªEP, principalmente às 15 horas (Figuras 3C, 3D e 4C), em média 15% e 7% menor para clorofilas totais e carotenoides, respectivamente.

Figura 4 - Teor de carotenoides obtidos a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



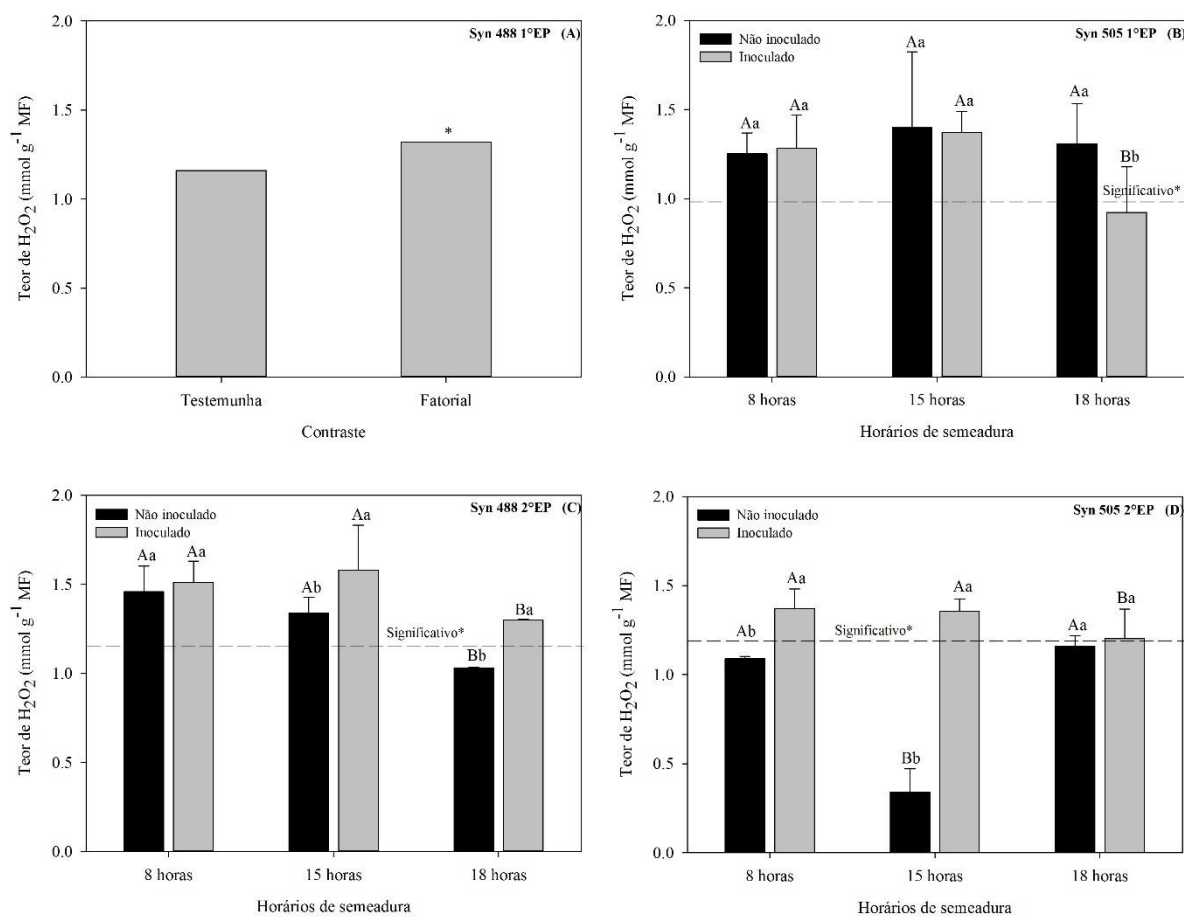
(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Percebe-se que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos mantém certa correlação com o *status* nutricional do vegetal, onde plantas testemunhas, as quais receberam fertilizantes nitrogenados, além de apresentarem maior concentração de nitrogênio nos tecidos (Figura 8), mantiveram menores quantidades da ERO na planta, com concentração média nos tecidos de 1,14 nmol grama<sup>-1</sup> MF, independente do genótipo testado (Figura 5). Isto corrobora com os resultados encontrados para o conteúdo de carotenoides e guaiacol peroxidase em plantas nitrogenadas, independente da época de semeadura (Figuras 4 e 6).

Ao contrário do que se esperava, a inoculação com *Azospirillum brasilense* promoveu a produção de altos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, principalmente para semeaduras tardias (Figuras 5C, 5D),

exceto para a cultivar Syn505 semeada às 18 horas na primeira época, a qual apresentou redução de 30% para a ERO na condição inoculada (Figura 5B). Tais dados estão em acordo com os resultados encontrados para a atividade das enzimas POD e SOD (Figuras 6 e 7), as quais responderam significativamente a maior concentração de  $H_2O_2$  devido à presença da bactéria.

Figura 5 - Teor de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) obtido a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



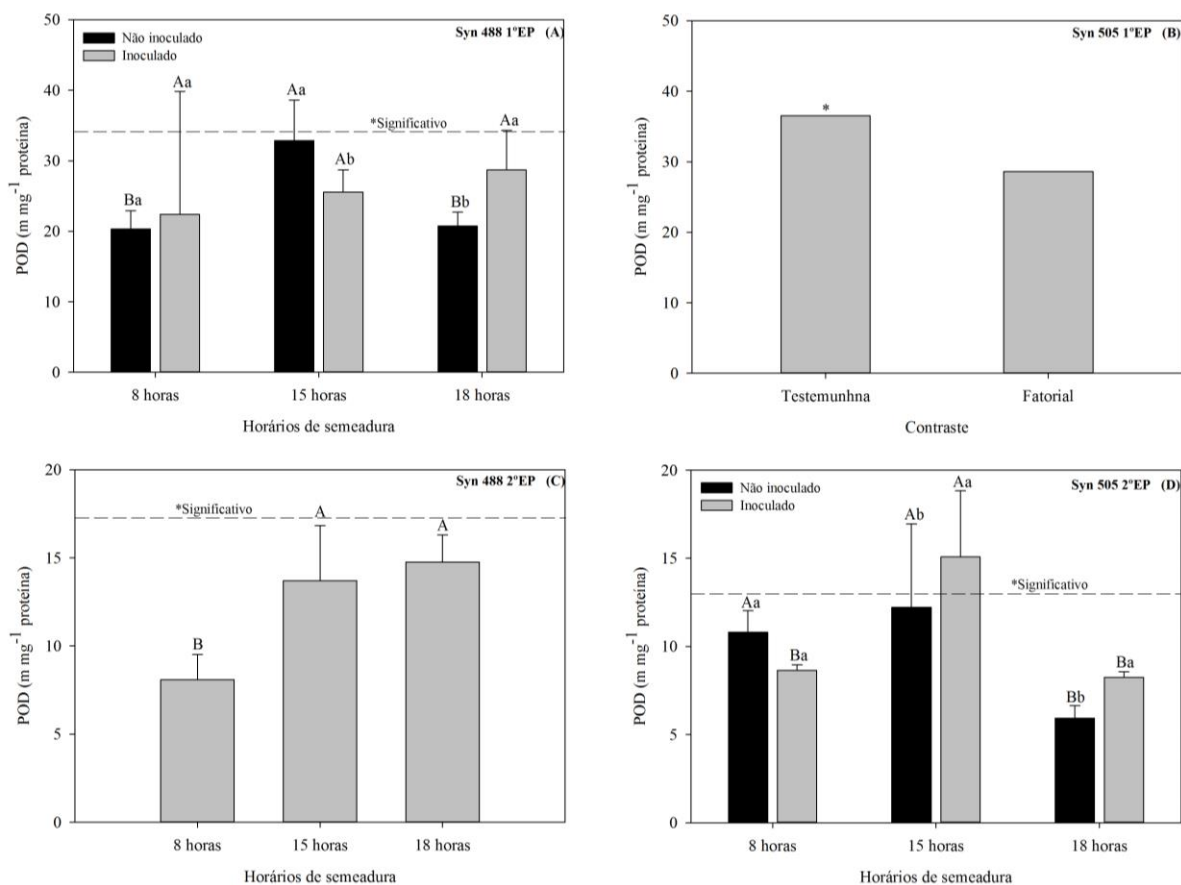
(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Quando avaliou-se a atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD), cada cultivar apresentou um comportamento distinto dentro das épocas de semeaduras testadas (Figura 6), possivelmente em resposta as condições edafoclimáticas enfrentadas dentro de cada estação

de cultivo (Figura 1). Porém, evidenciou-se que a atividade enzimática foi 62% maior na semeadura precoce, com contribuição significativa da inoculação com *Azospirillum brasilense* às 8 e 18 horas (Figura 6A). Adicionalmente, os horários das 15 e 18 horas apresentaram os valores mais elevados para POD na segunda época (Figuras 6C, 6D), o que pode estar relacionado a maior produção de ERO nestas condições.

Por outro lado, de acordo com os resultados obtidos a partir das parcelas testemunhas, é notável o incremento da atividade enzimática em plantas com *status* nutricional superior, o qual expressou em média 28% maior atividade da POD em plantas nitrogenadas (Figuras 6A, 6B), além de apresentar maior concentração de carotenoides nos tecidos, os quais também estão envolvidos no sistema redox do vegetal (Figuras 4A, 4B).

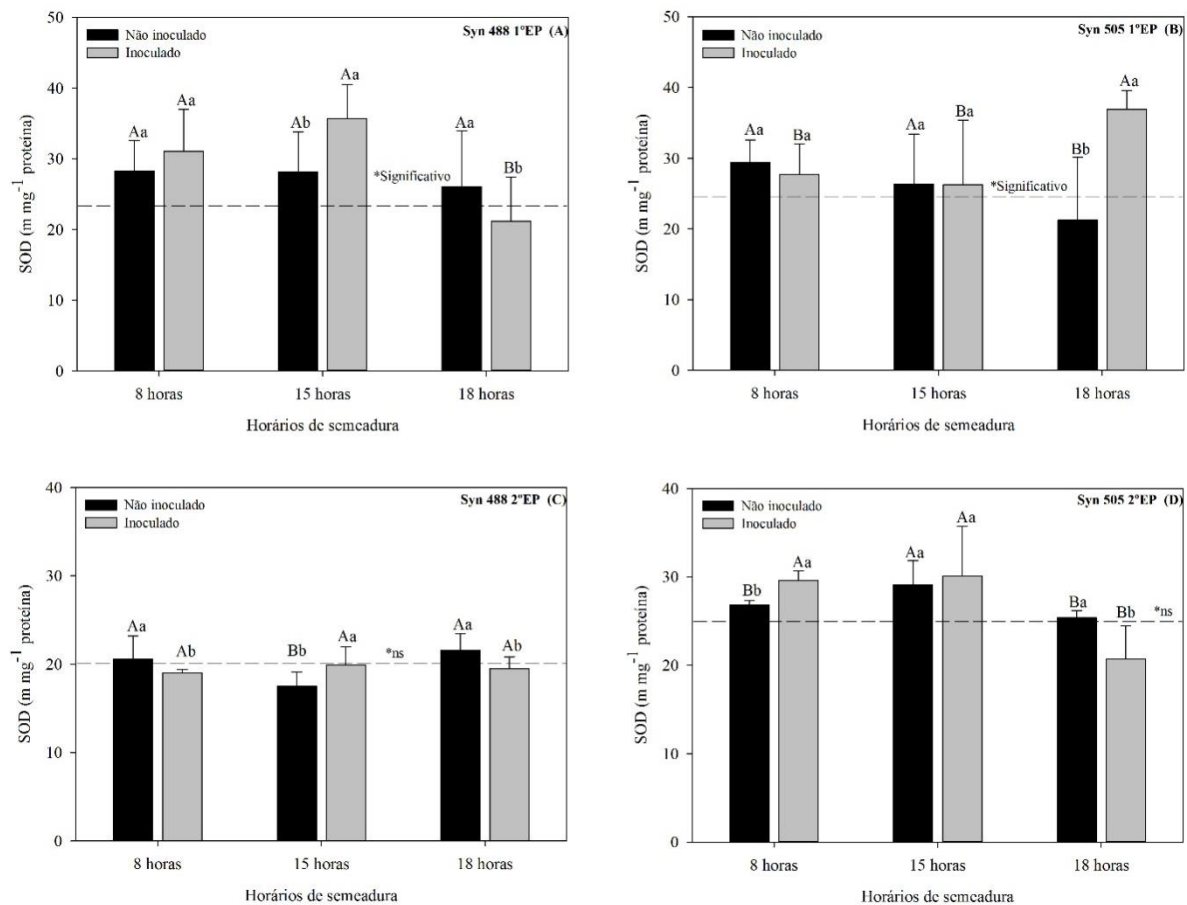
Figura 6 - Atividade de guaiacol peroxidase (POD) obtida a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Ao contrário do que foi observado para a POD e carotenoides, a atividade de superóxido dismutase (SOD) foi menor em plantas fertilizadas com nitrogênio, em média 23  $\text{m grama}^{-1}$  proteína, sem variações expressivas em ambas as épocas de cultivo. Contudo, similarmente ao observado para a POD, constatou-se que na primeira época de semeadura a atividade da SOD foi significativamente maior, sendo 20% superior à segunda época de cultivo. Conseqüentemente, maiores respostas da inoculação com *Azospirillum brasilense* foram verificadas para Syn 488 1°EP às 15 horas, com incremento de 24% na atividade enzimática (Figura 7A), seguido por um decréscimo em parcelas semeadas às 18 horas, o que pode estar relacionado ao aumento da POD neste mesmo horário (Figura 6A). Entretanto, para a cultivar Syn 505, houve efeito significativo da inoculação às 18 horas, com atividade da enzima 42% maior neste horário (Figura 7B).

Figura 7 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) obtida a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Na segunda época, ambas as cultivares não apresentaram efeito significativo para o contraste (testemunha x fatorial) (Figuras 7C, 7D), o que torna os resultados estatisticamente iguais, embora seja notável a tendência de aumento da atividade às 15 horas e redução às 18 horas, em ambos os materiais.

### 7.3.3 Macronutrientes

Todas as possíveis interações para cada cultivar e época estão apresentadas abaixo, de acordo com a variável analisada, sendo considerado o nível de significância pelo teste F da ANOVA para o contraste (testemunha x fatorial) e os desdobramentos da interação (horários de semeadura x com ou sem *Azospirillum brasilense*).

A partir dos dados obtidos com a diagnose foliar, de modo geral, plantas que receberam adubação nitrogenada apresentaram maior concentração de macronutrientes, exceto a cultivar Syn 505 para a porcentagem de potássio nos tecidos (Figura 10B). Além disso, conforme os valores de referência para diagnose foliar, o percentual de N, P e K de plantas nitrogenadas manteve-se dentro dos níveis adequados para a cultura, o que se conclui que as mesmas apresentavam *status* nutricional ótimo (Tabela 3). Contudo, observou-se que Syn 488 1ªEP não atingiu tais valores para N (Figura 8A), o que pode estar relacionado a menor eficiência de uso do nitrogênio aplicado.

Tabela 3 - Valores de referência para macro e micronutrientes no tecido foliar considerados adequados para a cultura do milho.

Macronutrientes	Teor (%)	Micronutrientes	Teor (ppm)
Nitrogênio	2,75 – 3,25	Cobre	6 – 20
Fósforo	0,25 – 0,35	Zinco	20 – 70
Potássio	1,75 – 2,25	Manganês	20 – 150
-----	-----	Ferro	20 - 250

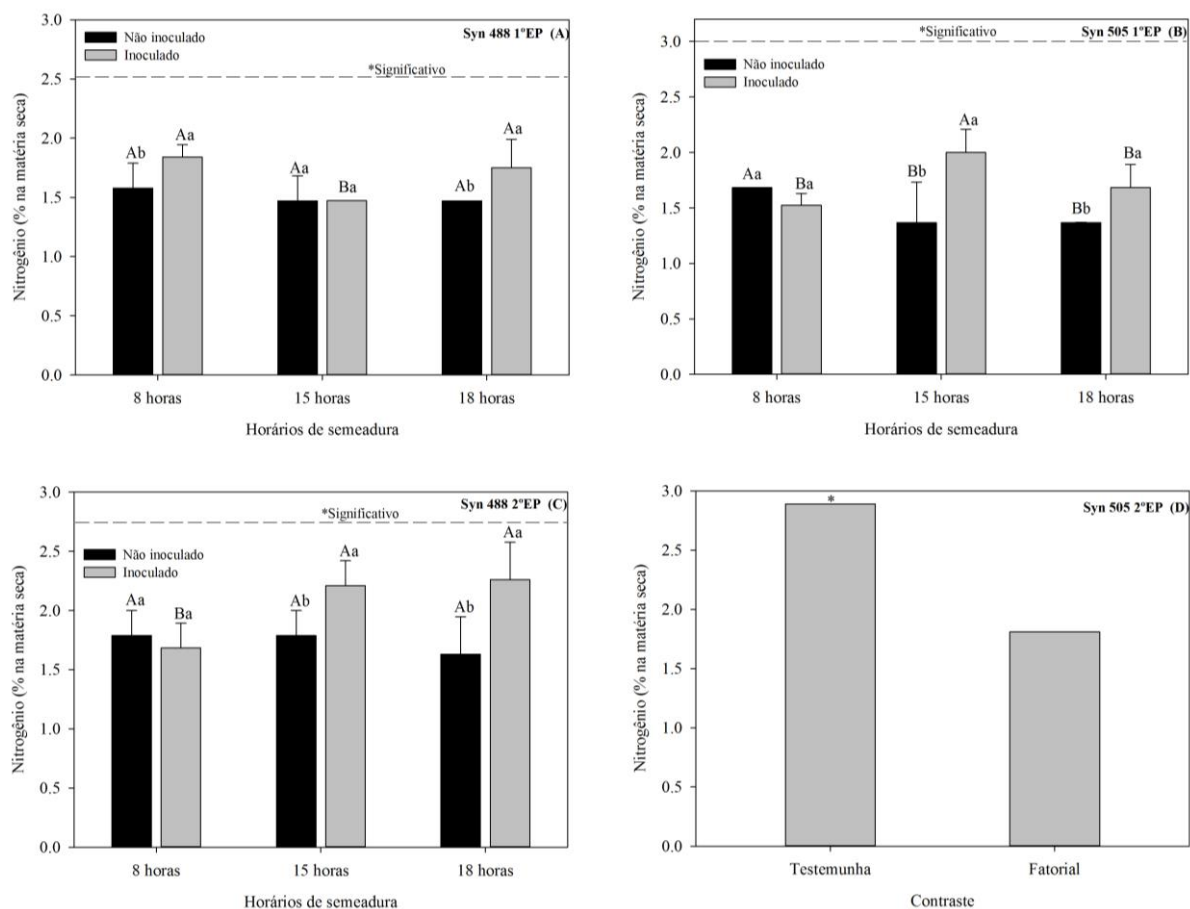
Fonte: Martinez et al. (1999)

Para a interação (horários de semeadura x inoculação), constatou-se que não houve especificidade quanto ao horário de semeadura preferencial pela bactéria, alternando os resultados dependendo do nutriente avaliado, cultivar e época de cultivo. Neste sentido, Syn 488 1ªEP inoculada com *Azospirillum brasilense* apresentou maior teor de N nos tecidos para



semeaduras às 08 e 18 horas, já Syn 505 1<sup>a</sup>EP alternou a melhor resposta da inoculação para semeaduras realizadas às 15 e 18 horas do dia, com incremento médio de 17 e 21%, respectivamente. Similarmente, Syn 488 2<sup>a</sup>EP apresentou respostas significativas da inoculação em relação à ausência da bactéria às 15 e 18 horas, com 24% a mais de N no tecido.

Figura 8 - Porcentagem de nitrogênio (N) no tecido foliar, obtido a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.

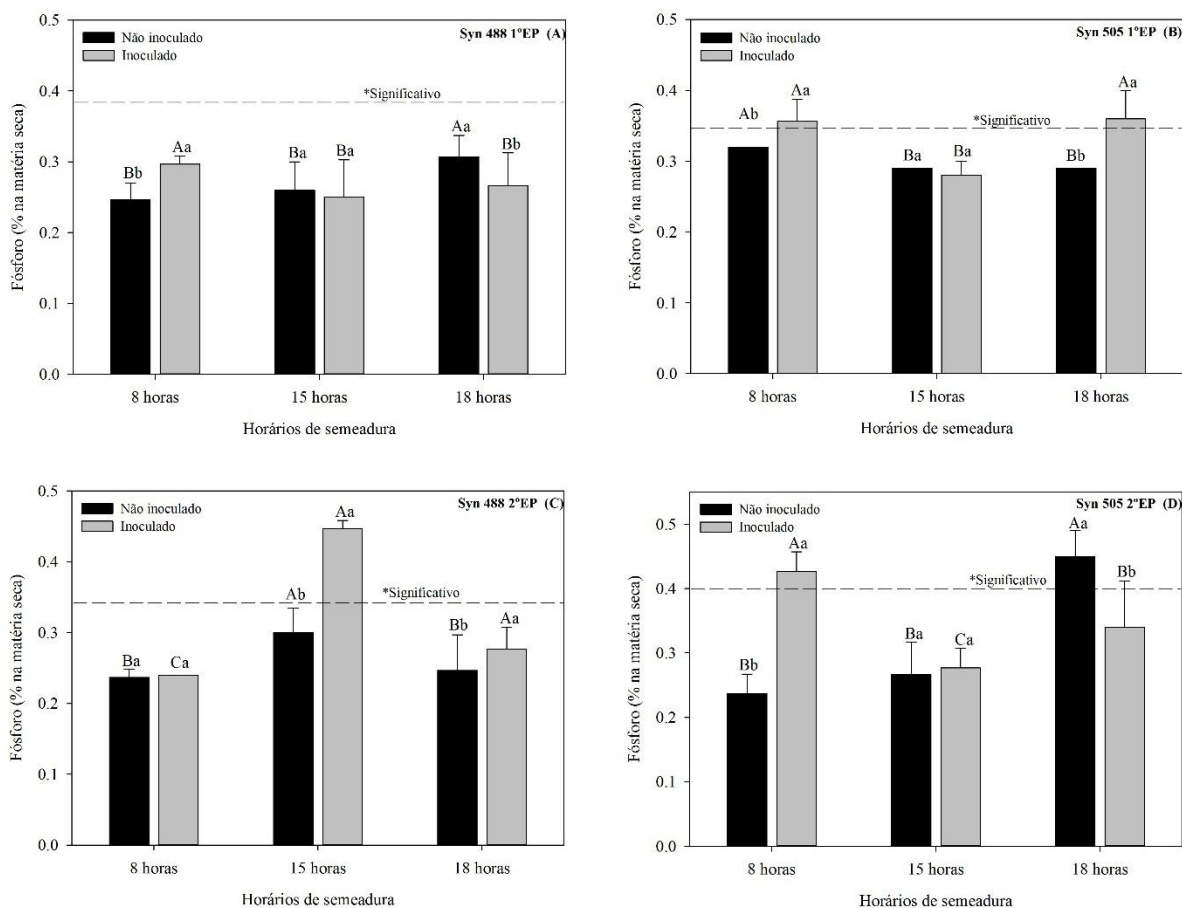


(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Com relação ao conteúdo de P nos tecidos, plantas inoculadas com *A. brasilense* novamente diferiram quanto ao melhor horário de semeadura dependendo da cultivar e época. Desta forma, Syn 488 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup>EP demonstrou melhores respostas da inoculação quando

semeada às 08 e 15 horas, respectivamente (Figuras 9A, 9C). Contudo, Syn 505 inoculada foi estatisticamente superior quando semeada às 08 e 15 horas na 1ªEP e apenas às 08 horas na 2ªEP. Salienta-se que Syn 505, na presença da bactéria, atingiu níveis extremamente elevados para P na matéria seca independente da época (Figuras 9B, 9D), com valores superiores ao limite máximo de referência (Tabela 2), o que também foi verificado para Syn 488 2ªEP semeada as 15 horas.

Figura 9 - Porcentagem de fósforo (P) no tecido foliar, obtido a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.

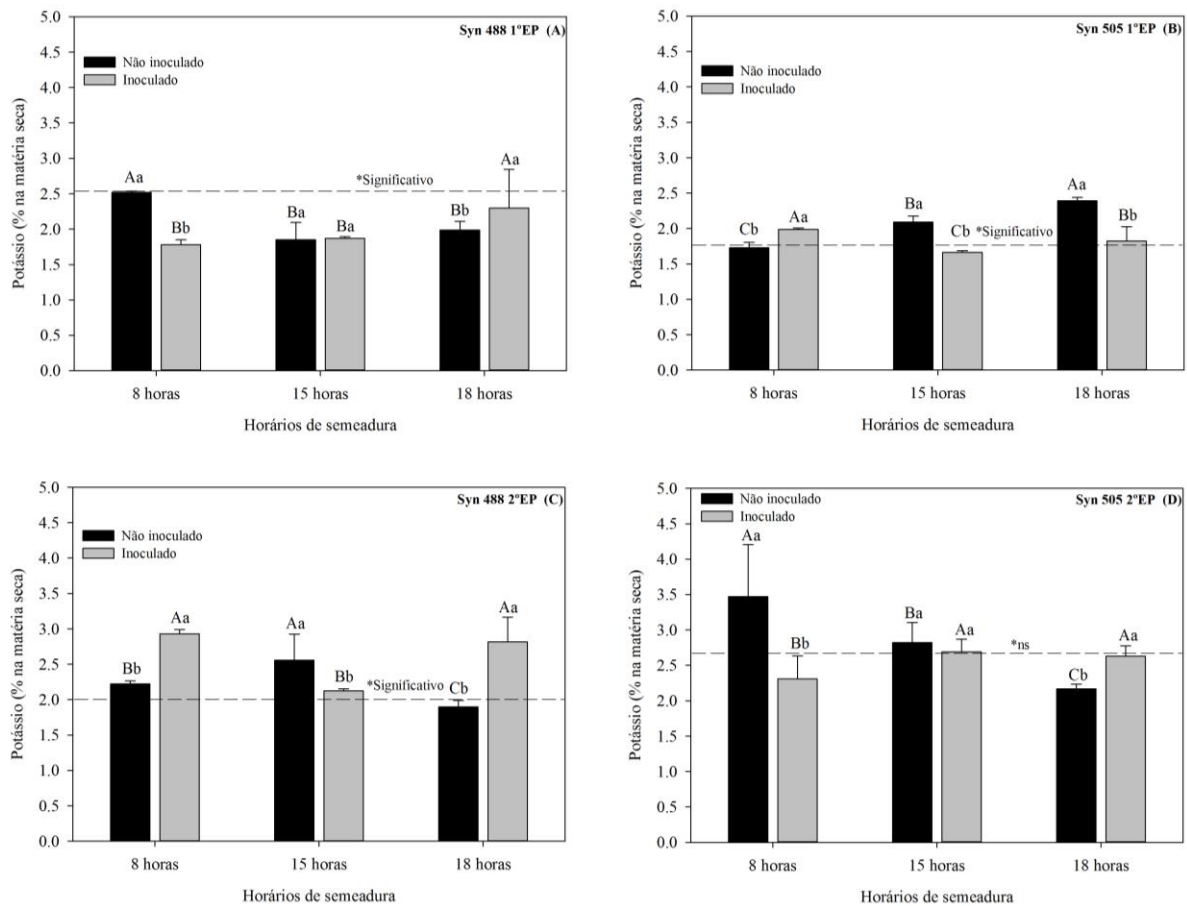


(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

De acordo com as constatações já realizadas acima, em plantas com maior conteúdo de N no tecido foliar, evidenciou-se menor acúmulo de K na matéria seca (Figuras 8 e 10). Tais dados justificam as menores respostas da inoculação quanto a porcentagem de K, nos horários

correspondentes ao maior acúmulo de N. Além disso, independente da cultivar testada, a segunda época de cultivo apresentou os maiores valores para o conteúdo do nutriente no tecido, com incremento médio de 28% em parcelas inoculadas, como observado para Syn 488 (Figura 10C).

Figura 10 - Porcentagem de potássio (K) no tecido foliar, obtido a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

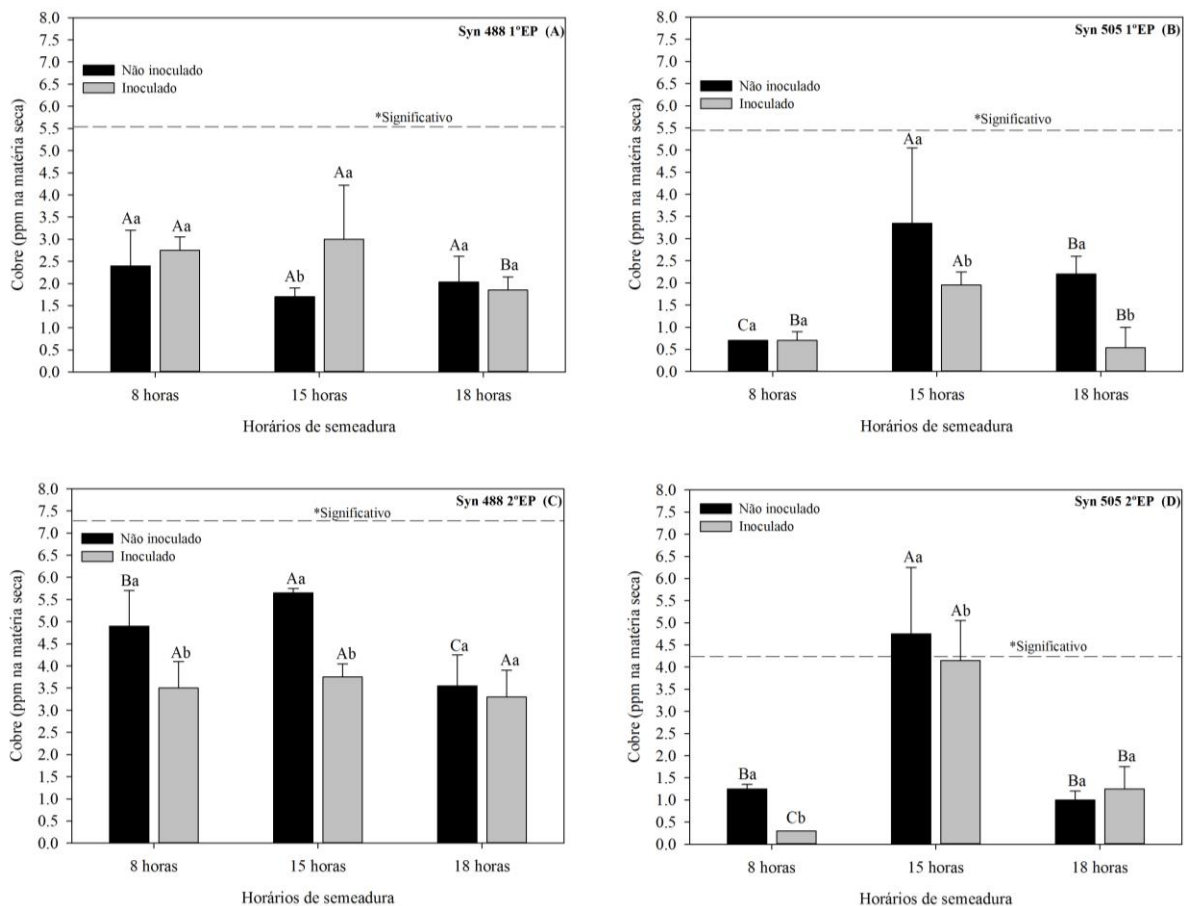
### 7.3.4 Micronutrientes

Todas as possíveis interações para cada cultivar e época estão apresentadas abaixo, de acordo com a variável analisada, sendo considerado o nível de significância pelo teste F da

ANOVA para o contraste (testemunha x fatorial) e os desdobramentos da interação (horários de semeadura x com ou sem *Azospirillum brasilense*).

A partir da análise dos dados referente à concentração de cobre (Cu) nos tecidos (Figura 11) constatou-se que, independente do tratamento aplicado, todas as plantas avaliadas apresentaram concentrações de Cu abaixo dos valores de referência (Tabela 3), exceto plantas nitrogenadas da cultivar Syn 488 2ª EP (Figura 11C). De modo geral, considerando a interação (horários x inoculação) houve redução na concentração de Cu em plantas inoculadas com a bactéria para a maioria das situações avaliadas, exceto Syn 488 1ªEP que apresentou incremento de 42% na concentração de cobre às 15 horas (Figura 11A). Além disso, evidenciou-se maior absorção do nutriente na segunda época de cultivo, para ambas as cultivares, com valores médios 35% superior à primeira época. Resultados similares foram observados para os demais micronutrientes, os quais apresentaram incrementos médios de 21, 47 e 31% para Zn, Mn e Fe, respectivamente (Figuras 12, 13 e 14).

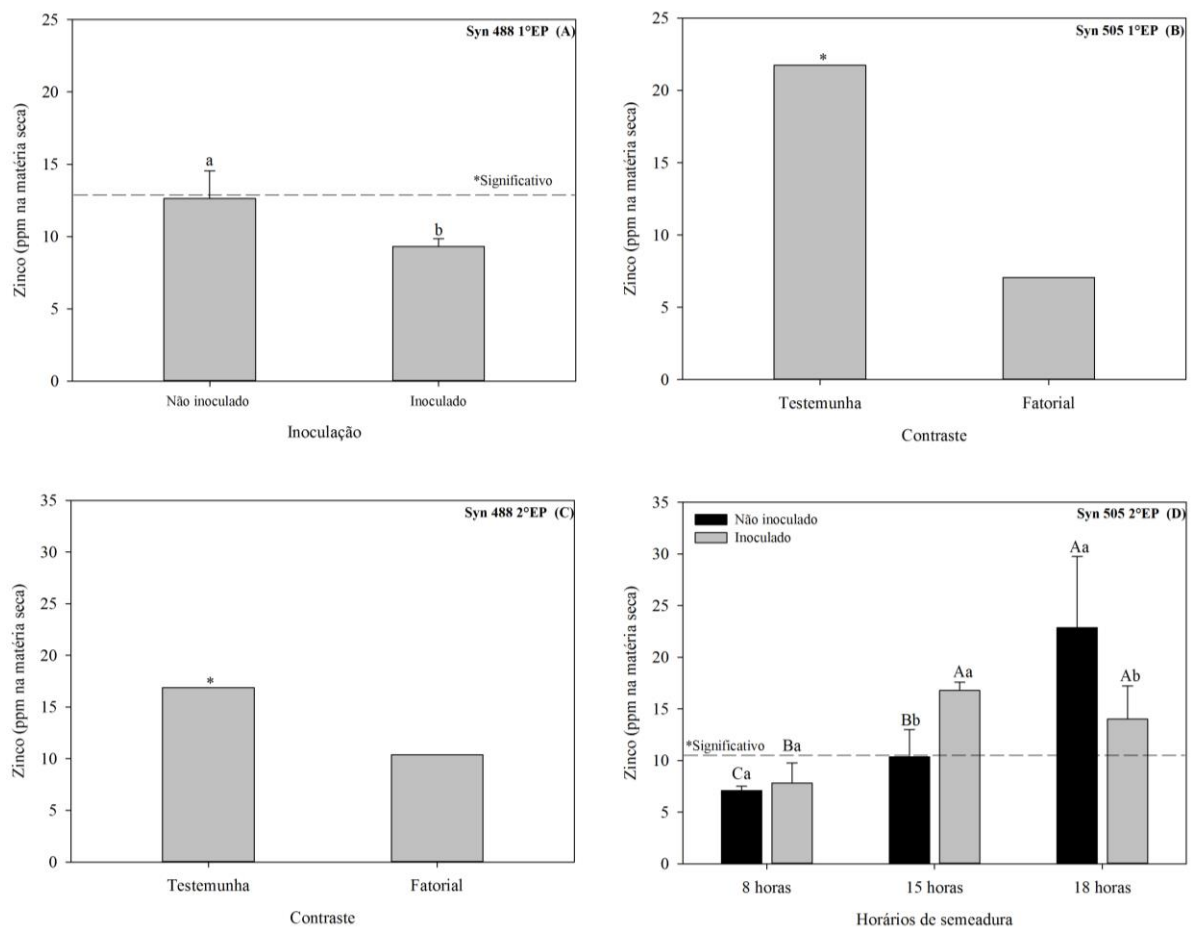
Figura 11 - Concentração de cobre (Cu) no tecido foliar, obtido a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Similarmente ao observado para o conteúdo de Cu nos tecidos, a concentração de Zn (Figura 12) também se manteve abaixo dos níveis de referência considerados adequados para a cultura do milho (Tabela 3), exceto para plantas nitrogenadas da cultivar Syn 505 1ªEP. Além disso, evidenciou-se redução significativa da absorção do micronutriente em plantas de milho inoculadas com a bactéria para Syn 488 1ªEP (Figura 12A), o que pode estar relacionado a possíveis efeitos antagônicos entre nutrientes, uma vez que plantas inoculadas apresentaram maior absorção de Mn (Figura 13A). Por outro lado, plantas que receberam nitrogênio, mesmo sem atender os valores de referência obtiveram incremento médio de 68% do nutriente na matéria seca, exceto Syn 505 2ªEP.

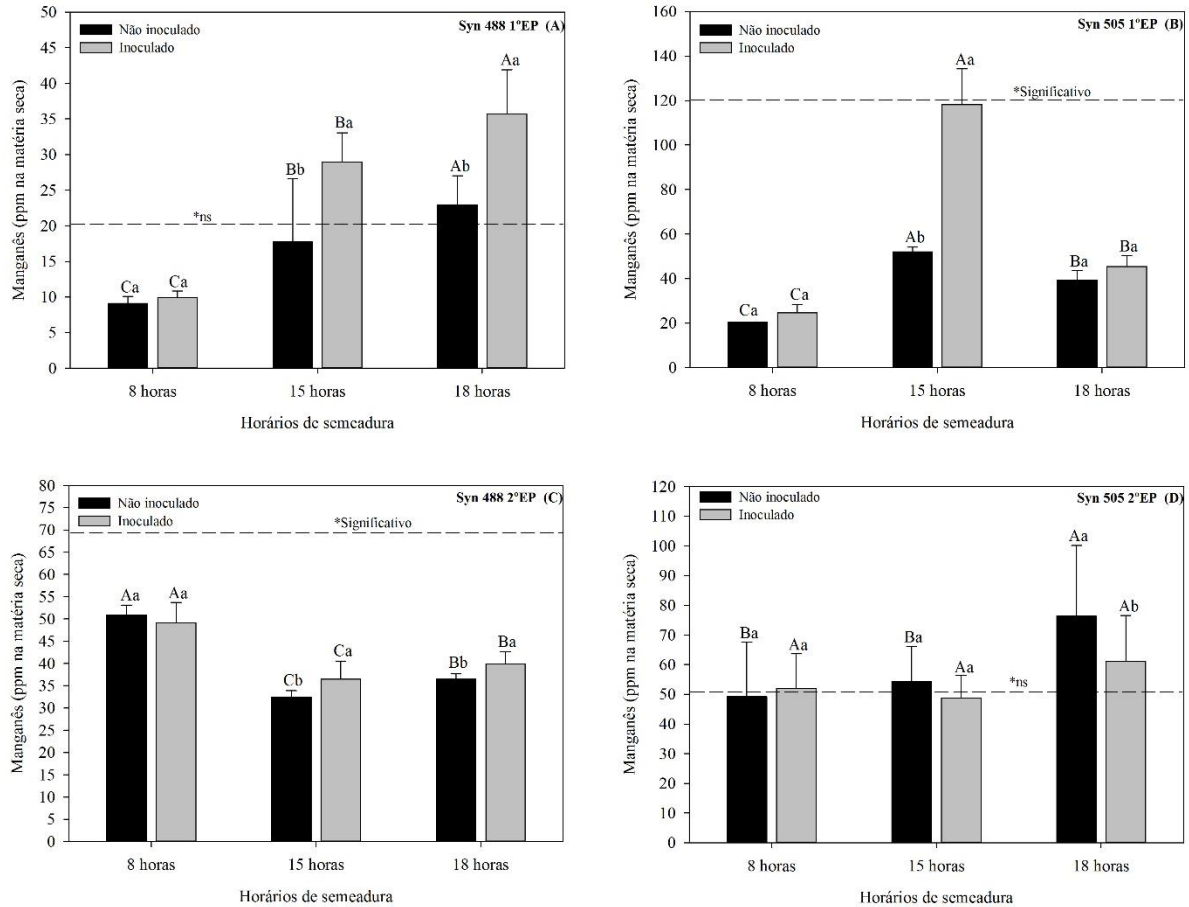
Figura 12 - Concentração de zinco (Zn) no tecido foliar, obtido a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Ao contrário do que foi observado para Zn, Mn foi o micronutriente que demonstrou as maiores respostas da inoculação em diferentes horários, com valores dentro dos níveis de referência para a maioria das condições estudadas. Destaca-se o acúmulo do micronutriente na matéria seca em plantas inoculadas às 15 e 18 horas para o genótipo Syn 488 na primeira e segunda época de cultivo, com valores 37% e 9% maiores comparado a ausência da bactéria. Em contra partida, o genótipo Syn 505 1ªEP demonstrou um elevado acúmulo do nutriente quando a cultura foi semeada exclusivamente às 15 horas, com a presença da bactéria *A. brasilense* (Figura 13B), obtendo 56% maior quantidade de Mn na matéria seca, comparada a ausência de inoculação, o que não foi observado na segunda época de cultivo (Figura 13D). Neste sentido, constatou-se que nas plantas inoculadas que apresentaram altas concentrações de Mn (Figura 13B), observou-se redução significativa para o teor de Cu no tecido (Figura 11B), justificando a ideia de que a maior acumulação de alguns nutrientes pode inibir a absorção de outros.

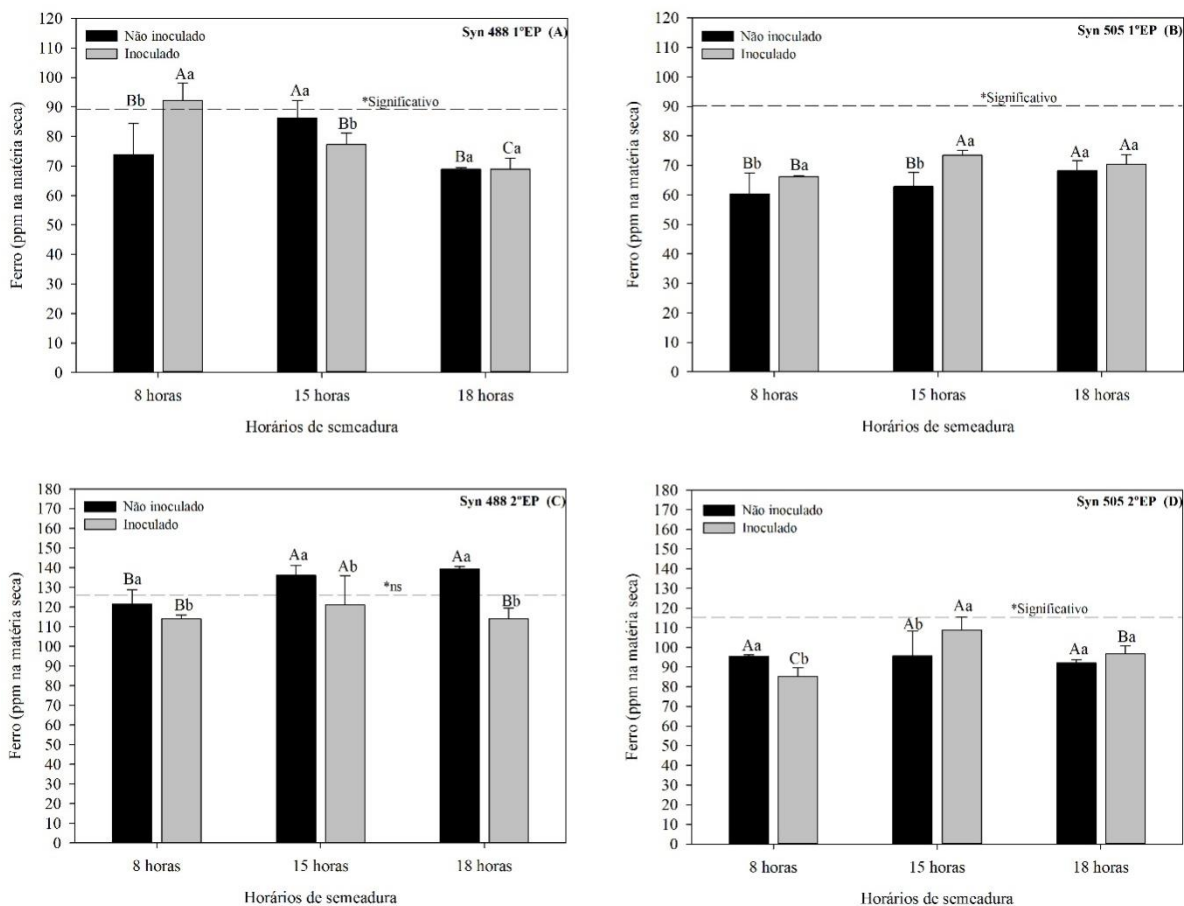
Figura 13 - Concentração de Manganês (Mn) no tecido foliar, obtido a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

A análise de tecido vegetal referente ao conteúdo de Fe na matéria seca corrobora com os demais resultados encontrados para os outros nutrientes, os quais são afetados de acordo com o genótipo testado, bem como a época de cultivo. Contudo, todos os tratamentos testados atingiram níveis aceitáveis do nutriente (Tabela 3), com melhores respostas da inoculação às 08 horas para Syn 488 1ªEP e 15 horas para Syn 505 1ª e 2ªEP (Figuras 14A, 14B, 14D). Entretanto, salienta-se que, de modo geral, na maioria das situações em que foi constatado um aumento no conteúdo de Fe, reduções significativas para o teor de Cu, Zn e Mn foram observadas, o que justifica o efeito negativo da bactéria em algumas situações.

Figura 14 - Concentração de Ferro (Fe) no tecido foliar, obtido a partir de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

### 7.3.5 Produtividade de grãos e proteína bruta

Para primeira época de semeadura, a maior produtividade de grãos (PG) e proteína bruta (PB) foi encontrada quando houve a aplicação de nitrogênio em ambos os genótipos Syn 488 e Syn 505, com valores médios de 7.800 e 9.800 Kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Figuras 15 e 16). Por outro lado, na segunda época a aplicação de N não demonstrou efeito significativo sobre a PG para Syn 488, exceto para o genótipo Syn 505 que apresentou redução de 14% para a variável em parcelas que receberam N (Figuras 15C e 15D).

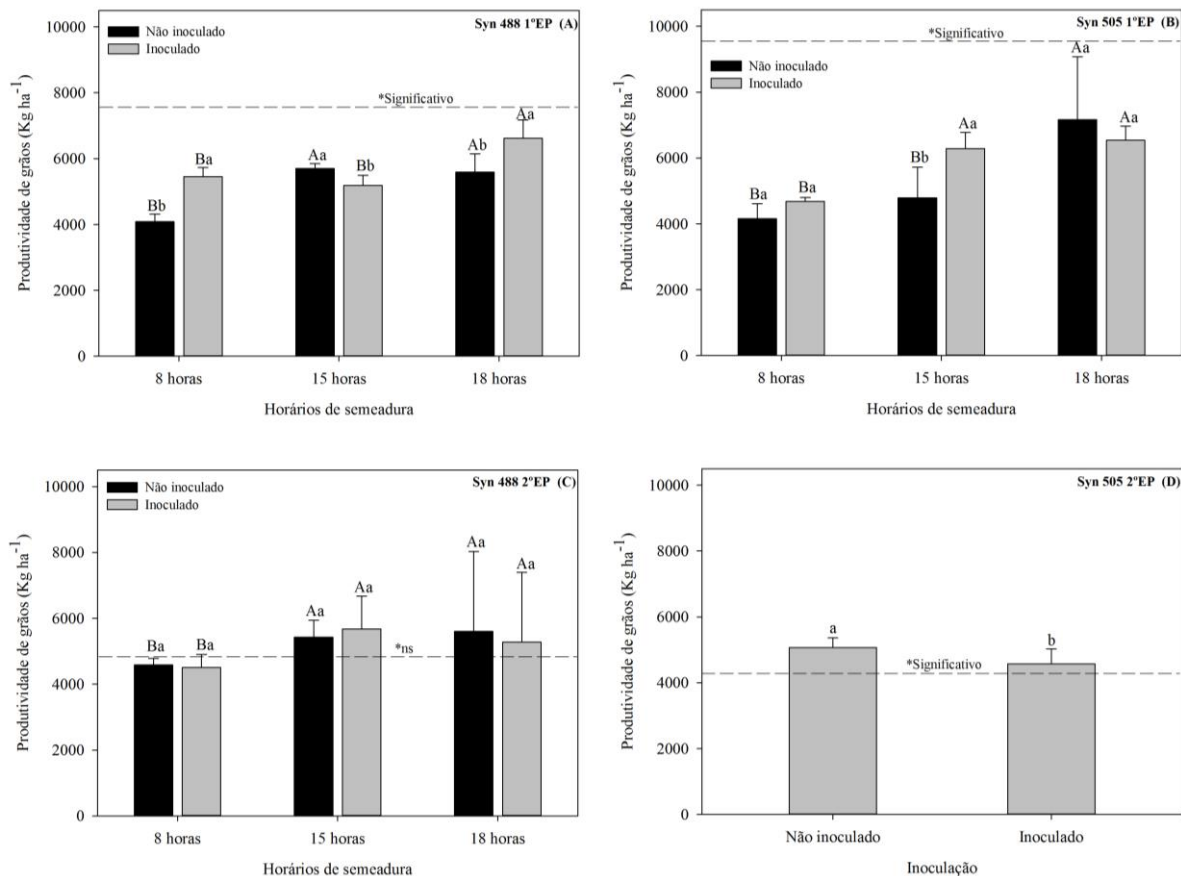


Comparando-se os efeitos da interação (horários de semeadura x inoculação), as melhores respostas da bactéria para ambas as variáveis novamente foram modulados em função da cultivar testada e época de cultivo. Contudo, para a cultivar Syn 505, semeaduras realizadas às 15 e 18 horas na primeira época resultaram em maior acúmulo de N nos tecidos e altas produtividades (6.200 Kg ha<sup>-1</sup>), com incremento de 22% para a variável, aliado ao maior percentual de PB nos grãos (Figuras 8B, 15B e 16B), o que comprova a maior atividade da bactéria nessas condições, mesmo sem alterar o número de UFC grama de raiz<sup>-1</sup> (Tabela 2), principalmente pela condição de solo no momento da semeadura que apresentava-se mais quente nestes horários, 28 e 25 °C, respectivamente.

Na segunda época de semeadura, evidenciou-se ausência de efeitos da inoculação na PG para Syn 488 e redução da PG para Syn 505 (Figuras 15C e 15D). Salienta-se que, a temperatura do solo no momento da semeadura atingiu valores próximos a 40 °C (Figura 2B), o que poderia prejudicar o desenvolvimento microbiano, contudo, a contagem bacteriana evidenciou um acréscimo no número de UFC grama de raiz<sup>-1</sup> na segunda safra, em resposta a maior temperatura do solo.

Embora a condição não inoculada seja desprovida de qualquer aplicação da bactéria *A. brasilense* nos tratamentos, pelo método do número mais provável foi verificado que a área apresenta alta densidade da espécie habitando o solo, o que explica o rendimento de grãos expressivo em tratamentos não inoculados. Por outro lado, a re-inoculação proporcionou um incremento médio de 22% na primeira época de cultivo sem nenhuma adição de fertilizantes nitrogenados.

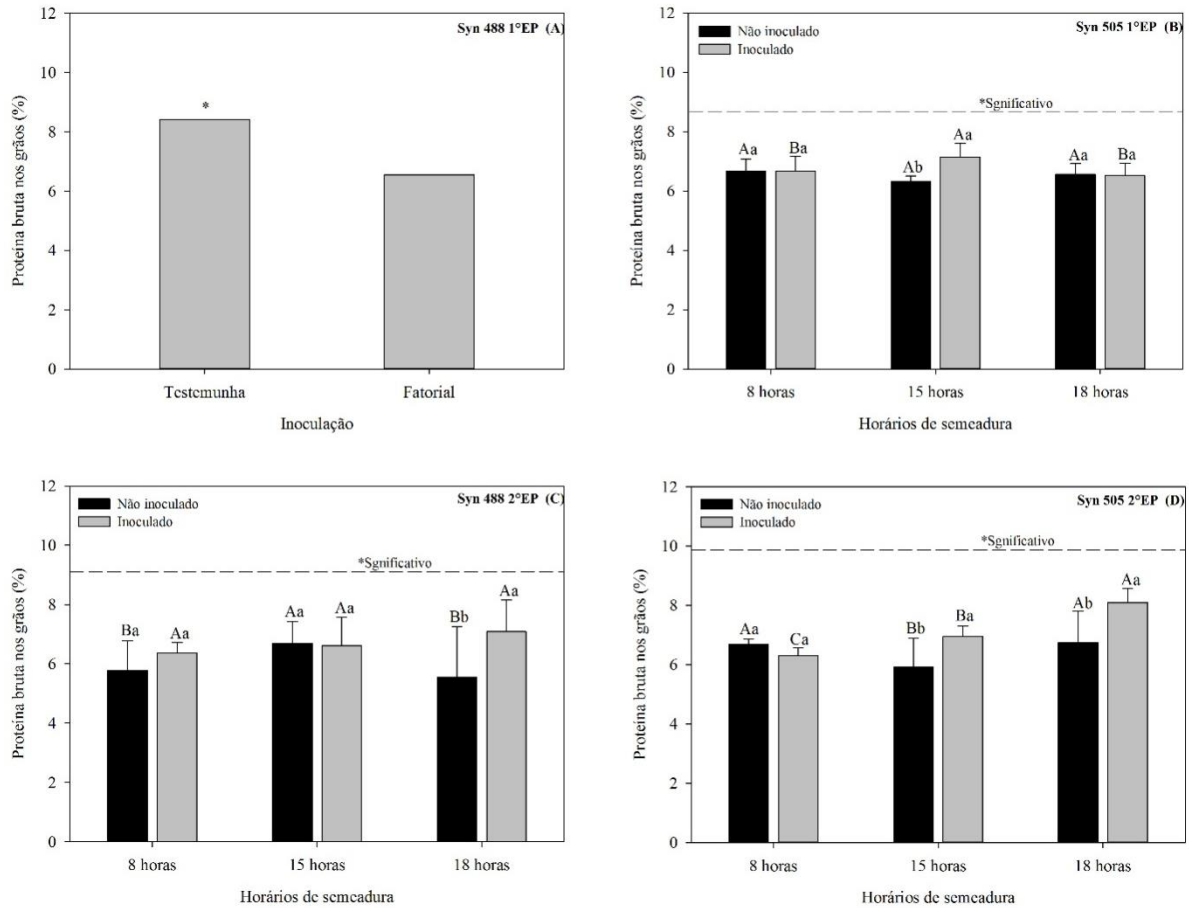
Figura 15 - Produtividade de grãos ( $\text{Kg ha}^{-1}$ ) de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Ao contrário do que foi observado para a variável anterior, obtiveram-se respostas significativas da inoculação para PB na segunda época de cultivo em ambos os genótipos (Figuras 16C e 16D), com incremento médio de 18% para a variável em parcelas semeadas às 18 horas, comparado a ausência de inoculação. Tais dados podem ser correlacionados com o conteúdo de N nos tecidos, o qual foi estatisticamente superior às 15 e 18 horas (Figura 8C), comprovando a influência do horário de semeadura na variável analisada. Coincidentemente, neste horário a temperatura do solo estava em torno de  $34\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 2), o que indica melhor resposta da bactéria sob condições de temperaturas próximas de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Figura 16 - Percentagem de proteína bruta nos grãos de plantas de milho submetidas a diferentes horários de semeadura e sistema de inoculação em duas estações de cultivo no município de Santa Maria/RS.



(\*) representa o contraste pelo teste F entre a testemunha adicional e a interação (horários x inoculação). Linha tracejada representa a média obtida na testemunha adicional. Letras maiúsculas comparam os efeitos dos horários de semeadura em cada sistema de inoculação e letras minúsculas a presença ou ausência da bactéria pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Os coeficientes de trilha das variáveis consideradas primárias, correlacionadas com a PG (dependente) estão listados na Tabela 4. Verificou-se que ambos os genótipos apresentaram coeficiente de determinação acima de 90% na primeira época de semeadura, com efeito residual baixo (erro), garantindo maior confiabilidade dos dados. Entretanto, na segunda época a análise de correlações demonstrou maior valor de erro para ambas as cultivares, com menor coeficiente de determinação para Syn 488 (53%) e Syn 505 (78%), sendo desconsideradas na discussão dos resultados.

Pela análise de trilha referente ao impacto das variáveis analisadas na PG, para a cultivar Syn 488 1ªEP, o efeito direto por meio da análise de trilha foi observado para Chlt (-505), POD (0,236), N (0,919), P (0,535) e Mn (0,380), com valores superiores ao efeito

residual. Além disso, dentre os efeitos indiretos de maior expressividade, destaca-se Chlt (0,799), Carot (0,691), POD (0,366), P (0,707), K (0,456) e Fe (0,447) via N, indicando que 54% das variáveis analisadas estão correlacionadas positivamente com o conteúdo do nutriente nos tecidos da planta. Além disso, verificou-se efeitos indiretos para Chlt (0,417) e N (0,411) via P e N via Chlt (-439). Já para o genótipo Syn 505, efeitos diretos foram identificados apenas para N (0,398) e Fe (1,157), além disso, efeitos indiretos de Chlt via N, e carotenoides e Mn via ferro foram observados.

Tabela 4 - Estimativas dos efeitos diretos e indiretos das variáveis consideradas primárias sobre a produtividade de grãos.

<b>Vias de associação</b>	<b>----- Coeficiente de trilha -----</b>			
<b>Temperatura</b>	<b>Syn 488 1ºEP</b>	<b>Syn 488 2ºEP</b>	<b>Syn 505 1ºEP</b>	<b>Syn 505 2ºEP</b>
Efeito direto sobre PG	0.194	1.470	0.152	0.247
Efeito indireto via Chlt	-0.034	-0.101	-0.072	0.079
Efeito indireto via Carot	0.003	0.004	0.001	-0.053
Efeito indireto via POD	0.122	0.080	0.069	0.078
Efeito indireto via SOD	0.005	0.001	-0.027	-0.058
Efeito indireto via N	-0.190	-0.608	0.132	-0.121
Efeito indireto via P	-0.057	-0.037	0.131	-0.009
Efeito indireto via K	-0.001	0.104	-0.045	-0.236
Efeito indireto via Mn	0.214	-0.033	-0.371	0.043
Efeito indireto via Fe	0.004	-0.398	0.538	-0.211
<b>Total</b>	<b>0.260</b>	<b>0.481</b>	<b>0.508</b>	<b>-0.242</b>
<b>Chlt</b>				
Efeito direto sobre PG	-0.505	-0.199	-0.176	0.249
Efeito indireto via Temp	0.013	0.744	0.062	0.078
Efeito indireto via Carot	-0.136	0.021	0.002	-0.020
Efeito indireto via POD	0.100	0.058	0.072	0.025
Efeito indireto via SOD	-0.010	0.008	-0.046	0.185
Efeito indireto via N	0.799	-0.526	0.338	-0.080
Efeito indireto via P	0.417	-0.015	-0.035	0.060
Efeito indireto via K	0.001	-0.100	-0.152	-0.302
Efeito indireto via Mn	0.028	0.023	-0.332	-0.012
Efeito indireto via Fe	-0.024	0.075	0.942	0.023
<b>Total</b>	<b>0.684</b>	<b>0.090</b>	<b>0.676</b>	<b>0.207</b>
<b>Carotenoides</b>				
Efeito direto sobre PG	-0.181	0.036	0.002	0.154
Efeito indireto via Temp	-0.003	0.144	0.037	-0.084
Efeito indireto via Chlt	-0.381	-0.118	-0.140	-0.032
Efeito indireto via POD	0.049	0.016	0.055	-0.053
Efeito indireto via SOD	-0.007	0.010	-0.061	-0.013
Efeito indireto via N	0.691	-0.322	0.214	0.004

Efeito indireto via P	0.263	-0.005	0.022	0.207
Efeito indireto via K	0.001	-0.119	-0.082	-0.525
Efeito indireto via Mn	0.066	0.057	-0.205	0.043
Efeito indireto via Fe	-0.010	0.183	0.539	0.067
<b>Total</b>	<b>0.489</b>	<b>-0.120</b>	<b>0.381</b>	<b>-0.232</b>

**POD**

Efeito direto sobre PG	0.236	0.092	0.158	0.184
Efeito indireto via Temp	0.100	1.267	0.066	0.104
Efeito indireto via Chlt	-0.214	-0.125	-0.080	0.034
Efeito indireto via Carot	-0.038	0.006	0.001	-0.045
Efeito indireto via SOD	-0.013	0.001	-0.055	0.177
Efeito indireto via N	0.366	-0.785	0.144	-0.118
Efeito indireto via P	0.126	-0.028	0.022	-0.110
Efeito indireto via K	0.000	0.064	-0.008	0.423
Efeito indireto via Mn	0.097	0.013	-0.181	-0.200
Efeito indireto via Fe	-0.018	-0.181	0.604	-0.284
<b>Total</b>	<b>0.644</b>	<b>0.325</b>	<b>0.672</b>	<b>0.165</b>

**SOD**

Efeito direto sobre PG	0.041	-0.016	0.143	0.675
Efeito indireto via Temp	0.022	-0.135	-0.029	-0.021
Efeito indireto via Chlt	0.124	0.095	0.056	0.068
Efeito indireto via Carot	0.032	-0.023	-0.001	-0.003
Efeito indireto via POD	-0.072	-0.004	-0.061	0.048
Efeito indireto via N	-0.356	-0.049	-0.059	0.076
Efeito indireto via P	-0.226	0.004	-0.147	-0.069
Efeito indireto via K	-0.001	0.164	-0.037	0.021
Efeito indireto via Mn	-0.082	0.042	0.127	-0.133
Efeito indireto via Fe	-0.013	-0.037	-0.252	0.026
<b>Total</b>	<b>-0.529</b>	<b>0.041</b>	<b>-0.259</b>	<b>0.689</b>

**N**

Efeito direto sobre PG	0.919	-1.151	0.398	-0.237
Efeito indireto via Temp	-0.040	0.777	0.050	0.126
Efeito indireto via Chlt	-0.439	-0.091	-0.149	0.084
Efeito indireto via Carot	-0.136	0.010	0.001	-0.003
Efeito indireto via POD	0.094	0.063	0.057	0.091
Efeito indireto via SOD	-0.016	-0.001	-0.021	-0.216
Efeito indireto via P	0.411	-0.033	-0.064	0.118
Efeito indireto via K	0.001	0.044	-0.204	-0.085
Efeito indireto via Mn	-0.028	0.089	-0.379	0.020
Efeito indireto via Fe	-0.031	0.245	1.057	-0.218
<b>Total</b>	<b>0.737</b>	<b>-0.048</b>	<b>0.748</b>	<b>-0.320</b>

**P**

Efeito direto sobre PG	0.535	-0.059	-0.295	0.317
Efeito indireto via Temp	-0.021	0.918	-0.068	-0.007

Efeito indireto via Chlt	-0.394	-0.049	-0.021	0.047
Efeito indireto via Carot	-0.089	0.003	0.000	0.101
Efeito indireto via POD	0.056	0.044	-0.012	-0.064
Efeito indireto via SOD	-0.017	0.001	0.071	-0.147
Efeito indireto via N	0.707	-0.645	0.086	-0.089
Efeito indireto via K	0.001	0.080	-0.069	-0.803
Efeito indireto via Mn	-0.026	-0.019	0.128	0.170
Efeito indireto via Fe	-0.025	0.031	0.244	0.058
<b>Total</b>	<b>0.726</b>	<b>0.306</b>	<b>0.064</b>	<b>-0.415</b>

**K**

Efeito direto sobre PG	0.002	-0.271	0.233	1.045
Efeito indireto via Temp	-0.063	-0.563	-0.029	-0.056
Efeito indireto via Chlt	-0.198	-0.074	0.115	-0.072
Efeito indireto via Carot	-0.076	0.016	-0.001	-0.078
Efeito indireto via POD	0.020	-0.022	-0.005	0.074
Efeito indireto via SOD	-0.022	0.010	-0.023	0.014
Efeito indireto via N	0.456	0.189	-0.348	0.019
Efeito indireto via P	0.138	0.018	0.088	-0.243
Efeito indireto via Mn	-0.016	-0.034	0.319	-0.181
Efeito indireto via Fe	0.016	0.500	-0.779	-0.090
<b>Total</b>	<b>0.256</b>	<b>-0.232</b>	<b>-0.431</b>	<b>0.433</b>

**Mn**

Efeito direto sobre PG	0.380	0.178	-0.490	0.321
Efeito indireto via Temp	0.109	-0.276	0.115	0.033
Efeito indireto via Chlt	-0.038	-0.026	-0.119	-0.010
Efeito indireto via Carot	-0.032	0.011	0.001	0.021
Efeito indireto via POD	0.060	0.007	0.058	-0.114
Efeito indireto via SOD	-0.009	-0.004	-0.037	-0.279
Efeito indireto via N	-0.067	-0.578	0.308	-0.015
Efeito indireto via P	-0.036	0.006	0.077	0.168
Efeito indireto via K	0.000	0.052	-0.152	-0.590
Efeito indireto via Fe	0.031	0.207	0.919	0.104
<b>Total</b>	<b>0.398</b>	<b>-0.423</b>	<b>0.681</b>	<b>-0.361</b>

**Fe**

Efeito direto sobre PG	-0.063	-0.882	1.157	-0.334
Efeito indireto via Temp	-0.012	0.663	0.071	0.156
Efeito indireto via Chlt	-0.190	0.017	-0.143	-0.017
Efeito indireto via Carot	-0.029	-0.007	0.001	-0.031
Efeito indireto via POD	0.066	0.019	0.082	0.156
Efeito indireto via SOD	0.008	-0.001	-0.031	-0.053
Efeito indireto via N	0.447	0.320	0.364	-0.155
Efeito indireto via P	0.215	0.002	-0.062	-0.055
Efeito indireto via K	0.000	0.154	-0.157	0.281
Efeito indireto via Mn	-0.186	-0.042	-0.389	-0.100

Total	0.256	0.242	0.893	-0.153
<b>Coef. Determinação</b>	0.948	0.526	0.906	0.783
<b>Residual</b>	0.228	0.689	0.306	0.465

## 7.4 DISCUSSÃO

### 7.4.1 Efeito da interação *Azospirillum brasilense* x temperatura nos parâmetros bioquímicos

Em geral, híbridos de milho podem responder de maneira diferente a inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum sp.*, em resposta a constituição genética dos mesmos, exsudatos radiculares liberados, atração da bactéria, deslocamento até a rizosfera e adesão a superfície radicular (DROGUE et al., 2012; PEREIRA et al., 2020; O'NEAL et al., 2019). Com respostas da interação planta-bactéria sobre o crescimento vegetal via aumento do sistema radicular e parte aérea, produção de fitormônios, alteração do metabolismo redox da planta, bem como o incremento na absorção/acúmulo de nutrientes nos tecidos, com impacto direto sobre a produtividade de grãos (SPAEPEN et al., 2014; FUKAMI et al., 2018; ALEN'KINA et al., 2018; FUKAMI et al., 2017). No entanto, pesquisas têm demonstrado um importante papel da condição ambiental no sucesso da interação planta - microrganismo, podendo limitar os efeitos benéficos da associação (MARQUES et al., 2020). Neste sentido, a temperatura pode exercer influência sobre a população de *Azospirillum brasilense*, com redução do crescimento microbiano, além de menor produção de auxinas e fixação biológica de nitrogênio (FBN) sob temperaturas acima de 30 °C (ROMERO-PERDOMO et al., 2015; MOLINA et al., 2018; TRIPATHI et al., 1992). Tais dados corroboram com as melhores respostas da inoculação no sistema antioxidante de plantas de milho semeadas às 15 horas (28 °C) e 18 horas (25 °C) na primeira época, com maior atividade da POD e SOD nestes horários (Figuras 6A, 6B, 7A, 7B). Adicionalmente, na segunda época de semeadura, houve influência significativa da inoculação sobre o conteúdo de clorofilas, carotenoides, POD e SOD (Figuras 3, 4, 6 e 7), para semeaduras realizadas às 08 e 18 horas (25 e 34 °C), respectivamente, o que pode estar associado a melhor condição ambiental para a sobrevivência bacteriana e colonização radicular. Pesquisas sugerem a existência de uma faixa de temperatura ideal para a máxima colonização/interação da bactéria, a qual situa-se entre 25 a 30 °C, em resposta a capacidade adaptativa da estirpe testada (MOLINA et al., 2018; RINKEE VERMA et al., 2011; LANDA et al., 2004; MOLINA-FAVERO et al., 2008).

Quanto ao conteúdo de  $H_2O_2$  em plantas de milho, independente do genótipo testado houve maior acúmulo da ERO no tecido foliar de plantas inoculadas com *A. brasilense* às 15 e 18 horas para Syn 488 e às 08 e 15 horas para Syn 505, principalmente na segunda época, o que pode estar ligado a condição ambiental restritiva, resultando em maior produção de ERO. Neste sentido, uma concentração de  $H_2O_2$  a nível basal destaca-se como molécula sinalizadora de processos fisiológicos como expansão e sinalização celular, capaz de aumentar a tolerância de plantas a fatores promotores de estresse (temperatura, seca, patógenos), com elevada permeabilidade via proteínas de membrana (aquaporinas) (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; SIES et al., 2017), obtendo-se incremento significativo sobre o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, fotossíntese, condutância estomática e compostos antioxidantes em plantas submetidas a baixas concentrações da molécula (NURNAEIMAH et al., 2020; HABIB et al., 2020). Adicionalmente, relatos científicos evidenciaram que o processo de infecção/colonização bacteriana pode alterar o *status* redox do vegetal, de modo que ERO e atividade antioxidante são reguladas após a associação, com incremento significativo de ânion superóxido,  $H_2O_2$  e SOD em plantas inoculadas (MÉNDEZ-GOMEZ et al., 2015; MÉNDEZ-GOMEZ et al., 2016). Tais dados corroboram com o comportamento observado para o conteúdo de clorofilas e carotenoides nos horários de maior  $H_2O_2$  no tecido vegetal (Figuras 5, 3 e 4), associado ao incremento na atividade enzimática de guaiacol peroxidase (Figuras 6C, 6D) como estratégia para evitar possível dano oxidativo.

De acordo com os resultados encontrados para POD e SOD, a primeira época de semeadura apresentou os maiores valores para atividade enzimática de ambos os compostos antioxidantes (Figuras 6 e 7), o que pode estar correlacionado a maior disponibilidade hídrica na primeira safra, associado a menores picos de temperatura (Figura 1). Neste sentido, evidências científicas apontam que o estresse térmico pode reduzir consideravelmente a atividade das enzimas SOD, catalase e peroxidases, além de pigmentos fotossintéticos, como resultado de um drástico aumento da concentração de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^{\bullet}$ , com capacidade de prejudicar a atividade enzimática, além da geração de peroxidação lipídica (AWASTHI et al., 2015; DJANAGUIRAMAN et al., 2010), o que justifica a menor atividade antioxidante e maior conteúdo de  $H_2O_2$  na segunda época de semeadura (Figuras 6, 7 e 5).

Considerando os resultados obtidos em plantas nitrogenadas, independente do híbrido de milho utilizado e época, verificou-se maior tolerância das plantas a fatores promotores de estresse, uma vez que constatou-se redução significativa do conteúdo de  $H_2O_2$  nas plantas em que o fertilizante foi aplicado (Figura 5), o que pode ser justificado pela maior quantidade de clorofilas, carotenoides e atividade enzimática de POD e SOD (Figuras 3, 4, 6 e 7), indicando



correlação direta do *status* nutricional da planta com a capacidade fisiológica do vegetal suportar diferentes condições de temperatura e precipitação (Figura 1). Tais dados corroboram com Zhang et al. (2014) que enfatizaram o papel extremamente importante do N na tolerância a toxicidade por cádmio, via aumento da expressão de genes relacionados a SOD, CAT e APX, com redução expressiva da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas fertilizadas. Adicionalmente, Lqbal et al. (2020) concluíram que o fornecimento de nitrogênio em doses maiores na cultura do algodão reduziu significativamente o estresse por seca, em resposta a maior atividade antioxidante, redução de peroxidação lipídica e ajuste osmótico, similar aos dados obtidos no presente estudo.

#### **7.4.2 Efeito da interação *A. brasilense* x temperatura na nutrição de plantas, PG e PB**

Rizobactérias promotoras de crescimento ainda podem influenciar no desenvolvimento vegetal via maior absorção de água e nutrientes, o que está fortemente vinculado ao maior desenvolvimento do sistema radicular das plantas inoculadas, capazes de explorar maior volume de solo e, conseqüentemente, absorver maior quantidade de solutos (ADESEMOYE et al., 2009). Além disso, estudos já têm evidenciado que a maior absorção de minerais em plantas colonizadas por *A. brasilense* pode estar vinculada a maior atividade de proteínas específicas na membrana plasmática, com uma dinâmica de absorção estritamente regulada via transportadores específicos, modulando a dinâmica de absorção da planta (PII et al., 2015; PII et al., 2019; WHITE, 2003). Neste sentido, a inoculação de plantas aumentou a absorção de N, P, Mn e Fe, independente do genótipo testado ou época, seguido por uma redução significativa para os teores de K, Cu e Zn. Efeitos relacionados a maior concentração de N no tecido (Figura 7) podem ser atribuídos, pelo menos em parte, a FBN realizada por *A. brasilense*, através da conversão de nitrogênio atmosférico a amônio, e posterior assimilação do mesmo em aminoácidos via glutamina sintetase/glutamato sintase (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; WESTBY et al., 1987). Adicionalmente, a maior absorção de P na presença da bactéria (Figura 9) pode estar vinculada ao mecanismo de solubilização de fosfato, através da liberação de ácido glucônico e redução do pH na rizosfera via extrusão de prótons H<sup>+</sup>, liberando fosfato na solução do solo (LUDUENA et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2004), como requisito essencial para incremento de produtividade das culturas (PEREIRA et al., 2020).

Possíveis efeitos antagônicos para K, Cu e Zn foram observados (Figuras 10, 11 e 12). Pesquisas reforçam a ideia que maiores concentrações de N e P na rizosfera podem afetar

diretamente a absorção de Zn e Cu pelas plantas, associado a relações entre cátions K, Fe e Mn no solo, capazes de competir por sítios de absorção na raiz (RIETRA et al., 2017; MOUSAVI et al., 2012). Considerando os mecanismos de promoção de crescimento pela bactéria descritos acima (FBN e solubilização de P), tais dados justificam a menor concentração de alguns nutrientes no tecido, sem prejuízos à produtividade de grãos (Figuras 15A, 15B). Tais dados corroboram com Pii et al. (2019) os quais avaliaram o ionoma completo de plantas de milho submetidas a inoculação com *Azospirillum brasilense*, os quais evidenciaram incremento significativo de N, Fe, Mn, P e S no tecido vegetal, associado a menor concentração de Cu, K e Zn.

Embora não foi evidenciado um horário específico para a interação (horários de semeadura x inoculação), os melhores resultados da interação planta-bactéria referente ao incremento simultâneo de N e P na matéria seca foram evidenciados às 18 horas para Syn 488 e 15 horas para Syn 505 na primeira época, bem como maior produtividade de grãos e PB nestas condições (Figuras 15 e 16). Tais resultados coincidem com a temperatura do solo próxima da condição ideal para o crescimento bacteriano destacada anteriormente (30 C°) (Figura 2), o que pode estar relacionado a manutenção de células bacterianas ativas no solo por mais tempo. Penna et al. (2011) mostraram que bactérias do gênero *Rhizobium* podem reduzir sua população em até dez vezes após uma hora de inoculação sob temperaturas mais altas, reforçando o impacto da condição ambiental sobre a inoculação. Com isso, Arsac et al. (1990) destacaram que a concentração de *A. brasilense* ideal em plantas de milho situa-se em torno de  $10^7$  UFC, com efeito inibitório acima destes valores. Logo, a quantificação bacteriana evidenciou que numericamente a semeadura realizada às 15 e 18 horas atingiu valores muito próximos da condição ideal na primeira época ( $10^5$  e  $10^6$ ), o que pode justificar as melhores respostas da inoculação para as variáveis bioquímicas, nutricionais e produtividade de grãos nos respectivos horários.

Períodos de restrição hídrica podem desencadear respostas na planta a nível morfológico, fisiológico, bioquímico e molecular, como estratégias de tolerância ao estresse (KAPOOR et al., 2020). Logo, observou-se um incremento na absorção de K, Mn e Fe nas plantas de milho na segunda época, independente da inoculação, como possível resposta do vegetal a uma condição climática adversa, com menor volume de chuvas e altas temperaturas (Figura 1B). Estudos evidenciaram o papel fundamental do K na ativação de enzimas antioxidantes, absorção de água via aquaporinas e ajuste osmótico, com reflexo direto sobre a manutenção de turgor celular em plantas submetidas à seca (WANG et al., 2013; LIU et al., 2006). Adicionalmente, Samarah et al. (2004) evidenciaram que plantas submetidas a

restrição hídrica acumularam maior quantidade de K, Ca, Mo, Mn, Cu e Zn em órgãos reprodutivos, similar aos dados encontrados para o presente estudo, associado a redução significativa de produtividade devido a menor disponibilidade hídrica na segunda safra.

Redução significativa da produtividade de grãos foi verificada para Syn 505 2ªEP, quando as plantas foram inoculadas com a bactéria *A. brasilense* (Figura 15D). Neste sentido, supõe-se que dada a condição de maior temperatura do solo no momento da semeadura, o número de UFC presente na semente foi reduzido drasticamente, de modo que os benefícios da inoculação foram prejudicados. Contudo, a análise de quantificação bacteriana mostrou alta concentração do diazotrófico em plantas com ou sem a bactéria, o que indica possível colonização e elevado crescimento destes organismos nativos do solo em torno da raiz. Bao et al. (2013), ao avaliarem a abundância relativa de *Azospirillum* spp. em plantas de arroz com e sem inoculação, constataram alta colonização radicular da bactéria em parcelas sem a aplicação do microrganismo, sem diferença estatística da condição inoculada. Contudo, tais autores reforçam que o incremento para os parâmetros morfofisiológicos ocorreram exclusivamente em plantas inoculadas. Estudos a nível de DNA bacteriano identificaram que a habilidade da *Azospirillum* sp. associar-se a planta hospedeira, fixar N e produzir auxinas está localizada em um plasmídeo de 90 MDA (mega daltons) na célula, o qual pode ser compartilhado via transferência horizontal de genes entre organismos do solo, bem como ser perdido como estratégia adaptativa ao ambiente (MICHIELS et al., 1990; KATZY et al., 1990; PEREG et al., 2016). Com isso, a re-inoculação torna-se imprescindível para garantir a viabilidade de células e benefícios da interação, o que comprova os dados encontrados no presente estudo para PG e PB na primeira época.

#### **7.4.3 Análise de trilha para produtividade de grãos**

Análises estatísticas que permitam estimar a influência direta ou indireta de uma variável sobre outra, tornam-se imprescindíveis para maximizar manejos que potencializem tais efeitos ligados a PG. Neste sentido, a análise de trilha possibilita conhecer em detalhes a influência de diferentes parâmetros sobre o caractere desejado, bem como justificar a existência de correlações positivas e negativas, de baixa e alta magnitude, em um conjunto de combinações previamente definido (SANTOS et al., 2014).

Para ambos os genótipos avaliados, pela ordem de magnitude dos efeitos diretos para Syn 488 N>P>Chlt>Mn>POD, e Syn 505 Fe>N, observou-se alta correlação do *status*

nutricional das plantas com seu respectivo potencial produtivo. Tais dados reforçam a ideia de que o aumento de produtividade na cultura do milho está diretamente ligado ao incremento da concentração de N, P e Fe no tecido (GALINDO et al., 2016), com valores mínimos de referência considerados adequados na matéria seca em torno de 2,75%, 0,25%, e 20 ppm, respectivamente (MARTINEZ et al., 1999). Sendo assim, plantas submetidas à inoculação com *Azospirillum brasilense* no presente estudo não atingiram níveis satisfatórios para N no tecido foliar, o que pode estar relacionado a baixa eficiência da FBN realizada pela bactéria, em geral abaixo de 50%, com PG significativamente menor comparado a condição nitrogenada (DE SALAMONE et al., 1996; FUKAMI et al., 2016; AGUIRRE et al., 2020), similar aos dados obtidos no presente estudo (Figuras 8 e 15). Contudo, para os demais nutrientes tais níveis foram satisfatoriamente atendidos (Figuras 8, 9, 13 e 14), em resposta a maior absorção de nutrientes em plantas inoculadas com a bactéria. Constatou-se ainda que para Syn 505, a concentração de Fe apresentou efeito positivo direto superior ao N, o que pode estar ligado a maior ativação do sistema de defesa do vegetal, via cofator de enzimas como SOD, CAT e peroxidases (SANTOS et al., 2019), resultando em incremento de produtividade (Figuras 6B, 7B e 15B). Adicionalmente, observou-se que o teor de Chlt (-505) para Syn 488 foi correlacionado negativamente com a PG. Entretanto, tais resultados podem ser explicados pelo momento de coleta das folhas, o qual ocorreu no período de florescimento pleno das plantas. Neste período, reduções significativas para o conteúdo de clorofilas e N nas folhas já foi observado, ligado a mobilização de reservas para os drenos, seguido de um aumento expressivo na eficiência de captura de radiação pelas plantas em resposta ao estágio fenológico crítico (GITELSON et al., 2016; MUCHOW; DAVIS, 1988).

De modo geral, o incremento na atividade de enzimas antioxidantes está relacionado a possíveis mecanismos de tolerância do vegetal a fatores promotores de estresse, desencadeando respostas a nível fisiológico como estratégia adaptativa da planta, com maior estabilidade de produção (LAXA et al., 2019; KAMARUDIN et al., 2018). Logo, a maior atividade enzimática para POD em plantas inoculadas ou que receberam N justificam a maior produtividade de grãos para o genótipo Syn 505 (Figuras 6A e 15A). Adicionalmente, considerando os efeitos indiretos de maior magnitude observados para os respectivos genótipos, grande parte das variáveis analisadas está vinculada a concentração de N, P ou Fe nos tecidos, indicando a relevância dos efeitos diretos discutidos acima.

## 7.5 CONCLUSÕES

A temperatura do solo nos horários de semeadura afetam a inoculação com *Azospirillum brasilense*, modulando as respostas a nível bioquímico e nutricional e PG da cultura do milho.

Semeaduras realizadas às 15 e 18 horas com temperatura do solo de 28 e 25 °C, promoveram incremento significativo na atividade de enzimas do sistema antioxidante de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*.

Horários de semeadura influenciaram o *status* nutricional de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense*, com variação dos resultados dependendo do genótipo testado e época de semeadura, sem um horário específico para a maioria dos nutrientes, exceto N, o qual demonstrou melhores respostas para condições de temperatura do solo próximas de 30 °C.

A interação horários de semeadura x inoculação afetou significativamente a produtividade de grãos, com melhores respostas da inoculação para Syn 488 e Syn 505 1°EP semeadas às 18 horas e 15 e 18 horas, respectivamente.

## 7.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, v.58, n.4, p.921-929, 2009.

AGUIRRE, P. F.; GIACOMINI, S. J.; OLIVO, C. J.; BRATZ, V. F.; QUATRN, M. P.; SCHAEFER, G. L. Biological nitrogen fixation and urea-N recovery in 'Coastcross-1' pasture treated with *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.55, 2020.

ALEN'KINA, S. A.; ROMANOV, N. I.; NIKITINA, V. E. Regulation by *Azospirillum* lectins of the activity of antioxidant enzymes in wheat seedling roots under short-term stresses. **Brazilian Journal of Botany**, v.41, n.3, p.579-587, 2018.

ARSAC, J. F.; LAMOTHE, C.; MULARD, D.; FAGES, J. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. **Agronomie**, v.10, p.640-654, 1990.

AWASTHI, R.; BHANDARI, K.; NAYYAR, H. Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. **Frontiers in Environmental Science**, v.3, 2015.

BAO, Z.; SASAKI, K.; OKUBO, T.; IKEDA, S.; ANDA, M.; HANZAWA, E.; KAKIZAKI, K.; SATO, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Impact of *Azospirillum* sp. B510

Inoculation on Rice-Associated Bacterial Communities in a Paddy Field. **Microbes and environments**, v.28, n.4, p.487–490, 2013.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. In: **Advances in agronomy**, p.77-136, 2010.

BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; LAURETH, J. C. U. *Azospirillum brasilense* affects the antioxidant activity and leaf pigment content of *Urochloa ruziziensis* under water stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46, n.3, p.343-349, 2016.

CHAI, R. et al. Greenhouse gas emissions from synthetic nitrogen manufacture and fertilization for main upland crops in China. **Carbon balance and management**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2019.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.35, p.271-276, 2013.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. v.1. 3ª ed. Viçosa, UFV. 2004, 480p.

DA ROCHA, D. R.; MARIN, V. A. Transgênicos-Plantas produtoras de fármacos (PPF). **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, p. 3339-3347, 2011.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v.2, p.53, 2014.

DE LEÓN, J. L. D.; CASTELLANOS, T.; LING, J.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A.; RODER, M. S. Quantitative trait loci underlying the adhesion of *Azospirillum brasilense* cells to wheat roots. **Euphytica**, v.204, p.81–90, 2015.

DE LIMA, G. C.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; FILHO, M. C. M. T.; MOREIRA, A.; HEINRICHS, R.; FILHO, C. V. S. Yield, yield components and nutrients uptake in zuri guinea grass inoculated with plant growth-promoting bacteria. **International Journal for Innovation Education and Research**, v.8, n.4, 2020.

DE SALAMONE, I. E. G.; DOBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the a <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v.23, p.249-256, 1996.

DEAK, E. A.; MARTIN, T. N.; FIPKE, G. M.; STECA, J. D. L.; TABALDI, L. A.; NUNES, U. R.; WINCK, J. E. M.; GRANDO, L. F. T. Effects of soil temperature and moisture on biological nitrogen fixation in soybean crop. **Australian Journal of Crop Science**, v.13, n.8, 2019.

DJANAGUIRAMAN, M.; PRASAD, P. V.V.; SEPPANEN, M. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.999-1007, 2010.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 1995, 60p.

DROGUE, B.; DORÉ, H.; BORLAND, S.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; PRIGENT-COMBARET, C. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? **Research in Microbiology**, v.163, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília, 2013, 353p.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v.8, 2018.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v.6, p.1-13, 2016.

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v.7, n.1, p.1-13, 2017.

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; OSA, DE LA OSA, C.; VALDERRAMA-FERNÁNDEZ, R.; NOGUEIRA, M. A.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Archives of Microbiology**, v.200, n.8, p.1191-1203, 2018.

GALINDO, F. S.; FILHO, M. C. M. T.; BUZETTI, S.; SANTINI, J. M. K.; ALVES, C. J.; NIGUEIRA, L. M.; LUDKIEWCZ, M. G. Z.; ANDREOTTI, M.; BELLOTE, L. M. Corn Yield and Foliar Diagnosis Affected by Nitrogen Fertilization and Inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.40, 2016.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v.48, n.59, p.315-318, 1977.

GITELSON, A. A.; PENG, Y.; VIÑA, A.; ARKEBAUER, T.; SCHEPERS, S. Efficiency of chlorophyll in gross primary productivity: A proof of concept and application in crops. **Journal of Plant Physiology**, v.201, p.101-110, 2016.

HABIB, N.; ALI, Q.; ALI, S.; JAVED, M. T.; HAIDER, M. Z.; PERVEEN, R.; SHAHID, M. R.; RIZWAN, M.; ABDEL-DAIM, M. M.; ELKELISH, A.; BIN-JUMAH, M. Use of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide for Better Yield of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Water Deficit Conditions: Growth, Osmoregulation, and Antioxidative Defense Mechanism. **Plants**, v.9, 2020.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v.57, p.1332-1334, 1979.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, n.1, p.413-425, 2010.

KAMARUDIN, Z. S.; YUSOP, M. R.; MOHAMED, M. T. M.; ISMAIL, M. R.; HARUN, A. R. Growth Performance and Antioxidant Enzyme Activities of Advanced Mutant Rice Genotypes under Drought Stress Condition. **Agronomy**, v.8, n.12, p.279-294, 2018.

KAPOOR, D.; BHARDWAJ, S.; LANDI, M.; SHARMA, A.; RAMAKRISHMAN, M.; SHARMA, A. The Impact of Drought in Plant Metabolism: How to Exploit Tolerance Mechanisms to Increase Crop Production. **Applied science**, v.10, 2020.

KATZY, E. L.; LOSIPENKO, A. D.; EGORENKOV, D. A.; ZHURAVLEVA, E. A.; PANASENKO, V. I.; IGNATOV, V. V. Involvement of *Azospirillum brasilense* plasmid DNA in the production of indole acetic acid. **FEMS Microbiology Letters**, v.72, p.1-4, 1990.

KAUSHIK, R.; SAXENA, A.; TILAK, K. V. B. R. Can *Azospirillum* strains capable of growing at a sub-optimal temperature perform better in field-grown-wheat rhizosphere. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, n.2, p. 92-95, 2002.

LANDA, B. B.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Influence of temperature on plant–rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of *fusarium* wilt of chickpea. **Plant Pathology**, v.53, p.341–352, 2004.

LAXA, M.; LIEBTHAL, M.; TELMAN, W.; CHIBANI, K.; DIETZ, K. The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. **Antioxidants**, v.8, n.94, 2019.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p.350-382, 1987.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agriculture soil. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v.65, p.4601–4607, 2015.

LIU, H.; SUN, W.; SU, W.; TANG, Z. Co-regulation of water channels and potassium channels in rice. **Physiologia Plantarum**, v.128, p.58–69. 2006.

LORETO, F.; MANNOZZI, M.; MARIS, C.; NASCETTI, P.; FERRANTI, F.; PASQUALINI, S. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v.127, p.1781-1787, 2001.

LQBAL, A.; DONG, Q.; WANG, X.; GUI, H.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; SONG, M. High Nitrogen Enhance Drought Tolerance in Cotton through Antioxidant Enzymatic Activities, Nitrogen Metabolism and Osmotic Adjustment. **Plants**, v.9, n.178, 2020.

LUDUENA, L. M.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; MCINTOSH, M.; BECKER, A.; RUPP, O.; GOESMANN, A.; BLOM, J.; FABRA, A.; TAURIAN, T. Strain Serratia sp. S119: A potential biofertilizer for peanut and maize and a model bacterium to study phosphate solubilization mechanisms. **Applied Soil Ecology**, v.126, p.107-112, 2018.



MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Potássio e do Fósforo, 1997. 319 p.

MARQUES, D. M.; MAGALHÃES, P. C.; MARRIEL, I. E.; JÚNIOR, C. C. G.; DA SILVA, A. B.; MELO, I. G.; DE SOUZA, T. C. *Azospirillum brasilense* favors morphophysiological characteristics and nutrient accumulation in maize cultivated under two water regimes. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.19, 2020.

MARTINEZ, H. E. P.; CARVALHO, J. G.; SOUZA, R. B. Diagnose foliar. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ V., V. H. (eds.). *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais*. 5ª Aproximação. Viçosa: UFV, p.143-168, 1999.

MÉNDEZ-GÓMEZ, M.; CASTRO-MERCADO, E.; ALEXANDRE, G.; GARCÍA-PINEDA, E. Oxidative and antioxidative responses in the wheat-*Azospirillum brasilense* interaction. **Protoplasma**, 2015.

MÉNDEZ-GÓMEZ, M.; CASTRO-MERCADO, E.; ALEXANDRE, G.; GARCÍA-PINEDA, E. Superoxide anion production in the interaction of wheat roots and rhizobacteria *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v.400, p.55-65, 2016.

MICHIELS, K.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* surface polysaccharide mutants that are affected in flocculation. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, p.705-711, 1990.

MOLINA, R.; RIVERA, D.; MORA, V.; LÓPEZ, G.; ROSAS, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; CASSÁN, F. Regulation of IAA Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* under environmental stress conditions. **Current Microbiology**, v.75, p.1408–1418, 2018.

MOLINA-FAVERO, C.; CREUS, C. M.; SIMONTACHI, M.; PUNTARULO, S.; LAMATTINA, L. Aerobic Nitric Oxide Production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato. **Molecular plant-microbe interactions**, v.21, n.7, p.1001-1009, 2008.

MONTGOMERY, D. C.; PECK, E. A. *Introduction to linear regression analysis*. New York: J. Wiley, 1981, 504p.

MORENO-GALVÁN, A.; ROJAS-TAPIAS, D. F.; BONILLA, R. Development and evaluation of an alternative culture medium for mass cultivation of *Azospirillum brasilense* C16 using sequential statistical designs. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v.13, n.2, p.201-206, 2012.

MOUSAVI, S. R.; GALAVI, M.; REZAEI, M. The interaction of zinc with other elements in plants: a review. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v.4, n.24, p.1881-1884, 2012.

MUCHOW, R. C.; DAVIS, R. Effect of nitrogen supply on the comparative productivity of maize and sorghum in a semi-arid tropical environment II. Radiation interception and biomass accumulation. **Field Crops Research**. v.18, p.17–30, 1988.

NURNAEIMAH, N.; MAT, N.; MOHD, K. S.; BADALUDDIN, N. A.; YUSOFF, N.; SAJILI, M. H.; MAHMUD, K.; ADNAN, A. F. M.; KHANDAKER, M. M. The Effects of Hydrogen Peroxide on Plant Growth, Mineral Accumulation, as Well as Biological and Chemical Properties of *Ficus deltoidea*. **Agronomy** v.10, n.4, p.599, 2020.

NUSS, E. T.; TANUMIHARDJO, S. A. Maize: A Paramount Staple Crop in the Context of Global Nutrition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, 2010.

O'NEAL, L.; AKHTER, S.; ALEXANDRE, G. A PilZ-containing chemotaxis receptor mediates oxygen and wheat root sensing in *Azospirillum brasilense*. **Frontiers in Microbiology**, v.10, n.312, 2019.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Koppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Science**, v.11, p.1633–1644, 2007.

PENNA, C.; MASSA, R.; OLIVIERI, F.; GUTKIND, G.; CASSÁN, F. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. **AMB Express**, v.1, n.21, 2011.

PEREG, L.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant and Soil**, v.399, p.389–414, 2016.

PEREIRA, N. C. M.; GALINDO, F. S.; GAZOLA, R. P. D.; DUPAS, E.; ROSA, P. A. L.; MORTINHO, E. S.; FILHO, M. C. M. T. Corn Yield and Phosphorus Use Efficiency Response to Phosphorus Rates Associated With Plant Growth Promoting Bacteria. **Frontiers in Environmental Science**, v.8, 2020a.

PEREIRA, L. C.; PEREIRA, C. B.; CORREIA, L. V.; MATERA, T. C.; DOS SANTOS, R. F.; DE CARVALHO, C.; OSIPI, E. A. F.; BRACCINI, A. L. Corn Responsiveness to *Azospirillum*: Accessing the effect of Root Exudates on the Bacterial Growth and Its Ability to Fix Nitrogen. **Plants**, v.9, 2020b.

PII, Y.; ALDRIGHETTI, A.; VALENTINUZZI, F.; MIMMO, T.; CESCO, S. *Azospirillum brasilense* inoculation counteracts the induction of nitrate uptake in maize plants. **Journal of Experimental Botany**, v.70, n.4, p.1313-1324, 2019.

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

RIETRA, R. P. J. J.; HEINEN, M.; DIMKPA, C. O.; BINDRABAN, P. S. Effects of Nutrient Antagonism and Synergism on Yield and Fertilizer Use Efficiency. **Communications in soil science and plant analysis**, v.48, n.16, p.1895–1920, 2017.

RINKEE VERMA, S. K.; CHOURASIA, M. N.; JHA, M. N. Population dynamics and identification of efficient strains of *Azospirillum* in maize ecosystems of Bihar (India). **3 Biotech**, v.1; p.247–253, 2011.

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

RODRÍGUEZ-SALAZAR, J. SUÁREZ, R.; CABALLERO-MELLADO, J.; ITURRIAGA, G. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. **FEMS Microbiology Letters**, v.296, n.1, p.52-59, 2009.

ROMERO-PERDOMO, F.; CAMELO-RUSINQUE, M.; CRIOLLO-CAMPOS, P.; BONILLA-BUITRAGO, R. Effect of temperature and pH on the biomass production of *Azospirillum brasilense* C16 isolated from Guinea grass. **Pastos y Forrajes**, v.38, n.3, p.231-233, 2015.

SAMARAH, N.; MULLEN, R.; CIANZIO, S. Size Distribution and Mineral Nutrients of Soybean Seeds in Response to Drought Stress. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, n.5, p.815–835, 2004.

SANTOS, A.; CECCON, G.; DAVIDE, L. M. C.; CORREA, A. M.; ALVES, V. B. Correlations and path analysis of yield components in cowpea. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.14, p.82-87, 2014.

SANTOS, C. S.; OZGUR, R.; UZILDAY, B.; TURKAN, I.; RORIZ, M.; RANGEL, A. O. S. S.; CARVALHO, S. M. P.; VASCONCELOS, M. W. Understanding the Role of the Antioxidant System and the Tetrapyrrole Cycle in Iron Deficiency Chlorosis. **Plants**, v.8, n.9, 2019.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Revisão anual de bioquímica**, v.86, p.715-748, 2017.

SKONIESKI, F. R.; VIÉGAS, J.; MARTIN, T. N.; MINGOTTI, C. C. A.; NAETZOLD, S.; TONIN, T. J.; DOTTO, L. R.; MEINERZ, G. R. Effect of nitrogen topdressing fertilization and inoculation of seeds with *Azospirillum brasilense* on corn yield and agronomic characteristics. **Agronomy**, v.9, n.12, p.812, 2019.

SPAEPEN, S.; BOSSUYT, S.; ENGELEN, K.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J. Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. **New Phytologist**, v.201, n.3, p.850-861, 2014.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.487-506, 2000.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre, Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

TRIPATHI, A. K.; KLINGMÜLLER, W. Temperature sensitivity of nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, n.12, p.1238-1241, 1992.

WANG, M.; ZHENG, Q.; SHEN, Q.; GUO, S. The Critical Role of Potassium in Plant Stress Response. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.7370-7390, 2013.

WESTBY, C. A.; ENDERLIN, C. S.; STEINBERG, N. A.; JOSEPH, C. M.; MEEKS, J. C. Assimilation of  $^{13}\text{NH}_4^+$  by *Azospirillum brasilense* Grown under Nitrogen Limitation and Excess. **Journal of Bacteriology**, v.169, n.9, p.4211-4214, 1987.

WHITE P. J. Ion transport. In: THOMAS, B.; MURPHY, D. J.; MURRAY, B. G. (eds) *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Academic Press, London, p.625–634, 2003.

ZERAIK, A. E.; DE SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v.31, n.4, p.731-734, 2008.

ZHANG, F.; WAN, X.; ZHENG, Y.; SUN, L.; CHEN, Q.; ZHU, X.; GUO, Y.; LIU, M. Effects of nitrogen on the activity of antioxidant enzymes and gene expression in leaves of *Populus* plants subjected to cadmium stress. **Journal of Plant Interactions**. v.9, n.1, p.599-609, 2014.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Práticas agrícolas que busquem o melhor uso de recursos do meio, redução de fertilizantes, aliado ao aumento da tolerância de plantas a fatores promotores de estresse tornam-se fundamentais para a criação de uma agricultura mais limpa e sustentável. Neste contexto, bactérias promotoras de crescimento destacam-se no cenário mundial como uma importante alternativa para a criação de sistemas de produção cada vez mais biológicos e auto suficientes. Contudo, o sucesso de inoculantes comerciais em culturas não leguminosas, além da interdependência do genótipo utilizado, pode ser drasticamente afetado pela temperatura a que semente e bactéria são expostas no momento inicial de desenvolvimento da cultura.

Os mecanismos de promoção de crescimento afetados pela temperatura em bactérias *Azospirillum brasilense* associadas a plantas de milho ainda precisam ser melhor elucidados, entretanto, percebe-se que a condição ambiental pode influenciar drasticamente as respostas da inoculação, o que pode explicar a existência de dados insipientes na pesquisa com tais bactérias. Tais respostas aumentam o nível de complexidade em condições de campo, uma vez que a existência de bactérias nativas em altas populações no solo pode influenciar nos resultados, contudo, evidenciou-se que a re-inoculação pode trazer benefícios adicionais para a cultura, justificando o uso de microrganismos benéficos a cada safra.

Por fim, a capacidade de *Azospirillum brasilense* alterar as respostas bioquímicas de plantas de milho, com maior atividade de enzimas antioxidantes em condições de laboratório e a campo, reforça a importância da tecnologia para a obtenção de plantas mais tolerantes a estresses ambientais, desde que o processo de inoculação seja eficiente. Neste sentido, mais estudos relacionados à ocorrência de estresses combinados (temperatura x déficit hídrico) em plantas de milho inoculadas tornam-se imprescindíveis, para garantir a permanência da cultura dentro do sistema de produção, aliado a redução de custos com aplicação de fertilizantes nitrogenados.

## ANEXO A – ANÁLISE DE SOLO

Protocolo		Identificação da amostra		Área (ha)	Sistema de cultivo	Prof. (cm)	Georref.	
15578	S					0-20		
15579	N					0-20		

Protocolo	pH água 1:1	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC efet.	Saturação (%)		Índice SMP
		cmol <sub>c</sub> dm <sup>3</sup>					Al	Bases	
15578	5,6	5,2	2,1	0,0	3,1	7,5	0,0	70,6	6,3
15579	5,2	5,0	2,1	0,8	7,7	8,0	10,0	48,5	5,5

Protocolo	pH água 1:1	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC efet.	Saturação (%)		Índice SMP
		cmol <sub>c</sub> dm <sup>3</sup>					Al	Bases	
15578	5,6	5,2	2,1	0,0	3,1	7,5	0,0	70,6	6,3
15579	5,2	5,0	2,1	0,8	7,7	8,0	10,0	48,5	5,5


Protocolo	% MO	% Argila	Textura	S	P-Mehlich	C Total*	K	CTC pH7	K
	m/v			mg/dm <sup>3</sup>		g.kg <sup>-1</sup>	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>		mg/dm <sup>3</sup>
15578	2,1	23,0	3,0	--X--	12,9	--X--	0,133	10,6	52,0
15579	2,2	27,0	3,0	--X--	7,5	--X--	0,102	14,9	40,0

Protocolo	Cu	Zn	B	Fe	Mn	Na	Relações Molares		
	mg/dm <sup>3</sup>						Ca/Mg	(Ca+Mg)/K	K/(Ca+Mg) <sup>1/2</sup>
15578	--X--	--X--	--X--	--X--	--X--	--X--	2,5	55,20	0,049
15579	--X--	--X--	--X--	--X--	--X--	--X--	2,4	69,80	0,038

Os dados analíticos são de exclusividade da amostra  
Vinculado a ROLAS-RS/SC



SELO DE QUALIDADE  
ANÁLISE BÁSICA  
+MICRONUTRIENTES  
ROLAS  
2019

Assinatura digital  
**DE-FF-9E-1A-E6-A7-DD-2A-31-12-17-EF-4D-60-F0-DA**  
Para autenticar acesse <http://silas.ccr.ufsm.br>, em "Autenticar" informe a sequência acima.  
**Responsável técnico: Sandro José Giacomini - CREA/RS 100472**

Pagamento Realizado  
\* Determinado em analisador elementar-combustão seca