

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ALEX PINTO DE MATOS

INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* PARA AMENIZAÇÃO DOS EFEITOS DO
DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO, FEIJÃO, TRIGO E SOJA

PONTA GROSSA

2024

ALEX PINTO DE MATOS

INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* PARA AMENIZAÇÃO DOS EFEITOS DO
DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO, FEIJÃO, TRIGO E SOJA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de Concentração: Agricultura. Linha de Pesquisa: Uso e Manejo do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires

PONTA GROSSA – PR

2024

M433 Matos, Alex Pinto
 Inoculação de *Azospirillum brasilense* para amenização dos efeitos do
déficit hídrico em plantas de milho, feijão, trigo e soja / Alex Pinto Matos. Ponta
Grossa, 2024.
 104 f.

 Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração: Ciência do Solo e
Recursos Ambientais), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires.

 1. Bactérias diazotróficas. 2. Déficit hídrico. 3. Nutrição - Plantas. 4.
Segurança alimentar. I. Caires, Eduardo Fávero. II. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Ciência do Solo e Recursos Ambientais. III.T.

 CDD: 633



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

TERMO

ALEX PINTO DE MATOS

INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* PARA AMENIZAÇÃO DOS EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO, FEIJÃO, TRIGO E SOJA.

Tese apresentada para obtenção do título

doutor em Agronomia na Universidade

Estadual de Ponta Grossa, Área de Ciência

do Solo e Recursos Ambientais.

Ponta Grossa, 29 de julho de 2024.

Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires - Orientador
Doutor em Agronomia
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª. Dra. Carolina Weigert Galvão
Doutora em Ciências
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Daniel Ruiz Potma Gonçalves
Doutor em Agronomia
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Fernando José Garbuio
Doutor em Agronomia
Instituto Federal de Santa Catarina

Dr. Hélio Antônio Wood Joris
Doutor em Agricultura Tropical e Subtropical
Fundação ABC



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Favero Caires, Professor(a)**, em 30/07/2024, às 11:57, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Helio Antonio Wood Joris, Usuário Externo**, em 30/07/2024, às 15:57, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Weigert Galvao, Professor(a)**, em 30/07/2024, às 18:52, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Fernando José Garbuio, Usuário Externo**, em 01/08/2024, às 08:26, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Ruiz Potma Goncalves, Professor(a)**, em 07/08/2024, às 20:56, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **2108607** e o código CRC **FDF34F43**.

À toda minha família que me incentivou de várias formas em todos os momentos do processo de formação e obtenção deste título.

AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus autor da vida e provedor de todas as coisas.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para conclusão dessa pesquisa.

Ao meu orientador Eduardo Fávero Caires pela orientação e conhecimento compartilhado.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa em nome do Programa de Pós Graduação em Agronomia pelo suporte e apoio dos recursos para análises laboratoriais.

À toda equipe do Laboratório de Fertilidade do Solo-LABFER que estiveram contribuindo para condução da pesquisa.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pelo apoio financeiro por meio da bolsa de estudos.

O temor do Senhor é o princípio da sabedoria (Provérbios 9:10).

RESUMO

O déficit hídrico é um dos principais problemas da agricultura em todo mundo, pois pode causar danos severos no metabolismo das plantas, ocasionando perdas significativas que podem chegar a mais de 50% dependendo do estágio de desenvolvimento das culturas. Nesse sentido, as práticas de manejo que visam a amenização do déficit hídrico são um dos principais desafios do setor agrícola. As plantas com sistemas radiculares longos, com maior comprimento, menor diâmetro e alta incidência de pelos mais longos têm maior potencial para aquisição de recursos do solo, produção de biomassa e fotoassimilados. O uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas tem sido uma prática utilizada para aumentar a resistência das plantas a estresses abióticos, isso porque podem melhorar o sistema radicular bem como produção de fitormônios que podem amenizar efeitos deletérios de déficit hídrico. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da inoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense*, sem e com restrição hídrica, no desempenho das culturas de milho, feijão, trigo e soja em duas condições hídricas. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na Universidade Estadual de Ponta Grossa na região Centro-Sul do Paraná. Foi utilizado delineamento em blocos completos ao acaso, no esquema fatorial 3×2 , com três repetições. Cada experimento continha os seguintes tratamentos: sem inoculação, com inoculação de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e com inoculação de *A. brasilense* HM053; sem e com déficit hídrico. As condições hídricas foram definidas de acordo com a capacidade de campo, em que 80% eram tratamentos sem estresse e 40% da capacidade de campo era os tratamentos com estresse. Aos 50 dias após a semeadura foram determinados os seguintes parâmetros: fotossíntese líquida, condutância estomática, concentração de carbono intracelular e transpiração nas culturas de soja e milho; leitura de clorofila, produção de matéria seca da parte aérea e de raízes, e extração de nutrientes pelas plantas de milho, feijão, trigo e soja. Os resultados foram submetidos à análise de variância, e os efeitos dos tratamentos envolvendo inoculação de estirpes de *A. brasilense* e níveis de água foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Os parâmetros fotossintéticos nas plantas de milho e soja não apresentaram resposta significativa mediante uso das estirpes AbV5-AbV6 ou HM053. Para as culturas de milho e trigo, as clorofilas *a* e *b* não apresentaram diferença significativa para nenhuma das fontes de variação, mostrando que a inoculação e o déficit hídrico não tiveram influência nesses parâmetros dessas culturas. Plantas de milho inoculadas com HM053 apresentaram maior biomassa da parte aérea e extração de nitrogênio. Já, as plantas de trigo apresentaram maior densidade de raízes quando inoculadas com HM053. Na cultura do feijão observou-se que a co-inoculação com HM053 reduziu os índices de clorofila *a* e *b*, assim como número e massa de nódulos, e massa seca da parte aérea. A indução de déficit hídrico reduziu significativamente o índice de clorofila *b* e a produção de biomassa do feijoeiro. O uso das estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053 não amenizaram os efeitos negativos do déficit hídrico nas culturas de milho, soja, trigo e feijão.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas, déficit hídrico, nutrição de plantas, segurança alimentar.

ABSTRACT

Water deficit is one of the major problems in agriculture worldwide, as it can cause severe damage to plant metabolism, resulting in significant losses that can exceed 50% depending on the crop development stage. Therefore, management practices aimed at mitigating water deficit represent one of the main challenges in the agricultural sector. Plants with longer root systems, characterized by greater length, smaller diameter, and higher incidence of longer root hairs, have greater potential for soil resource acquisition, biomass production, and assimilate formation. The use of plant growth-promoting bacteria has been a practice to enhance plant resistance to abiotic stresses, as they can improve root systems and produce phytohormones that mitigate the deleterious effects of water deficit. This study aimed to evaluate the effects of inoculating strains of *Azospirillum brasilense*, with and without water restriction, on the performance of maize, bean, wheat, and soybean under two water conditions. Experiments were conducted in a greenhouse at the State University of Ponta Grossa in the Centro-Sul region of Paraná, Brazil. The experiments followed a randomized complete block design in a 3×2 factorial scheme with three replications. Each experiment included the following treatments: without inoculation, inoculation with *A. brasilense* strains AbV5-AbV6, and inoculation with *A. brasilense* strain HM053; without and with water deficit. Water conditions were defined based on field capacity, where 80% represented the non-stress treatments and 40% represented the water deficit treatments. At 50 days after sowing, the following parameters were measured: net photosynthesis, stomatal conductance, intracellular carbon concentration, and transpiration in soybean and maize crops; chlorophyll readings, aboveground and root biomass production, and nutrient extraction by maize, beans, wheat, and soybean plants. The results were subjected to analysis of variance, and treatment effects involving inoculation with *A. brasilense* strains and water levels were compared using Tukey's test at the 5% significance level. Photosynthetic parameters in maize and soybean plants did not show significant responses to the use of AbV5-AbV6 or HM053 strains. For maize and wheat crops, chlorophyll *a* and *b* levels did not differ significantly for any of the variation sources, indicating that inoculation and water deficit did not influence these parameters in these crops. Maize plants inoculated with HM053 showed higher aboveground biomass and nitrogen extraction. Wheat plants exhibited improved root density when inoculated with HM053. In bean cultivation, co-inoculation with HM053 reduced chlorophyll *a* and *b* indices, as well as the number and mass of nodules and aboveground dry mass. The induction of water deficit significantly reduced chlorophyll *b* levels and bean biomass production. The use of *A. brasilense* strains AbV5-AbV6 and HM053 did not mitigate the negative effects of water deficit in the maize, soybean, wheat, and bean crops.

Keywords: Diazotrophic bacteria, water deficit, plant nutrition, food security.

LISTA DE FIGURA

Figura 2.1 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na densidade de raízes de trigo na camada de solo 0 a 10 cm.....	52
Figura 2.2 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na extração de K pelas plantas de trigo.....	54
Figura 2.3 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na extração de Ca pelas plantas de trigo.	56
Figura 2.4 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na extração de Mg pelas plantas de trigo.	56

LISTA DE TABELA

Tabela 1.1 - Resultados das análises químicas de solo da camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm), antes da instalação do experimento nos tubos de PVC.	26
Tabela 1.2 - Clorofila <i>a</i> (CLF <i>a</i>), clorofila <i>b</i> (CLF <i>b</i>) e clorofila total (CLFT) em plantas de milho considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).	29
Tabela 1.3 - Correlação linear entre fotossíntese líquida (FL), condutância estomática (GS), carbono no mesófilo (Ci), transpiração (T), eficiência do uso da água (EUA) e eficiência da carboxilação (ECi), clorofila <i>a</i> (CLF <i>a</i>), clorofila <i>b</i> (CLF <i>b</i>) e clorofila total (CLFT) da cultura do milho submetido a déficit hídrico.	30
Tabela 1.5 – Fotossíntese líquida (FL), Condutância estomática (GS), carbono no mesófilo (Ci), Transpiração (T), eficiência do uso da água (EUA) e eficiência da carboxilação (ECi) em plantas de milho, considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.	31
Tabela 1.6 – Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), densidade de raízes e biomassa total de plantas de milho, considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.	34
Tabela 1.7 - Extração de nutrientes pelas de milho, considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).	36
Tabela 2.1 - Resultados das análises químicas de solo da camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm), antes da instalação do experimento nos tubos de PVC.	47
Tabela 2.2 . Clorofila <i>a</i> (CLF <i>a</i>), clorofila <i>b</i> (CLF <i>b</i>) e clorofila total (CLF total) em plantas de trigo considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).	50
Tabela 2.3 – Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), densidade de raízes e biomassa total de plantas de trigo, considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.	51
Tabela 2.4 - Extração de nutrientes pelas de trigo, considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).	53
Tabela 3.1 - Resultados das análises químicas de solo da camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm), antes da instalação do experimento nos tubos de PVC.	65
Tabela 3.2 - Clorofila <i>a</i> (CLF <i>a</i>), clorofila <i>b</i> (CLF <i>b</i>) e clorofila total (CLF total) em plantas de feijão considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH) aos 50 dias após emergência.	68

Tabela 3.3 – Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), densidade de raízes e biomassa total de plantas de feijão, considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.....	69
Tabela 3.4 - Desdobramento da interação entre co-inoculação (I) e déficit hídrico (DH) densidade de raiz de plantas de feijão na camada 20 a 50 cm.....	70
Tabela 3.5 - Número e massa seca de nódulos de plantas de feijão considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.....	72
Tabela 3.6 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) para número de nódulos em plantas de feijão.	73
Tabela 3.7 - Extração de nutrientes pelas plantas de feijão, considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.	74
Tabela 3.8 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na extração de nitrogênio por plantas de feijão.	75
Tabela 3.9 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na extração de fósforo por plantas de feijão.	75
Tabela 4.1 - Resultados das análises químicas de solo da camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm), antes da instalação do experimento nos tubos de PVC.	87
Tabela 4.2 . Clorofila <i>a</i> (CLF <i>a</i>), clorofila <i>b</i> (CLF <i>b</i>) e clorofila total (CLF total) em plantas de soja considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).....	90
Tabela 4.3 - Fotossíntese líquida (FL), condutância estomática (GS), carbono no mesófilo (Ci), transpiração (T), eficiência do uso da água (EUA) e eficiência da carboxilação (ECi) em plantas de soja, considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).	91
Tabela 4.4 – Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), densidade de raízes e biomassa total de plantas de soja, considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de <i>A. brasilense</i> AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.....	92
Tabela 4.5 - Desdobramento da interação entre co-inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na densidade de raízes de soja na camada de solo de 0 a 10 cm, aos 50 dias após a emergência.	94
Tabela 4.6 - Desdobramento da interação entre co-inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na densidade de raízes de soja na camada de solo de 20 a 50 cm, aos 50 dias após emergência.	94
Tabela 4.7 - Desdobramento da interação entre co-inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na densidade de raízes de soja em toda a coluna de solo (0 a 50 cm), aos 50 dias após emergência.	95

Tabela 4.8 - Número e massa de nódulos de soja na camada de 0 a 10 cm e em toda a coluna de solo (0 a 50 cm), considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH). 96

Tabela 4.9 - Extração de nutrientes pelas plantas de soja, considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência. 99

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	16
INTRODUÇÃO GERAL	17
REFERÊNCIAS	20
CAPITULO 1. INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> PARA AMENIZAÇÃO DOS EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO	22
1.1 INTRODUÇÃO.....	23
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1.2.1 Local do estudo e delineamento experimental	24
1.2.2 Inoculação das sementes e semeadura do milho	25
1.2.3 Condicionamento do déficit hídrico	26
1.2.4 Avaliação de parâmetros relacionados à fotossíntese.....	27
1.2.5 Leitura de clorofila	27
1.2.6 Produção de matéria seca da parte aérea e de raízes	27
1.2.7 Extração de nutrientes pelas plantas	28
1.2.8 Análises estatísticas	28
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
1.3.1 Índice de clorofila em plantas de milho.....	28
1.3.2 Parâmetros fotossintéticos nas plantas de milho	31
1.3.3 Produção da biomassa de plantas de milho	33
1.3.4 Acúmulo de nutrientes na parte aérea de plantas de milho	35
1.4 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 2. INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> PARA AMENIZAÇÃO DOS EFEITOS DE DEFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE TRIGO.....	43
2.1 INTRODUÇÃO.....	44
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.2.1 Local do estudo e delineamento experimental	46

2.2.2 Inoculação das sementes e semeadura do trigo	46
2.2.3 Condicionamento do déficit hídrico	48
2.2.4 Leitura de clorofila	48
2.2.5 Produção de matéria seca da parte aérea e de raízes	48
2.2.6 Extração de nutrientes pelas plantas	49
2.2.7 Análises estatísticas	49
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
2.3.1 Índice de clorofila em plantas de trigo	49
2.3.2 Produção de biomassa de plantas de trigo	50
2.3.3 Acúmulo de nutrientes na parte aérea de plantas de trigo	53
2.4 CONCLUSÕES	57
REFERENCIAS	57
CAPÍTULO 3. CO-INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> PARA AMENIZAÇÃO DOS EFEITOS DE DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE FEIJÃO	61
3.1 INTRODUÇÃO.....	62
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3.2.1 Local do estudo e delineamento experimental	64
3.2.2 Co-inoculação das sementes e semeadura do feijão	64
3.2.3 Condicionamento do déficit hídrico	66
3.2.4 Leitura de clorofila	66
3.2.5 Matéria seca da parte aérea e de raízes e número e massa de nódulos	66
3.2.6 Extração de nutrientes pelas plantas	67
3.2.7 Análises estatísticas	67
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.3.1 Índice de clorofila em plantas de feijão.....	67
3.3.2 Produção de biomassa de plantas de feijão	68
3.3.3 Nodulação em plantas de feijão.....	71
3.3.4 Acúmulo de nutrientes em plantas de feijão.....	73

3.4 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO 4. CO-INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> PARA AMENIZAÇÃO DOS EFEITOS DE DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE SOJA	83
4.1 INTRODUÇÃO.....	84
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
4.2.1 Delineamento experimental e local do estudo	85
4.2.2 Co-inoculação das sementes e semeadura da soja.....	86
4.2.4 Condicionamento do déficit hídrico	87
4.2.5 Avaliação de parâmetros relacionados a fotossíntese.....	88
4.2.6 Leitura de clorofila	88
4.2.7 Matéria seca da parte aérea e de raízes e número e massa de nódulos.....	88
4.2.8 Extração de nutrientes pelas plantas	89
4.2.9 Análises estatísticas	89
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
4.3. Índice de clorofila em plantas de soja	89
4.3.2 Parâmetros fotossintéticos nas plantas de soja	90
4.3.3 Produção de biomassa de plantas de soja	92
4.3.4 Nodulação em plantas de soja	96
4.3.5 Acúmulo de nutriente em plantas de soja.....	98
4.4 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS	100
CONCLUSÕES GERAIS	104

APRESENTAÇÃO

Esta tese foi escrita de acordo com o “Manual de padronização bibliográfica de trabalhos científicos, UEPG (2019)” e é composta por quatro capítulos:

Capítulo 1. Inoculação de *Azospirillum brasilense* para amenização dos efeitos de déficit hídrico em plantas de milho

Capítulo 2. Inoculação de *Azospirillum brasilense* para amenização dos efeitos de déficit hídrico em plantas de trigo

Capítulo 3. Co-inoculação de *Azospirillum brasilense* para amenização dos efeitos de déficit hídrico em plantas de feijão

Capítulo 4. Co-inoculação de *Azospirillum brasilense* para amenização dos efeitos de déficit hídrico em plantas de soja

Todos os capítulos reproduzem literalmente a pesquisa realizada e existe interligações entre os capítulos por se tratar do mesmo projeto de tese. Para facilitar a leitura, cada capítulo é independente dos demais. Antecedendo o primeiro capítulo, há uma introdução geral e o último item é composto pelas conclusões gerais.

INTRODUÇÃO GERAL

Estudos mostram projeções de aumento significativo da população nos próximos anos, bem como na expectativa de vida em todo o mundo, o que necessariamente requer produção de maiores quantidades de alimentos para suprir toda demanda global (FAO, 2022). As culturas de soja, milho, trigo e feijão se destacam no cenário nacional e mundial devido à alta demanda global por produtos advindos desses cultivos, havendo necessidade de elevar a oferta desses produtos. A alta demanda mundial de grãos de soja, por exemplo, se deve a sua ampla utilidade que vai desde a alimentação humana e animal, até as indústrias farmacêuticas e de tecnologia (Chen et al., 2012). O milho, além de ser usado na alimentação humana e animal, também é utilizado para a produção de biocombustíveis, dentre outras aplicações. A cultura do feijão e trigo são de fundamental para segurança alimentar pois são tem sua principal aplicação a indústria alimentícia.

Normalmente, para se aumentar a produção dos produtos agrícolas é preciso intensificar e expandir a agricultura por meio de aumento da área cultivada, o que consequentemente deve aumentar o consumo de insumos agrícolas, incluindo pesticidas, fertilizantes e desmatamento de novas áreas (McArthur; McCord, 2017) bem como questionamentos sobre a contribuição das atividades agrícolas para mudanças climáticas no planeta. Por isso, será também necessário o desenvolvimento de práticas sustentáveis e alternativas que possam atenuar os efeitos de adversidades na cadeia produtiva, aumentando a produtividade das culturas e a produção agrícola de forma que seja suficiente para atender a demanda global.

Um dos maiores desafios na agricultura atual é o desenvolvimento de práticas de manejo que visem reduzir os efeitos de períodos secos durante os cultivos, de forma a evitar perdas no rendimento das culturas. As mudanças climáticas globais em curso, a gravidade, a frequência e a duração das secas em muitas áreas de produção agrícola ao redor do mundo tendem a aumentar de forma imprevisível (Solomon et al., 2007). Estudos mostram que os modelos climáticos projetam diminuição da frequência das chuvas aliada ao aumento das temperaturas, o que aumentará ainda mais a diferença entre o rendimento real e o rendimento potencial das plantas cultivadas (Rani et al., 2020) ou seja redução significativas na produção.

O déficit hídrico causa danos severos no metabolismo das plantas, os quais resultam em perdas que podem chegar a mais de 50%, dependendo do estágio de desenvolvimento das culturas como tem se observado no Brasil nos últimos anos (MAPA, 2022). Por isso, a escassez de água para uso agrícola tem sido o foco de debates e é cada vez mais percebida como uma ameaça socioambiental global à segurança alimentar e energética (Kummu et al., 2016). O

relatório mostrado pelo Painel Intergovernamental para as Alterações Climáticas (IPCC, 2021) indicou que a mudança no clima futuro é inevitável e, provavelmente, terá impacto significativo nos setores que depende da água, principalmente nos países em desenvolvimento, os quais possuem capacidade limitada de adaptação às mudanças climáticas.

Quando ocorre déficit hídrico, as plantas reduzem processos fisiológicos, afetando o seu desenvolvimento. A restrição hídrica também pode desencadear estresse osmótico nas plantas que, na ausência de ajuste osmótico, impede a atividade enzimática e prejudica a estrutura das macromoléculas devido à redução nas trocas gasosas, na fotossíntese e em outros processos fundamentais para o crescimento, o desenvolvimento e a produção de biomassa (Mafakheri et al., 2010; Mwadzingeni et al., 2016). A redução do rendimento das culturas agrícolas devido a irregularidade da precipitação hídrica durante os ciclos das culturas tem se tornado uma preocupação global. No Brasil, por exemplo, a redução da produtividade de trigo na safra de 2023 foi de mais de 20%, mesmo em um cenário em que houve aumento da área cultivada no país (CONAB, 2023). Em se tratando de uma cultura em que a produção nacional atende apenas cerca de 50% da demanda interna, a situação fica mais preocupante.

A prevenção contra efeitos adversos de períodos de seca requer práticas de manejo que muitas vezes requer alta demanda de insumo. A irrigação, por exemplo é a maneira mais eficiente de suprir o déficit hídrico das culturas. Entretanto, devido ao alto custo, a falta de recurso hídrico para irrigar toda área cultivada e em alguns casos a impossibilidade da operacionalidade em alguns locais, torna inviável implementar a técnica de irrigar em todas as áreas cultivadas. A adoção de técnicas de manejo de solo que visam construir um perfil de solo mais favorável para o desenvolvimento das plantas, bem como aumentar a cobertura vegetal no solo são outras alternativas imprescindíveis que podem contribuir para as plantas suportarem períodos de estresse por déficit hídrico, porém são manejos que precisam de anos para serem efetivos.

Nesse sentido, o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas tem sido uma prática utilizada para tentar aumentar a tolerância das plantas aos estresses abióticos, dentre eles déficit hídrico. Essas bactérias podem habitar a rizosfera das raízes vivendo em uma associação simbiótica com as plantas. Dentre essas bactérias se destacam o gênero *Azospirillum*, que possuem a capacidade de promover o desenvolvimento do sistema radicular (Santos et al., 2017). Bulegon et al. (2016) afirmaram que a inoculação de *Azospirillum brasilense* estirpes AbV5 e AbV6 em gramíneas foi eficaz na elevar a atividade das enzimas superóxido de dismutase e catalase sob forte déficit hídrico, não permitindo redução no teor de clorofila e,

ainda, promovendo incremento de outros carotenoides, o que manteve as plantas em atividade regular durante o período de seca.

Estudo realizado por Rodino et al. (2019) na cultura da soja mostrou que a co-inoculação de *A. brasilense* com *Bradyrhizobium* spp melhorou a morfologia do sistema radicular, aumentando o comprimento e o volume de raízes, e aumentou o número de ramos e a abundância de pelos radiculares, bem como a nodulação. Hungria et al. (2010) também relataram que o uso de *A. brasilense* no cultivo de trigo pode melhorar a produção da cultura por melhorar a absorção de nutrientes pelas plantas.

Certamente, o uso de técnicas de manejo mais sustentáveis para aumentar a produtividade ou até mesmo evitar perdas quando as culturas passam por condições adversas, é uma necessidade da agricultura atual. Recentemente, em uma metanálise realizada por Barbosa et al. (2022), verificou-se que o uso de *A. brasilense* no cultivo de milho estimulou significativamente o crescimento do sistema radicular, aumentou as concentrações de nitrogênio nas folhas e nos grãos, bem como promoveu aumento na produtividade de grãos sob diversas condições agronômicas e edafoclimáticas.

A inoculação ou co-inoculação de bactérias promotoras do crescimento como *A. brasilense* tem crescido bastante na agricultura, especialmente nos últimos anos. Entretanto, é preciso conhecer melhor as condições que proporcionam maior potencial de resposta dessa tecnologia por meio de estudos de interação entre plantas e bactérias, especialmente em condições adversas de disponibilidade hídrica. Um dos desafios é selecionar estirpes que são realmente eficazes em proporcionar os benéficos esperados nas diversas condições de cultivo. A estirpe HM053 de *A. brasilense* tem sido estudada e tem apresentado resultados promissores. A utilização dessa estirpe tem promovido melhor desenvolvimento de plantas de milho e trigo, principalmente pela fixação de nitrogênio do ar e aumento na produção de biomassa, especialmente do sistema radicular, o que pode ocasionar melhor exploração do solo e aumento na absorção de nutrientes (Santos et al., 2017; Pedrosa et al., 2020). Nesse sentido, objetivou-se com esse trabalho avaliar a eficiência das estirpes AbV5-AbV6 e HM053 de *A. brasilense* em atenuar os efeitos negativos causados pelo déficit hídrico no desenvolvimento inicial das culturas de milho, trigo, feijão e soja.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, J. Z., DE ALMEIDA ROBERTO, L., HUNGRIA, M., CORRÊA, R. S., MAGRI, E.; CORREIA, T. D. Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasilense* inoculation in Brazil: Benefits and lessons to improve inoculation efficiency. **Applied Soil Ecology**, v. 170, p. 104276, 2022.
- 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.
- CHEN, K. I., ERH, M. H., SU, N. W., LIU, W. H., CHOU, C. C.; CHENG, K. C. Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 9-22, 2012.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos: décimo segundo levantamento, setembro de 2023, safra 2022/2023. Brasília, DF, v. 10, n.12, 110 p. 2023.
- FAO Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (2022) Dados sobre alimentação e agricultura. Produção - Culturas. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acessado em 16 de maio de 2024
- 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, p. 413-425, 2010.
- IPCC Summary for Policymakers. In: Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 3 – 32, 2021
- KUMMU, M., GUILLAUME, J. H., DE MOEL, H., EISNER, S., FLÖRKE, M., PORKKA, M.; WARD, P. J. The world's road to water scarcity: shortage and stress in the 20th century and pathways towards sustainability. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2016.
- MAFAKHERI, A., SIOSEMARDEH, A. F., BAHRAMNEJAD, B., STRUIK, P. C.; SOHRABI, Y. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 8, p. 580-585, 2010.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Histórico de perdas na agricultura brasileira: 2000-2021. Brasília, 1ª ed. p.111, 2022.
- MCARTHUR, J. W.; MCCORD, G. C. Fertilizing growth: Agricultural inputs and their effects in economic development. **Journal of Development Economics**, v. 127, p. 133-152, 2017.

MWADZINGENI, L., SHIMELIS, H., TESFAY, S.; TSILO, T. J. Screening of bread wheat genotypes for drought tolerance using phenotypic and proline analyses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 182193, 2016.

PEDROSA, F. O., OLIVEIRA, A. L. M., GUIMARÃES, V. F., ETTO, R. M., SOUZA, E. M., FURMAM, F. G.; GALVÃO, C. W. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, p. 45-56, 2020.

RANI, A., DEVI, P., JHA, U. C., SHARMA, K. D., SIDDIQUE, K. H.; NAYYAR, H. Developing climate-resilient chickpea involving physiological and molecular approaches with a focus on temperature and drought stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 478034, 2020.

RODIÑO, A. P., RIVEIRO, M.; DE RON, A. M. Implications of the symbiotic nitrogen fixation in common bean under seasonal water stress. **Agronomy**, v. 11, n. 1, p. 70, 2020.

SANTOS, A. R. S., ETTO, R. M., FURMAM, R. W., DE FREITAS, D. L., SANTOS, K. F. D. E. N., DE SOUZA, E. M.; GALVÃO, C. W. Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 422-426, 2017.

SOLOMON, S., QIN, D., MANNING, M., CHEN, Z., MARQUIS, M., AVERY, K M., TIGNOR, M. L. H. **Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC**. Cambridge university press, v.1, 2007.

CAPITULO 1. INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* PARA AMENIZAÇÃO DOS EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO

INOCULATION OF *Azospirillum brasilense* IN MITIGATING THE EFFECTS OF WATER DEFICIT IN MAIZE PLANTS

RESUMO – Bactérias do gênero *Azospirillum* podem contribuir para o bom desenvolvimento das plantas de milho, seja fornecendo nitrogênio ou produzindo fito-hormônios que atenuem os possíveis problemas fisiológicos que ocorrem durante o déficit hídrico. Por isso, objetivou-se com esse trabalho avaliar o desempenho de plantas de milho com sementes inoculadas com duas estirpes de *A. brasilense*, em duas condições hídricas. O trabalho foi realizado em casa de vegetação, no esquema fatorial 3×2 , com três repetições. Os tratamentos foram: sem inoculação, com inoculação de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e com inoculação de *A. brasilense* HM053; sem e com déficit hídrico. As sementes de milho híbrido AG 9025 PRO3, foram inoculadas com inoculantes líquidos, na dose de 3 mL kg^{-1} de sementes. Condicionaram-se dois regimes hídricos, 80% da capacidade de campo de forma constante e elevar a capacidade de campo para 80% quando o solo atingisse 40%. O milho foi cultivado em tubos de policloreto de vinila com dimensões de 50 cm de altura e 15 cm de diâmetro. Avaliaram-se parâmetros fotossintéticos como fotossíntese líquida, carbono no mesófilo, transmitância, eficiência do uso da água e de clorofila, biomassa da parte aérea e do sistema radicular, e extração de nutrientes pelas plantas. A inoculação das sementes com as estirpes AbV5-AbV6 e HM053 de *A. brasilense* não influenciou os parâmetros fotossintéticos e índice de clorofila em plantas de milho. A biomassa total e o acúmulo de nitrogênio em plantas de milho foram maior com a inoculação de *A. brasilense* estirpe HM053. Plantas com déficit hídrico apresentaram menor concentração de carbono intracelular. As estirpes não atenuaram efeitos negativos do déficit hídrico.

Palavras-chave – *Zea mays*; Bactérias promotoras de crescimento vegetal; HM053

ABSTRACT- Bacteria of the genus *Azospirillum* can contribute to the proper development of maize plants, either by providing nitrogen or by producing phytohormones that mitigate potential physiological problems that occur during water deficit. Therefore, the objective of this study was to evaluate the performance of maize plants with seeds inoculated with two strains of *A. brasilense* under two water conditions. The study was conducted in a greenhouse, in a 3×2 factorial scheme, with three repetitions. The treatments were: without inoculation, with inoculation of *A. brasilense* AbV5-AbV6, and with inoculation of *A. brasilense* HM053; without and with water stress. The seeds of the hybrid maize AG 9025 PRO3 were inoculated with liquid inoculants at a dose of 3 mL kg^{-1} of seeds. Two water regimes were conditioned: a constant 80% field capacity and raising the field capacity to 80% when the soil reached 40%. The maize was cultivated in polyvinyl chloride tubes with dimensions of 50 cm in height and 15 cm in diameter. Photosynthetic parameters such as net photosynthesis, mesophyll carbon, transmittance, water use efficiency, chlorophyll efficiency, shoot and root biomass, and nutrient extraction by the plants were evaluated. The inoculation of seeds with the strains AbV5-AbV6 and HM053 of *A. brasilense* did not influence the photosynthetic parameters and chlorophyll index in maize plants. Total biomass and nitrogen accumulation in maize plants were higher with the inoculation of *A. brasilense* strain HM053. Plants under water deficit showed lower Ci concentration. The strains did not mitigate the negative effects of water deficit.

Key words - *Zea mays*; Plant growth-promoting bacteria; HM053

1.1 INTRODUÇÃO

A demanda por produtos agrícolas aumenta com o crescimento da população mundial. Um dos principais desafios para o aumento da produção agrícola no mundo é aumentar a oferta de produtos de forma sustentável e que seja aumento de forma vertical, ou seja aumentar a produção por unidade de área sem que haja a necessidade de ocorrer desmatamento acelerado, uma vez que as áreas destinadas aos cultivos são limitadas. A cultura do milho (*Zea mays* L.), é uma das culturas mais importantes do mundo, devido as diversas utilidades que possui. Além de ser usado na alimentação humana ou animal os grãos de milho são usados como matéria prima na produção de vários produtos, dentre eles, bebidas, polímeros e combustíveis (Shad, et al 2021). No Brasil, o milho é o segundo cereal mais produzido, porém, com o aumento da população mundial e a expectativa futura de que a demanda por grãos de milho aumente de forma significativa, mostra a importância de elevar sua produção (CONAB, 2024).

É verdade que nos últimos anos a produção mundial de produtos advindos da agricultura aumentou consideravelmente devido à adoção de novas tecnologias no processo produtivo e principalmente aumento de área cultivada. Entretanto, fatores climáticos vêm preocupando o setor agrícola por afetar de forma significativa o desenvolvimento dessa cultura. A instabilidade do regime de chuvas com a ocorrência de déficit hídrico durante os períodos de cultivo é um dos fatores climáticos que mais tem causado preocupação. Segundo Aslam et al. (2022), o déficit hídrico é considerado um dos fatores mais limitantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas, afetando consideravelmente o rendimento das culturas no campo. As culturas anuais são as mais afetadas pela deficiência hídrica porque as plantas dificilmente conseguem se recuperar dos danos causados pela falta de água no solo no decorrer do seu ciclo relativamente curto.

Segundo Naseem et al. (2018), estima-se que aproximadamente um terço das terras destinadas à agricultura no mundo passa por escassez de água, limitando a produção agrícola. No Brasil, a intensidade, a frequência e a duração da irregularidade na distribuição de chuvas aumentaram nas últimas décadas devido às mudanças climáticas globais, fato que reduziu significativamente a produção de milho em algumas regiões do país (CONAB, 2024). Por isso, nos últimos anos, tem se intensificado as pesquisas em estratégias que possam amenizar os efeitos negativos do déficit hídrico.

Uma das estratégias que vem sendo estudada para auxiliar nesse desafio é a utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas. Essas bactérias possuem a capacidade de se associarem com mais de 100 espécies de plantas dentre elas o milho (Yadav; Sarkar, 2019).

Dentre as bactérias utilizadas merecem destaque as do gênero *Azospirillum*, as quais são de vida livre encontradas basicamente em todos os tipos de solo.

Inicialmente foi proposto que a espécie *A. brasilense* tinha a capacidade de fixar nitrogênio em gramíneas (Döbereiner; Day, 1976; Döbereiner; Pedrosa, 1987), o que poderia reduzir a utilização de fertilizantes nitrogenados principalmente para cultura do milho que exige altas quantidades de nitrogênio. Com o avanço das pesquisas, foi proposto que essas bactérias também eram capazes de produzir fito-hormônios, como auxinas, citocininas e giberelinas, que possuem diversas funções no metabolismo das plantas (Cassán; Vanderleyden; Spaepen, 2014), dentre eles reduzir efeitos deletérios promovidos por estresses como a salinidade do solo e o déficit hídrico (Creus; Sueldo; Barassi, 1997).

A identificação de estirpes de bactérias que apresentem maior eficiência na promoção do crescimento das plantas tem sido estudada. As estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 são as mais utilizadas, recentemente a estirpe de *A. brasilense* HM053 tem sido considerada promissora uma vez que diferentemente das AbV5-AbV6, esta possui a capacidade de fixar nitrogênio mesmo quando há concentrações de amônio no solo, o que poderia disponibilizar maiores quantidade de nitrogênio para cultura (Machado et al., 1991; Santo et al., 2017; Pedrosa et al., 2020).

Pedrosa et al. (2020), relataram que as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053 foram capazes de suprir uma quantidade significativa de nitrogênio na cultura do milho, melhorando o rendimento de grãos. Apesar de resultados positivos já relatados, outras pesquisas mostram resultados divergentes quanto a utilização desses microrganismos, demonstrando que ainda são necessários mais estudos que norteiem estratégias mais assertivas quanto à inoculação de *A. brasilense* em sementes de milho principalmente em condições adversas (Albrecht et al., 1981; Andrade et al., 2019; Oliveira et al., 2022). Por isto objetivou-se com esse trabalho avaliar a eficiência de duas estirpes de *A. brasilense* em atenuar os efeitos negativos causados pelo déficit hídrico no desenvolvimento da cultura do milho.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Local do estudo e delineamento experimental

O experimento foi realizado em estufa climatizada localizada na Universidade Estadual de Ponta Grossa, na região Centro-Sul do Paraná. Inicialmente, coletou-se uma porção de um Latossolo de textura média com alta acidez na profundidade de 10 a 30 cm em área de campo nativo do município de Ponta Grossa – PR. Uma parte do solo foi incubada com calcário

dolomítico (PRNT de 95%) durante 90 dias, visando elevar a saturação por bases do solo para 70%. Durante o período de incubação, a umidade do solo foi mantida na capacidade de campo para favorecer a reação do calcário com o solo.

Para o estudo, foram utilizados tubos de policloreto de vinila (PVC) com dimensões de 50 cm de altura e 15 cm de diâmetro. A porção de solo corrigida com calcário foi colocada nos 10 cm superiores dos tubos e o restante do tubo de PVC (10–50 cm) foi preenchido com solo contendo alta acidez para simular condições de subsolo ácido, condição semelhante aos solos de campos agrícolas que recebem calagem superficial. Em todo o tubo foi adicionado um total de 10 kg de solo.

O experimento foi realizado no delineamento em blocos completos ao acaso, no esquema fatorial 3×2 , com três repetições. Os seguintes tratamentos foram empregados: sem inoculação, com inoculação de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e com inoculação de *A. brasilense* HM053; e sem e com déficit hídrico .

1.2.2 Inoculação das sementes e semeadura do milho

Sementes de milho, híbrido AG 9025 PRO3 com tratamento industrial (Fludixonil 2,5% + Metalaxil-M 2,0% + Tiabendazol 15%, Deltametrina 2,5 %, Pirimifós-Metílico 50 % e Polioxietileno Alquil Fenol Éter 20%) foram inoculadas na dose de 3 mL kg⁻¹ de sementes, tanto de AbV5-AbV6 quanto de HM053. A estirpe de *A. brasilense* AbV5-AbV6 foi adquirida de produtos comerciais. Já, a estirpe HM053 foi adquirida do Laboratório de Biologia Molecular Microbiana (LABMOM) da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Foram utilizados inoculante na forma líquida e a inoculação nas sementes foi realizada manualmente em sacos plásticos por meio de mistura homogênea no momento da semeadura, de forma a garantir que todas as sementes tivessem o número de células mínimo exigido. As duas estirpes, no momento da inoculação, tiveram contagem de unidade formadora de colônia (UFC) superior a 1×10^8 mL⁻¹.

Na Tabela 1.1 são mostrados os resultados das análises químicas do solo na camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm) antes da instalação do experimento. Para suprir adequadamente os nutrientes, realizou-se adubação com N, P, K e solução nutritiva de micronutrientes em todos os tratamentos, por meio da abertura de sulco de 5 cm de profundidade no centro do tubo de PVC, no momento da semeadura. No sulco, foram aplicados 2,57 g de superfosfato triplo (00-46-00), 1,18 g de ureia (45-00-00) de forma a suprir a necessidade inicial de N pela cultura e 0,98 g de

KCl (00-00-60). Para o fornecimento de micronutrientes, foram adicionados em cada tubo 75 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 44 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 36 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 11,4 mg de H_3BO_3 e 0,55 mg de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Tabela 1.1 - Resultados das análises químicas de solo da camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm), antes da instalação do experimento nos tubos de PVC.

Solo na coluna	pH (CaCl_2)	H + Al	Al	Ca	Mg	K	P	C-orgânico	V
		----- $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ -----					mg dm^{-3}	g dm^{-3}	%
0 a 10 cm	5,7	3,83	0,0	3,3	2,3	0,14	22,2	16,6	60
10 a 50 cm	4,2	8,24	1,6	1,2	0,3	0,15	15,9	15,6	17

Al, Ca e Mg trocáveis extraídos com KCl 1 mol L^{-1} ; P e K extraídos com Mehlich-1 e C-orgânico determinado pelo método Walkley-Black. V = saturação por bases

Visando melhorar as condições químicas no subsolo para o crescimento das plantas, foi realizada aplicação de gesso agrícola sobre a superfície do solo em todos os tubos. Essa aplicação teve o objetivo de fornecer S e melhorar as condições químicas na camada subsuperficial do solo. A dose de gesso aplicada (equivalente a $4,8 \text{ t ha}^{-1}$) foi definida de acordo com o método proposto por Caires e Guimarães (2018). O gesso foi aplicado sobre a superfície das colunas de solo 30 dias antes da semeadura. Logo após a aplicação de gesso, todos os tubos foram irrigados com quantidade de água equivalente a 50 mm por tonelada de gesso aplicada, totalizando 240 mm de água. Essa irrigação foi realizada de forma parcelada por um período de 30 dias antes da semeadura.

A semeadura do milho foi realizada em janeiro de 2021, colocando-se quatro sementes por tubo à profundidade de 2 cm. Logo após a emergência das plântulas realizou-se o desbaste, mantendo somente uma planta por tubo. Os dois regimes hídricos foram iniciados logo após a realização do desbaste e foram mantidos até o final do experimento.

1.2.3 Condicionamento do déficit hídrico

Os tratamentos com e sem déficit hídrico foram definidos de acordo com a capacidade de campo (CC) de 80% (sem estresse) e 40% (com estresse) considerando a textura média do solo utilizado. Inicialmente, determinou-se a CC pela máxima capacidade de retenção de água pelo solo no tubo. Para a condição sem restrição hídrica, os tubos foram mantidos com 80% da CC. Já, para a condição de restrição hídrica, os tubos eram regados para 80% da CC sempre que a umidade do solo atingia 40% da CC. Isso foi feito para simular situações de déficit hídrico

(veranicos) ao longo do ciclo da cultura. A manutenção dos regimes hídricos foi realizada por meio de pesagem diária e individual dos tubos durante todo o período de execução do experimento. Nos tratamentos com déficit hídrico, a primeira rega para elevar a umidade do solo de 40% para 80% da CC ocorreu no 24º dia após emergência.

1.2.4 Avaliação de parâmetros relacionados à fotossíntese

Leituras de fotossíntese líquida (FL), condutância estomática (Gs), concentração de carbono intracelular (Ci) e transpiração celular (T) foram realizadas por meio do medidor IRGA ("Infrared gas analyzer"), em aparelho Marrichi LiCor-6400, conforme Santos Junior et al. (2006). Essas medições foram realizadas durante o período da manhã, das 8:30 h às 10:30 h, na última folha completamente aberta, aos 50 dias após a emergência. Calculou-se também a eficiência e uso da água (FL/T) e eficiência da carboxilação (FL/Ci).

1.2.5 Leitura de clorofila

Aos 50 dias após emergência também foi determinado o índice de clorofila no período da manhã (8:30 h às 10:30 h), na folha abaixo e oposta à espiga, considerando que as plantas estavam iniciando o estágio reprodutivo. Para essa avaliação, foi utilizado o índice SPAD para as leituras de clorofila *a* e *b* por meio do medidor eletrônico ClorofiLOG.

1.2.6 Produção de matéria seca da parte aérea e de raízes

Aos 50 dias após emergência, as plantas foram cortadas na base rente ao solo, lavadas com água deionizada e colocadas para secar em estufa a 60°C até atingir massa constante. Posteriormente, essas amostras foram pesadas para a determinação da produção de matéria seca da parte aérea. Logo após o corte das plantas, as colunas de solo foram seccionadas em três camadas: 0–10, 10–20 e 20–50 cm de profundidade. As raízes foram separadas do solo por meio de lavagem em água corrente, utilizando-se peneira com malha de 0,5 mm para reter todas as raízes. Depois de retiradas as impurezas, as raízes foram colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar a 60°C até atingir massa constante e, posteriormente, foram pesadas em balança de precisão para determinar a massa de raízes por volume de solo em cada camada e em toda coluna. Calculou-se, ainda, a produção de biomassa total das plantas por meio da soma da produção da biomassa seca da parte aérea e das raízes de cada planta.

1.2.7 Extração de nutrientes pelas plantas

Logo após a determinação da matéria seca da parte aérea das plantas, as amostras foram moídas para a determinação dos teores de N, P, K, Ca, Mg e S, utilizando-se os métodos descritos em Malavolta; Vitti; Oliveira (1997). A extração dos nutrientes pela parte aérea das plantas foi calculada multiplicando-se a concentração de cada nutriente analisado pela matéria seca total da parte aérea de cada planta.

1.2.8 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, de acordo com o delineamento em blocos completos ao acaso no esquema fatorial 3×2 . Os efeitos dos tratamentos envolvendo inoculação de *A. brasilense* e níveis de água foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5%. No caso de interação significativa entre os tratamentos, foram realizados os devidos desdobramentos. Também foi realizada análise de correlação linear de *Pearson* entre as variáveis para melhor explicar a relação entre os parâmetros avaliados e os tratamentos em que as plantas foram submetidas. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software R.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Índice de clorofila em plantas de milho

Na avaliação do índice de clorofila nas plantas de milho, a inoculação das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053 não promoveu alterações significativas nos teores de clorofilas *a*, *b* e total (Tabela 1.2). Também não houve interação entre a inoculação e a condição de estresse para estes parâmetros. Lima-Tenório et al. (2023) também não observaram diferença significativa no teor de clorofila após inoculação de *A. brasilense*. Esses autores afirmaram que a ausência do efeito significativo pode estar relacionada ao tratamento de semente que pode reduzir a atividade dos microrganismos e, consequentemente, possíveis efeitos significativos no período avaliado para estas variáveis.

Tabela 1.2 - Clorofila *a* (CLF *a*), clorofila *b* (CLF *b*) e clorofila total (CLFT) em plantas de milho considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).

Tratamento	CLF <i>a</i>	CLF <i>b</i>	CLFT
Inoculação (I)		Índice SPAD	
Sem I	19,52	4,45	23,98
AbV5-AbV6	19,09	4,36	23,45
HM053	18,08	3,92	22,02
Déficit (DH)			
Sem DH	18,39	4,03b	22,42
Com DH	19,41	4,46a	23,88
<i>P</i> > <i>F</i>			
Inoculação (I)	0,232	0,063	0,168
Déficit (DH)	0,146	0,020	0,098
I × DH	0,132	0,163	0,127
CV (%)	7,3		

CV: Coeficiente de variação.

De forma isolada, apenas o índice de clorofila *b* foi influenciado significativamente pelo fator déficit hídrico (Tabela 1.2). As plantas sob restrição hídrica apresentaram maior índice desse pigmento. O índice de clorofila *a* teve comportamento semelhante, porém sem efeito significativo. A resposta desses pigmentos indica que as plantas tiveram alguma aclimação na condição em que estavam sendo cultivadas. A aclimação ocorre quando as plantas apresentam respostas à mudança no ambiente, alterando sua fisiologia ou morfologia periodicamente para melhorar a sobrevivência e a reprodução, uma vez que períodos de déficit hídrico podem ocasionar redução na respiração e na atividade fotossintética e, consequentemente, menor estímulo da síntese de clorofila (Taiz et al., 2017).

Os valores dos índices de clorofila *a* e clorofila *b* estiveram abaixo dos obtidos em experimentos realizado a campo como os de Xiong et al. (2023). Essa diferença pode ter sido ocasionada pelo condicionamento da luminosidade dentro do ambiente protegido. Após a leitura da intensidade de luz no interior da cada de vegetação, observou-se que a quantidade de luz internamente estava 40% menor quando comparada com o ambiente externo durante a condução do experimento. Borba et al. (2023) observaram variações de parâmetros fotossintéticos na cultura do milho ao longo do dia decorrentes, principalmente, da intensidade luminosa e da temperatura indicando ser um fator que pode afetar os parâmetros fotossintéticos.

A clorofila *b* é um pigmento acessório que ajuda na captação de luz juntamente com a clorofila *a* e, maiores concentrações desse pigmento podem melhorar a taxa fotossintética principalmente da cultura do milho que é uma planta do tipo C4 com maior eficiência de uso da radiação solar (Taiz et al., 2017). Assim, em condições de déficit hídrico as plantas poderiam

apresentar melhor desenvolvimento quando comparadas com outras espécies de plantas devido à maior eficiência no aproveitamento da luz. Um dado que pode confirmar a vantagem de maiores quantidades de pigmentos acessórios clorofilados em condição de déficit hídrico para a fotossíntese foi a correlação entre clorofila *b* e fotossíntese líquida (FL). Quando a análise de correlação foi realizada nas duas condições hídricas separadamente (Tabelas 1.3 e 1.4) observou-se que a clorofila *b* se correlacionou positivamente com a FL na condição de déficit hídrico. Logo, supõe-se que houve maior síntese de moléculas de energia como adenosina trifosfato (ATP) e, posteriormente, maior síntese de fotoassimilados usados nos demais estádios de desenvolvimento da planta com o aumento da clorofila *b* (Taiz et al., 2017).

Tabela 1.3 - Correlação linear entre fotossíntese líquida (FL), condutância estomática (GS), carbono no mesófilo (Ci), transpiração (T), eficiência do uso da água (EUA) e eficiência da carboxilação (ECi), clorofila *a* (CLF *a*), clorofila *b* (CLF *b*) e clorofila total (CLFT) da cultura do milho submetido a déficit hídrico

Parâmetros	FL	Gs	Ci	T	EUA	ECi	CLF <i>a</i>	CLF <i>b</i>
GS	0,864**							
Ci	-0,395	0,105						
T	0,511	0,341	-0,549					
EUA	0,300	0,337	0,208	-0,656				
ECi	0,851**	0,491	-0,803**	0,672*	0,020			
CLF <i>a</i>	0,649	0,333	-0,666	0,428	0,180	0,731*		
CLF <i>b</i>	0,668*	0,363	-0,643	0,339	0,285	0,710*	0,931**	
CLFT	0,659	0,342	-0,669*	0,416	0,201	0,735*	0,998**	0,954**

** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$.

Tabela 1.4 - Correlação linear entre fotossíntese líquida (FL), condutância estomática (GS), carbono no mesófilo (Ci), transpiração (T), eficiência do uso da água (EUA) e eficiência da carboxilação (ECi), clorofila *a* (CLF *a*), clorofila *b* (CLF *b*) e clorofila total (CLFT) da cultura do milho sem restrição hídrica

Parâmetros	FL	Gs	Ci	T	EUA	ECi	CLF <i>a</i>	CLF <i>b</i>
GS	0,870**							
Ci	-0,256	0,243						
T	0,872**	0,609	-0,579					
EUA	-0,180	0,132	0,733*	-0,635				
ECi	0,756*	0,354	-0,814**	0,900**	-0,595			
CLF <i>a</i>	0,481	0,467	-0,066	0,324	0,139	0,350		
CLF <i>b</i>	0,251	0,399	0,255	0,027	0,339	0,051	0,708*	
CLFT	0,449	0,478	0,016	0,264	0,200	0,291	0,982**	0,830**

** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$.

Importante destacar que as rotas de biossíntese da clorofila *b*, em alguns aspectos, ainda não são bem compreendidas, pois existem incertezas na compreensão das vias de síntese e dos seus mecanismos de regulação (Chem et al., 2014). Entretanto, acredita-se que a síntese desse

pigmento ocorre através da oxidação do grupo metil da clorofila *a* para um grupo aldeído e que esse mesmo pigmento pode ser convertido em clorofila *a* através da catalisação convertendo o grupo metil ao grupo aldeído por intermédio de uma enzima chamada clorofila *a* oxigenase (Xu et al., 2001; Lin et al., 2014). Desta forma, uma vez ocorrendo a conversão entre as duas moléculas, o que provavelmente ocorreu nesta pesquisa, a tendência é de haver maior possibilidade de captação de luz pelas plantas, principalmente quando as condições hídricas forem reestabelecidas (Hu et al., 2021).

1.3.2 Parâmetros fotossintéticos nas plantas de milho

Os dados dos parâmetros fotossintéticos avaliados estão apresentados na tabela 1.5. As estirpes AbV5-AbV6 e HM053 não influenciaram significativamente a FL, a condutância estomática (GS), o carbono no mesófilo (Ci), a transpiração (T), a eficiência do uso da água (EUA) e a eficiência da carboxilação (ECi) nas plantas de milho. Os parâmetros GS, Ci e T apresentaram médias mais elevadas nas plantas que tiveram as sementes inoculadas com a estirpe HM053; provavelmente esses índices poderiam aumentar uma vez que as plantas estavam se aproximando do período de florescimento e, nessa fase, as demandas de água e fotoassimilados são maiores, o que poderia exigir mais dos processos fotossintéticos como observado por Hirich et al., (2014), entretanto aos 50 dias após a emergência não foi observado diferença entre os tratamentos.

Tabela 1.5 – Fotossíntese líquida (FL), Condutância estomática (GS), carbono no mesófilo (Ci), Transpiração (T), eficiência do uso da água (EUA) e eficiência da carboxilação (ECi) em plantas de milho, considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.

Tratamento	FL	GS	Ci	T	EUA ¹	ECi ²
Inoculação (I)	$\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\text{mol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol CO}_2$ mol^{-1}	$\text{mmol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$		
Sem I	16,42	0,128	160	2,98	5,50	0,10
AbV5-AbV6	16,21	0,130	161	3,06	5,41	0,10
HM053	15,89	0,133	169	3,07	5,29	0,09
Déficit (DH)						
Sem DH	16,14	0,137	173a	3,16	5,20	0,09
Com DH	16,21	0,124	154b	2,92	5,60	0,10
P > F						
Inoculação (I)	0,935	0,949	0,483	0,909	0,717	0,637
Déficit (DH)	0,957	0,268	0,016	0,248	0,079	0,288
I × DH	0,871	0,968	0,578	0,937	0,349	0,777
CV (%)	15,7	17,0	8,5	13,6	8,0	21,7

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. ¹EUA em $[(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}) / (\text{mmol H}_2\text{O}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})]$, ²ECi em $(\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}) / (\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1})$.

Vale ressaltar que o processo fotossintético é de fundamental importância para sustentar a vida no planeta e necessário para o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo responsável pelo equilíbrio dos ecossistemas e a obtenção de boas produtividades das culturas agrícolas como a cultura do milho. Esse processo, juntamente com outros processos bioquímicos, pode ser afetado por diversos fatores, dentre eles o déficit hídrico (Nilahyane et al., 2020). Entretanto, neste trabalho, a restrição hídrica empregada para elevar a CC do solo a 80% quando esta atingia 40% da CC demonstrou não ser suficiente para alterar a FL da planta de milho (Tabela 1.5). A atividade fotossintética também é regulada pelo índice de radiação que é incidido na planta, período de exposição, temperatura e quantidade de CO₂ no ambiente; todos esses fatores levam as plantas a reagirem a estímulos de aumento ou redução da atividade fotossintética.

As plantas de milho apresentaram resposta significativa de forma isolada ao déficit hídrico apenas para o Ci (Tabela 1.5). Quando as plantas estavam sob restrição hídrica, essas plantas apresentaram menor concentração de C intracelular aos 50 dias após a emergência. A redução do Ci em decorrência do déficit hídrico também foi observada por Nilahyane et al. (2020) ambos os resultados podem estar relacionados com o sistema de defesa da planta que ocorre quando o fornecimento de água no solo é reduzido. Isso ocorre porque os poros regulados por turgor nos estômatos das plantas estão envolvidos em duas funções opostas abertura e fechamento dos estômatos. As plantas abrem os estômatos para permitir a entrada de CO₂ para a fotossíntese, bem como a saída de H₂O durante a transpiração. Quando as plantas sofrem déficit hídrico devido à baixa umidade do solo, as plantas fecham os estômatos para reduzir a perda de água das folhas e, ao mesmo tempo, limita a entrada de CO₂ para a fotossíntese. Então, o CO₂ no interior da célula passa ser fixado, reduzindo sua concentração interna (Medrano et al., 2015).

Apesar da redução na concentração de Ci nas plantas de milho sob déficit hídrico, a atividade fotossintética não foi significativamente alterada no período avaliado (Tabela 1.5). A análise de correlação entre os parâmetros fotossintéticos das plantas sob déficit hídrico, mostram que a FL teve correlação positiva apenas com GS e T (Tabela 1.4). Esses resultados evidenciam a necessidade de manter as plantas em condições em que os estômatos estejam abertos ou parcialmente abertos para que haja as trocas gasosas.

Outra explicação para as plantas sob déficit hídrico não terem apresentado diferença significativa nos demais parâmetros fotossintéticos, pode estar relacionada ao fato da cultura do milho ser planta tipo C₄, a qual apresenta maior eficiência de uso da radiação solar em decorrência da anatomia foliar, com menor área entre as nervuras e lamela suberizada, o que

previne a perda de CO₂ para o meio. Além disso, a planta C4 também apresenta separação espacial das enzimas carboxilativas, com a PEP-carboxilase no mesófilo e a RUBISCO na bainha vascular, reduzindo, assim, a fotorrespiração (Hattersley, 1984; Bergamaschi; Matzenauer, 2014).

Outra hipótese que pode explicar a manutenção da atividade fotossintética sob déficit hídrico no presente estudo é a movimentação dos cloroplastos e ou o movimento da folha. Nilsen; Forseth (2018) relataram que as folhas tendem a se posicionar para melhor aproveitamento da luz, melhorando a fotossíntese e a eficiência no uso de recursos como água e nutrientes, desempenhando, assim, um papel importante na redução de danos causados por altas e baixas temperaturas. Já Königer (2023) relatou que sob condições de pouca luz, os cloroplastos espalham-se numa chamada resposta de acumulação e maximizam a interceptação da luz. Esses dois mecanismos podem, pelo menos em parte, atenuar o efeito de estresses abióticos nas plantas.

As bactérias promotoras de crescimento de plantas poderiam atuar diretamente em dois fatores que afetam a fotossíntese: (i) estado nutricional fornecendo principalmente nitrogênio que é o nutriente mais exigido pela planta de milho e (ii) síntese de substâncias que amenizam os efeitos do déficit hídrico nas plantas, como fito-hormônios (Picazevicz; Kusdra, 2017; Moreno et al., 2017). Entretanto, nenhuma das estirpes foi capaz de promover resultados significativos na melhoria do processo fotossintético das plantas de milho nas condições experimentais do presente estudo.

1.3.3 Produção da biomassa de plantas de milho

Os dados de produção de biomassa da parte aérea e de raízes de milho estão apresentados na Tabela 1.6. A inoculação das sementes de milho com a estirpe de *A. brasilense* HM053 promoveu aumento significativo na produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e na produção de biomassa total em relação ao tratamento sem inoculação. Esses resultados corroboram com os obtidos por Santos et al. (2017b). Marini et al. (2015) relataram que a inoculação de *A. brasilense* promoveu aumento de 11% na área foliar e de 12% na MSPA do milho em relação ao tratamento sem inoculação. Já, Quadros (2009) observou aumento de até 53% na produção de MSPA do milho no tratamento com *A. brasilense*, evidenciando efeito benéfico da inoculação na cultura do milho.

Tabela 1.6 – Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), densidade de raízes e biomassa total de plantas de milho, considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.

Tratamento	MSPA	Densidade de raízes				Biomassa total
		0 a 10 cm	10 a 20 cm	20 a 50 cm	Total	
Inoculação (I)	g planta ⁻¹	g dm ⁻³				g planta ⁻¹
Sem I	49,56b	2,93	0,78	0,88	4,60	60,84b
AbV5-AbV6	52,75ab	3,20	0,80	0,84	4,84	64,30ab
HM053	55,46a	3,67	0,84	0,97	5,49	68,64a
Déficit (DH)						
Sem DH	51,50	3,46	0,72b	0,92	5,12	63,83
Com DH	53,68	3,07	0,89a	0,88	4,84	65,35
P > F						
Inoculação (I)	0,009	0,140	0,293	0,263	0,111	0,011
Déficit (DH)	0,108	0,182	<0,001	0,521	0,410	0,381
I × DH	0,397	0,591	0,711	0,654	0,736	0,732
CV (%)	4,97	17,9	7,8	15,3	13,6	5,47

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

O acréscimo de biomassa nas plantas de milho ocasionado pela inoculação com HM053 pode estar correlacionado à maior eficiência na absorção de N fixado pelas bactérias. O N está envolvido diretamente na fotossíntese, sendo constituinte de moléculas importantes, como clorofila, ATP e ADP, proteínas e ácidos nucleicos, as quais estão envolvidas diretamente no crescimento e no desenvolvimento das plantas (Fageria; Baligar, 2005).

A densidade de raízes de milho foi numericamente maior em plantas inoculadas, especialmente com a estirpe HM053, em todas as camadas de solo, embora tais diferenças não tenham sido significativas a $P < 0,05$ (Tabela 1.6). Mesmo que tais diferenças não tenham sido significativas, pode ter havido contribuição do crescimento radicular no acréscimo de biomassa da parte aérea, como relatado por Santos et al. (2017b). Vale ressaltar que o incremento na densidade de raízes na camada de 0 a 50 cm no tratamento com sementes de milho inoculadas com a estirpe HM053 foi de 19% em relação às plantas não foram inoculadas ($P = 0,11$), o que poderia ter contribuído para maior absorção de água e nutrientes, e maior produção de biomassa das plantas.

D'Angioli et al. (2016), avaliando o efeito da inoculação de duas estirpes de *A. brasilense* inoculadas em sementes de milho, relataram que a inoculação resultou em maior comprimento e área radicular. De acordo com esses autores, a inoculação de *A. brasilense* estimulou a exsudação de carboxilato radicular, sendo que esses exsudados apresentaram

correlação positiva com o comprimento e área radicular nas plantas inoculadas, demonstrando que houve boa relação simbiótica entre as plantas de milho e as bactérias. O *A. brasilense* também pode sintetizar fito-hormônios que estimulam o alongamento e o desenvolvimento das raízes (Machado et al., 1991). Housh et al. (2021) observaram aumento significativo de auxina e ácido indolacético com a inoculação de *A. brasilense* em relação às plantas não inoculadas e associaram o desenvolvimento das raízes ao aumento dessas substâncias. Nesse mesmo estudo, os autores mostraram que a biossíntese de auxina e etileno estava relacionada à inoculação de *A. brasilense* com HM053 e que as taxas de emissão de ácido indol-3-acético nas raízes de milho foram significativamente elevadas confirmando a capacidade de desses microrganismos sintetizar esses hormônios vegetais.

Outro fito-hormônio produzido pelas bactérias do gênero *Azospirillum* são as giberelinas. Segundo Bottini; Cassán; Piccolo (2004), as giberelinas também estão ligadas à promoção do crescimento radicular, na abundância de pelos radiculares, no atraso da senescência em muitos órgãos de uma variedade de espécies de plantas. Combinada com outros fito-hormônios, as giberelinas também podem atuar na germinação de sementes, na emergência de plântulas e no crescimento de caule e folhas. Todos esses benefícios promovidos pelas bactérias ocorrem em troca de energia na forma de moléculas de C exsudadas pelas raízes das plantas podendo promover seu crescimento.

As plantas crescidas na condição de restrição hídrica apresentaram maior densidade de raízes na camada 10 a 20 cm (Tabela 1.6). Não houve interação significativa entre os fatores de inoculação e déficit hídrico nas variáveis de produção de matéria seca das plantas de milho. Não é comum plantas com restrição hídrica apresentarem maior densidade de raízes, entretanto as plantas crescidas com déficit hídrico podem se adaptar às condições nas quais foram expostas, sofrendo aclimação, o que as permitem resistir por mais tempo as condições adversas (López-Bucio et al., 2003; Taiz et al., 2017). A metodologia empregada para induzir o déficit hídrico, por meio de elevação da CC do solo para 80% quando esta alcançava 40%, pode ter estimulado a planta a desenvolver mais raízes na camada de 10 a 20 cm para buscar água e nutrientes enquanto estava ocorrendo a deficiência hídrica.

1.3.4 Acúmulo de nutrientes na parte aérea de plantas de milho

A extração de nutrientes pelas plantas de milho não foi significativamente influenciada pela interação dos fatores de inoculação e déficit hídrico (Tabela 1.7). Na avaliação dos fatores de forma isolada, alguns tratamentos obtiveram resposta significativa no acúmulo de nutrientes.

A extração de N e de Mg foi 29% e 34% maior, respectivamente, no tratamento sob restrição hídrica. Para o fator inoculação, a extração de N teve aumento gradual nos tratamentos com inoculação de AbV5-AbV6 e HM053. Entretanto, apenas as plantas cujas sementes foram inoculadas com HM053 apresentaram diferença significativa com relação ao tratamento sem inoculação. A absorção de N pelas plantas de milho foi 28% superior com a inoculação da estirpe de *A. brasilense* HM053 em relação ao tratamento sem inoculação.

Tabela 1.7 - Extração de nutrientes pelas de milho, considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S
Inoculação (I)	----- mg planta ⁻¹ -----					
Sem I	414b	128	820	181	97	69
AbV5-AbV6	464ab	104	827	157	89	52
HM053	530a	130	833	187	114	69
Déficit (DH)						
Sem DH	410b	126	835	160	85b	61
Com DH	529a	116	818	190	114a	66
P > F						
Inoculação (I)	0,022	0,353	0,904	0,358	0,105	0,366
Déficit (DH)	0,001	0,532	0,482	0,110	0,007	0,700
I × DH	0,436	0,956	0,760	0,361	0,576	0,856
CV (%)	12,7	27,0	6,0	20,6	18,2	37,0

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Em gramíneas, há vários estudos que mostraram aumento de N acumulado na parte aérea das plantas quando as sementes foram inoculadas com *A. brasilense*. Hungria et al. (2010) e Picazevicz; Kusdra; Moreno (2017) verificaram que em folhas de plantas inoculadas com *Azospirillum* spp. tiveram aumentos significativos nos teores de nutrientes dentre eles o N, melhorando também outros parâmetros biométricos da cultura. Avaliando a interação de bactérias promotoras de crescimento e corretivos de solo na cultura de milho, Galindo et al. (2020) observaram que a inoculação de *A. brasilense* aumentou o acúmulo de N na parte aérea e radicular, além de aumentar o número de grãos por espiga, o índice de colheita e a produtividade de grãos em 15%.

O aumento de 28% na absorção e acúmulo de N pelas plantas de milho inoculadas com a estirpe de *A. brasilense* HM053 em relação às plantas não inoculadas (Tabela 1.7) pode ser também explicado pela maior capacidade dessa estirpe em fixar N₂ atmosférico. A estirpe HM053 expressa constitutivamente os genes *nif*, os quais codificam enzimas envolvidas na fixação de N₂, e excreta grandes quantidades de amônio na rizosfera (Machado et al., 1991).

São bactérias fixam N_2 mesmo quando já há N fixado disponível no solo. Ao contrário de outras estirpes que cessam a fixação de N_2 com o aumento na disponibilidade de N fixado no solo, tal característica da estirpe HM053 a tem tornado promissora para ser usada como biofertilizante (Santos et al., 2017a).

Segundo López-Bucio et al. (2003), a distribuição heterogênea de N no solo também pode estimular as plantas a se adaptarem, alterando a arquitetura de suas raízes para melhorar a aquisição de nutrientes com o aumento de raízes laterais. Uma hipótese é que a inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* contribui para essa mudança na arquitetura radicular, ou seja, melhora a distribuição e o alongamento das raízes das plantas, permitindo que elas explorem maior volume de solo para absorção de nutrientes. Santos et al. (2017b) verificaram que as plantas de cevada tratadas com as estirpes de *A. brasilense* FP2 e HM053 apresentaram raízes mais alongadas quando comparadas com as raízes de plantas sem inoculação.

Para espécies gramíneas ainda não se tem definidas estirpes que sejam capazes de suprirem todo o N exigido pelas culturas, mas boa parte das estirpes atualmente estudadas demonstra capacidade de fixar N_2 e fornecer N em quantidades significativas. No caso do milho, por ser uma cultura muito exigente em N, ainda há necessidade de realizar adubações nitrogenadas, como relatado por Andrade et al. (2016). Assim, a fixação de N_2 pelas bactérias se torna um complemento para a cultura. Por isso, há necessidade de se buscar e identificar estirpes que venham suprir ou fixar quantidades superiores de N_2 , e de forma constante.

Ao avaliar o efeito da inoculação em plantas de *Setaria viridis* da família *Poaceae*, Pankievicz et al. (2015) mostraram que a inoculação com *A. brasilense* HM053 fixou N suficiente para suprir a demanda diária da planta, indicando que, sob condições adequadas, essa espécie pode obter N suficiente através da fixação biológica de N_2 para promover o crescimento das plantas. Assim, entre as estirpes de *Azospirillum*, a estirpe HM053 vem se destacando por apresentar alta capacidade de fixar N_2 atmosférico. Em um estudo realizado com a cultura do milho, Pedrosa et al. (2020) observaram que a inoculação de *A. brasilense* com a estirpe HM053, associada com a adubação nitrogenada de base, promoveu aumento no teor de N nas folhas e melhorou consideravelmente o rendimento de grãos da cultura em quatro experimentos de campo, confirmando o potencial dessa estirpe para melhorar a nutrição de N e aumentar a produtividade de milho. Housh et al. (2021) também verificaram que a inoculação de *A. brasilense* com a estirpe HM053 provocou respostas fisiológicas e metabólicas benéficas em plantas de milho, contribuindo para o aumento da assimilação de Fe e CO_2 pela planta, e dos teores de auxina e de exsudatos das raízes. Esses mesmos autores observaram que a estirpe

HM053 produziu elevadas quantidades de AIA, indicando maior interação entre planta e bactéria, o que pode contribuir para melhor desenvolvimento das mesmas.

1.4 CONCLUSÕES

A inoculação de *A. brasilense* com as estirpes AbV5-AbV6 e HM053 nas sementes não influenciou o índice de clorofila, a fotossíntese líquida, a condutância estomática, o C intracelular no mesófilo, a transpiração, a eficiência de uso da água e a eficiência de carboxilação em plantas de milho.

A produção de biomassa da parte aérea e de biomassa total das plantas de milho aumentou com a inoculação de *A. brasilense* estirpe HM053.

A inoculação de *A. brasilense* com a estirpe HM053 nas sementes aumentou a extração de N pela parte aérea das plantas de milho.

A indução de déficit hídrico por meio de aumento da CC do solo para 80% quando a mesma alcançou 40% não refletiu uma condição de deficiência hídrica severa e prejudicou somente a concentração de C intracelular no mesófilo das plantas de milho.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. D. F., ZOZ, T., ZOZ, A., OLIVEIRA, C. E. D. S.; WITT, T. W. *Azospirillum brasilense* inoculation methods in corn and sorghum. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, p. 1-9, 2019.
- ANDRADE, A. T., CONDÉ, A. B. T., COSTA, R. L., POMELA, A. W. V., SOARES, A. L., MARTINS, F. A. D.; DE OLIVEIRA, C. B. Produtividade de milho em função da redução do nitrogênio e da utilização de *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 2, p. 229-239, 2016.
- ALBRECHT, S. L., OKON, Y., LONNQUIST, J.; BURRIS, R. H. Nitrogen Fixation by Corn-*Azospirillum* Associations in a Temperate Climate 1. **Crop Science**, v. 21, n. 2, p. 301-306, 1981.
- ASLAM, M. M., IDRIS, A. L., ZHANG, Q. I. A. N., WEIFENG, X. U., KARANJA, J. K.; WEI, Y. U. A. N. Rhizosphere microbiomes can regulate plant drought tolerance. **Pedosphere**, v. 32, n. 1, p. 61-74, 2022.
- BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. O milho e o clima. **Porto Alegre: Emater/RS-Ascar**, v. 84, p. 85, 2014.
- BORBA, A. R., REYNA-LLORENS, I., DICKINSON, P. J., STEED, G., GOUVEIA, P., GÓRSKA, A. M.; HIBBERD, J. M. Compartmentation of photosynthesis gene expression in C4 maize depends on time of day. **Plant Physiology**, v. 193, n. 4, p. 2306-2320, 2023.

BOTTINI, R., CASSÁN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 497-503, 2004.

CAIRES, E. F.; GUIMARÃES, A. M. A novel phosphogypsum application recommendation method under continuous no-till management in Brazil. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 5, p. 1987-1995, 2018.

CASSÁN, F., VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 440-459, 2014.

CHEN, M. Chlorophyll modifications and their spectral extension in oxygenic photosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 83, p. 317-340, 2014.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos: Sétimo levantamento, abril de 2024, safra 2023/2024. Brasília, DF, v. 11, n.7, 117 p, 2024.

CREUS, C. M., SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Shoot growth and water status in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings grown under osmotic and salt stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 12, p. 939-944, 1997.

D'ANGIOLI, A. M., VIANI, R. A. G., LAMBERS, H., SAWAYA, A. C. H. F.; OLIVEIRA, R. S. Inoculation with *Azospirillum brasilense* (Ab-V4, Ab-V5) increases *Zea mays* root carboxylate-exudation rates, dependent on soil phosphorus supply. **Plant and Soil**, v. 410, p. 499-507, 2017.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E., NYMAN, C.T. (eds) Proceedings of the international symposium on nitrogen fixation, v.2. Washington State University Press, Pullman, 1976. p 518–538.

DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Springer Verlag, Madison, p 1–155, 1987.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy**, v. 88, p. 97-185, 2005.

GALINDO, F. S., PAGLIARI, P. H., BUZETTI, S., RODRIGUES, W. L., SANTINI, J. M. K., BOLETA, E. H. M.; FILHO, M. C. M. T. Can silicon applied to correct soil acidity in combination with *Azospirillum brasilense* inoculation improve nitrogen use efficiency in maize? **PLoS One**, v. 15, n. 4, p. e0230954, 2020.

, P.W. Characterization of C4 type leaf anatomy in grasses (*Poaceae*). Mesophyll:bundles sheath area ratios. **Annual of Botany**, v.53, p.163-179, 1984.

HIRICH, A., RAGAB, R., CHOUKR-ALLAH, R.; RAMI, A. The effect of deficit irrigation with treated wastewater on sweet corn: experimental and modelling study using SALTMED model. **Irrigation Science**, v. 32, p. 205-219, 2014.

HOUSH, A. B., NOEL, R., POWELL, A., WALLER, S., WILDER, S. L., SOPKO, S.; FERRIERI, R. A. Functional mutants of *Azospirillum brasilense* elicit beneficial physiological and metabolic responses in *Zea mays* contributing to increased host iron assimilation. **The ISME Journal**, v. 15, n. 5, p. 1505-1522, 2021.

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, p. 413-425, 2010.

KÖNIGER, M. Chloroplast movement in higher plants, ferns and bryophytes: a comparative point of view. **In: Photosynthesis in bryophytes and early land plants**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 131-150.

LIMA-TENÓRIO, M. K., FURMAM-CHEROBIM, F., KARAS, P. R., HYEDA, D., TAKAHASHI, W. Y., JUNIOR, A. S. P.; ETTO, R. M. *Azospirillum brasilense* AbV5/6 encapsulation in dual-crosslinked beads based on cationic starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 308, p. 120631, 2023.

LÓPEZ-BUCIO, J., CRUZ-RAMIREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L., The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 280-287, 2003.

MACHADO, H. B., FUNAYAMA, S., RIGO, L. U.; PEDROSA, F. D. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549-553, 1991.

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

MARINI, D., GUIMARÃES, V. F., DARTORA, J., LANA, M. D. C.; PINTO JÚNIOR, A. S. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, v. 62, p. 117-123, 2015.

MEDRANO, H., TOMÁS, M., MARTORELL, S., FLEXAS, J., HERNÁNDEZ, E., ROSSELLÓ, J.; BOTA, J. From leaf to whole-plant water use efficiency (WUE) in complex canopies: Limitations of leaf WUE as a selection target. **The Crop Journal**, v. 3, n.3, p.220-228. 2015.

NASEEM, H., AHSAN, M., SHAHID, M. A.; KHAN, N. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1009-1022, 2018.

NILAHYANE, A., ISLAM, M. A., MESBAH, A. O., HERBERT, S. K.; GARCIA Y GARCIA, A. Growth, water productivity, nutritive value, and physiology responses of silage corn to water stress. **Agronomy Journal**, v. 112, n. 3, p. 1625-1635, 2020.

NILSEN, E. T.; FORSETH, I. N. The role of leaf movements for optimizing photosynthesis in relation to environmental variation. **The leaf: a platform for performing photosynthesis**, p. 401-423, 2018.

OLIVEIRA, A. D., SAITO, M. A., BALERONI, A. G., MATSUZAKI, R. A., BERTAGNA, F., COLEVATE, A. T. K.; GUIMARÃES, L. S. D. A. Methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria in specialty maize genotypes under organic agriculture system. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 44, p. e54910, 2022.

PANKIEVICZ, V. C., DO AMARAL, F. P., SANTOS, K. F., AGTUCA, B., XU, Y., SCHUELLER, M. J.; FERRIERI, R. A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **The Plant Journal**, v. 81, n. 6, p. 907-919, 2015.

PEDROSA, F. O., OLIVEIRA, A. L. M., GUIMARÃES, V. F., ETTO, R. M., SOUZA, E. M., FURMAM, F. G.; GALVÃO, C. W. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, p. 45-56, 2020.

PICAZEVICZ, A. A., KUSDRA, J. F.; MORENO, A. D. L. Maize growth in response to *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, molybdenum and nitrogen. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, p. 623-627, 2017.

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado)–Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 62p.

SANTOS JUNIOR, U. M. CARVALHO GONÇALVES, J. F.; FELDPAUSCH, T. R. Growth, leaf nutrient concentration and photosynthetic nutrient use efficiency in tropical tree species planted in degraded areas in central Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 226, n. 1-3, p. 299-309, 2006.

SANTOS, A. R. S., ETTO, R. M., FURMAM, R. W., DE FREITAS, D. L., SANTOS, K. F. D. E. N., DE SOUZA, E. M.; GALVÃO, C. W. Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 422-426, 2017b.

SANTOS, K. F. D. N., MOURE, V. R., HAUER, V., SANTOS, A. R. S., DONATTI, L., GALVÃO, C. W.; STEFFENS, M. B. R. *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 415, p. 245-255, 2017a.

SHAD, Z. M., VENKITASAMY, C.; WEN, Z. Corn distillers dried grains with solubles: Production, properties, and potential uses. **Cereal Chemistry**, v. 98, n. 5, p. 999-1019, 2021.

, L., ZEIGER, E., MOLLER, I. M., MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858p.

XIONG, X., LI, J., SU, P., DUAN, H., SUN, L., XU, S.; TANG, J. Genetic dissection of maize (*Zea mays* L.) chlorophyll content using multi-locus genome-wide association studies. **BMC Genomics**, v. 24, n. 1, p. 384, 2023.

XU, H., VAVILIN, D.; VERMAAS, W. Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 14168-14173, 2001.

YADAV, K. K.; SMRITIKANA SARKAR. Biofertilizers, impact on soil fertility and crop productivity under sustainable agriculture. **Environment and Ecology**, v.37, pp.89-93, 2019

LIN, Y. P., LEE, T. Y., TANAKA, A.; CHARNG, Y. Y. Analysis of an Arabidopsis heat-sensitive mutant reveals that chlorophyll synthase is involved in reutilization of chlorophyllide during chlorophyll turnover. **The Plant Journal**, v. 80, n. 1, p. 14-26, 2014.

HU, X., GU, T., KHAN, I., ZADA, A.; JIA, T. Research progress in the interconversion, turnover and degradation of chlorophyll. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3134, 2021.

CAPÍTULO 2. INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* PARA AMENIZAÇÃO DOS EFEITOS DE DEFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE TRIGO

INOCULATION OF *Azospirillum brasilense* IN MITIGATING THE EFFECTS OF WATER DEFICIT IN WHEAT PLANTS

Resumo – A cultura do trigo é uma das principais dentre as culturas agrícolas no mundo, entretanto a produtividade de trigo vem sendo afetada drasticamente pela irregularidade de chuvas, necessitando de práticas de manejo que atenuem os efeitos negativos desse estresse. Com este trabalho objetivou-se avaliar o efeito da inoculação em sementes de trigo com *Azospirillum brasilense*, sem e com a indução de déficit hídrico, sobre o desenvolvimento de plantas de trigo. O trabalho foi realizado em casa de vegetação, em esquema fatorial 3×2 e três repetições. Os tratamentos foram: sem inoculação, com inoculação de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e com inoculação de *A. brasilense* HM053; sem e com déficit hídrico. As sementes de trigo foram inoculadas com dose de 2,5 mL kg⁻¹ de sementes para ambas estirpes. Os regimes hídricos visaram manter o solo com 80% e 40% da capacidade de campo. O trigo foi cultivado em tubos de 50 cm de altura. Avaliou-se o índice de clorofila, a produção biomassa da parte aérea e das raízes nas camadas de 0–10, 10–20 e 20–50 cm, e extração de nutrientes pela parte aérea das plantas. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5%. A estirpe HM053 promoveu aumento na densidade de raízes de trigo na camada de solo de 20 a 50 cm. Houve maior acúmulo de potássio nas plantas que tiveram sementes inoculadas com HM053. Ambas as estirpes favoreceram a absorção de Ca, Mg e K pelas plantas na condição de déficit hídrico.

Palavras-chave: Restrição hídrica; biofertilizante; bactérias promotoras de crescimento de plantas

Abstract - Wheat is one of the main agricultural crops in the world; however, wheat productivity has been drastically affected by irregular rainfall, requiring management practices that mitigate the negative effects of this stress. This study aimed to evaluate the effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, both with and without induced water deficit, on the development of wheat plants. The study was conducted in a greenhouse, in soil columns, using a randomized block design in a 3×2 factorial scheme, with three repetitions. The treatments were: without inoculation, with inoculation of *A. brasilense* AbV5-AbV6, and with inoculation of *A. brasilense* HM053; without and with water stress. Wheat seeds, cv. TBio Tibagi, were inoculated with liquid inoculants at a dose of 2.5 mL kg⁻¹ of seeds for both strains. The water regimes aimed to maintain the soil at 80% and 40% of field capacity. The wheat was cultivated in polyvinyl chloride tubes with dimensions of 50 cm in height and 15 cm in diameter. The chlorophyll index in the flag leaf, root biomass production in the 0–10, 10–20, and 20–50 cm layers, and nutrient extraction by the aerial parts of the plants were evaluated. The results were subjected to analysis of variance and the means were compared using Tukey's test at 5%. The HM053 strain promoted an increase in wheat root density in the 20 to 50 cm soil layer. There was a greater accumulation of potassium in plants whose seeds were inoculated with HM053. Both strains favored the absorption of Ca, Mg, and K by plants under water stress conditions.

Keywords: Water restriction; biofertilizer; plant growth-promoting bacteria

2.1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) está entre os cereais mais antigos e importantes do mundo devido à sua participação no desenvolvimento da civilização e da agricultura mundial. É um cereal rico em proteínas com ampla variedade de subprodutos, tanto na indústria alimentícia com produção de farinhas, macarrão, biscoitos, bolos e pães, como também na indústria não alimentícia na fabricação de misturas adesivas, colas, misturas para impressão, agentes surfactantes, embalagens solúveis, álcool, antibióticos, vitaminas e fármacos.

No Brasil, apesar de apresentar vasta área para agricultura, o cultivo de trigo predomina na região Sul. É cultivado no período de inverno, quando o clima é mais favorável com temperaturas mais baixas, o que permite melhor desenvolvimento das plantas. Apesar de o clima favorável, o país precisa importar cerca de 50% do trigo consumido no país para atender a demanda interna, já que a produção do país não é suficiente para suprir o consumo nacional. Para isso, há a necessidade de aumentar a produtividade de trigo nas áreas destinadas ao seu cultivo (CONAB, 2024).

No ano de 2023, houve aumento significativo na área cultivada com trigo no país. Entretanto, a produção de grãos foi cerca de 23% menor quando comparada com a safra anterior, essa redução é devido à queda significativa na produtividade que foi ocasionada principalmente por fatores climáticos, como chuvas irregulares no período de cultivo (CONAB, 2023). A falta de chuvas nos estádios de desenvolvimento mais sensíveis da cultura, como no florescimento, ou por longos períodos tem sido o fator primordial que afeta a produção e a qualidade de grãos (Zahra et al., 2021). A ocorrência de déficit hídrico tem se tornado muito comum em todo o mundo, tornando-se uma preocupação mundial no setor agrícola, principalmente por afetar a segurança alimentar no planeta (Hussain et al., 2015).

A seca pode afetar os parâmetros fisiológicos da vegetação, como teor de clorofila, parâmetros fotossintéticos, biomassa e rendimento de grãos (Zhao et al., 2020). Em condição de estresse por déficit hídrico, as plantas passam por efeito de aceleração do seu desenvolvimento, usando a energia armazenada para suportar os efeitos negativos do estresse, como por exemplo, acúmulo de espécies reativas de oxigênio no interior das células, bem como produzir grãos para perpetuação da espécie. Porém, essa aceleração e gasto de energia, apesar de ser ponto positivo por garantir produção mínima de grãos, reduz o rendimento de forma bastante significativa (Chavoushi et al., 2019).

Uma das alternativas para reduzir os efeitos da escassez hídrica é o uso da irrigação. Entretanto, essa técnica ainda é dispendiosa e, na maioria das vezes, inviável devido aos altos

custos de instalação, seja pelo relevo das áreas ou pela disponibilidade de água em quantidades suficientes para serem usadas em todas as áreas destinadas a produção da cultura. Por isso, é necessário buscar alternativas que possam ser implementadas com maior assertividade, de forma sustentável e melhor custo-benefício para o cultivo de trigo.

O uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas, dentre elas o *Azospirillum brasilense*, vem sendo uma das alternativas mais promissoras para elevar a produção e mitigar efeitos adversos do déficit hídrico em gramíneas, pois são microrganismos capazes de fornecer uma série de vantagens para as plantas (Hungria et al., 2010; Arzanesh et al., 2011; Takahashi et al., 2022). Os benefícios do uso de bactérias do gênero *Azospirillum* vêm sendo relatados há muito tempo demonstrando que essas bactérias podem fixar nitrogênio no solo disponibilizando-o para as plantas (Piccinin et al., 2013; Galindo et al., 2020, 2022). Outra característica desses microrganismos é a sua capacidade de excretar alguns fito-hormônios no solo, os quais promovem o desenvolvimento radicular, podendo contribuir para proporcionar maior tolerância ao déficit hídrico (Spaepen et al., 2014). Estudo realizado em milho com a estirpe de *A. brasilense* HM053, demonstrou que ela foi capaz de melhorar o desempenho agrônomo de forma considerável (Pedrosa et al., 2020). Porém, os estudos com essa estirpe na cultura do trigo são bastante escassos.

Apesar dos resultados promissores com o uso de *A. brasilense* na agricultura principalmente em gramíneas, ainda há muitos questionamentos sobre a efetividade e os benefícios desses microrganismos visando recomendações mais assertivas. Alguns trabalhos demonstraram que nem sempre as plantas apresentaram resposta positiva após a inoculação com essas bactérias, não havendo acúmulo de nitrogênio e nem aumentos significativos na massa de raízes e de biomassa das plantas; mesmo quando a planta apresentou melhoria nos parâmetros biométricos, não houve aumento na produtividade (Ludwig, et al., 2022; Kasi et al., 2016; Gaspareto et al., 2023). A relação entre microrganismos, planta e ambiente é fundamental para que a associação ocorra de forma satisfatória, devendo haver em primeiro lugar, boa compatibilidade entre planta e bactéria (Ludwig et al., 2018). Por isso, há necessidade de testar e analisar a eficiência de novas estirpes de bactérias consideradas promissoras, de forma que o uso dessa ferramenta possa garantir aumento na produção de alimentos com maior sustentabilidade.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da inoculação de sementes de trigo com diferentes estirpes de *A. brasilense*, sem e com déficit hídrico, no desenvolvimento e produção de biomassa de plantas de trigo.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Local do estudo e delineamento experimental

O experimento foi realizado no Campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa, na região Centro-Sul do Paraná, em estufa climatizada. Para o cultivo das plantas de trigo foram usados tubos de policloreto de vinila (PVC) com dimensões de 50 cm de altura e 15 cm de diâmetro. Como substrato coletou-se uma porção de um Latossolo com alta acidez em uma profundidade de 0–30 cm, em área de campo nativo do município de Ponta Grossa – PR.

Parte do solo foi incubado com calcário dolomítico (PRNT de 95%) durante 90 dias, visando elevar a saturação por bases para 70%. Durante o período de incubação, a umidade do solo foi mantida na capacidade de campo para favorecer a reação do calcário com o solo.

O solo foi acondicionado no tubo de forma que simulasse o sistema plantio direto, forma de cultivo predominante na região Sul do Brasil. Nesse sistema, ocorre um gradiente de correção da acidez ao longo do perfil a partir das camadas superficiais do solo. Sendo assim, os tubos foram preenchidos com solo corrigido com calcário nos primeiros 10 cm e solo sem correção na parte inferior (10–50 cm) para simular condições de acidez no subsolo.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos completos ao acaso, no esquema fatorial 3×2 , com três repetições. Para o primeiro fator, foram empregados os seguintes tratamentos: sem inoculação, com inoculação de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e com inoculação de *A. brasilense* HM053. Já, para o segundo fator, foram empregados dois níveis de água no solo, simulando as condições sem e com restrição hídrica.

2.2.2 Inoculação das sementes e semeadura do trigo

A inoculação nas sementes de trigo com as estirpes de *A. brasilense* foi realizada manualmente em sacos plásticos por meio de uma mistura homogênea, de forma a garantir que todas as sementes tivessem o número de células mínimo exigido. Utilizaram-se sementes do cultivar TBio Tibagi previamente tratado com triflumurom (200 mL p.c./100 kg de sementes) e imidacloprido (100 mL p.c./100 kg de sementes). As sementes de trigo (1 kg para cada tratamento) foram inoculadas pouco antes da semeadura, com inoculantes líquidos, na dose de 2,5 mL kg⁻¹ de sementes, tanto de AbV5-AbV6 quanto de HM053. No tratamento sem inoculação, adicionou-se 2,5 mL de água deionizada. A estirpe AbV5-AbV6 foram adquiridas de produto comercial, enquanto a estirpe HM053 foi adquirida do Laboratório de Biologia Molecular Microbiana (LABMOM) da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ambas as

estirpes no momento da inoculação tiveram contagem de unidade formadora de colônia (UFC) superior a $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$.

Na Tabela 2.1 são mostrados os resultados das análises químicas do solo na camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm) antes da instalação do experimento. Para suprir adequadamente os nutrientes, realizou-se adubação com N, P, K e solução nutritiva de micronutrientes em todos os tratamentos, por meio da abertura de sulco de 5 cm de profundidade no centro do tubo de PVC, no momento da sementeira. No sulco, foram aplicados 1,77 g de superfosfato simples (03-17-00), 0,15 g de ureia (45-00-00) e 0,48 g de KCl (00-00-60). Para o fornecimento de micronutrientes, foram adicionados em cada tubo 75 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 44 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 36 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 11,4 mg de H_3BO_3 e 0,55 mg de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Visando melhorar as condições químicas no subsolo para o crescimento das plantas, foi realizada aplicação de gesso agrícola sobre a superfície do solo em todos os tubos. Essa aplicação teve o objetivo de fornecer S e melhorar as condições químicas na camada subsuperficial do solo. A dose de gesso aplicada (equivalente a $4,8 \text{ t ha}^{-1}$) foi definida de acordo com o método proposto por Caires; Guimarães (2018). O gesso foi aplicado sobre a superfície das colunas de solo 30 dias antes da sementeira. Logo após a aplicação de gesso, todos os tubos foram irrigados com uma quantidade de água equivalente a 50 mm por tonelada de gesso aplicada, totalizando 240 mm de água. Essa irrigação foi realizada de forma parcelada por um período de 30 dias antes da sementeira.

A sementeira do trigo foi realizada em agosto de 2021, colocando-se oito sementes em cada tubo na profundidade de 2 cm. Após a emergência das plântulas, realizou-se o desbaste, mantendo-se quatro plantas por tubo. Logo após o desbaste, os tubos foram mantidos sob os dois regimes hídricos até o final do experimento.

Tabela 2.1 - Resultados das análises químicas de solo da camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm), antes da instalação do experimento nos tubos de PVC.

Solo na coluna	pH (CaCl_2)	H + Al	Al	Ca	Mg	K	P	C-orgânico	V
		----- $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ -----					mg dm^{-3}	g dm^{-3}	%
0 a 10 cm	5,7	3,83	0,0	3,3	2,3	0,14	22,2	16,6	60
10 a 50 cm	4,2	8,24	1,6	1,2	0,3	0,15	15,9	15,6	17

Al, Ca e Mg trocáveis extraídos com KCl 1 mol L^{-1} ; P e K extraídos com Mehlich-1 e C-orgânico determinado pelo método Walkley-Black. V = saturação por bases

2.2.3 Condicionamento do déficit hídrico

Para condicionar os dois regimes hídricos, inicialmente foi determinada a capacidade de campo (CC) do solo. Para a condição de deficiência hídrica, os tubos foram mantidos com 40% da CC, enquanto os tubos sem restrição hídrica foram mantidos com 80% da CC, durante todo o período de desenvolvimento das plantas a partir da emergência. Para a manutenção dos regimes hídricos de forma mais precisa foi realizada pesagem individual dos tubos diariamente, com a devida complementação de água, dependendo da condição hídrica, durante todo o período de condução do experimento.

2.2.4 Leitura de clorofila

Aos 50 dias após emergência foi determinado o índice de clorofila durante o período da manhã, entre 9:00 h e 11:00 h. Para esse parâmetro, utilizou-se o medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG, determinando-se o índice SPAD para as clorofilas *a* e *b*. As leituras foram realizadas na folha-bandeira. Após as leituras dos índices de clorofila *a* e *b*, determinou-se o índice de clorofila total por meio da soma das duas leituras.

2.2.5 Produção de matéria seca da parte aérea e de raízes

Aos 50 dias após emergência, após as leituras de clorofila, as plantas foram cortadas rente ao solo, lavadas em água deionizada e, posteriormente, colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar a 60°C, até atingir massa constante. Após secas, as amostras foram pesadas em balança de precisão para a determinação da produção de matéria seca da parte aérea. Após a retirada da parte aérea, as colunas de solo foram seccionadas em três camadas: 0–10, 10–20 e 20–50 cm. Em cada camada, as raízes foram separadas do solo por meio de lavagem em água corrente, com o auxílio de uma peneira com malha de 0,5 mm. Depois da retirada do solo e impurezas, as raízes foram colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar a 60°C até atingir massa constante e, posteriormente, foram pesadas em balança de precisão. Em seguida, determinou-se a densidade de raízes por meio da relação entre a massa seca de raízes e o volume de solo em cada camada e em toda a coluna. A produção total de biomassa de plantas também foi determinada, somando-se a matéria seca da parte aérea e a matéria seca de raízes na coluna.

2.2.6 Extração de nutrientes pelas plantas

Logo após a determinação da matéria seca da parte aérea das plantas de trigo, as amostras foram moídas para a determinação dos teores de N, P, K, Ca, Mg e S, por meio dos métodos descritos em Malavolta; Vitti; Oliveira (1997). Em seguida, a extração de nutrientes pela parte aérea das plantas foi determinada multiplicando-se a concentração de cada nutriente analisado pela matéria seca total da parte aérea das plantas.

2.2.7 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, de acordo com o delineamento em blocos completos ao acaso, no esquema fatorial 3×2 . Os efeitos dos tratamentos envolvendo inoculação das sementes com *A. brasilense* e níveis de água no solo foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5%. No caso de interação significativa entre os tratamentos, foram realizados os devidos desdobramentos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software R.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Índice de clorofila em plantas de trigo

Os índices de clorofila *a* e *b*, bem como o de clorofila total não foram influenciados de forma significativa pela inoculação das sementes com as estirpes de *A. brasilense*, déficit hídrico e interação entre os dois fatores (Tabela 2.2). Kazi et al. (2016), avaliando a resposta de genótipos de trigo à inoculação com estirpes de *A. brasilense* Sp7 e sua cepa mutante *A. brasilense* Sp7-S também observaram que até 43 dias após a semeadura, a inoculação não promoveu aumento no teor de clorofila em folhas trigo, em nenhum dos genótipos avaliados. Já, Nia et al. (2012) observaram que, em diferentes níveis de salinidade, plantas de trigo inoculadas com *A. brasilense* apresentaram maiores índices de clorofila *a* e *b* aos 120 dias após a semeadura. Gaspareto et al. (2023), avaliando a inoculação de *A. brasilense* em dois cultivos de trigo, verificaram que a inoculação promoveu aumento no índice de clorofila apenas no primeiro cultivo, e atribuíram essa diferença às diferentes condições climáticas nos anos experimentais, com melhor volume e distribuição das chuvas durante o primeiro ano.

Tabela 2.2 . Clorofila *a* (CLF *a*), clorofila *b* (CLF *b*) e clorofila total (CLF total) em plantas de trigo considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).

Tratamento	CLF <i>a</i>	CLF <i>b</i>	CLF total
Inoculação (I)		Índice SPAD	
Sem I	23,63	11,31	34,93
AbV5-AbV6	22,70	10,58	33,28
HM053	23,31	11,06	34,36
Déficit (DH)			
Sem DH	23,16	10,80	33,94
Com DH	23,26	11,17	34,44
<i>P</i> > <i>F</i>			
Inoculação (I)	0,063	0,376	0,165
Déficit (DH)	0,733	0,383	0,465
I × DH	0,176	0,687	0,394
CV (%)	2,6	8,0	4,0

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

A clorofila é um importante pigmento para as plantas, responsável principalmente pela captação de luz usada durante o processo de fotossíntese. A síntese de clorofila está relacionada diretamente com fatores abióticos como estresse e estado nutricional, além de fatores genéticos (Kazi, et al., 2016). Kasim et al. (2021), avaliando o efeito da inoculação de *A. brasilense* no estágio inicial de desenvolvimento do trigo, observaram que aos 15 dias após semeadura e após sete dias de restrição hídrica, as plantas apresentaram índices de clorofila *a* e *b* mais elevados. Entretanto, antes do início da indução do déficit hídrico, além da inoculação nas sementes, esses autores também realizaram aplicação das bactérias em mistura com a água na irrigação, uma metodologia diferente da utilizada no presente trabalho. Assim, é possível inferir que a cultura do trigo pode responder de forma diferente à inoculação com *A. brasilense*, dependendo do genótipo, da forma e da época de aplicação, bem como às condições ambientais.

2.3.2 Produção de biomassa de plantas de trigo

Na tabela 2.3 são apresentados os resultados da avaliação da produção de matéria seca das plantas de trigo, aos 50 dias após a emergência. As plantas oriundas de sementes inoculadas com HM053 apresentaram densidade de raízes significativamente maior na camada de solo de 20 a 50 cm e em toda a coluna (0–50 cm) em relação aos tratamentos sem inoculação e com inoculação de AbV5-AbV6. Outro destaque é que a densidade de raízes na camada de 0 a 10 cm apresentou significância ao nível de 10%, indicando que a estirpe HM053 tendeu a aumentar o desenvolvimento das raízes de trigo nessa camada de solo. Portanto, a inoculação das

sementes de trigo com HM053 contribuiu para aumentar a biomassa de raízes de trigo no perfil do solo. Com isso, as plantas inoculadas com HM053 poderiam apresentar maior tolerância ao déficit hídrico, cuja ocorrência vem se tornando cada vez mais comum nas principais regiões de cultivo de trigo no Brasil.

Tabela 2.3 – Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), densidade de raízes e biomassa total de plantas de trigo, considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.

Tratamento	MSPA	Densidade de raízes				Biomassa total
		0 a 10 cm	10 a 20 cm	20 a 50 cm	Total	
Inoculação (I)	g/planta	g dm ⁻³				g/planta
Sem I	2,95	0,11	0,06	0,06b	0,25b	3,60
AbV5-AbV6	3,04	0,12	0,07	0,06b	0,26b	3,65
HM053	3,33	0,14	0,06	0,08a	0,29a	3,70
Déficit (DH)						
Sem DH	3,13	0,13	0,05b	0,07	0,26	3,83
Com DH	3,08	0,12	0,08a	0,06	0,27	3,46
P > F						
Inoculação (I)	0,170	0,066	0,206	0,011	0,005	0,093
Déficit (DH)	0,729	0,360	<0,001	0,137	0,335	0,114
I × DH	0,131	0,033	0,348	0,057	0,057	0,942
CV (%)	10,6	13,9	12,1	16,9	7,1	12,34

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

A estirpe de *A. brasilense* HM053 possui característica de excreção de amônio em elevadas quantidades, por ser considerada uma estirpe resistente espontânea à etilenodiamina (Machado et al., 1991). Santos et al. (2017a,b) relataram que a estirpe HM053 promoveu aumento significativo de biomassa seca em plantas de trigo e cevada. Esses autores afirmaram que o aumento nos parâmetros biométricos pode estar associado com a maior disponibilidade de amônio proporcionada por essa estirpe. No caso na cevada, os mutantes HM053 P *nifH-gusA* colonizaram o interior dos pelos radiculares e expressaram os genes *nif* na superfície radicular, indicando potencial e efetiva associação simbiótica entre a estirpe e a cultura.

O desdobramento dos fatores para a densidade de raízes na camada de solo de 0 a 10 cm (Figura 2.1) mostrou que a inoculação com a estirpe HM053 proporcionou maior densidade de raízes do que o tratamento sem inoculação na ausência de déficit hídrico. Por outro lado, as plantas que tiveram sementes inoculadas com HM053 apresentaram menor densidade de raízes quando submetidas ao déficit hídrico. Esses resultados permitem inferir que a estirpe HM053

tem a capacidade de estimular o crescimento de raízes de trigo, entretanto pode ser sensível à sobrevivência em ambiente com déficit hídrico. Na camada de solo de 10 a 20 cm, a densidade de raízes foi maior com do que sem déficit hídrico. É possível que o déficit hídrico na camada superficial tenha forçado o crescimento das raízes na camada de 10 a 20 cm.

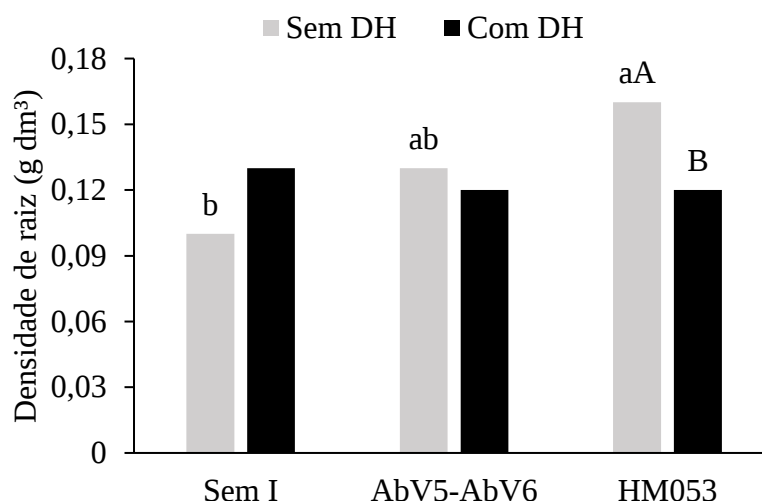


Figura 2.1 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na densidade de raízes de trigo na camada de solo 0 a 10 cm.

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na comparação de cada estirpe com e sem déficit hídrico e minúsculas na comparação entre as estirpes com ou sem déficit hídrico, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Os benefícios de bactérias promotoras de crescimento na cultura do trigo podem ocorrer por vários motivos. Segundo Tsavkelova et al. (2006), o melhor desenvolvimento do sistema radicular pode estar relacionado à produção de fito-hormônios pelas bactérias, como as auxinas e ácido indolacético. Esses fito-hormônios são essenciais para o alongamento celular, regulando a dominância apical, retardando o início da abscisão foliar, coordenando o fototropismo e o geotropismo, e regulando, assim, o crescimento das plantas e a produção de biomassa (Taiz et al., 2017). Spaepen et al. (2014) verificaram que a inoculação de *A. brasilense* em *Arabidopsis thaliana* aumentou o número de raízes laterais e de pelos radiculares, além de elevar a concentração interna de auxina na planta. Dal Cortivo et al. (2020) também observaram efeito positivo da inoculação com *A. brasilense* no crescimento radicular de plantas de trigo.

Importante destacar que a interação entre hospedeiro e planta é determinante para eficiência da inoculação na promoção do crescimento de plantas de trigo. Ludwig et al. (2018; 2022) por exemplo, verificaram que a inoculação de sementes de trigo com *A. brasilense* proporcionou respostas diferentes no comprimento de raízes, na produção de biomassa da parte aérea e em componentes de produção, como número de perfilhos e de espigas, dependendo do

cultivar utilizado, o que indica que outros fatores podem também interferir na associação entre hospedeiro e bactérias.

Dobbelaere et al. (1999) relataram que a inoculação com as estirpes de *A. brasilense* Sp245 e Sp7 resultou em diminuição no comprimento da raiz e aumento na formação de pelos radiculares. Este efeito deixou de existir ao inocular a estirpe ipdC. As culturas agrícolas geralmente apresentam correlação positiva entre a biomassa de raízes e outros parâmetros biométricos (Santos et al., 2017b). Quanto mais desenvolvido o sistema radicular, as plantas podem explorar maior volume de solo, absorver mais água e nutrientes, e aumentar a produção de biomassa da parte aérea.

2.3.3 Acúmulo de nutrientes na parte aérea de plantas de trigo

Os tratamentos com inoculação das estirpes de *A. brasilense* e déficit hídrico não influenciaram significativamente a extração de N, P e S pelas plantas de trigo (Tabela 2.4). Alguns estudos mostraram que a inoculação de *A. brasilense* foi capaz de suprir parcialmente a demanda de N ou aumentar a concentração desse nutriente na planta, indicando a capacidade desses microrganismos em melhorar o aproveitamento de N pelas plantas, como relatado por Piccinin et al. (2013). Entretanto, os resultados do presente trabalho mostraram que a inoculação de *A. brasilense*, independentemente da estirpe (AbV5-AbV6 ou HM053), não promoveu aumento na extração de N.

Tabela 2.4 - Extração de nutrientes pelas de trigo, considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S
Inoculação (I)	----- mg planta ⁻¹ -----					
Sem I	66,39	7,37	91,49b	8,75	5,09	10,21
AbV5-AbV6	69,63	7,89	93,48ab	8,80	5,07	10,30
HM053	72,27	9,40	100,27a	9,12	5,36	10,50
Déficit (DH)						
Sem DH	68,62	7,95	97,54a	8,71	5,33	10,12
Com DH	70,23	8,49	91,74b	9,11	5,02	10,56
P > F						
Inoculação (I)	0,411	0,140	0,040	0,121	0,326	0,942
Déficit (DH)	0,650	0,511	0,037	0,284	0,099	0,552
I × DH	0,460	0,538	0,001	0,006	0,001	0,343
CV (%)	10,5	20,2	5,8	8,41	6,9	14,7

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

A extração de K, Ca e Mg pelas plantas de trigo foi influenciada pela interação dos tratamentos de inoculação $\times$ déficit hídrico (Tabela 2.4). Quando o fator inoculação foi avaliado de forma isolada, houve maior extração de K pelas plantas inoculadas com a estirpe HM053 em relação ao tratamento sem inoculação. Resultado semelhante ao obtido neste estudo, com aumento de K na planta de trigo em decorrência da inoculação com *A. brasilense*, foi relatado por Ardakani et al. (2011). Considerando a interação entre os fatores, observou-se as plantas inoculadas com as duas estirpes de *A. brasilense* (AbV5-AbV6 e HM053) extraíram quantidades significativamente mais elevadas de K quando comparadas com o tratamento sem inoculação, tanto na ausência como na presença de déficit hídrico (Figura 2.2).

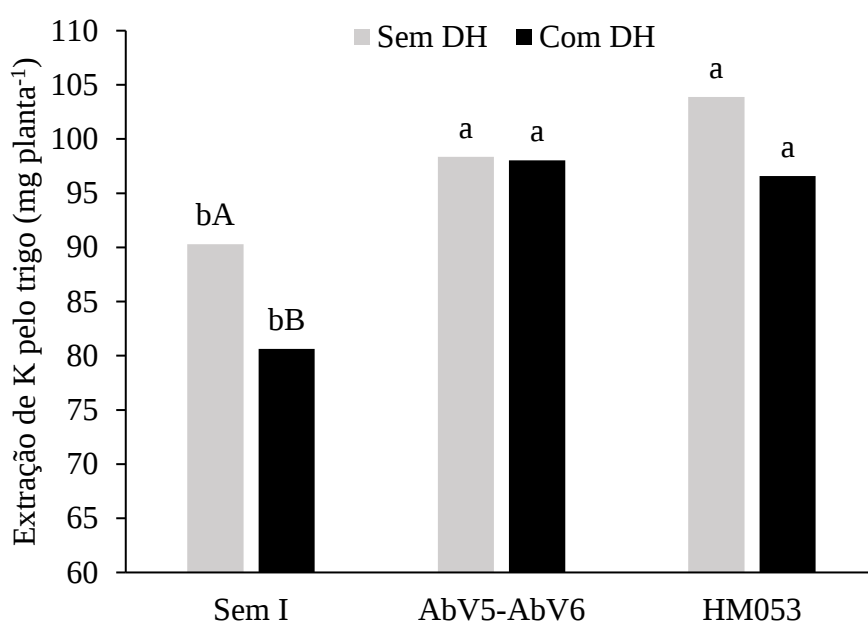


Figura 2.2 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na extração de K pelas plantas de trigo.

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na comparação de cada estirpe com e sem déficit hídrico e minúsculas na comparação entre as estirpes com ou sem déficit hídrico, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Ainda não é conhecida uma relação direta entre a nutrição de K e o metabolismo ou processos bioquímicos das bactérias do gênero *Azospirillum*. O aumento na extração de K pelas plantas de trigo com a inoculação de *A. brasilense* pode estar relacionado com o aumento da biomassa de raízes. Como o K^+ apresenta alta mobilidade no solo, pode ter ocorrido movimentação vertical de K^+ na coluna de solo em que as plantas de trigo foram cultivadas (Broschat, 1995; Rosolem et al., 2010). Dessa forma, boa parte do K^+ pode ter se concentrado na parte inferior do tubo onde tinha maior densidade de raízes no tratamento com HM053, o

que favoreceu a absorção desse nutriente. Deve-se considerar também que o K^+ pode se movimentar até o sistema radicular pelos mecanismos de difusão e fluxo de massa quando o solo apresenta teores relativamente elevados deste nutriente (Ruiz et al., 1999). A maior absorção de K certamente está relacionada com o crescimento do sistema radicular das plantas, ou seja, quanto mais desenvolvidas as raízes, principalmente os pelos radiculares, maior será a área explorada por elas, como relatado por Dal Cortivo et al. (2020). Dessa forma, o maior crescimento do sistema radicular, tanto verticalmente quanto horizontalmente, facilita o contato íon-raiz, aumentando a possibilidade de absorção de K pelas plantas.

As plantas não-inoculadas apresentaram menor acúmulo de K quando estavam sob déficit do que na sua ausência (Figura 2.2). Em contra partida, os tratamentos que tiveram sementes inoculadas não apresentaram diferença significativa na absorção de K quando comparadas as duas condições hídricas. Portanto, o déficit hídrico prejudicou a absorção de K somente em plantas não-inoculadas e a inoculação de *A. brasilense* com as estirpes AbV5-AbV6 e HM053 promoveu acúmulo de K nas plantas, independentemente do déficit hídrico.

O K apresenta papel fundamental no mecanismo de controle do transporte de água, metabólitos e nutrientes através dos tecidos e órgãos vegetais, manutenção da homeostase osmótica, além de apresentar ação direta na defesa das plantas contra estresses oxidativos (LU et al., 2016). Quando as plantas são cultivadas em solos com níveis adequado de K ocorre aumento na assimilação fotossintética, no turgor das células do limbo foliar e na abertura dos estômatos, permitindo fluxos adequados de gases e água (Andrés et al., 2014; Tränkner et al., 2018; Sardans et al., 2021).

As plantas não-inoculadas apresentaram menor acúmulo de Ca (Figura 2.3) e de Mg (Figura 2.4) quando estavam sob déficit hídrico do que na sua ausência. Na condição de déficit hídrico, a extração de Ca e Mg pelas plantas foi maior quando as sementes foram inoculadas com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053. Na ausência de déficit hídrico, a inoculação com *A. brasilense* não ocasionou melhoria na absorção de Ca e Mg pelas plantas. Esses resultados revelam que um dos grandes benefícios da inoculação com *A. brasilense* em trigo é a melhoria da nutrição de Ca e Mg na condição de déficit hídrico.

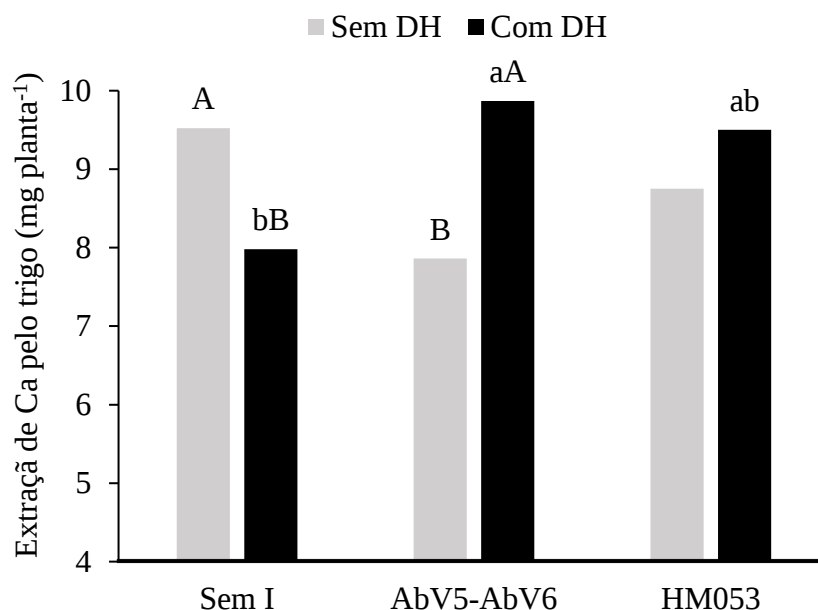


Figura 2.3 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na extração de Ca pelas plantas de trigo.

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na comparação de cada estirpe com e sem déficit hídrico e minúsculas na comparação entre as estirpes com ou sem déficit hídrico, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

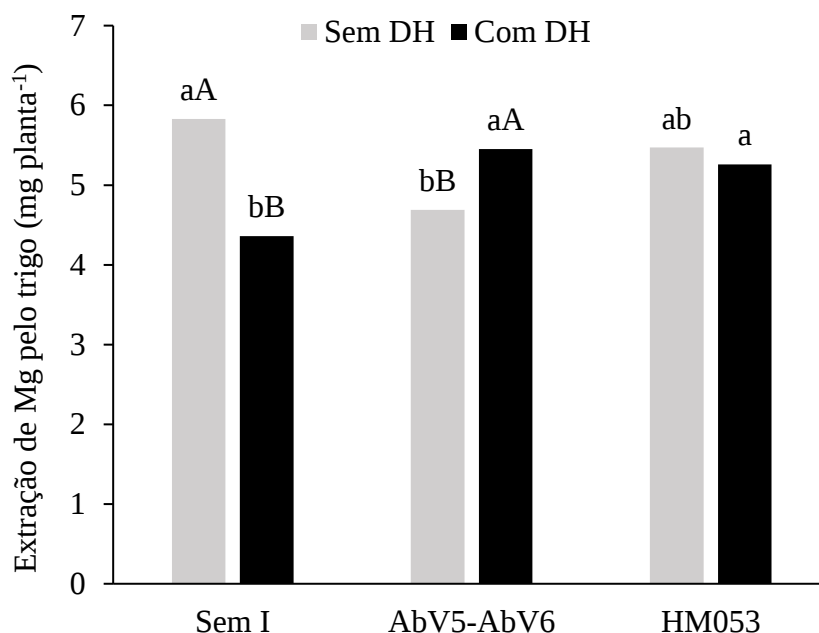


Figura 2.4 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na extração de Mg pelas plantas de trigo.

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na comparação de cada estirpe com e sem déficit hídrico e minúsculas na comparação entre as estirpes com ou sem déficit hídrico, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

2.4 CONCLUSÕES

A inoculação das sementes de trigo com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053 não influenciou o índice de clorofila e a produção de biomassa das plantas.

A estirpe HM053 promoveu aumento na densidade de raízes de trigo, especialmente na camada de 20 a 50 cm.

A inoculação das sementes de trigo com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053 favoreceu a absorção de Ca, Mg e K pelas plantas na condição de déficit hídrico.

REFERENCIAS

ANDRÉS, Z., PÉREZ-HORMAECHE, J., LEIDI, E. O., SCHLÜCKING, K., STEINHORST, L., MCLACHLAN, D. H.; PARDO, J. M. Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 17, p. 1806-1814, 2014.

ARDAKANI, M. R., MAZAHARI, D., MAFAKHERI, S.; MOGHADDAM, A. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus* intraradices and manure application. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, p. 181-192, 2011.

ARZANESH, M. H., ALIKHANI, H. A., KHAVAZI, K., RAHIMIAN, H. A.; MIRANSARI, M. "Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress." **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 197-205, 2011.

BROSCHAT, T. K. Nitrate, phosphate, and potassium leaching from container-grown plants fertilized by several methods. **Hort Science**, v. 30, n. 1, p. 74-77, 1995.

CAIRES, E. F.; GUIMARÃES, A. M. A novel phosphogypsum application recommendation method under continuous no-till management in Brazil. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 5, p. 1987-1995, 2018.

CHAVOUSHI, M., NAJAFI, F., SALIMI, A.; ANGAJI, S. A. Improvement in drought stress tolerance of safflower during vegetative growth by exogenous application of salicylic acid and sodium nitroprusside. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 168-176, 2019.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos: Sétimo levantamento, abril de 2024, safra 2023/2024. Brasília, DF, v. 11, n.7, 117p. 2024.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos: décimo segundo levantamento, setembro de 2023, safra 2022/2023. Brasília, DF, v. 10, n.12, 110 p. 2023.

DAL CORTIVO, C., FERRARI, M., VISIOLI, G., LAURO, M., FORNASIER, F., BARION, G.; VAMERALI, T. Effects of seed-applied biofertilizers on rhizosphere biodiversity and growth of common wheat (*Triticum aestivum* L.) in the field. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 72, 2020.

DOBBELAERE, S., CROONENBORGH, A., THYS, A., VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, n. 2, p. 153-162, 1999.

GALINDO, F. S., PAGLIARI, P. H., FERNANDES, G. C., RODRIGUES, W. L., BOLETA, E. H. M., JALAL, A.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Improving sustainable field-grown wheat production with *Azospirillum brasilense* under tropical conditions: a potential tool for improving nitrogen management. **Frontiers in Environmental Science**, v. 10, p. 821628, 2022.

GALINDO, F.S., BUZZETTI, S., RODRIGUES, W.L., BOLETA, E.H.M., SILVA, V.M., TAVANTI, R.F.R.; TEIXEIRA FILHO, M.C.M. Inoculation of *Azospirillum brasilense* associated with silicon as a liming source to improve nitrogen fertilization in wheat crops. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6160, 2020.

GASPARETO, R. N., JALAL, A., ITO, W. C. N., OLIVEIRA, C. E. D. S., GARCIA, C. M. D. P., BOLETA, E. H. M.; FILHO, M. C. M. T. Inoculation with Plant Growth-Promoting Bacteria and Nitrogen Doses Improves Wheat Productivity and Nitrogen Use Efficiency. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1046, 2023.

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, p. 413-425, 2010.

HUSSAIN, S., PENG, S., FAHAD, S., KHALIQ, A., HUANG, J., CUI, K.; NIE, L. Rice management interventions to mitigate greenhouse gas emissions: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 3342-3360, 2015.

KASIM, W. A., OSMAN, M. E., OMAR, M. N.; SALAMA, S. Enhancement of drought tolerance in *Triticum aestivum* L. seedlings using *Azospirillum brasilense* NO40 and *Stenotrophomonas maltophilia* B11. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 45, n. 1, p. 95, 2021.

KAZI, N., DEAKER, R., WILSON, N., MUHAMMAD, K.; TRETHOWAN, R. The response of wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasilense* in the field. **Field Crops Research**, v. 196, p. 368-378, 2016.

LU, Z., LU, J., PAN, Y., LI, X., CONG, R.; REN, T. Genotypic variation in photosynthetic limitation responses to K deficiency of *Brassica napus* is associated with potassium utilization efficiency. **Functional plant biology**, v. 43, n. 9, p. 880-891, 2016.

LUDWIG, R. L., MARTIN, T. N., ROCKENBACH, D., GIACOMINI, S.; VEY, R. T. Agronomic performance of wheat cultivars in response to inoculation (*Azospirillum brasilense*) and nitrogen application. **Revista Caatinga**, v. 35, p. 799-808, 2022.

LUDWIG, R. L., MARTIN, T. N., STECCA, J. D. L., CUNHA, V. D. S., NUNES, U. R.; GRANDO, L. F. T. Action specificity of chemical treatment and inoculation with *Azospirillum brasilense* in wheat seed on the crop initial growth. **Revista Ceres**, v. 65, p. 407-414, 2018.

MACHADO, H. B., FUNAYAMA, S., RIGO, L. U.; PEDROSA, F. D. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549-553, 1991.

MALAVOLTA, E., VITTI, G. C., OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba, POTAFOS, 1997. 319p

NIA, S. H., ZAREA, M. J., REJALI, F.; VARMA, A. Yield and yield components of wheat as affected by salinity and inoculation with *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 11, n. 2, p. 113-121, 2012.

PEDROSA, F. O., OLIVEIRA, A. L. M., GUIMARÃES, V. F., ETTO, R. M., SOUZA, E. M., FURMAM, F. G.; GALVÃO, C. W. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, p. 45-56, 2020.

PICCININ, G. G., BRACCINI, A. L., DAN, L. G., SCAPIM, C. A., RICCI, T. T.; BAZO, G. L. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 393-397, 2013.

ROSOLEM, C. A., SGARIBOLDI, T., GARCIA, R. A.; CALONEGO, J. C. Potassium leaching as affected by soil texture and residual fertilization in tropical soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 41, n. 16, p. 1934-1943, 2010.

RUIZ, H. A., MIRANDA, J.; CONCEIÇÃO, J. C. S. Contribuição dos mecanismos de fluxo de massa e de difusão para o suprimento de K, Ca e Mg a plantas de arroz. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 1015-1018, 1999.

SANTOS, A. R. S., ETTO, R. M., FURMAM, R. W., DE FREITAS, D. L., SANTOS, K. F. D. E. N., DE SOUZA, E. M.; GALVÃO, C. W. Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 422-426, 2017b.

SANTOS, K. F. D. N., MOURE, V. R., HAUER, V., SANTOS, A. R. S., DONATTI, L., GALVÃO, C. W.; STEFFENS, M. B. R. *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 415, p. 245-255, 2017a.

SARDANS, J. E.; PEÑUELAS, J. Potassium control of plant functions: Ecological and agricultural implications. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 419, 2021.

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

TAIZ, L., ZEIGER, E., MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TAKAHASHI, W. Y., GALVÃO, C. W., URREA-VALENCIA, S., GONÇALVES, D. R. P., HYEDA, D., CAIRES, E. F.; ETTO, R. M. Impact of seed-applied fungicide and insecticide on *Azospirillum brasilense* survival and wheat growth-promoting ability. **Letters in Applied Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 604-612, 2022.

TRÄNKNER, M., TAVAKOL, E.; JÁKLI, B. Functioning of potassium and magnesium in photosynthesis, photosynthate translocation and photoprotection. **Physiologia Plantarum**, v. 163, n. 3, p. 414-431, 2018.

TSAVKELOVA, E. A., KLIMOVA, S. Y., CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 117-126, 2006.

ZAHRA, N., WAHID, A., HAFEEZ, M. B., ULLAH, A., SIDDIQUE, K. H.; FAROOQ, M. Grain development in wheat under combined heat and drought stress: Plant responses and Zhao, W., LIU, L., SHEN, Q., YANG, J., HAN, X., TIAN, F.; WU, J. Effects of water stress on photosynthesis, yield, and water use efficiency in winter wheat. **Water**, v. 12, n. 8, p. 2127, 2020.

CAPÍTULO 3. CO-INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* PARA AMENIZAÇÃO DOS EFEITOS DE DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE FEIJÃO

CO-INOCULATION OF *Azospirillum brasilense* IN MITIGATING THE EFFECTS OF WATER DEFICIT IN BEAN PLANTS

Resumo – Os grãos de feijão são um dos principais produtos agrícolas responsáveis por contribuir para segurança alimentar de mais de 300 milhões de pessoas, principalmente na América Latina. Entretanto, o feijoeiro é uma cultura muito sensível a períodos de seca, fator recorrente nos últimos anos, o que ocasiona perdas consideráveis no rendimento da cultura. Estudos com bactérias promotoras de crescimento dentre elas *Azospirillum brasilense* vem sendo conduzidos por apresentarem características promissoras para aliviar o efeito de déficit hídrico na cultura. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a eficiência da co-inoculação de sementes de feijão com estirpes de *Azospirillum brasilense* após sua inoculação com *Rhizobium tropici*, em duas condições de umidade do solo. O trabalho foi realizado em estufa climatizada da Universidade Estadual de Ponta Grossa em Ponta Grossa-PR. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso no esquema fatorial 3×2 , com três repetições. Os tratamentos foram: sem co-inoculação, com co-inoculação das sementes com AbV5-AbV6 e com co-inoculação das sementes com HM053; e duas condições de umidade do solo, com e sem deficiência hídrica. As sementes de feijão, cv. BRS Esteio, foram inoculadas com inoculante líquido à base de *Rhizobium tropici*, na dose de 3 mL kg^{-1} de sementes e co-inoculadas com inoculantes líquidos, na dose de 3 mL kg^{-1} de sementes para as estirpes AbV5-AbV6 e HM053. Os regimes hídricos visaram manter o solo com 80% e 40% da capacidade de campo. O feijão foi cultivado em tubos de policloreto de vinila com dimensões de 50 cm de altura e 15 cm de diâmetro. Foram avaliados o índice de clorofila, o desenvolvimento radicular, massa seca da parte aérea e a extração de nutrientes pelas plantas. Os resultados mostraram que o déficit hídrico afetou negativamente todos os parâmetros avaliados. Plantas co-inoculadas com HM053 apresentaram redução no número de nódulos, na densidade de raízes e na produção de biomassa da parte aérea. A co-inoculação das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053 não promoveram melhoria no desenvolvimento do feijoeiro sob déficit hídrico.

Palavras-chave: Rizobactérias, *Phaseolus vulgaris*, déficit hídrico, segurança alimentar

Abstract – Bean grains are one of the main agricultural products contributing to the food security of over 300 million people, especially in Latin America. However, beans are very sensitive to drought periods, a recurrent factor in recent years, which leads to considerable losses in crop yield. Studies with plant growth-promoting bacteria, including *Azospirillum brasilense*, are being conducted due to their promising characteristics in alleviating the effects of water deficit on the crop. The aim of this study was to evaluate the efficiency of co-inoculation of bean seeds with strains of *A. brasilense* after their inoculation with *Rhizobium tropici* under two soil moisture conditions. The study was conducted in a climate-controlled greenhouse at the State University of Ponta Grossa in Ponta Grossa-PR. The experimental design was a randomized block design in a 3×2 factorial scheme, with three repetitions. The treatments were: without co-inoculation, with co-inoculation of seeds with AbV5-AbV6, and with co-inoculation of seeds with HM053; and two soil moisture conditions, with and without water deficiency. Bean seeds, cv. BRS Esteio, were inoculated with a liquid inoculant based on *Rhizobium tropici* at a dose of 3 mL kg^{-1} of seeds and co-inoculated with liquid inoculants at a dose of 3 mL kg^{-1} of seeds for strains AbV5-AbV6 and HM053. The water regimes aimed to maintain the soil at 80% and 40% of field capacity. The beans were cultivated in polyvinyl

chloride tubes with dimensions of 50 cm in height and 15 cm in diameter. The chlorophyll index, root development, shoot dry mass, and nutrient extraction by the plants were evaluated. The results showed that water deficit negatively affected all evaluated parameters. Plants co-inoculated with HM053 showed a reduction in the number of nodules, root density, and shoot biomass production. The seed co-inoculation with the *A. brasilense* strains AbV5-AbV6 and HM053 did not promote improvement in the development of bean plants under water stress.

Keywords: Rhizobacteria, *Phaseolus vulgaris*, drought, food security

3.1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais importantes utilizada para consumo humano direto, sem a necessidade de processamento industrial. Sua importância ocorre devido ao seu alto teor de proteínas e à sua combinação de carboidratos, fibras alimentares e minerais, dentre eles ferro e zinco. Atualmente, os grãos de feijão desempenham papel importantíssimo na segurança alimentar e no combate à desnutrição de mais de 300 milhões de pessoas no mundo, principalmente no Brasil (Siddiq; Mark et al., 2022).

Devido sua essencialidade na dieta de milhares de pessoas, a demanda por grãos de feijão tende a aumentar de forma significativa, levando em conta a estimativa de aumento da população mundial nos próximos anos. Pesquisas recentes demonstraram que o feijão pode ser usado como fonte de matéria prima alternativa para obtenção de ingrediente proteico não convencional pela indústria alimentícia (Paiva Gouvêa et al., 2023), o que, consequentemente, deverá aumentar ainda mais a demanda de feijão.

O Brasil é um dos países que possui o feijão como um dos principais componentes da dieta alimentar que, somado às condições climáticas favoráveis, coloca o país como um dos maiores produtores de feijão no mundo (FAO, 2022). Entretanto, a produtividade média nacional de grãos de feijão ainda é baixa. A eficiência no cultivo de feijão pode ser afetada por diversos fatores biofísicos, dentre eles o estresse causado por altas temperaturas, doenças, secas prolongadas, invernos mais rigorosos, verões mais prolongados e com excesso de chuvas nas colheitas (Mbow et al., 2017). Dentre esses fatores, a restrição hídrica vem sendo um dos mais limitantes da produção de grãos e muito recorrente devido às mudanças climáticas e o aquecimento global que vêm preocupando os agricultores em todo o mundo.

O feijoeiro é uma das culturas mais sensíveis ao déficit hídrico, podendo ocorrer perdas significativas no rendimento de grãos da cultura com a falta de chuvas (Nascimento Silva et al., 2020). A redução da disponibilidade de água no solo de forma mais severa pode levar à redução do potencial hídrico nas plantas. Consequentemente, como mecanismo de defesa, as plantas fecham os estômatos e, com isso, ocorre redução na atividade fotossintética. Quando as secas

ocorrem por períodos prolongados, pode ocorrer dano oxidativo nas células, inibição do crescimento e comprometimento da capacidade produtiva (Taiz et al., 2017). Segundo Halford et al. (2014), o déficit hídrico afeta não apenas o crescimento e o rendimento das plantas, mas também a qualidade dos grãos que está relacionada tanto com a composição nutricional quanto às suas propriedades funcionais, incluindo sabor, cor e aroma. Em períodos de seca muito severa, a nodulação das raízes e a fixação de N_2 podem ser afetadas de forma ainda mais drástica (Argaw et al., 2016; Fenta et al., 2020).

Esforços no manejo da cultura visando aumentar a tolerância das plantas de feijão ao déficit hídrico são necessários, de forma a garantir maior segurança alimentar em todo mundo. Uma das estratégias que vem sendo estudadas é o uso de bactérias promotoras de crescimento em plantas. O feijoeiro, por ser uma leguminosa, tem a capacidade de se associar às bactérias do gênero *Rhizobium* que fixam N_2 atmosférico no solo, disponibilizando-o para as plantas (Hungria; Nogueira, 2000). Essa é uma alternativa não apenas de baixo custo, como também mais sustentável, uma vez que pode reduzir a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados. O gênero *Azospirillum* também tem sido estudado como alternativa promissora para atenuar os efeitos deletérios de déficit hídrico em plantas. Dentre os benefícios do *Azospirillum* tem-se a fixação de N_2 atmosférico (Machado et al. 1991) e a síntese de fito-hormônios vegetais que contribuem para o crescimento e o desenvolvimento das plantas, especialmente as raízes (Souza; Ferreira, 2017; Cassán, Vanderleyden, Spaepen, 2014, 2014).

Em princípio, o aumento no crescimento das raízes promovido por *A. brasilense* pode melhorar o desenvolvimento das plantas em condições de déficit hídrico, por promover maior absorção de água e nutrientes em profundidade (Steiner et al., 2020; Messias et al., 2023). Alguns estudos mostraram que a co-inoculação de *A. brasilense* em sementes de feijão inoculadas com *Rhizobium tropici* proporcionou resultados promissores nos parâmetros de crescimento e produtividade da cultura. Entretanto, há pesquisas que mostraram resultados divergentes, afirmando que a eficiência da combinação das duas bactérias depende do genótipo, da condição ambiental, da dose do inoculante, bem como da estirpe co-inoculada (Reis et al., 2023; Remans et al., 2008). Nesse sentido, este trabalho teve o objetivo de avaliar a eficiência da co-inoculação de duas estirpes de *A. brasilense*, após inoculação com *Rhizobium tropici*, em sementes de feijão cultivadas em duas condições de umidade, sem e com deficiência hídrica.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local do estudo e delineamento experimental

O experimento foi realizado em estufa climatizada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, na região Centro-Sul do Paraná. Para este estudo foi utilizado um Latossolo coletado em área de campo nativo do município de Ponta Grossa – PR, na profundidade de 0–30 cm. Parte do solo coletado foi incubado com calcário dolomítico (PRNT de 95%) durante 90 dias. Durante esse período a umidade do solo foi mantida na capacidade de campo para favorecer a reação do calcário com o solo. A incubação teve o objetivo de elevar a saturação por bases do solo para 70%.

A plantas foram cultivadas em tubos de policloreto de vinila (PVC) com dimensões de 50 cm de altura e 15 cm de diâmetro. Os primeiros 10 cm dos tubos foram preenchidos com solo incubado com calcário e a parte inferior, de 10–50 cm, foi preenchida com solo apresentando alta acidez para simular condições de subsolo ácido. Esse arranjo foi realizado com o intuito de assemelhar as condições de campo com manejo em sistema plantio direto, no qual existe um gradiente de correção da acidez no perfil a partir da superfície do solo.

O experimento foi realizado no delineamento em blocos completos ao acaso, no esquema fatorial 3×2 , com três repetições. Os seguintes tratamentos foram empregados: sem co-inoculação, com co-inoculação de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e com co-inoculação de *A. brasilense* HM053; e duas condições de umidade no solo, com e sem déficit hídrico.

3.2.2 Co-inoculação das sementes e semeadura do feijão

As sementes de feijão foram primeiramente inoculadas manualmente em sacos plásticos com inoculante líquido à base de *Rhizobium tropici*, na dose 3 mL kg^{-1} de sementes. Após a secagem das sementes, à sombra, foi realizada a co-inoculação das sementes de feijão com as estirpes de *A. brasilense*. A co-inoculação, também com inoculante líquidos, foi realizada de forma manual em sacos plásticos por meio de uma mistura homogênea, de forma a garantir que todas as sementes ficassem com o número de células mínimo exigido. Utilizaram-se 3 mL kg^{-1} de sementes de ambas estirpes, AbV5-AbV6 e HM053. Antes dos procedimentos de inoculação e co-inoculação foi realizada a contagem de células de todas as estirpes, as quais apresentaram contagem de unidade formadora de colônia (UFC) superior a $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$. A inoculação e a co-inoculação foram realizadas alguns minutos antes da semeadura para evitar redução na viabilidade dos microrganismos. Os inoculante à base de *Rhizobium tropici* e das estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 foram adquiridas de produtos comerciais, enquanto a estirpe de *A.*

brasiliense HM053 foi adquirida no Laboratório de Biologia Molecular Microbiana (LABMOM) da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Na Tabela 3.1 são mostrados os resultados das análises químicas do solo na camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm) antes da instalação do experimento. Para suprir adequadamente os nutrientes, realizou-se adubação com P, K e solução nutritiva de micronutrientes em todos os tratamentos, por meio da abertura de sulco de 5 cm de profundidade no centro do tubo de PVC, no momento da semeadura. No sulco, foram aplicados 4,4 g de superfosfato simples (03-17-00), e 0,50 g de KCl (00-00-60). Para o fornecimento de micronutrientes, foram adicionados em cada tubo 75 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 44 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 36 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 11,4 mg de H_3BO_3 e 0,55 mg de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Visando melhorar as condições químicas no subsolo para o crescimento das plantas, foi realizada aplicação de gesso agrícola sobre a superfície do solo em todos os tubos. Essa aplicação teve o objetivo de fornecer S e melhorar as condições químicas na camada subsuperficial do solo. A dose de gesso aplicada (equivalente a $4,8 \text{ t ha}^{-1}$) foi definida de acordo com o método proposto por Caires; Guimarães (2018). O gesso foi aplicado sobre a superfície das colunas de solo 30 dias antes da semeadura. Logo após a aplicação de gesso, todos os tubos foram irrigados com uma quantidade de água equivalente a 50 mm por tonelada de gesso aplicada, totalizando 240 mm de água. Essa irrigação foi realizada de forma parcelada por um período de 30 dias antes da semeadura.

A semeadura do feijão, cultivar BRS Esteio sem tratamento químico, foi realizada em março de 2022, colocando-se quatro sementes em cada tubo na profundidade de 2 cm. Após a emergência das plântulas, realizou-se o desbaste, mantendo-se apenas duas plantas por tubo. Logo após o desbaste, os tubos foram mantidos sob os dois regimes hídricos até o final do experimento.

Tabela 3.1 - Resultados das análises químicas de solo da camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm), antes da instalação do experimento nos tubos de PVC.

Solo na coluna	pH (CaCl_2)	H + Al	Al	Ca	Mg	K	P	C-orgânico	V
		----- $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ -----					mg dm^{-3}	g dm^{-3}	%
0 a 10 cm	5,7	3,83	0,0	3,3	2,3	0,14	22,2	16,6	60
10 a 50 cm	4,2	8,24	1,6	1,2	0,3	0,15	15,9	15,6	17

Al, Ca e Mg trocáveis extraídos com KCl 1 mol L^{-1} ; P e K extraídos com Mehlich-1 e C-orgânico determinado pelo método Walkley-Black. V = saturação por bases

3.2.3 Condicionamento do déficit hídrico

Para simular os dois regimes hídricos, inicialmente foi determinada a capacidade de campo (CC) do solo. Para a condição de deficiência hídrica, os tubos foram mantidos com 40% da CC, enquanto os tubos sem restrição hídrica foram mantidos com 80% da CC, durante todo o período de desenvolvimento das plantas a partir da emergência. Para a manutenção dos regimes hídricos de forma mais precisa foi realizada pesagem individual dos tubos diariamente, com a devida complementação de água, dependendo da condição hídrica, durante todo o período de condução do experimento.

3.2.4 Leitura de clorofila

Aos 50 dias após emergência foi determinado o índice de clorofila durante o período da manhã, entre 9:00 h e 11:00 h, sempre usando o antepenúltimo trifólio totalmente aberto do ramo principal. Para esse parâmetro, utilizou-se o medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG, determinando-se o índice SPAD para as clorofilas *a* e *b*. Após as leituras dos índices de clorofila *a* e *b*, determinou-se o índice de clorofila total por meio da soma das duas leituras.

3.2.5 Matéria seca da parte aérea e de raízes e número e massa de nódulos

Aos 50 dias após a emergência, as plantas foram cortadas na base rente ao solo, lavadas com água deionizada e colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar a 60°C, até atingir massa constante. Posteriormente, essas amostras foram pesadas em balança de precisão para a determinação da produção de matéria seca da parte aérea. Logo após o corte das plantas, as colunas de solo foram seccionadas nas camadas de 0–10, 10–20 e 20–50 cm e as raízes foram separadas do solo por meio de lavagem em água corrente, utilizando-se peneira de malha de 0,5 mm. Depois de retiradas as impurezas, os nódulos presentes nas raízes foram cuidadosamente destacados, contados, colocados para secar em estufa com circulação forçada de ar a 60°C, até atingir massa constante, posteriormente foram pesados em balança de precisão esse mesmo procedimento foi realizado para das raízes de cada camada.. Em seguida, determinou-se a densidade de raízes por meio da relação entre a massa seca de raízes e o volume de solo em cada camada e em toda a coluna. A produção total de biomassa de plantas também foi determinada, somando-se a matéria seca da parte aérea e a matéria seca de raízes na coluna.

3.2.6 Extração de nutrientes pelas plantas

Logo após a determinação da matéria seca da parte aérea das plantas, as amostras foram moídas para a determinação dos teores de N, P, K, Ca, Mg e S, utilizando-se os métodos descritos em Malavolta; Vitti; Oliveira (1997). A extração dos nutrientes pela parte aérea das plantas foi calculada multiplicando-se a concentração de cada nutriente pela matéria seca total da parte aérea da planta.

3.2.7 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, de acordo com o delineamento em blocos completos ao acaso no esquema fatorial 3×2 . Os efeitos dos tratamentos envolvendo co-inoculação com as estirpes de *A. brasilense* e déficit hídrico foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Quando houve interação significativa entre os dois fatores, foram realizados os devidos desdobramentos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software R.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Índice de clorofila em plantas de feijão

Os tratamentos empregados na cultura do feijão apresentaram diferenças significativas nos índices de clorofila, mas apenas de forma isolada nos fatores co-inoculação e déficit hídrico (Tabela 3.2). Quanto à co-inoculação, os índices de clorofila *a* e de clorofila total foram maiores no tratamento com co-inoculação de AbV5-AbV6 nas sementes comparados com a co-inoculação das sementes com HM053. Quanto ao fator déficit hídrico, as plantas que se desenvolveram sem restrição hídrica apresentaram índices mais elevados de clorofila *b*. Steiner et al. (2020), ao avaliarem a co-inoculação de sementes de feijão com *Rhizobium* e *A. brasilense* AbV5-AbV6, em diferentes condições hídricas, também observaram que essas duas estirpes combinadas resultou em maior índice relativo de clorofila, sem ou com restrição hídrica.

Os resultados do presente trabalho para os índices de clorofila demonstram que a restrição de umidade do solo à 40% da capacidade de retenção afetou significativamente a síntese de clorofila nas plantas de feijão aos 50 dias após a emergência e que a co-inoculação não foi capaz de atenuar o efeito negativo do déficit hídrico no teor de clorofila. Destacam-se os valores mais baixos de índices de clorofila no tratamento com HM053 comparados com o tratamento com AbV5-AbV6 (Tabela 3.2). Importante destacar que a síntese de clorofila pode ser afetada por

Tabela 3.2 - Clorofila *a* (CLF *a*), clorofila *b* (CLF *b*) e clorofila total (CLF total) em plantas de feijão considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH) aos 50 dias após emergência.

Tratamento	CLF <i>a</i>	CLF <i>b</i>	CLF total
Co-inoculação (I)		Índice SPAD	
Sem I	24,71ab	7,88	32,60ab
AbV5-AbV6	25,86a	8,58	34,43a
HM053	23,15b	7,16	30,30b
Déficit (DH)			
Sem DH	24,85	8,38a	33,24
Com DH	24,30	7,36b	31,64
<i>P</i> > <i>F</i>			
Co-inoculação (I)	0,036	0,064	0,041
Déficit (DH)	0,462	0,037	0,187
I × DH	0,880	0,975	0,930
CV (%)	6,27	11,51	7,40

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

vários fatores, dentre eles a disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente aqueles que constituem a molécula desse pigmento, como é o caso do N e do Mg (Fritsch; Ray, 2007). É possível que a estirpe HM053 tenha prejudicado a fixação simbiótica do N₂ por ter disponibilizado mais amônio para as plantas. O déficit hídrico é um dos principais fatores que afetam o desenvolvimento das plantas e, nessa condição de restrição de umidade, as plantas podem ter reduzido a atividade fotossintética, comprometendo a síntese de clorofila nas plantas (Fenta et al., 2020).

3.3.2 Produção de biomassa de plantas de feijão

A co-inoculação das sementes influenciou significativamente somente a densidade de raízes na camada de solo de 20 a 50 cm (Tabela 3.3). Nessa camada, as plantas que tiveram as sementes co-inoculadas com a estirpe AbV5-AbV6 apresentaram maior densidade de raízes em relação às plantas inoculadas com a estirpe HM053, seguindo resultados semelhantes aos obtidos para clorofila *a* e clorofila total (Tabela 3.2), porém não se diferenciaram das plantas sem inoculação. A indução do déficit hídrico reduziu a produção de matéria seca da parte aérea, a densidade de raízes no perfil da coluna de solo e a produção de biomassa total das plantas de feijão.

Avaliando a associação da inoculação de *Rhizobium tropici* e co-inoculação de *A. brasilense* em quatro cultivares de feijão, Reis et al. (2023) observaram que o fator genético pode ter influenciado os resultados encontrados na produção de biomassa seca da parte aérea e

Tabela 3.3 – Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), densidade de raízes e biomassa total de plantas de feijão, considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.

Tratamento	MSPA	Densidade de raízes				Biomassa total
		0 a 10 cm	10 a 20 cm	20 a 50 cm	Total	
Co-inoculação (I)	g planta ⁻¹	g dm ⁻³				g planta ⁻¹
Sem I	9,04	0,62	0,20	0,19ab	1,01	11,22
AbV5-AbV6	8,84	0,60	0,23	0,22a	1,07	11,57
HM053	8,26	0,62	0,20	0,17b	1,00	11,16
Déficit (DH)						
Sem DH	10,39a	0,66a	0,25a	0,27a	1,19a	13,47a
Com DH	7,03b	0,57b	0,17b	0,12b	0,86b	9,16b
P > F						
Co-inoculação (I)	0,085	0,918	0,195	0,008	0,91	0,224
Déficit (DH)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I × DH	0,421	0,252	0,112	0,033	0,781	0,947
CV (%)	7,73	0,69	14,95	9,52	5,17	8,9

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

das raízes. O cultivar BRS Esteio, o mesmo utilizado neste experimento, não apresentou diferença significativa para produção de matéria seca da parte aérea, mas apresentou acréscimo significativo de raízes quando as sementes foram co-inoculadas com *A. brasilense*. Vale ressaltar que os autores aplicaram doses diferentes e inferiores à utilizada neste experimento, além de terem realizado uma aplicação via foliar no estágio R₄ da cultura, o que pode ter influenciado a eficiência dos tratamentos.

Os resultados aqui apresentados também divergem de outros estudos que concluíram que a co-inoculação em leguminosas com bactérias simbióticas e associativas produz efeitos benéficos, promovendo melhor desenvolvimento da cultura. Hungria et al. (2013) por exemplo, ao estudarem a co-inoculação com *Rhizobium tropici* e *A. brasilense* estirpes AbV5-AbV6 na cultura do feijoeiro relataram que a combinação entre as duas espécies melhorou os parâmetros biométricos das plantas. Souza; Ferreira (2017) também concluíram que os parâmetros de crescimento das plantas de feijoeiro, como peso seco das raízes e da parte aérea, foram significativamente aumentados pela co-inoculação de *A. brasilense* AbV5-AbV6, o que contribuiu para o incremento de mais de 20 % na produtividade de grãos.

Dentre os principais benefícios esperados da co-inoculação de sementes com *A. brasilense* podem ser destacados o aumento na disponibilidade de N por fixação de N₂, melhoria no desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente, na produção de biomassa da

parte aérea das plantas, maior absorção de nutrientes e aumento da tolerância ao déficit hídrico devido às raízes mais profundas (Zaidi et al., 2017). Segundo Cassán; Vanderleyden; Spaepen (2014), todos esses benefícios também foram associados à produção de fito-hormônios como giberelinas, citocininas e auxinas, representada principalmente pelo ácido indol-3-acético que é considerado um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento das raízes

De fato, uma das hipóteses do presente estudo era que ambas as estirpes de *A. brasilense* viessem a ter forte sinergismo com *Rhizobium tropici*, promovendo melhor desenvolvimento das plantas de feijão, bem como redução dos efeitos negativos do déficit hídrico. Entretanto, os resultados obtidos com a co-inoculação de cada estirpe *A. brasilense* foram distintos nas duas condições de umidade do solo (Tabela 3.4). Quando o efeito da co-inoculação foi avaliado na condição sem restrição hídrica, a densidade de raízes na camada de 20 a 50 cm foi maior com o uso de AbV5-AbV6 do que de HM053, embora ambas estirpes não tenham apresentado diferença significativa em relação ao tratamento sem co-inoculação. Na condição de déficit hídrico, as duas estirpes não ocasionaram alterações significativas na densidade de raízes na camada 20 a 50 cm. Ainda é possível observar que o déficit hídrico reduziu a densidade de raízes na camada de 20 a 50 cm em todos os tratamentos, sem ou com a co-inoculação.

Tabela 3.4 - Desdobramento da interação entre co-inoculação (I) e déficit hídrico (DH) densidade de raiz de plantas de feijão na camada 20 a 50 cm.

Tratamento	Densidade de raízes na camada de 20 a 50 cm		
	Sem DH	Com DH	<i>P > F</i>
Sem I	0,27abA	0,11B	<0,001
AbV5-AbV6	0,31aA	0,13B	<0,001
HM053	0,23bA	0,12B	<0,001
<i>P > F</i>	0,001	0,674	

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados da associação entre microrganismos, pode depender também de um fator genético, em um estudo com diferentes genótipos de feijão de Remans et al. (2008) demonstrou que a combinação entre *Rhizobium* e *Azospirillum* Sp245 reduziu o rendimento de grãos em quatro locais diferentes em relação à inoculação única com *Rhizobium* o que corroboram com os resultados aqui apresentado. Entretanto, os dados de Steiner et al. (2020) contrastam com os divulgados neste estudo, pois a co-inoculação com *A. brasilense* AbV5-AbV6 atenuou os efeitos do déficit hídrico em plantas de feijão, os mesmo ainda observaram que as plantas apresentaram maior índice de estabilidade da membrana foliar e aumento no conteúdo relativo

de água nas folhas quando comparadas àquelas não co-inoculadas, tanto sob condições de estresse moderado quanto de estresse severo. Steiner et al. (2020) também observaram maior volume de raízes e aumento na área foliar e produção de matéria seca total das plantas, e associaram os resultados obtidos ao crescimento radicular e à formação de raízes laterais.

3.3.3 Nodulação em plantas de feijão

O número e a massa de nódulos por planta de feijão foram influenciados significativamente pelos tratamentos de co-inoculação e seguiram a seguinte ordem: sem co-inoculação > AbV5-AbV6 > HM053 (Tabela 3.5). Isso significa que a nodulação das plantas de feijão foi mais bem estabelecida somente com a inoculação de *Rhizobium tropici*. O número de nódulos foi maior com do que sem déficit hídrico, mas a massa de nódulos não foi influenciada pela condição hídrica. Isso significa que na ausência de limitação hídrica, os nódulos foram maiores do que com deficiência hídrica.

No estudo de Horácio et al. (2020) verificou-se que a co-inoculação não alterou de forma significativa o número de nódulos de feijão. Já, Souza; Ferreira (2017) observaram que a nodulação do feijoeiro, determinada pelo número e massa seca de nódulos, foi significativamente aumentada pela co-inoculação de *Rhizobium tropici* e *A. brasilense* AbV5-Ab-V6. Messias et al. (2023) avaliaram o efeito da co-inoculação de *R. tropici* e diferentes doses de *A. brasilense* sobre o número e a massa seca de nódulos do feijoeiro cultivado em cinco locais e em diferentes épocas. Os autores observaram melhoria da nodulação na maioria dos cultivos; entretanto, alguns resultados corroboraram com os dados apresentados neste trabalho, pois não apresentaram diferenças significativas e, dependendo da dose aplicada, houve redução no número de nódulos nas raízes de feijoeiro. É possível que, de alguma forma, fatores como época de semeadura, precipitação pluvial, características químicas e físicas do solo e histórico de cultivo possam afetar a eficiência da co-inoculação do feijoeiro.

Tabela 3.5 - Número e massa seca de nódulos de plantas de feijão considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência

Tratamento	Número de nódulos por planta	Massa de nódulos por planta
Co-inoculação (I)		g planta ⁻¹
Sem I	118a	0,16a
AbV5-AbV6	89b	0,11b
HM053	67c	0,06c
Déficit (DH)		
Sem DH	65b	0,11
Com DH	117a	0,11
P > F		
Co-inoculação (I)	<0,001	<0,001
Déficit (DH)	<0,001	0,813
I × DH	0,030	0,365
CV (%)	10,67	17,01

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

O número de nódulos por planta de feijão foi influenciado significativamente pela interação dos tratamentos de co-inoculação × déficit hídrico (Tabela 3.6). O número de nódulos foi significativamente mais elevado quando houve restrição hídrica do que na sua ausência, em todos os tratamentos sem ou com co-inoculação. Resultados semelhantes também foram relatados por Rodiño et al. (2021) ao avaliarem a interação entre diferentes estirpes de bactérias noduladoras em diferentes genótipos de feijão e condições hídricas. Uma hipótese para esse resultado, é que devido ao estresse e provável redução das bactérias, iniciou-se vários pontos de infecção, como não havia ambiente para desenvolvimento das colônias, os nódulos não se desenvolveram devidamente.

Em outros estudos (Mnasri et al., 2007; Verdoy et al., 2004) verificou-se que não apenas o número de nódulos, mas também a massa fresca e seca da parte aérea, e a massa das raízes de plantas de feijão em condição de déficit hídrico foram significativamente afetados pela perda de água, sugerindo que as condições de seca tiveram um efeito negativo no crescimento das plantas. O déficit hídrico normalmente limita o crescimento e a sobrevivência do *Rhizobium* no solo, além de causar redução no número de pelos absorventes nas raízes das plantas (Nascimento Silva et al., 2020). No presente estudo, parece claro que o déficit hídrico de alguma forma proporcionou aumento do número de nódulos ao passo que também limitou o desenvolvimento desses nódulos, enquanto que na condição sem limitação hídrica, as plantas produziram menos nódulos de maior tamanho e ativos. Redução no tamanho de nódulos em plantas de feijão em condição de déficit hídrico também foi observado por Fenta et al. (2020).

Esses autores, ao avaliarem a nodulação em diferentes linhagens de feijão em dois regimes de irrigação, observaram redução no tamanho dos nódulos em todas as linhagens de feijão. Este efeito pode estar associado à interferência da seca no mecanismo de simbiose que impede que o nódulo se desenvolva (Hungria; Vargas, 2000).

Tabela 3.6 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) para número de nódulos em plantas de feijão.

Tratamento	Número de nódulos		
	Sem DH	Com DH	<i>P > F</i>
Sem I	84aB	152aA	<0,001
AbV5-AbV6	62bB	117bA	<0,001
HM053	50bB	83cA	0,02
<i>P > F</i>	0,005	<0,001	

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Um menor número de nódulos nas raízes de plantas de feijão co-inoculadas com AbV5-AbV6 e HM053 foi observado nas duas condições hídricas (Tabela 3.6). Avaliando o efeito da co-inoculação de *Azospirillum* em feijão inoculado com *Rhizobium* em diferentes locais no campo, Cardoso; Ferreira (2021) relataram resultados semelhantes para o número e massa seca de nódulos; porém a massa seca da parte aérea de plantas foi mais elevada com a co-inoculada de *Azospirillum*. Os autores relacionaram os resultados aos diferentes tipos de manejo que podem influenciar o nível de fertilidade do solo e o desenvolvimento das plantas que dependem menos dos microrganismos. No presente estudo, parece claro que a co-inoculação das sementes de feijão com *A. brasilense* prejudicou a nodulação das plantas, especialmente quando a co-inoculação foi realizada com a estirpe HM053.

3.3.4 Acúmulo de nutrientes em plantas de feijão

A co-inoculação das sementes com a estirpe AbV5-AbV6 não se diferenciou do tratamento sem co-inoculação para a absorção de nutrientes pelas plantas de feijão (Tabela 3.7). Entretanto, a extração de N, P, Ca, Mg e S foi significativamente menor no tratamento com a co-inoculação de HM053. Esses resultados contrastam com os obtidos por Messias et al. (2023), os quais verificaram que a inoculação de *Rhizobium tropici* na semente associada com a co-inoculação com *A. brasilense* pode ser uma alternativa para a substituição parcial ou total do uso de fertilizante nitrogenado na cultura do feijoeiro, indicando eficiência da co-inoculação em disponibilizar N para as plantas.

Tabela 3.7 - Extração de nutrientes pelas plantas de feijão, considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S
Co-inoculação (I)						
	mg planta ⁻¹					
Sem I	152,9a	24,98a	199,63	77,23ab	22,81a	35,99a
AbV5-AbV6	169,9a	24,78a	204,20	79,31a	22,60a	37,29a
HM053	127,3b	21,37b	184,81	68,77b	19,43b	31,01b
Déficit (DH)						
Sem DH	186,2a	27,09a	218,39a	67,84a	28,35a	41,42a
Com DH	113,4b	20,32b	174,03b	82,37b	14,74b	28,11b
P > F						
Co-inoculação (I)	0,001	0,012	0,132	0,025	0,038	0,010
Déficit (DH)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I × DH	0,039	0,020	0,185	0,184	0,843	0,800
CV (%)	9,02	7,92	8,01	7,8	9,56	8,52

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

O déficit hídrico reduziu a absorção de todos os nutrientes pelas plantas de feijão (Tabela 3.7). A absorção de N e P pelas plantas de feijão foi significativamente influenciada pela interação dos tratamentos de co-inoculação × déficit hídrico. A condição de déficit hídrico reduziu significativamente a absorção de N (Tabela 3.8) e P (Tabela 3.9) quando comparados com o tratamento sem restrição hídrica, independentemente dos tratamentos de co-inoculação. A redução na absorção de N na condição de déficit hídrico pode estar relacionada ao diâmetro dos nódulos, já que a atividade de fixação de N₂ dos nódulos radiculares pode estar intimamente relacionada ao seu tamanho. Nódulos maiores apresentam capacidade de fixar maior quantidade de N₂, podendo inclusive ser um índice eficaz na mensuração da atividade de fixação de N₂ dos nódulos (Hungria et al., 2001). Segundo Gil-Quintana et al. (2013), a seca pode prejudicar especificamente a atividade da nitrogenase dos nódulos e também o fornecimento de açúcares excretados pelas plantas aos nódulos, reduzindo a eficiência na fixação de N₂.

Quando as plantas estavam sem déficit hídrico, a absorção de N (Tabela 3.8) e P (Tabela 3.9) pelas plantas de feijão ocorreu de forma semelhante à avaliação dos fatores isolados (Tabela 3.7), em que o tratamento com a estirpe HM053 proporcionou menor extração de N e P pelas plantas quando comparada com os tratamentos sem inoculação e com co-inoculação de AbV5-AbV6. Na condição de déficit hídrico, não houve diferença significativa entre esses tratamentos na absorção de N e P pelas plantas de feijão.

Tabela 3.8 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na extração de nitrogênio por plantas de feijão.

Tratamento	N (mg planta ⁻¹)		
	Sem DH	Com DH	<i>P</i> > <i>F</i>
Sem I	191,2 aA	114,6B	<0,001
AbV5-AbV6	217,38 aA	122,48B	<0,001
HM053	151,34 bA	103,4B	0,001
<i>P</i> > <i>F</i>	<0,001	0,265	

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 3.9 - Desdobramento da interação entre inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na extração de fósforo por plantas de feijão.

Tratamento	P (mg planta ⁻¹)		
	Sem DH	Com DH	<i>P</i> > <i>F</i>
Sem I	30,39aA	19,57B	<0,001
AbV5-AbV6	27,78aA	21,77B	0,002
HM053	23,11bA	19,77B	0,046
<i>P</i> > <i>F</i>	0,002	0,306	

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Dados de Yadegari et al. (2010) ao avaliarem o potencial de fixação de N₂ com duas linhagens de *Rhizobium* em sementes feijoeiro co-inoculadas com *A. lipoferum*, demonstram resultados que divergem aos apresentados nesta pesquisa, pois concluíram que a combinação entre as bactérias promoveu melhor desenvolvimento das plantas, em consequência do aumento expressivo da nodulação, fixação e acúmulo de N na planta. Entretanto, os autores também observaram variação nos resultados conforme as linhagens de *Rhizobium* e cultivares de plantas utilizadas, indicando haver diferenças na interação e associação entre os microrganismos no solo e a planta.

Mortinho et al. (2022), estudando o efeito da co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal no aumento da eficiência da fertilização com N, P e K em dois anos de cultivo de feijão comum, também verificaram que a co-inoculação promoveu aumento no teor de N no primeiro ano de cultivo. Esse resultado foi associado à maior expansão do sistema radicular proporcionada pelas bactérias promotoras de crescimento e também à disponibilidade de N na região da rizosfera, a qual é influenciada pela fixação biológica de N₂. Nesse mesmo estudo, no segundo ano de cultivo, os teores de P e K foram significativamente mais baixos nas plantas co-inoculadas em comparação às plantas com apenas inoculação de *Bradyrhizobium*, a divergência entre os resultados desses autores e os dados aqui apresentados demonstram que

ainda existem desafios a serem vencidos ao se trabalhar com esses microrganismos promotores de crescimento.

A diminuição do número de nódulos nas raízes de plantas co-inoculadas com *A. brasilense* estirpe HM053 pode ter influenciado negativamente os demais parâmetros analisados nas plantas de feijão, principalmente no acúmulo de N, uma vez que as plantas dependiam quase que exclusivamente da fixação de N₂ pelas bactérias fixadoras presente nos nódulos. O N é um dos nutrientes mais exigidos pelas plantas de feijão e possui várias funções nas plantas, fazendo parte dos aminoácidos, proteínas e outras moléculas fundamentais para o bom crescimento e desenvolvimento das plantas.

Importante destacar que o teor de N nas folhas é fundamental para o processo fotossintético que contribui para aumento da biomassa das plantas e, muitas vezes, permite até usar essa informação para modelar a fotossíntese em escala de ecossistema (Rogers et al., 2017). A forte relação entre o teor de N nas plantas e a eficiência do uso da água em espécies de leguminosas (Adams et al., 2016) pode conferir às plantas maior tolerância em períodos de déficit hídrico. Segundo Fenta et al. (2020), a baixa disponibilidade de N também pode afetar de forma significativa sua absorção e, consequentemente, a produção de biomassa da parte aérea, o desenvolvimento das raízes e a fisiologia da planta.

Por meio dos resultados obtidos é possível inferir que houve possível antagonismo entre a estirpe HM053 e o *Rhizobium tropici*, principal responsável pelo fornecimento de N para o feijoeiro na ausência de adubação nitrogenada. Segundo Ruthayathas et al. (1983), a eficiência da simbiose entre microrganismos fixadores de N₂ depende de vários fatores que interferem na interação da bactéria com a planta. Apesar da quantidade de *Rhizobium* inoculada nas sementes ter sido bem expressiva, quase sempre as sementes inoculadas são semeadas em solos diferentes do local em que os microrganismos foram isolados, podendo apresentar condições desfavoráveis para sobrevivência dos mesmos. Após a inoculação e a semeadura, os microrganismos precisam se adaptar às condições ambientais prevalecentes no solo, se multiplicarem e, muitas vezes, podem competir com espécies nativas ou no caso em questão entre as espécies inoculadas. Posteriormente, habitam a rizosfera até iniciarem o processo de infecção e, posterior, nodulação (Laguerre et al., 2003; Rathjen et al., 2024). Vários trabalhos vêm demonstrando boa compatibilidade entre *Rhizobium* e bactérias do gênero *Azospirillum*, inclusive as estirpes AbV5-AbV6, entretanto, a estirpe HM053 pode apresentar incompatibilidade com o *Rhizobium tropici* por liberar mais amônio, reduzindo sua capacidade de nodulação e fixação de N₂.

Broughton et al. (2000) relatam que o controle simbiótico entre o *Rhizobium* e a planta hospedeira é influenciado por vários fatores. Após sobreviverem, as bactérias devem ser atraídas por sinais ou substâncias excretadas pelas raízes das plantas, dentre elas os flavonoides. Os flavonoides são específicos do hospedeiro que são reconhecidos por fatores de transcrição nos rizóbios (Liu; Murray, 2016). Após alcançarem as raízes das plantas, as bactérias iniciam a infecção primeiramente no córtex radicular, na endoderme e o periciclo se divide para formar um nódulo onde os rizóbios continuam a se dividir e diferenciar em bacteroides (Oldroyd; Downie, 2008). Dependendo do tipo e concentração de flavonóides excretados pode ocorrer interrupção no desenvolvimento dos nódulos, redução na atividade do *Rhizobium* e, conseqüentemente, na fixação N₂.

As bactérias do gênero *Azospirillum* não apresentam capacidade de formar nódulos, porém podem estar presentes no interior das raízes. Estudos mostram que as bactérias *A. brasilense* podem ser transmitidas verticalmente em plantas de *Phaseolus vulgaris*, demonstrando ser parte ativa do microbioma da semente de feijão e podendo efetivamente ser transmitida às gerações subsequentes (Malinich; Bauer, 2018). Essa mobilidade das bactérias somado a possíveis excreção de carboidratos específicos também pode ter favorecido a distribuição da bactéria no sistema radicular, aumentando a competitividade com o *Rhizobium*.

Para a inoculação de múltiplas espécies ser bem-sucedida é necessário que haja interação entre elas, a comunidade residente e o meio ambiente. Ou seja, as espécies inoculadas devem explorar os nichos disponíveis no novo habitat, bem como resistir à exclusão devido à competição por recursos e outras interações antagônicas (Vall-Llosera et al., 2016; ALBA et al., 2017). As interações competitivas diretas entre as espécies são mais comuns devido à utilização sobreposta de recursos (Wei et al., 2015; Hudina, et al., 2011). Dessa forma, a coexistência de ambas espécies de bactérias depende da heterogeneidade de recursos que geralmente é regulada pela planta, a geolocalização e o tipo de solo, como foi relatado por (Kumar et al., 2016).

Importante destacar que a estirpe HM053 de *A. brasilense* possui a característica de continuar fixando N mesmo na presença de elevada quantidade de amônio no solo (Machado et al. 1991). Apesar de sua eficiência em promover o crescimento e a produção em gramíneas como demonstrado por Pedrosa et al., (2020), sua utilização na co-inoculação de leguminosas precisa ser estudada mais profundamente, tanto a capacidade de interação das plantas com o *Rhizobium*, quanto a forma e a dose de aplicação.

3.4 CONCLUSÕES

A condição de déficit hídrico afetou negativamente a nodulação, o desenvolvimento das raízes e da parte aérea, bem como a extração de nutrientes pelas plantas de feijão.

A co-inoculação com *A. brasilense* não reduziu os efeitos negativos do déficit hídrico nas plantas de feijão.

O uso da estirpe de *A. brasilense* AbV5-AbV6 na co-inoculação das sementes aumentou a densidade de raízes de feijão em profundidade de 20 a 50 cm, na ausência de déficit hídrico.

O uso da estirpe de *A. brasilense* HM053 na co-inoculação das sementes reduziu o número e a massa de nódulos, bem como a extração de N, P, Ca, Mg e S pelas plantas de feijão.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. A., TURNBULL, T. L., SPRENT, J. I.; BUCHMANN, N. Legumes are different: Leaf nitrogen, photosynthesis, and water use efficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 15, p. 4098-4103, 2016.

ALBA, C., NESMITH, J. E., FAHEY, C., ANGELINI, C.; FLORY, S. L. Methods to test the interactive effects of drought and plant invasion on ecosystem structure and function using complementary common garden and field experiments. **Ecology and Evolution**, v.7, pp.1442-1452. 2017

ARGAW, A. Effectiveness of Rhizobium inoculation on common bean productivity as determined by inherent soil fertility status. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 311-322, 2016.

BROUGHTON, W. J., JABBOURI, S.; PERRET, X. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 20, p. 5641-5652, 2000.

CAIRES, E. F.; GUIMARÃES, A. M. A novel phosphogypsum application recommendation method under continuous no-till management in Brazil. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 5, p. 1987-1995, 2018.

CARDOSO, R. M.; FERREIRA, E. P. B. Assessment of consortia inoculation effects on the agronomical performance of the common bean. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 52, n. 16, p. 1971-1980, 2021.

CASSÁN, F., VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 440-459, 2014.

FENTA, B.A., BEEBE, S.E.; KUNERT, K.J. Role of fixing nitrogen in common bean growth under water deficit conditions. **Food and Energy Security**, v. 9, n.1, p.183. 2020.

FRITSCHI, F. B.; RAY, J. D. Soybean leaf nitrogen, chlorophyll content, and chlorophyll a/b ratio. **Photosynthetica**, v. 45, p. 92-98, 2007.

GIL-QUINTANA, E., LARRAINZAR, E., SEMINARIO, A., DÍAZ-LEAL, J. L., ALAMILLO, J. M., PINEDA, M.; GONZÁLEZ, E. M. Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 8, p.2171-2182. 2013

HALFORD, N. G., CURTIS, T. Y., CHEN, Z.; HUANG, J. Effects of abiotic stress and crop management on cereal grain composition: implications for food quality and safety. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 5, p. 1145-1156, 2014.

HORÁCIO, E. H., ZUCARELI, C., GAVILANES, F. Z., YUNES, J. S., DOS SANTOS SANZOVO, A. W.; ANDRADE, D. S. Co-inoculation of rhizobia, azospirilla and cyanobacteria for increasing common bean production. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5supl1, p. 2015-2028, 2020.

HUDINA, S., GALIĆ, N., ROESSINK, I.; HOCK, K. Competitive interactions between co-occurring invaders: identifying asymmetries between two invasive crayfish species. **Biological Invasions**, v. 13, p.1791-1803. 2011.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2-3, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M., CAMPO, R. J.; MENDES, I. D. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina-PR, Embrapa Soja. v. 35, 2001. 48p.

HUNGRIA, M., NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013.

KUMAR, M., MÄNNISTÖ, M. K., VAN ELSAS, J. D.; NISSINEN, R. M. Plants impact structure and function of bacterial communities in Arctic soils. **Plant and Soil**, v. 399, p. 319-332, 2016.

LAGUERRE, G., LOUVRIER, P., ALLARD, M. R.; AMARGER, N. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2276-2283, 2003.

LIU, C. W.; MURRAY, J. D. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. **Plants**, v. 5, n. 3, p. 33, 2016.

MACHADO, H. B., FUNAYAMA, S., RIGO, L. U.; PEDROSA, F. D. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549-553, 1991.

MALAVOLTA, E., VITTI, G. C., OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba, POTAFOS, 1997. 319p

MALINICH, E. A.; BAUER, C. E. The plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* is vertically transmitted in *Phaseolus vulgaris* (common bean). **Symbiosis**, v. 76, n. 2, p. 97-108, 2018.

MBOW, H. O. P., REISINGER, A., CANADELL, J.; O'BRIEN, P. Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems (SR2). **Ginevra, IPCC**, v. 650, 2017.

MESSIAS, M., ASOBIA, P. C.; FERREIRA, E. P. D. B. Rhizobia and azospirilla co-inoculation boosts growth and productivity of common bean. **International Journal of Agriculture; Biology**, v. 29, p. 65-73, 2023.

MNASRI, B., AOUANI, M. E.; MHAMDI, R. Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 1744-1750, 2007.

MORTINHO, E. S., JALAL, A., DA SILVA OLIVEIRA, C. E., FERNANDES, G. C., PEREIRA, N. C. M., ROSA, P. A. L.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Co-inoculations with plant growth-promoting bacteria in the common bean to increase efficiency of NPK fertilization. **Agronomy**, v. 12, n. 6, p. 1325, 2022.

NASCIMENTO SILVA, A., RAMOS, M. L. G., JÚNIOR, W. Q. R., DE ALENCAR, E. R., DA SILVA, P. C., DE LIMA, C. A.; SILVA, M. A. V. Water stress alters physical and chemical quality in grains of common bean, triticale and wheat. **Agricultural Water Management**, v. 231, p. 106023. 2020.

OLDROYD, G. E.; DOWNIE, J. A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 519-546, 2008.

FAO Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (2022) Dados sobre alimentação e agricultura. Produção - Culturas. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/v> isualize. Acessado em 16 de maio de 2024

PAIVA GOUVÊA, L., CALDEIRA, R., DE LIMA AZEVEDO, T., GALDEANO, M. C., FELBERG, I., LIMA, J. R.; MELLINGER, C. G. Physical and techno-functional properties of a common bean protein concentrate compared to commercial legume ingredients for the plant-based market. **Food Hydrocolloids**, v. 137, p. 108351, 2023.

PEDROSA, F. O., OLIVEIRA, A. L. M., GUIMARÃES, V. F., ETTO, R. M., SOUZA, E. M., FURMAM, F. G.; GALVÃO, C. W. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, p. 45-56, 2020.

RATHJEN, J. R., ZAW, M., RYDER, M. H., ZHOU, Y., LAI, T. V.; DENTON, M. D. Native soil origin influences the symbiotic N fixation effectiveness of chickpea *mesorhizobia* grown in Australian soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 60, n. 1, p. 137-151, 2024.

REIS, D. R., TEIXEIRA, G. C. S., TEIXEIRA, I. R., SILVA, G. R.; RIBEIRO, B. B. A. Organomineral Fertilization Associated with Inoculation of *Rhizobium tropici* and Co-

Inoculation of *Azospirillum brasilense* in Common Bean. **Sustainability**, v. 15, n. 24, p. 16631, 2023.

REMANS, R., RAMAEKERS, L., SCHELKENS, S., HERNANDEZ, G., GARCIA, A., REYES, J. L.; VANDERLEYDEN, J. Effect of *Rhizobium*–*Azospirillum* co-inoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. **Plant and Soil**, v. 312, p. 25-37, 2008.

RODIÑO, A. P., RIVEIRO, M.; DE RON, A. M. Implications of the symbiotic nitrogen fixation in common bean under seasonal water stress. **Agronomy**, v. 11, n. 1, p. 70, 2020.

ROGERS, A., MEDLYN, B. E., DUKES, J. S., BONAN, G., VON CAEMMERER, S., DIETZE, M. C.; ZAEHLE, S. A roadmap for improving the representation of photosynthesis in Earth system models. **New Phytologist**, v. 213, n. 1, p. 22-42, 2017.

RUTHAYATHAS, E. E.; GUNASEKARAN, S.; VLASSAK, K. Effect of combined inoculation of *Azospirillum* and *Rhizobium* on nodulation and N₂-fixation of winged bean and soybean. **Scientia Horticulturae**, v. 20, n. 3, p. 231-240, 1983.

SIDDIQ, Muhammad; Mark A. Uebersax, eds. Dry beans and pulses: production, processing, and nutrition. John Wiley; Sons, 2022.

SOUZA, J. E. B.; FERREIRA, E. P.B. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. **Agriculture, Ecosystems; Environment**, v. 237, p. 250-257, 2017.

STEINER, F., SILVA OLIVEIRA, C. E., ZOZ, T., ZUFFO, A. M.; DE FREITAS, R. S. Co-Inoculation of common bean with *Rhizobium* and *Azospirillum* enhance the drought tolerance. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 67, p. 923-932, 2020.

TAIZ, L., ZEIGER, E., MØLLER, I. M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858p.

VALL-LLOSERÀ, M., LLIMONA, F., DE CÁCERES, M., SALES, S.; SOL, D. Competition, niche opportunities and the successful invasion of natural habitats. **Biological Invasions**, v.18, p. 3535-3546. 2016.

VERDOY, D., LUCAS, M. M., MANRIQUE, E., COVARRUBIAS, A. A., DE FELIPE, M. R.; PUEYO, J. J. Differential organ-specific response to salt stress and water deficit in nodulated bean (*Phaseolus vulgaris*). **Plant, Cell; Environment**, v. 27, n. 6, p. 757-767, 2004.

WEI, Z., YANG, T., FRIMAN, V. P., XU, Y., SHEN, Q.; JOUSSET, A. Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 8413, 2015.

YADEGARI, M., RAHMANI, H. A., NOORMOHAMMADI, G.; AYNEBAND, A. Plant growth promoting rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Plant Nutrition**, v. 33, n. 12, p. 1733-1743, 2010.

ZAIDI, A., KHAN, M. S., SAIF, S., RIZVI, A., AHMED, B.; SHAHID, M. Role of nitrogen-fixing plant growth-promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. **Microbial Strategies for Vegetable Production**, p. 49-79, 2017.

CAPÍTULO 4. CO-INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* PARA AMENIZAÇÃO DOS EFEITOS DE DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE SOJA

CO-INOCULATION OF *Azospirillum brasilense* IN MITIGATING THE EFFECTS OF WATER DEFICIT IN SOYBEAN PLANTS

Resumo – A soja é um dos produtos agrícolas mais comercializados no mundo. Entretanto, devido aos recorrentes e prolongados períodos de déficit hídrico nos campos agrícolas, o rendimento da cultura tem sido reduzido. Algumas alternativas como o uso de bactérias do gênero *Azospirillum* tem sido utilizada como forma de amenizar os efeitos negativos dos períodos secos, mas ainda faltam estudos que gerem mais assertividade na utilização desses microrganismos na cultura da soja. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a eficiência da co-inoculação de estirpes de *A. brasilense* em sementes de soja inoculadas com *Bradyrhizobium* em duas condições hídricas. O trabalho foi realizado em estufa climatizada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, na região Centro-Sul do Paraná. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso no esquema fatorial 3×2 , com três repetições. Os tratamentos foram: sem co-inoculação, com co-inoculação das sementes com AbV5-AbV6 e com co-inoculação das sementes com HM053; e duas condições de umidade do solo, com e sem deficiência hídrica. As sementes de soja, cv. Brasmax Lança 58i60 RSF IPRO, foram inoculadas pouco antes da semeadura com inoculante líquido à base de *Bradyrhizobium japonicum*, na dose de 2 mL kg^{-1} de sementes. Em seguida, as sementes foram co-inoculadas com inoculantes líquidos, na dose de 2 mL kg^{-1} de sementes para as estirpes AbV5-AbV6 e HM053. Os regimes hídricos visaram manter o solo com 80% e 40% da capacidade de campo. A soja foi cultivada em tubos de policloreto de vinila com dimensões de 50 cm de altura e 15 cm de diâmetro. Realizou-se avaliações de parâmetros fotossintéticos, biomassa e extração de nutrientes pelas plantas. O déficit hídrico afetou negativamente a produção de biomassa e a extração de nutrientes pelas plantas de soja. As estirpes AbV5-AbV6 e HM053 não foram capazes de melhorar o desempenho da soja na condição de déficit hídrico. A co-inoculação de sementes de soja com *A. brasilense* HM053 promoveu melhor desenvolvimento radicular na ausência de restrição hídrica.

Palavras-chave: Rizobactérias, AbV5-AbV6, HM053, fotossíntese, biomassa, *Glycine max*

Abstract - Soybean is one of the most traded agricultural products in the world. However, due to the recurring and prolonged periods of water deficit in agricultural fields in recent years, the crop yield has been reduced. Some alternatives, such as the use of bacteria from the genus *Azospirillum*, have been employed as a way to mitigate the negative effects of dry periods, but there is still a lack of studies that provide more certainty in the use of these microorganisms in soybean cultivation. The objective of this study was to evaluate the effect of co-inoculation of *A. brasilense* strains on soybean seeds inoculated with *Bradyrhizobium* under two water conditions. The work was conducted in a climate-controlled greenhouse at the State University of Ponta Grossa, in the south-central region of Paraná. The experimental design was a randomized block design in a 3×2 factorial scheme, with three repetitions. The treatments were: without co-inoculation, with co-inoculation of seeds with AbV5-AbV6, and with co-inoculation of seeds with HM053; and two soil moisture conditions, with and without water deficiency. Soybean seeds, cv. Brasmax Lança 58i60 RSF IPRO, were inoculated shortly before sowing with a liquid inoculant based on *Bradyrhizobium japonicum* at a rate of 2 mL kg^{-1} of seeds. Subsequently, the seeds were co-inoculated with liquid inoculants at a rate of 2 mL kg^{-1} of seeds for the AbV5-AbV6 and HM053 strains. The water regimes aimed to maintain the soil

at 80% and 40% of field capacity. Soybean was cultivated in polyvinyl chloride tubes with dimensions of 50 cm in height and 15 cm in diameter. Evaluations of photosynthetic parameters, biomass, and nutrient extraction by the plants were conducted. Water stress negatively affected biomass production and nutrient extraction by soybean plants. The AbV5-AbV6 and HM053 strains were not able to improve soybean performance under water deficit conditions. The co-inoculation of soybean seeds with *A. brasilense* HM053 promoted better root development in the absence of water restriction.

Keywords: Rhizobacteria, symbiosis, photosynthesis, biomass, *Glycine max*

4.1 INTRODUÇÃO

A demanda por produtos de origem agrícola nos últimos vem sendo cada vez maior. A tendência para os próximos anos é que a necessidade por alimentos seja ainda mais significativa considerando o aumento da população mundial. Dentre os produtos que apresentam maior demanda global, destacam-se os grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] – uma das espécies mais cultivadas em todo mundo (FAO, 2023). A soja é uma leguminosa oleaginosa de grande importância mundial, rica em óleo, proteínas dentre outros componentes, o que faz dela matéria prima para vários setores, dentre eles a pecuária, para produção de proteína animal, a indústria alimentícia e de biodiesel (Foyer et al., 2016).

Devido a sua vasta aplicação, o cultivo de soja é hoje uma das principais atividades no setor agrícola, de forma que houve um aumento significativo na produção de soja nos últimos anos para atender a demanda pelo produto. O Brasil, atualmente, é um dos principais produtores e principais responsáveis pelos grãos de soja exportado no cenário global, fazendo dessa commodity um dos principais produtos na economia do país (IBGE, 2024). Apesar do aumento na produção de soja quando se compara o cenário atual com períodos mais distantes, dados recentes mostram uma queda de produção em algumas regiões do país, demonstrando um sinal de alerta na produção nacional (CONAB, 2024).

A redução na produção pode ser ocasionada por diversos fatores de natureza biótica e abiótica, como doenças, pragas, variedades e manejo de solo. Entretanto, a baixa escassez de água durante o período de cultivo vem sendo um dos principais desafios a serem vencidos no cultivo de soja, uma vez que a seca pode ocasionar perdas de até 70% no rendimento da cultura (Mertz-Henning, et al 2014). As perdas podem ocorrer em grande magnitude porque o déficit hídrico, dependendo de sua intensidade e duração, compromete a germinação, o desenvolvimento inicial das plantas, a formação e o enchimento dos grãos, e a qualidade do produto quanto ao teor de óleo e proteína (Manavalan et al., 2009; Tavares et al., 2019).

Com a escassez de água no solo, o desenvolvimento radicular das plantas pode ser comprometido, o que, consequentemente, reduz a quantidade de água e nutrientes absorvidos. Além disso, plantas estressadas podem reduzir a atividade fotossintética, afetando a produção de fotoassimilados e a produção de biomassa das plantas (Rosário Rosa et al., 2021; Medina et al., 2023; DU et al., 2024). Esforços estão sendo realizados para a adoção de técnicas que amenizem os efeitos negativos do déficit hídrico nas plantas, como manejo de solo, seleção de variedades com maior tolerância à seca e irrigação. Esta última, porém, é muito limitada devido à grande extensão da área de cultivo.

Uma outra alternativa que tem apresentado grande expansão na agricultura é o uso de bactérias promotoras do crescimento de plantas (Brignoli et al., 2023). Dentre elas se destacam as do gênero *Azospirillum*. Essas bactérias foram isoladas, primeiramente, de gramíneas, e são capazes de fixar N₂ e excretar fito-hormônios que estimulam o crescimento radicular das plantas (Fukami et al., 2016; Moretti et al., 2020). A co-inoculação dessas bactérias após inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* pode contribuir para o aumento da produtividade de grãos, da concentração de proteínas, do número de nódulos e da produção de biomassa (Zeffa et al., 2020; Barbosa et al., 2021; Braccini et al., 2023).

Os benefícios da co-inoculação de *A. brasilense* são tão relevantes na comunidade científica que alguns autores consideram essa técnica indispensável para o cultivo de soja (Martin et al., 2023). Entretanto, ainda há questionamentos sobre a efetividade da co-inoculação ou contribuição de *A. brasilense* no aumento do rendimento da soja (Reis et al., 2022; Bais et al., 2022). Alguns fatores podem afetar a eficiência dos microrganismos na associação entre as espécies, como, clima, tipo de solo, nível de fertilidade, cultivar, e as estirpes de bactérias envolvidas na co-inoculação (Gong et al., (2020). Neste sentido, são necessários mais estudos para direcionar melhor uso dessa ferramenta. Estudos sobre a interação entre novas estirpes de bactérias e regime hídrico ainda são escassas. Este trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos da co-inoculação de duas estirpes de *A. brasilense* no desenvolvimento de plantas de soja em duas condições de umidade no solo, sem e com déficit hídrico .

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Delineamento experimental e local do estudo

O experimento foi realizado em estufa climatizada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, na região Centro-Sul do Paraná. Para este estudo foi utilizado um Latossolo coletado em área de campo nativo do município de Ponta Grossa – PR, na profundidade de 0–30 cm.

Parte do solo coletado foi incubado com calcário dolomítico (PRNT de 95%) durante 90 dias. Durante esse período a umidade do solo foi mantida na capacidade de campo para favorecer a reação do calcário com o solo. A incubação teve o objetivo de elevar a saturação por bases do solo para 70%.

A plantas foram cultivadas em tubos de policloreto de vinila (PVC) com dimensões de 50 cm de altura e 15 cm de diâmetro. Os primeiros 10 cm dos tubos foram preenchidos com solo incubado com calcário e a parte inferior, de 10–50 cm, foi preenchida com solo apresentando alta acidez para simular condições de subsolo ácido. Esse arranjo foi realizado com o intuito de assemelhar as condições de campo com manejo em sistema plantio direto, no qual existe um gradiente de correção da acidez no perfil a partir da superfície do solo.

O experimento foi realizado no delineamento em blocos completos ao acaso, no esquema fatorial 3×2 , com três repetições. Os seguintes tratamentos foram empregados: sem co-inoculação, com co-inoculação de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e com co-inoculação de *A. brasilense* HM053; e duas condições de umidade no solo, com e sem déficit hídrico.

4.2.2 Co-inoculação das sementes e semeadura da soja

As sementes de soja foram primeiramente inoculadas manualmente em sacos plásticos com inoculante líquido à base de *Bradyrhizobium japonicum*, na dose 2 mL kg^{-1} de sementes. Após a secagem das sementes, à sombra, foi realizada a co-inoculação das sementes de soja com as estirpes de *A. brasilense*. A co-inoculação, também com inoculante líquidos, foi realizada de forma manual em sacos plásticos por meio de uma mistura homogênea, de forma a garantir que todas as sementes ficassem com o número de células mínimo exigido. Foram aplicados 2 mL kg^{-1} de sementes de ambas estirpes, AbV5-AbV6 e HM053. Antes dos procedimentos de inoculação e co-inoculação foi realizada a contagem de células de todas as estirpes utilizadas, as quais apresentaram contagem de unidade formadora de colônia (UFC) superior a $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$. A inoculação e a co-inoculação foram realizadas alguns minutos antes da semeadura para evitar redução na viabilidade dos microrganismos. Os inoculante à base de *Bradyrhizobium japonicum* e das estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 foram adquiridas de produtos comerciais, enquanto a estirpe de *A. brasilense* HM053 foi adquirida no Laboratório de Biologia Molecular Microbiana (LABMOM) da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Na Tabela 4.1 são mostrados os resultados das análises químicas do solo na camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm) antes da instalação do experimento. A adubação de semeadura foi realizada por

meio da abertura de um sulco no centro de cada tubo de PVC. Em todos os tratamentos foi realizada adubação básica de semeadura com P e K, utilizando a formulação 0–20–20 (N–P₂O₅–K₂O), na dose equivalente a 320 kg da formulação ha⁻¹. Foi realizada também adubação de cobertura com cloreto de potássio (KCl), na dose equivalente a 90 kg K₂O ha⁻¹.

Tabela 4.1 - Resultados das análises químicas de solo da camada superficial (0–10 cm) após a incubação com calcário dolomítico e da camada subsuperficial (10–50 cm), antes da instalação do experimento nos tubos de PVC.

Solo na coluna	pH (CaCl ₂)	H + Al	Al	Ca	Mg	K	P	C-orgânico	V
		-----cmol _c dm ⁻³ -----					mg dm ⁻³	g dm ⁻³	%
0 a 10 cm	5,7	3,83	0,0	3,3	2,3	0,14	22,2	16,6	60
10 a 50 cm	4,2	8,24	1,6	1,2	0,3	0,15	15,9	15,6	17

Al, Ca e Mg trocáveis extraídos com KCl 1 mol L⁻¹; P e K extraídos com Mehlich-1 e C-orgânico determinado pelo método Walkley-Black. V = saturação por bases

Visando melhorar as condições químicas no subsolo para o crescimento das plantas, foi realizada aplicação de gesso agrícola sobre a superfície do solo em todos os tubos. Essa aplicação teve o objetivo de fornecer S e melhorar as condições químicas na camada subsuperficial do solo. A dose de gesso aplicada (equivalente a 4,8 t ha⁻¹) foi definida de acordo com o método proposto por Caires; Guimarães (2018). O gesso foi aplicado sobre a superfície das colunas de solo 30 dias antes da semeadura. Logo após a aplicação de gesso, todos os tubos foram irrigados com uma quantidade de água equivalente a 50 mm por tonelada de gesso aplicada, totalizando 240 mm de água. Essa irrigação foi realizada de forma parcelada por um período de 30 dias antes da semeadura.

A semeadura da soja, cultivar Brasmax Lança 58i60 RSF IPRO, foi realizada em dezembro de 2019, colocando-se seis sementes em cada tubo na profundidade de 2 cm. Após a emergência das plântulas, realizou-se o desbaste, mantendo-se apenas duas plantas por tubo. Logo após o desbaste, os tubos foram mantidos sob os dois regimes hídricos até o final do experimento.

4.2.4 Condicionamento do déficit hídrico

Para o condicionamento dos dois regimes hídricos, inicialmente foi determinada a capacidade de campo (CC) do solo. Para a condição de deficiência hídrica, os tubos foram mantidos com 40% da CC, enquanto os tubos sem restrição hídrica foram mantidos com 80% da CC, durante todo o período de desenvolvimento das plantas a partir da emergência. Para a

manutenção dos regimes hídricos de forma mais precisa foi realizada pesagem individual dos tubos diariamente, com a devida complementação de água, dependendo da condição hídrica estabelecida, durante todo o período de condução do experimento.

4.2.5 Avaliação de parâmetros relacionados a fotossíntese

As leituras dos parâmetros relacionados à fotossíntese foram realizadas aos 50 dias após a emergência das plântulas. Foram realizadas leituras de fotossíntese líquida (FL), condutância estomática (GS), concentração de carbono intracelular (Ci) e transpiração celular (T) por meio do medidor IRGA ("Infrared gas analyzer"), em aparelho Marrichi LiCor-6400, conforme Santos Junior et al. (2006). As leituras foram realizadas no período da manhã, das 8:30 h às 10:30 h, no antepenúltimo trifólio completamente aberto do ramo principal. No momento das leituras, as plantas apresentavam-se no estágio de desenvolvimento R₂, quando todas as plantas tinham iniciado a floração. Realizaram-se também cálculos de eficiência de uso da água (FL/T) e de eficiência de carboxilação (FL/Ci).

4.2.6 Leitura de clorofila

Leituras de clorofila também foram realizadas no período da manhã, na mesma folha utilizada pelo medidor IRGA (antepenúltimo trifólio totalmente aberto do ramo principal). As leituras foram realizadas com o medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG, tendo-se determinado o índice SPAD para as clorofilas *a* e *b*. Após as leituras dos índices de clorofila *a* e *b*, determinou-se o índice de clorofila total por meio da soma das duas leituras.

4.2.7 Matéria seca da parte aérea e de raízes e número e massa de nódulos

Logo após as leituras de fotossíntese e clorofila as plantas foram cortadas na base rente ao solo, lavadas com água deionizada e colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar à 60°C, até atingir massa constante. Posteriormente, essas amostras foram pesadas em balança de precisão para a determinação da produção de matéria seca da parte aérea. Logo após o corte das plantas, as colunas de solo foram seccionadas nas camadas de 0–10, 10–20 e 20–50 cm e as raízes foram separadas do solo por meio de lavagem em água corrente para retirada das impurezas, utilizando-se peneira com malha de 0,5 mm. Posteriormente, os nódulos presentes nas raízes foram destacados, contados e secos em estufa com circulação forçada de ar a 60°C, até atingir massa constante, e pesados em balança de precisão para determinação da massa seca de nódulos. As raízes separadas foram colocadas para secar em estufa com circulação forçada

de ar a 60°C, até atingir massa constante para determinação a densidade de raízes por meio da relação entre a massa seca de raízes e o volume de solo em cada camada e em toda a coluna. A produção total de biomassa de plantas também foi determinada, somando-se a matéria seca da parte aérea e a matéria seca de raízes na coluna.

4.2.8 Extração de nutrientes pelas plantas

Depois da determinação da produção de matéria seca da parte aérea das plantas, as amostras foram moídas para a determinação dos teores de N, P, K, Ca, Mg e S, utilizando-se os métodos descritos em Malavolta; Vitti; Oliveira (1997). A extração dos nutrientes pela parte aérea das plantas foi calculada multiplicando-se a concentração de cada nutriente pela matéria seca total da parte aérea das plantas.

4.2.9 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, de acordo com o delineamento em blocos completos ao acaso no esquema fatorial 3×2 . Os efeitos dos tratamentos envolvendo a co-inoculação de *A. brasilense* e déficit hídrico foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5%. No caso de interação significativa entre os tratamentos, foram realizados os devidos desdobramentos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software R.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3. Índice de clorofila em plantas de soja

Na avaliação dos índices de clorofila, apesar de os tratamentos com AbV5-AbV6 e HM053 terem promovido médias superiores ao tratamento sem co-inoculação, esse aumento não foi significativo (Tabela 4.2). Resultados não significativos, também foram observados por Zuffo et al. (2016) ao avaliarem características morfo agronômicas e produtivas da soja com a co-inoculação de *A. brasilense* e por Bulegon et al. (2017), avaliando o efeito da co-inoculação e inoculação isolada em dois estádios de desenvolvimento da cultura da soja verificaram que a combinação de *B. japonicum* e *A. brasilense* AbV5-AbV6 não proporcionou diferença significativa na concentração de clorofila *a* no estágio vegetativo; porém, aumentou significativamente a concentração de clorofila *a* no estágio reprodutivo.

Tabela 4.2 . Clorofila *a* (CLF *a*), clorofila *b* (CLF *b*) e clorofila total (CLF total) em plantas de soja considerando a inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).

Tratamento	CLF <i>a</i>	CLF <i>b</i>	CLF total
Co-inoculação (I)		Índice SPAD	
Sem I	22,35	9,45	31,80
AbV5-AbV6	23,13	9,53	32,66
HM053	23,33	9,56	32,88
Déficit (DH)			
Sem DH	22,63	9,21	31,84
Com DH	23,23	9,82	33,05
<i>P</i> > <i>F</i>			
Co-inoculação (I)	0,449	0,943	0,512
Déficit (DH)	0,367	0,058	0,152
I × DH	0,896	0,562	0,741
CV (%)	5,89	6,37	5,11

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

A síntese de clorofila pode ser gerenciada por vários fatores relacionados com a disponibilidade de água e nutrientes no solo, temperatura, déficit hídrico e a própria planta. Dessa forma, as leituras dos índices de clorofila podem ter sido influenciadas não só pelos tratamentos experimentais, mas também pelas condições no momento da avaliação. Segundo Whitmarsh (2000), as plantas no estágio reprodutivo apresentam maior demanda de fotoassimilados e, conseqüentemente, exigem maior teor de pigmentos fotossintéticos na captura de luz para o processo fotossintético.

4.3.2 Parâmetros fotossintéticos nas plantas de soja

A co-inoculação das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053 não influenciou significativamente os parâmetros fotossintéticos avaliados nas plantas de soja (Tabela 4.3). Segundo Bulegon et al. (2019), a aplicação de *A. brasilense* é uma opção para amenizar os efeitos do déficit hídrico na fase de florescimento da soja devido à produção de fito-hormônios endógenos, como as citocininas, que podem contribuir para a aclimação e a adaptação das plantas ao estresse. Porém, tais benefícios não foram observados no presente estudo.

A fotossíntese também é gerenciada por vários fatores, como temperatura, déficit hídrico, concentração de CO₂, disponibilidade de nutrientes, assim como a concentração de pigmentos fotossintéticos que são responsáveis por absorver luz, o que é fundamental para iniciar o processo de conversão da energia luminosa em energia química. Como os teores de

clorofila *a* e *b* nas plantas de soja não foram afetados pela co-inoculação (Tabela 4.2), a atividade fotossintética também não foi afetada pela mesma (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Fotossíntese líquida (FL), condutância estomática (GS), carbono no mesófilo (Ci), transpiração (T), eficiência do uso da água (EUA) e eficiência da carboxilação (ECi) em plantas de soja, considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).

Tratamento	FL	GS	Ci	T	EUA ¹	ECi ²
	$\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\text{mol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol CO}_2$ mol^{-1}	$\text{mmol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$		
Co-inoculação (I)						
Sem I	23,85	1,24	323	9,33	2,56	0,07
AbV5-AbV6	24,80	1,32	322	9,45	2,62	0,07
HM053	23,36	1,22	324	9,46	2,47	0,07
Déficit (DH)						
Sem DH	24,31	1,36a	325	9,64a	2,52	0,07
Com DH	23,70	1,16b	321	9,18b	2,58	0,07
<i>P</i> > <i>F</i>						
Co-inoculação (I)	0,236	0,215	0,707	0,683	0,249	0,274
Déficit (DH)	0,370	0,001	0,185	0,006	0,469	0,727
I × DH	0,358	0,564	0,590	0,442	0,601	0,355
CV (%)	5,7	7,6	1,7	3,0	5,7	7,0

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. ¹ EUA em $(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}) / (\text{mmol H}_2\text{O}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1})$, ²ECi em $(\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}) / (\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1})$

As plantas de soja que não tiveram restrição hídrica apresentaram valores mais elevados de condutância estomática (GS) e transpiração mais intensa quando comparados com as plantas com restrição hídrica (Tabela 4.3). Medina et al. (2023) e Silva et al. (2020) observaram que plantas de soja expostas ao déficit hídrico também apresentaram redução significativa na fotossíntese líquida, na condutância estomática, na transpiração, na razão entre as concentrações internas e externas de CO₂ e na eficiência instantânea de carboxilação, resultados que corroboram, pelo menos em parte, com os observados no presente estudo.

Uma das primeiras respostas das plantas ao déficit hídrico é uma redução na área foliar e na taxa de crescimento das plantas, o que permite às plantas reduzir a sua taxa de transpiração e, conseqüentemente, diminuir as trocas gasosas na tentativa de aumentar a eficiência do uso da água (Xu et al., 2010). Engels et al. (2017) elencaram alguns mecanismos de defesa que a planta utiliza para tolerar os períodos de déficit hídrico: características morfofisiológicas como profundidade das raízes; aumento na proporção de tecidos condutores; rápida emissão de novas raízes; ajuste osmótico; enrolamento foliar; redução da área foliar; abscisão foliar; aumento de tricomas; deposição de ceras epicuticulares; floração precoce e endurecimento da parede

celular. Todos esses mecanismos podem contribuir para a sobrevivência das plantas; porém, como consequência, há redução no metabolismo fisiológico das plantas.

4.3.3 Produção de biomassa de plantas de soja

A co-inoculação não teve influência significativa na produção de matéria seca da parte aérea e na biomassa total das plantas de soja (Tabela 4.4). A densidade de raízes de soja na camada de solo de 10 a 20 cm foi significativamente menor quando as sementes foram co-inoculadas com AbV5-AbV6 em relação ao tratamento sem co-inoculação. Bais et al. (2022) não encontraram efeito da co-inoculação de *A. brasilense* em sementes inoculadas com *B. japonicum* quando comparada com a inoculação única de *B. japonicum* na cultura da soja. Por outro lado, Moretti et al. (2020) relataram que a co-inoculação de *A. brasilense* estirpe AbV5-AbV6 melhorou a qualidade dos grãos e o rendimento da soja por influenciar a absorção de N e P, a nodulação e a produção de biomassa da parte aérea.

As plantas com restrição hídrica apresentaram redução significativa de 28% da produção de matéria seca da parte aérea em relação ao tratamento sem restrição hídrica (Tabela 4.4). As plantas que estavam sob déficit hídrico também apresentaram redução significativa na densidade de raízes da camada de 0 a 10 cm e ao longo de toda a coluna de solo (0 a 50 cm), e na biomassa total.

Tabela 4.4 – Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), densidade de raízes e biomassa total de plantas de soja, considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.

Tratamento	MSPA	Densidade de raízes				Biomassa total
		0 a 10 cm	10 a 20 cm	20 a 50 cm	Total	
Co-inoculação (I)	g planta ⁻¹	g dm ⁻³				g planta ⁻¹
Sem I	17,20	0,77	0,34a	0,27	1,39	19,95
AbV5-AbV6	17,18	0,77	0,25b	0,31	1,34	19,78
HM053	17,59	0,81	0,29ab	0,26	1,37	21,06
Déficit (DH)						
Sem DH	20,10a	0,87a	0,29	0,29	1,46a	23,48a
Com DH	14,54b	0,70b	0,29	0,27	1,27b	17,05b
P > F						
Co-inoculação (I)	0,867	0,809	0,022	0,128	0,794	0,408
Déficit (DH)	<0,001	0,014	0,960	0,426	0,013	<0,001
I × DH	0,497	0,004	0,966	0,033	0,002	0,225
CV (%)	8,6	15,4	15,5	15,0	9,6	8,4

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Ao avaliar o efeito de diferentes métodos de inoculação e co-inoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense* no desempenho agrônomo da soja cultivada em campo, Brignoli et al. (2023) observaram resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo para parâmetros biométricos de plantas de soja; entretanto concluíram que em anos de maior restrição hídrica, a aplicação via foliar de *Azospirillum* pode contribuir de forma significativa para melhorar o desempenho de soja.

A restrição hídrica já é reconhecida como um dos principais desafios na agricultura. Isso porque o déficit hídrico pode condicionar a indisponibilidade de umidade e a restrição do crescimento das plantas e do rendimento das culturas. Segundo Iqbal et al. (2020), o estresse por déficit hídrico pode limitar a abertura estomática, acelerar a fotorredução do oxigênio no cloroplasto e aumentar a fotorrespiração que, consequentemente, pode provocar danos oxidativos devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas plantas. Em resposta ao déficit hídrico, as plantas alteram a expressão gênica, produzem o fito-hormônio ácido abscísico, fecham seus estômatos, o que pode vir a manter seu equilíbrio osmótico, melhorando a eficiência do uso da água. Entretanto, este último efeito não foi observado no presente estudo na condição de déficit hídrico. Vale ressaltar que a produção das plantas é determinada principalmente pela fotossíntese, e o processo fotossintético é governado, principalmente, pelos estômatos para trocas de gás carbônico e água nas células do mesófilo. Dessa forma, o déficit hídrico afeta não apenas as reações à luz, mas também a eficiência de assimilação das reações escuras, reduzindo, assim, o conteúdo dos produtos fotossintéticos e a produção de biomassa de raiz e parte aérea.

Houve interação significativa entre os fatores co-inoculação e déficit hídrico para a densidade de raízes nas camadas de 0 a 10 cm, 20 a 50 cm e em toda a coluna de solo (0 a 50 cm) (Tabela 4.4), com resultados distintos nas duas condições hídricas. Na camada de 0 a 10 cm, a co-inoculação de *A. brasilense* com HM053 promoveu maior densidade de raízes do que o tratamento sem co-inoculação quando as plantas ficaram sem restrição hídrica (Tabela 4.5). Na presença do déficit hídrico, não houve influência significativa dos tratamentos de co-inoculação na densidade de raízes na camada de 0 a 10 cm. Por outro lado, somente a co-inoculação com HM053 proporcionou menor densidade de raízes na camada de 0 a 10 cm com a indução do déficit hídrico em relação à ausência de deficiência hídrica.

Tabela 4.5 - Desdobramento da interação entre co-inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na densidade de raízes de soja na camada de solo de 0 a 10 cm, aos 50 dias após a emergência.

Tratamento	Densidade de raízes na camada de solo de 0 a 10 cm		
	Sem DH	Com DH	<i>P > F</i>
	----- g dm ⁻³ -----		
Sem I	0,72b	0,83	0,281
AbV5-AbV6	0,83ab	0,71	0,255
HM053	1,06aA	0,56B	<0,001
<i>P > F</i>	0,017	0,065	

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Na camada de 20 a 50 cm, a co-inoculação de *A. brasilense* com AbV5-AbV6 promoveu maior densidade de raízes do que o tratamento sem co-inoculação quando as plantas ficaram sem restrição hídrica (Tabela 4.6). Na presença do déficit hídrico, a influência dos tratamentos de co-inoculação na densidade de raízes na camada de 20 a 50 cm não foi significativa. Houve clara tendência (*P* = 0,052) de a co-inoculação com HM053 proporcionar menor densidade de raízes na camada de 20 a 50 cm com a indução do déficit hídrico em relação à ausência de deficiência hídrica, como ocorreu na camada de 0 a 10 cm.

Quando foi avaliada toda a coluna de solo (0 a 50 cm), a co-inoculação de *A. brasilense* com HM053 promoveu maior densidade de raízes na condição sem restrição hídrica e menor densidade de raízes quando houve restrição hídrica em relação ao tratamento sem co-inoculação (Tabela 4.7). Somente a co-inoculação com HM053 proporcionou menor densidade de raízes na camada de 0 a 50 cm com a indução do déficit hídrico em relação à ausência de deficiência hídrica.

Tabela 4.6 - Desdobramento da interação entre co-inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na densidade de raízes de soja na camada de solo de 20 a 50 cm, aos 50 dias após emergência.

Tratamento	Densidade de raízes na camada de solo de 20 a 50 cm		
	Sem DH	Com DH	<i>P > F</i>
	----- g dm ⁻³ -----		
Sem I	0,24b	0,31	0,072
AbV5-AbV6	0,33a	0,29	0,242
HM053	0,30ab	0,22	0,052
<i>P > F</i>	0,050	0,071	

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 4.7 - Desdobramento da interação entre co-inoculação (I) e déficit hídrico (DH) na densidade de raízes de soja em toda a coluna de solo (0 a 50 cm), aos 50 dias após emergência.

Tratamento	Densidade de raízes na camada de 0 a 50 cm		
	Sem DH	Com DH	<i>P</i> > <i>F</i>
	----- g dm ⁻³ -----		
Sem I	1,30b	1,47a	0,139
AbV5-AbV6	1,42ab	1,26ab	0,168
HM053	1,66aA	1,09bB	<0,001
<i>P</i> > <i>F</i>	0,015	0,020	

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Resultados que corroboram foram apresentados por Cassán et al. (2009) em que observaram que o peso seco de raízes e o comprimento da parte aérea de plantas co-inoculadas com *A. brasilense* foram significativamente maiores do que o de plantas somente inoculadas com *B. japonicum*. Os autores atribuíram esse efeito ao aumento de compostos reguladores do crescimento radicular, como ácido indolacético e zeatina, produzidos pelo *Azospirillum*. Os fito-hormônios produzidos por *A. brasilense* desempenham papel importante na formação e arquitetura das raízes, favorecendo ao processo de alongamento, bem como na formação de raízes laterais e pelos radiculares (Gulii et al., 2015). Esses benefícios também foram relatados em uma metanálise realizada por Barbosa et al. (2021) sobre o efeito da co-inoculação de *A. brasilense* após inoculação com *Bradyrhizobium* na cultura da soja, os autores mostraram que a co-inoculação aumentou em 11% a massa de raízes.

Apesar da co-inoculação com *A. brasilense* ter contribuído para o aumento da densidade de raízes em plantas de soja no presente estudo, esse aumento não contribuiu proporcionalmente para o desenvolvimento da parte aérea. Segundo Wu et al. (2016), a matéria seca das raízes nem sempre pode fornecer informações específicas únicas sobre o arranjo radicular no solo. Ou seja, apesar de apresentar maior massa do sistema radicular, outras características como diâmetro, comprimento e, principalmente, presença de pelos radiculares, devem ser consideradas para avaliar a eficiência do sistema radicular em sustentar e nutrir a parte aérea das plantas.

Nas plantas com déficit hídrico, em nenhuma das camadas de solo foi observado efeito positivo da co-inoculação para a densidade de raízes (Tabela 4.5, 4.6 e 4.7). Diferentemente do que ocorreu na condição com restrição hídrica, as plantas co-inoculadas com AbV5-AbV6 e com HM053 apresentaram maior densidade de raízes nas camadas de 0 a 10 e 20 a 50 cm, respectivamente, quando não houve limitação hídrica. Portanto, esses resultados mostraram que

a co-inoculação de *A. brasilense* foi vantajosa para o crescimento radicular da soja somente quando não há déficit hídrico.

4.3.4 Nodulação em plantas de soja

A co-inoculação das sementes de soja não promoveu diferença significativa na nodulação das raízes, assim como também não houve interação entre os fatores co-inoculação e déficit hídrico (Tabela 4.8). Avaliando o efeito da co-inoculação de *A. brasilense* Az39 com *B. japonicum* E109 em plantas de soja, Armendáriz et al. (2019) observaram que o número de nódulos efetivos não foi modificado pela co-inoculação, em comparação com a inoculação com apenas *B. japonicum* E109.

Tabela 4.8 - Número e massa de nódulos de soja na camada de 0 a 10 cm e em toda a coluna de solo (0 a 50 cm), considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH).

Tratamento	Número de nódulos por planta		Massa de nódulos por planta	
	0 a 10 cm	0 a 50 cm	0 a 10 cm	0 a 50 cm
			----- g planta ⁻¹ -----	
Co-inoculação (I)				
Sem I	150	212	0,453	0,583
AbV5-AbV6	131	205	0,451	0,611
HM053	171	249	0,431	0,623
Déficit (DH)				
Sem DH	190a	269a	0,531a	0,696a
Com DH	111b	175b	0,360b	0,516a
P > F				
Co-inoculação (I)	0,512	0,337	0,967	0,267
Déficit (DH)	0,015	0,003	0,048	0,060
I × DH	0,643	0,756	0,725	0,680
CV (%)	37,67	23,57	36,27	30,43

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Bais et al. (2023) também relataram que não houve diferença significativa no número total de nódulos com a co-inoculação de *A. brasilense* após inoculação com *B. japonicum*. Porém, os resultados da nodulação em plantas de soja obtidos no presente estudo divergem de outros autores. Cassán et al. (2009) por exemplo, observaram que o número de nódulos recém formados e a porcentagem de plantas noduladas em plantas de soja foram maiores em plantas co-inoculadas com *A. brasilense*. Na metanálise realizada por Barbosa et al. (2021), além do aumento de massa de raízes, constatou-se também que a co-inoculação com *A. brasilense* contribuiu para acrescentar em 5,4% o número de nódulos e em 10,6% a massa de nódulos em comparação a inoculação única com *Bradyrhizobium*. Em outra metanálise realizada por Zeffa

et al. (2018) também foi verificado que a co-inoculação de *A. brasilense* promoveu aumento significativo no número de nódulos em plantas de soja.

Por essa divergência nos resultados, pode se inferir que a nodulação pode ser afetada por vários fatores, sejam abióticos ou bióticos e vários deles não são possíveis de se controlar o que pode comprometer a eficiência da inoculação e co-inoculação. Como relatado por Pacentchuk et al. (2020) ao avaliarem o efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento na cultura da soja em quatro locais diferentes e observaram resultados distintos no número e na massa de nódulos. Os resultados da co-inoculação com *A. brasilense* em sementes inoculadas com *Bradyrhizobium* foram favoráveis dependendo do local do experimento, ou seja, fatores edafoclimáticos, características químicas e físicas do solo, bem como a população de microrganismos no solo podem ter influenciado a interação entre as espécies e a planta de soja.

Era esperado que a co-inoculação melhorasse a nodulação, bem como os demais parâmetros avaliados na condição de déficit hídrico. Entretanto, não foi observada interação entre a co-inoculação e o regime hídrico. No estudo de Silva et al. (2019), verificou-se que a inoculação de *B. japonicum* e a co-inoculação de *A. brasilense*, em combinação, reduziram a taxa de aborto de vagens sob déficit hídrico moderado, mas não tiveram efeito sob déficit hídrico severo, o que permitiu aos autores concluir que essa ferramenta poderia aliviar os efeitos adversos pelo déficit hídrico ao crescimento da soja, porém de forma limitada.

Importante destacar que a função do *Azospirillum* não é somente de disponibilizar N_2 fixado, mas também a síntese de moléculas que podem contribuir com o crescimento das plantas. Hungria et al. (2015), avaliando o efeito da inoculação de *Bradyrhizobium* e da co-inoculação com *Azospirillum* em sementes de soja em quatro locais, concluíram que a co-inoculação melhorou o rendimento da cultura sem a adição de qualquer fertilizante nitrogenado; entretanto, os resultados de nodulação e acúmulo de N nas plantas não foram alterados de forma significativa entre os tratamentos.

A indução do déficit hídrico reduziu significativamente o número e a massa de nódulos de soja, na camada de 0 a 10 cm e em toda coluna de solo (0 a 50 cm) (Tabela 4.8). Esses resultados demonstram que a manutenção de 40% da capacidade de campo foi uma condição restritiva para o desenvolvimento das plantas de soja. Garantir a eficiência da co-inoculação de *Azospirillum* em sementes de soja ainda é um desafio nas pesquisas científicas, uma vez que os resultados dos estudos divergem em vários aspectos. Um exemplo disso, são os resultados das pesquisas realizadas por Braccini et al. (2023) a respeito da eficiência agrônômica e da viabilidade da co-inoculação com *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense* no tratamento de

sementes de soja em diferentes regiões edafoclimáticas do Sul e Sudeste do Brasil. Apesar de a co-inoculação ter demonstrado eficiência agrônômica no aumento da produtividade de soja, os resultados quanto ao número e massa seca de nódulos, massa seca de raízes e parte aérea, acúmulo de N na parte aérea e nos grãos e, inclusive produtividade de grãos, foram significativos dependendo do local do experimento e da dose de inoculante aplicado.

Apesar do avanço nas pesquisas de espécies mais eficientes na promoção do crescimento das plantas, a eficiência da aplicação de múltiplas bactérias na cultura da soja ainda é condicionada por fatores bióticos e abióticos. Uma vez já comprovada a eficiência da inoculação única das bactérias promotoras de crescimento, fica o desafio para novas pesquisas científicas em estudar e ratificar quais as condições de cultivo ou variáveis como cultivares, características químicas e físicas do solo, estirpes, bem como a forma de aplicação que podem influenciar as combinações das espécies, de forma que o posicionamento possa resultar em melhoria mais concreta no desenvolvimento das plantas.

4.3.5 Acúmulo de nutriente em plantas de soja

A co-inoculação das sementes com *A. brasilense* não promoveu alterações significativas na extração de nutrientes pelas plantas de soja, independentemente da estirpe AbV5-AbV6 ou HM053 (Tabela 4.9). Houve efeito isolado do déficit hídrico, o qual reduziu a extração de N, P, K, Ca e Mg pelas plantas de soja. O acúmulo de nutrientes na parte aérea das plantas pode ser influenciado pela disponibilidade de nutrientes no solo e pelo crescimento do sistema radicular. A limitação de água no solo pode afetar as plantas tanto pela baixa disponibilidade de nutrientes quanto pelo menor desenvolvimento das raízes, uma vez que as plantas diminuem seu metabolismo para suportar o período de déficit hídrico.

A baixa absorção de N também pode estar relacionada com a sobrevivência das bactérias nessa condição. Segundo Berninger et al. (2018), a secagem do solo pela redução da umidade, principalmente após a inoculação das sementes ou no início do estabelecimento da cultura, é considerada, dentre outras causas, um dos principais responsáveis pela mortalidade de bactérias promotoras de crescimento de plantas comprometendo assim a fixação de N no solo. Por esse motivo, a seleção de microrganismos que apresentem maior tolerância a períodos de déficit hídrico é fundamental para obter êxito na simbiose entre plantas e bactérias (Grefe; Michiels, 2020). Logo, a manutenção de 40% da capacidade de campo no solo pode ter afetado a sobrevivência de *Bradyrhizobium*, principal responsável pela fixação N₂ e disponibilização de N para as plantas de soja.

Tabela 4.9 - Extração de nutrientes pelas plantas de soja, considerando a co-inoculação (I) das sementes com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053, sem e com déficit hídrico (DH), aos 50 dias após emergência.

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S
----- mg planta ⁻¹ -----						
Co-inoculação (I)						
Sem I	519	80	574	131	44	25
AbV5-AbV6	479	79	487	158	55	25
HM053	482	72	575	151	49	28
Déficit (DH)						
Sem DH	568a	84a	599a	121b	56a	24
Com DH	420b	69b	491b	173a	42b	28
P > F						
Co-inoculação (I)	0,647	0,493	0,195	0,387	0,256	0,794
Déficit (DH)	0,003	0,026	0,027	0,007	0,017	0,183
I × DH	0,903	0,073	0,237	0,148	0,162	0,479
CV (%)	16,3	15,4	16,3	22,4	20,9	24,0

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Esperava-se que houvesse interação entre os fatores para acúmulo de nutrientes na parte aérea, uma vez que a co-inoculação com as estirpes *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* promoveu aumento na densidade de raízes quando as plantas estavam sem restrição hídrica. Entretanto, a co-inoculação não alterou a absorção de nutrientes nessa condição, o que sugere que o crescimento adicional de raízes não se reverteu em aumento na extração dos nutrientes pelas plantas.

4.4 CONCLUSÕES

Os índices de clorofila *a* e *b*, a fotossíntese líquida, a condutância estomática, o carbono intracelular no mesófilo, a transpiração celular, a eficiência do uso da água, a eficiência de carboxilação e a absorção de nutrientes das plantas de soja não foram influenciados pela co-inoculação de *A. brasilense* com as estirpes AbV5-AbV6 e HM053.

O déficit hídrico afetou negativamente a condutância estomática, a transpiração celular, a produção de biomassa da parte aérea e das raízes, a nodulação e o acúmulo de nutrientes em plantas de soja.

A co-inoculação das sementes de soja com *A. brasilense* HM053 promoveu maior densidade de raízes de soja na ausência de restrição hídrica.

A co-inoculação de *A. brasilense* com as estirpes AbV5-AbV6 e HM053 não amenizou os efeitos deletérios causados pelo déficit hídrico nas plantas de soja.

REFERÊNCIAS

- ARMENDARIZ, A. L., TALANO, M. A., NICOTRA, M. F. O., ESCUDERO, L., BRESER, M. L., PORPORATTO, C.; AGOSTINI, E. Impact of double inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* E109 and *Azospirillum brasilense* Az39 on soybean plants grown under arsenic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 138, p. 26-35, 2019.
- BAIS, J., KANDEL, H., DESUTTER, T., DECKARD, E.; KEENE, C. Soybean Response to N Fertilization Compared with Co-Inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*. **Agronomy**, v. 13, n. 8, p. 1-14, 2023.
- BARBOSA, J. Z., HUNGRIA, M., DA SILVA SENA, J. V., POGGERE, G., DOS REIS, A. R.; CORRÊA, R. S. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, p. 1-10, 2021.
- BERNINGER, T., GONZÁLEZ LÓPEZ, Ó., BEJARANO, A., PREININGER, C.; SESSITSCH, A. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 277-301, 2018.
- BRACCINI, A. L., MILLÉO, M. V. I. R., ALLEONI, B., RONDINA, A. B. L., PAULITSCH, F., MARTINS, L. M., ; ALMEIDA, R. Influence of seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* species and *Azospirillum brasilense* on soybean development in Southern and Southeastern Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 19, n. 1, p. 81-90, 2023.
- BRIGNOLI, F. M., DE OLIVEIRA ZAMPAR, E. J., HENRIQUE VIEIRA DE ALMEIDA, J., CASSIM, B. M. A. R., INOUE, T. T.; BATISTA, M. A. Effect of different methods of inoculation and co-inoculation of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* on soybean agronomic performance in fields with a history of inoculation. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 69, n. 14, p. 2925-2937, 2023.
- BULEGON, L. G., GUIMARÃES, V. F., BATTISTUS, A. G., INAGAKI, A. M.; COSTA, N. V. D. Mitigation of drought stress effects on soybean gas exchanges induced by *Azospirillum brasilense* and plant regulators. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, p. e52807, 2019.
- BULEGON, L. G., GUIMARAES, V. F., KLEIN, J., BATTISTUS, A. G., INAGAKI, A. M., OFFEMANN, L. C.; DE SOUZA, A. K. P. Enzymatic activity, gas exchange and production of soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 7, p. 888-896, 2017.
- CAIRES, E. F.; GUIMARÃES, A. M. A novel phosphogypsum application recommendation method under continuous no-till management in Brazil. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 5, p. 1987-1995, 2018.
- 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

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos: Sétimo levantamento, abril de 2024, safra 2023/2024. Brasília, DF, v. 11, n.7, p 117, 2024.

DU, X., ZHANG, X., CHEN, X., JIN, W., HUANG, Z.; KONG, L. Drought stress reduces the photosynthetic source of subtending leaves and the transit sink function of podshells, leading to reduced seed weight in soybean plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1337544, 2024.

ENGELS, C., RODRIGUES, F. A., FERREIRA, A. D. O., INAGAKI, T. M.; NEPOMUCENO, A. L. Drought effects on soybean cultivation-A review. **Annual Research; Review in Biology**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2017.

FAO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2023. Urbanization, agrifood systems transformation and healthy diets across the rural–urban continuum. 2023. <https://doi.org/10.4060/cc3017en>

FOYER, C. H., LAM, H. M., NGUYEN, H. T., SIDDIQUE, K. H., VARSHNEY, R. K., COLMER, T. D.; CONSIDINE, M. J. Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. **Nature Plants**, v. 2, n. 8, p. 1-10, 2016.

GONG, Z., XIONG, L., SHI, H., YANG, S., HERRERA-ESTRELLA, L. R., XU, G.; ZHU, J. K. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. **Science China Life Sciences**, v. 63, p. 635-674, 2020.

GREFFE, V. R. G.; MICHIELS, J. Desiccation-induced cell damage in bacteria and the relevance for inoculant production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 3757-3770, 2020.

GULII, O. I., SOKOLOVA, M. K., SOKOLOV, O. I.; IGNATOV, O. V. Changes in the morphology of the root system of wheat inoculated with *Azospirillum brasilense* Sp7 and bacteriophage FAb-Sp7. **Agricultural Biology**, n. 3, p. 315-322, 2015.

HUNGRIA, M., NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, 6, 811-817 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Área plantada, área colhida e produção, por ano da safra e produção de lavoura. 2023, <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>, Acesso em 30 de abril de 2024.

IQBAL, M. S., SINGH, A. K.; ANSARI, M. I. Effect of drought stress on crop production. **In: RAKSHIT, A., SINGH, H. B., SINGH, A. K., SINGH, U. S.; FRACETO, L. Eds. New Frontiers in Stress Management for Durable Agriculture. Singapura, Springer Nature Singapore. 2020. p. 35-47.**

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.

MALAVOLTA, E., VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba, POTAFOS, 1997. 319p

MANAVALAN, L. P., GUTTIKONDA, S. K., PHAN TRAN, L. S.; NGUYEN, H. T. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 7, p. 1260-1276, 2009.

MARTIN, T. N., VEY, R. T., VIEIRA, F. C. B., JACQUES, R. J. S.; FERREIRA, M. M. How did the coinoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* become indispensable for soybean production in Brazil? **Symbiosis**, v. 91, n. 1, p. 119-137, 2023.

MEDINA, I. R., ROCHA, G. H. D.; PEREIRA, E. G. Photosynthetic adjustments and proline concentration are probably linked to stress memory in soybean exposed to recurrent drought. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 47, p. e015322, 2023.

MERTZ-HENNING, L. M., FERREIRA, L. C., HENNING, F. A., MANDARINO, J. M., SANTOS, E. D., OLIVEIRA, M. C.; NEUMAIER, N. Effect of water deficit-induced at vegetative and reproductive stages on protein and oil content in soybean grains. **Agronomy**, v. 8, n. 1, p. 3, 2017.

MORETTI, L. G., CRUSCIOL, C. A. C., BOSSOLANI, J. W., MOMESSO, L., GARCIA, A., KURAMAE, E. E.; HUNGRIA, M. Bacterial consortium and microbial metabolites increase grain quality and soybean yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 4, p. 1923-1934, 2020.

PACENTCHUK, F., GOMES, J. M., DE LIMA, V. A., MENDES, M. C., SANDINI, I. E.; JADOSKI, S. O. Efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento na cultura da soja. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p. e39291211360-e39291211360, 2020.

REIS, A. F. B., ROSSO, L. H. M., ADEE, E., DAVIDSON, D., KOVÁCS, P., PURCELL, L. C.; CIAMPITTI, I. A. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense* in the US soybean systems. **Field Crops Research**, v. 283, p. 108537, 2022.

ROSÁRIO ROSA, V., SANTOS, A. L. F., DA SILVA, A. A., SAB, M. P. V., GERMINO, G. H., CARDOSO, F. B.; DE ALMEIDA SILVA, M. Increased soybean tolerance to water deficiency through biostimulant based on fulvic acids and *Ascomyces nodosum* (L.) seaweed extract. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, p. 228-243, 2021.

SANTOS JUNIOR, U. M. CARVALHO GONÇALVES, J. F.; FELDPAUSCH, T. R. Growth, leaf nutrient concentration and photosynthetic nutrient use efficiency in tropical tree species planted in degraded areas in central Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 226, n. 1-3, p. 299-309, 2006.

SILV SILVA, E. R., ZOZ, J., OLIVEIRA, C. E. S., ZUFFO, A. M., STEINER, F., ZOZ, T.; VENDRUSCOLO, E. P. Can co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* alleviate adverse effects of drought stress on soybean (*Glycine max* L. Merrill.)? **Archives of Microbiology**, v. 201, p. 325-335, 2019.

SILVA, J. A. D., SANTOS, P. A. B. D., CARVALHO, L. G. D., MOURA, E. G.; ANDRADE, F. R. Gas exchanges and growth of soybean cultivars submitted to water deficiency. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 50, p. e58854, 2020.

TAVARES, C. J., RIBEIRO JUNIOR, W. Q., RAMOS, M. L. G., PEREIRA, L. F., CASARI, R. A. D. C. N., PEREIRA, A. F.; MERTZ-HENNING, L. M. Water stress alters morphophysiological, grain quality and vegetation indices of soybean cultivars. **Plants**, v. 11, n. 4, p. 559, 2022.

WHITMARSH J (2000) Electron transport and energy transduction In: Raghavendra AS (Ed), Photosynthesis: a comprehensive treatise. Cambridge University Press, Cambridge. 2000. p 83-107.

WU, Q., PAGÈS, L.; WU, J. Relationships between root diameter, root length and root branching along lateral roots in adult, field-grown maize. **Annals of Botany**, v. 117, n. 3, p. 379-390, 2016.

XU, Z., ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Plant responses to drought and rewatering. **Plant Signaling; Behavior**, v. 5, n. 6, p. 649-654, 2010.

ZEFFA, D. M., FANTIN, L. H., KOLTUN, A., DE OLIVEIRA, A. L., NUNES, M. P., CANTERI, M. G.; GONÇALVES, L. S. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. **PeerJ**, v. 8, p. e7905, 2020.

ZUFFO, A. M., BRUZI, A. T., DE REZENDE, P. M., BIANCHI, M. C., ZAMBIAZZI, E. V., SOARES, I. O.; VILELA, G. L. D. Morphoagronomic and productive traits of RR soybean due to inoculation via *Azospirillum brasilense* groove. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 13, p. 438-444, 2016.

CONCLUSÕES GERAIS

O uso das estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053 promoveu diferentes resultados nas culturas de milho, trigo, feijão e soja. Nas culturas de milho e trigo, a inoculação das sementes com *A. brasilense* ocasionou melhoria na biomassa da parte aérea e da raiz, respectivamente. Na cultura do feijão, a co-inoculação das sementes com a estirpe HM053 reduziu quase todos os parâmetros analisados, principalmente a biomassa e nodulação. Em nenhuma cultura a inoculação das sementes com as estirpes de *A. brasilense* aumentou o índice de clorofila. Os parâmetros fotossintéticos nas culturas de soja e milho não foram influenciados significativamente pelo uso das estirpes AbV5-AbV6 e HM053. Na cultura de feijão, o déficit hídrico afetou negativamente a nodulação, o desenvolvimento das raízes e da parte aérea, bem como a extração de nutrientes pelas plantas. Na cultura do milho, o déficit hídrico afetou negativamente a concentração de carbono intracelular. Na cultura da soja, plantas com déficit hídrico apresentaram redução na densidade de raízes. A inoculação das sementes de milho e trigo, bem como a co-inoculação das sementes de feijão e soja, com as estirpes de *A. brasilense* AbV5-AbV6 e HM053 não demonstrou eficiência em atenuar os efeitos negativos causados pelo déficit hídrico no desenvolvimento das plantas.