

Morfofisiologia do Milho Inoculado com *Azospirillum brasilense* Submetido à Restrição Hídrica e à Adubação Nitrogenada

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
227**

**Morfofisiologia do Milho Inoculado com
Azospirillum brasilense Submetido à Restrição
Hídrica e à Adubação Nitrogenada**

Hadassa Fortuna Jales
Paulo César Magalhães
Cláudio Pagotto Ronchi
Ana Paula Lima de Paiva
Lorena Pereira de Carvalho
Carlos César Gomes Júnior

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2021*

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Maria Marta Pastina

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
Cláudia Teixeira Guimarães, Mônica Matoso Campanha, Roberto dos Santos Trindade e Maria Cristina Dias Paes.

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Mônica Aparecida de Castro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Mônica Aparecida de Castro

Foto da capa
Hadassa Fortuna Jales

1ª edição
Publicação digital (2021)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Morfofisiologia do milho inoculado com *Azospirillum brasilense* submetido à restrição hídrica e adubação nitrogenada / Hadassa Fortuna Jales ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2021.
43 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 227).

1. *Zea mays*. 2. Inoculação. 3. Bactéria. 4. Fertilizante nitrogenado. 5. Deficiência hídrica. I. Jales, Hadassa Fortuna. II. Magalhães, Paulo César. III. Ronchi, Cláudio Pagotto. IV. Paiva, Ana Paula Lima de. V. Carvalho, Lorena Pereira de. VI. Gomes Júnior, Carlos César. VII. Série.

CDD (21. ed.) 633.15

Sumário

Resumo	05
Abstract	07
Introdução.....	08
Material e Métodos	11
Resultados.....	19
Discussão	32
Conclusões.....	37
Referências	37
Literatura Recomendada	41

Morfofisiologia do Milho Inoculado com *Azospirillum brasilense* Submetido à Restrição Hídrica e à Adubação Nitrogenada

Hadassa Fortuna Jales¹

Paulo César Magalhães²

Cláudio Pagotto Ronchi³

Ana Paula Lima de Paiva⁴

Lorena Pereira de Carvalho⁵

Carlos César Gomes Júnior⁶

Resumo – A disponibilidade de água e nitrogênio nos solos de cultivo brasileiros é vital ao metabolismo das plantas. Na busca por recursos que mitiguem o efeito da seca e da disponibilidade de nitrogênio (N), destaca-se o uso de bactérias diazotróficas. Nesse sentido, objetivou-se avaliar o crescimento do milho inoculado com estirpes de *Azospirillum brasilense*, submetido a dois níveis de N e a duas condições hídricas. O ensaio foi conduzido em vasos, mantidos em casa de vegetação, no qual foram testados os inoculantes Az₁, Az₂, Az₃, e Az₄ (mistura do inoculante Az₁ com Az₂), além de um tratamento sem inoculação, submetido a dois níveis de N (N₁ - 156 kg ha⁻¹ e N₂ - 312 kg ha⁻¹) aplicados em cobertura e a duas condições hídricas [irrigado – solo na capacidade de campo (CC) e com restrição hídrica (RH) – suspensão da irrigação por 14 dias, iniciando-se aos 19 dias após emergência das plantas – DAE]. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições. As avaliações ecofisiológicas (teor relativo de clorofila, rendimento quântico máximo – F_v/F_m , condutância estomática e potencial hídrico foliar - PHF) foram realizadas aos 25, 28 e 32 DAE. Aos 32 DAE foram realizadas as avaliações morfológicas de altura de planta (AP), diâmetro de caule (DC) e número de folhas totalmente expandidas (NFTE). Área foliar (AF), matéria seca da parte aérea e raiz

¹ Hadassa Fortuna Jales, estudante de Engenharia Agrônoma pela Universidade Federal de Viçosa;

² Paulo César Magalhaes, Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fiel Crop Physiology, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo;

³ Cláudio Pagotto Ronchi, Professor da Universidade Federal de Viçosa;

⁴ Ana Paula Lima de Paiva, estudante de Engenharia Química pelo Centro Universitário de Sete Lagoas ;

⁵ Lorena Pereira de Carvalho, estudante de Engenharia Agrônoma pela Universidade Federal de São João del-Rei;

⁶ Carlos César Gomes Júnior, doutorando em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa.

(MSPA e MSR), volume, área, comprimento e diâmetro médio das raízes foram avaliados aos 34 DAE. Para todas as avaliações realizadas não houve efeito significativo ($p>0,05$) dos inoculantes. As plantas do tratamento CC-N₁ exibiram maior AF com relação aos demais tratamentos. Com relação aos níveis de N, independentemente de outros fatores, o N₁ proporcionou maior incremento em AP, DC, NFTE, AF, MSPA, MSR, comprimento, área, diâmetro e volume, em relação ao nível N₂. A disponibilidade hídrica em CC influenciou positivamente o PHF, AP, DC, NFTE, AF, MSPA e F_v/F_m (3ª avaliação) em relação às plantas do tratamento com RH. Por outro lado, o déficit hídrico proporcionou aumento nas características de comprimento médio e área superficial de raiz. A inoculação com *Azospirillum brasilense* não alterou a morfofisiologia e o crescimento inicial da planta de milho, independentemente dos níveis de N, das condições hídricas e estirpes testadas.

Termos para indexação: *Azospirillum brasilense*, *Zea mays* L., déficit hídrico, nitrogênio.

Morphophysiology of Corn Inoculated with *Azospirillum brasilense* Submitted to Water Restriction and Nitrogen Fertilization

Abstract – The availability of water and nitrogen in Brazilian cultivation soils is vital to plant metabolism. In the search for resources that mitigate the effect of drought and the availability of nitrogen (N), the use of diazotrophic bacteria stands out. In this sense, the objective of this work was to evaluate the growth of maize inoculated with strains of *Azospirillum brasilense*, submitted to two levels of N and two water conditions. The rehearsal was conducted in pots, kept in the greenhouse, in which the inoculants Az₁, Az₂, Az₃, Az₄ (mixture of Az₁ and Az₂ inoculant) were tested, in addition to a treatment without inoculation, submitted to two levels of N (N₁ - 156 kg ha⁻¹ and N₂ - 312 kg ha⁻¹) applied in topdressing and two water conditions [irrigated - soil in field capacity (CC) and with water restriction (RH) - suspension of irrigation for 14 days, starting at 19 days after plant emergence - DAE]. The experimental design used was entirely randomized (DIC) with 4 replications. Ecophysiological evaluations (relative chlorophyll content, maximum quantum yield - F_v/F_m , stomatal conductance and leaf water potential - PHF) were performed at 25, 28 and 32 DAE. At 32 DAE, morphological evaluations of plant height (AP), stem diameter (DC) and number of fully expanded leaves (NFTE) were performed. The leaf area (AF), dry matter of the aerial part and root (MSPA and MSR), volume, area, length and average diameter of the roots were evaluated at 34 DAE. For all evaluations performed, there was no significant effect ($p > 0.05$) of inoculants. The plants of the CC-N₁ treatment exhibited greater AF compared to the other treatments. Regarding N levels, regardless of other factors, N₁ provided a greater increase in AP, DC, NFTE, AF, MSPA, MSR, length, area, diameter and volume, in relation to the N₂ level. The water availability in CC positively influenced the PHF, AP, DC, NFTE, AF, MSPA and F_v/F_m (3rd evaluation) in relation to the plants of the treatment with RH. On the other hand, the water deficit provided an increase in the characteristics of medium length and root surface area. Inoculation with *Azospirillum brasilense* did not alter the morphophysiology and initial growth of the maize plant, regardless of the levels of N, water conditions and strains tested.

Index terms: *Azospirillum brasilense*, *Zea mays* L., water deficit, nitrogen.

Introdução

O milho é um dos cereais considerados mais importantes, tendo alcançado patamar de maior cultura agrícola do globo (Contini et al., 2019). Atualmente, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, 2020), o Brasil se situa como terceiro maior produtor mundial de milho, com 101 milhões de toneladas produzidas na safra 2019/2020, atrás dos Estados Unidos e da China, com 347,5 e 254 milhões de toneladas, respectivamente. Para a safra 2019/2020, a exportação brasileira foi estimada em 42,7 milhões de toneladas, de forma que o Brasil ocupou o posto de maior exportador mundial de milho (Estados Unidos, 2020).

Estudos da FAO apontam para a necessidade de aumento da produção agrícola em 70% entre os anos de 2010 e 2050 (Gazzoni, 2017). No entanto, problemas ambientais como o aquecimento global promovem a alteração nos padrões de precipitação e, conseqüentemente, o aumento de períodos de estresse hídrico, gerando diminuição da produção agrícola (Guimarães et al., 2019).

Nesse contexto, a baixa disponibilidade hídrica nos tecidos vegetais reduz a pressão de turgor nas células, e, conseqüentemente, a expansão celular, reduzindo seu crescimento (Lisar et al., 2012). Paralelamente, há redução drástica da síntese de parede celular e de outros compostos, diminuição da síntese proteica, redução da condutância estomática e, por fim, redução da fotossíntese, que resulta em menor acúmulo de biomassa e produção de grãos (Lisar et al., 2012).

Por outro lado, além do déficit hídrico, o baixo teor de N presente nos solos de cultivo brasileiros é outro fator que limita o alcance de altas produtividades na cultura do milho (Pandolfo et al., 2015). O N é o nutriente mais requerido pelas plantas e sua importância está ligada à síntese das moléculas de clorofila, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas e enzimas importantes nas vias metabólicas (Taiz et al., 2017). É também considerado o nutriente mais importante no rendimento e no teor proteico dos grãos, e o que mais onera a produção da cultura (Machado et al., 1998).

Diante desse cenário, estudos envolvendo microrganismos fixadores de N nos solos são uma fonte alternativa de fornecimento que tem ganhado destaque, visto que é uma prática sustentável, de baixo custo e responsável por

gerar múltiplos benefícios às plantas. O gênero *Azospirillum* é o mais utilizado na promoção do desenvolvimento de plantas não leguminosas (em especial as gramíneas), colonizando em especial a região da rizosfera (Programa ABC Cerrado, 2019).

Essas bactérias são tidas como bioestimulantes, visto que atuam em todos os aspectos de vida das plantas como crescimento e nutrição, desenvolvimento e morfogênese, interações com outros microrganismos e respostas aos estresses abióticos e bióticos (Du Jardin, 2015). Além disso, são responsáveis pela produção de numerosos fitormônios, fixação de N, produção de uma variedade de moléculas e de enzimas, aumento da atividade da membrana plasmática, crescimento do sistema radicular, aumento da captação de água e minerais, mitigação de estresses em plantas, mobilização de minerais e controle biológico direto ou indireto de vários patógenos (Bashan; De-Bashan, 2010).

Portanto, o uso desses microrganismos visando tanto a mitigação do déficit hídrico como a oferta de N para as plantas é uma tecnologia benéfica e promissora para a agricultura sustentável, podendo diminuir a dependência de adubos nitrogenados e permitir maior tolerância da planta de milho ao estresse hídrico. Dessa forma, testou-se a hipótese de que estirpes de *A. brasilense* mitigam os efeitos do déficit hídrico e aumentam a disponibilidade de N para as plantas de milho em condição de alta produtividade.

Alinhado ao propósito deste estudo, os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU), se enquadram nesse contexto, como a ODS 2: “Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável”. Nesse sentido, sabe-se que o milho alcançou o patamar de maior cultura agrícola do mundo e, por outro lado, problemas na regularização das chuvas e outras condições adversas de clima exigem adaptações cada vez melhores por parte da cultura. Por essa razão, um dos propósitos deste estudo foi aumentar a capacidade de crescimento e desenvolvimento do milho, em condição de déficit hídrico por meio da inoculação com *Azospirillum brasilense*. Nesse sentido, a produção de numerosos fitormônios, fixação de N, produção de uma variedade de moléculas e enzimas, realizada por essas bactérias, auxilia na redução de custos em adubação nitrogenada e promove

maior tolerância do milho ao estresse hídrico, fazendo com que o uso dessa tecnologia gere uma agricultura mais sustentável com enfoque ecológico.

Aliado ao ODS anterior, o objetivo 12 - “Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis” - pressupõe o uso de tecnologias limpas e renováveis que pode ser obtido com a utilização de bactérias diazotróficas associativas, constituintes do grupo de Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP). Nesse contexto, os benefícios que resultam da interação de *Azospirillum* com as plantas são vários, por exemplo, o crescimento do sistema radicular, o aumento da captação de água e minerais, a fixação de N, etc. Dessa forma, potencializa-se a absorção de água em condição de estresse e reduzem-se as aplicações de fertilizantes de N, minimizando a contaminação do ambiente por volatilização (GEEs – Gases de Efeito Estufa) e lixiviação, garantindo padrões de produção e de consumo sustentáveis.

Além disso, o uso de adubos nitrogenados é uma prática frequente, porém muito debatida por gerar contaminação do ambiente, uma vez que a disponibilidade de N no solo é um processo dinâmico, por causa das múltiplas reações em que está envolvido. Nesse contexto, as consequências na volatilização de adubos resultam na produção de gases do efeito estufa, por exemplo, óxido nitroso (N₂O), que corroboram para o aquecimento global e, conseqüentemente, atuam na dinâmica climática. Diante desse cenário, o uso de fontes alternativas de N, como as bactérias do gênero *Azospirillum*, tem ganhado cada vez mais destaque, visto que é uma prática sustentável e de baixo custo. Por essa razão, pode-se dizer que o ODS 13, “Tomar medidas urgentes para combater a mudança do clima e seus impactos”, é contemplado neste trabalho, justamente porque o uso desses microrganismos permite um cultivo rentável, com enfoque ecológico para o uso responsável dos recursos naturais.

Material e Métodos

Condições experimentais

O experimento foi realizado na Embrapa Milho e Sorgo, situada em Sete Lagoas-MG, Brasil, nas coordenadas geográficas: 19°28' S, 44°15'08" W e altitude equivalente a 732 m. Utilizou-se uma casa de vegetação cuja constituição era de vidro nas laterais e na cobertura, equipada com sistema de climatização para o resfriamento evaporativo do ar. Esse sistema era formado por um painel montado com argila expandida e, na parede oposta ao painel, havia um sistema de ventilação com exaustores, controlados de forma automatizada.

O solo utilizado no experimento foi o Latossolo Vermelho Distrófico, cujo teor de argila era de 74,0 dag kg⁻¹ e apresentava os atributos químicos e físicos mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química do solo utilizado para o experimento em vaso.

pH _{H2O}	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	*SB	**V	***MO
-	mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻³			%		dag kg ⁻¹
5,24	2,17	30,33	2,47	0,2	0,37	9,07	2,74	23,23	5,97

Análises realizadas no Laboratório de Solo da Embrapa Milho e Sorgo (Embrapa, 2020).

pH em água – Relação 1:2,5.

P, K: Extrator Mehlich-1.

Al, Ca e Mg: Extrator KCl 1 mol L⁻¹.

H + Al: Extrator Ca(OAc)₂ 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0.

*SB: soma de bases; **V: saturação de bases; ***MO: matéria orgânica.

Antes do plantio foram realizadas as seguintes adubações:

- **Calagem e gessagem:**

Calcário dolomítico: 6,0 t/ha - (0,003 kg cal. dol./kg solo).

Gesso agrícola: 1,0 t/ha - (0,0005 kg ges. agric./kg solo).

- **Adubação com NPK:**

300 kg ha⁻¹ do formulado NPK 08-28-16.

- **Adubação com micronutrientes:**

FTE BR12 na dose de 50 kg/ha - (0,00003 kg/kg solo).

O FTE BR12 apresenta em sua constituição 1,8% de B; 0,8% de Cu; 3,0% de Fe; 2,0% de Mn; 0,1% de Mo e 9% Zn.

Descrição dos Tratamentos

Foram utilizadas três cepas (CMS11, CMS1626 e C) pertencentes à coleção de bactérias diazotróficas do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo, com exceção da cepa C, proveniente do inoculante líquido para gramíneas Azototal, comercializado pela empresa Total Biotecnologia. As estirpes de *A. brasilense* utilizadas foram cultivadas num meio de cultura composto por soja tripcaseína pelo período de 120 horas em temperaturas variando de 28 °C a 30 °C sob agitação constante de 120 rpm. Após esse processo, as culturas foram centrifugadas a 6.000 rpm, ressuspensas em solução salina [0,85% (m/v) NaCl] e, por fim, ajustadas para densidade óptica igual a 1,0 em absorbância a 500 nm, que equivale a aproximadamente 10⁸ células viáveis mL⁻¹ (Reis, 2015).

As três cepas foram dispostas em cinco tratamentos [Az₁ (cepa CMS11), Az₂ (cepa CMS1626), Az₃ (cepa C), Az₄ (mistura do inoculante Az₁ com Az₂), além de um tratamento sem inoculação]. Além desses tratamentos, foram testados também dois níveis de N (N₁ - 156 kg ha⁻¹; N₂ - 312 kg ha⁻¹), aplicados em cobertura na forma de ureia e associados a duas condições hídricas, irrigada (o solo permanecia na capacidade de campo - CC) e com restrição hídrica (RH - suspensão da irrigação por 14 dias a partir de V5). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 20 tratamentos dispostos em esquema fatorial 5x2x2 e quatro repetições.

Foto: Hadassa Fortuna Jales



Figura 1. Cepas cultivadas em caldo nutritivo de soja trip-caseína.

Condução do Experimento

A unidade experimental foi caracterizada por vasos de polietileno, com capacidade de 10 L. Os vasos foram preenchidos com o solo descrito anteriormente. Em seguida, o semeio foi feito em três covetas por vaso, com duas sementes por coveta, totalizando seis sementes por unidade experimental. O genótipo utilizado foi o BRS 1040 (híbrido simples), cultivar de milho sensível ao déficit hídrico, desenvolvido pelo programa de melhoramento genético de milho da Embrapa Milho e Sorgo no ano de 2008. Após o semeio, foi adicionado 0,0033 mL de inoculante (aplicado em cada coveta), utilizando uma micropipeta de precisão. A proporção de inoculante utilizada foi de 100 mL para 60.000 sementes, conforme orientação da Embrapa e da empresa Total Biotecnologia.

Fotos: Hadassa Fortuna Jales



Figura 2. Início do plantio e inoculação com as cepas. Semeio do milho nas unidades experimentais (A); Adição do inoculante contendo as cepas de *A. brasilense* em cada coveta, via solo (B).

O primeiro desbaste foi realizado aos 7 dias após emergência (DAE), sendo retirada uma plântula por coveta, permanecendo assim três plântulas por unidade experimental. Aos 15 DAE foi realizada a primeira adubação nitrogenada em cobertura, sendo aplicados 156 kg ha⁻¹ somente aos tratamentos N₂, sendo a aplicação de N solubilizada na água utilizada para a irrigação dos tratamentos. A segunda adubação nitrogenada em cobertura foi realizada aos 22 DAE, sendo aplicados mais 156 kg ha⁻¹ para todos os tratamentos, N₁ e N₂, solubilizados também na água utilizada para irrigação.

O segundo desbaste foi realizado aos 18 DAE, retirando-se uma planta por vaso, sendo mantidas duas plantas por unidade experimental. Aos 19 DAE, em V5, iniciou-se a imposição do déficit hídrico, no qual o solo dos tratamentos irrigados permanecia na CC, enquanto o solo dos tratamentos com RH recebia 40% da água total disponibilizada aos irrigados.

O potencial matricial do solo (Ψ_{solo}) foi monitorado diariamente com o auxílio do sensor de umidade Watermark® modelo 200SS (IRROMETER Company, Inc. USA, California), durante o período da manhã e tarde, 9h e 15h, respectivamente. Esse aparelho foi instalado nas unidades experimentais de cada repetição, na profundidade de 0,2 cm. Com o auxílio de um medidor eletrônico Watermark® modelo 30-KTCD-NL, foram recebidos os sinais do sensor de umidade Watermark® 200SS e convertidos em tensão de umidade do solo expressos em centibars (Copersa, 2017).

Análises ecofisiológicas e morfológicas das plantas

A primeira avaliação ecofisiológica ocorreu aos 25 DAE, quando foram avaliados a condutância estomática das folhas utilizando o porômetro (Leaf Porometer - Decagon Devices), o teor relativo de clorofila com o auxílio do SPAD (Konica Minolta) e o rendimento quântico máximo mensurado com o auxílio do aparelho FluorPen FP 100 (através da relação F_v/F_m). A segunda avaliação aconteceu aos 28 DAE, quando foram avaliados apenas o teor relativo de clorofila e a relação F_v/F_m . Por fim, a última avaliação ocorreu aos 32 DAE quando foram avaliados o teor relativo de clorofila, a relação F_v/F_m e o potencial hídrico foliar - Ψ_w (utilizando a Bomba de Scholander – 1000 Pressure Chamber). As avaliações foram realizadas na última folha totalmente expandida, no período da manhã, entre 8h e 10h, com exceção da avaliação do Ψ_w , realizado no período compreendido entre 12h e 14h. Durante as

avaliações, as temperaturas na casa de vegetação variaram entre 28 °C e 41 °C, com uma média de 28% de umidade relativa do ar (UR).

Fotos: Hadassa Fortuna Jales



Figura 3. Avaliações ecofisiológicas da condutância estomática na folha, rendimento quântico máximo do PSII, teor relativo de clorofila e potencial hídrico foliar, por meio dos instrumentos, respectivamente: Porômetro (A); FluorPen FP 100 (B); SPAD (C); Bomba de Scholander (D).

Ao final do experimento (34 DAE), foram avaliadas a parte aérea e raízes das plantas. Com relação à parte aérea, foram determinadas as alturas das plantas por meio de uma régua graduada, o diâmetro do colmo com o auxílio de um paquímetro digital, o número de folhas totalmente expandidas e a área foliar total de cada vaso por meio de um leitor de área foliar (LI-3100C, Licor, Nebraska, USA). Após o término das avaliações, a parte aérea foi acondicionada em sacos de papel e submetida à secagem em estufa com circulação de ar forçada durante 72 horas, a 65 °C, para obtenção da matéria seca.

Fotos: Hadassa Fortuna Jales



Figura 4. Avaliações finais do milho aos 34 DAE. Medição da altura de planta (A); Condicionamento da parte aérea em sacos de papel (B); Contabilização da matéria seca da parte aérea (C); Utilização do paquímetro digital para mensurar o diâmetro de caule (D).

O sistema radicular foi cuidadosamente lavado em água corrente e acondicionado em potes de plásticos contendo álcool 70%. Utilizou-se um sistema informatizado WinRhizo (WinRhizo Pro, Regent Inc. Instr., Canada), acoplado a um scanner (Epson, Expression 10000 XL, Epson America, Inc., USA), para medição do comprimento (cm/vaso), área superficial (cm²/vaso), diâmetro médio (Ø em mm) e volume das raízes (cm³/vaso). Após esse processo, as raízes foram secas para determinação da matéria seca, conforme descrito anteriormente.



Figura 5. Avaliação do sistema radicular. Acondicionamento da raiz em potes de plástico contendo álcool 70% (A); Utilização do sistema informatizado WinRhizo na mensuração do comprimento, área superficial, diâmetro médio e volume das raízes (B).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de médias (Tukey) a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), utilizando o software estatístico SISVAR (Sistema de Análise de Variância – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

Resultados

Análise parte aérea

Não houve interação tripla (níveis de N x condição hídrica x inoculação de *A. brasilense*) para as características avaliadas (Tabelas 2 e 3). No entanto, apenas os efeitos isolados de níveis de N e de disponibilidade hídrica, além da interação entre níveis de N x disponibilidade hídrica, para algumas características, foram estatisticamente significativos (Tabelas 2 e 3). A Figura 6 ilustra a ausência de efeito das estirpes ($p > 0,05$) por meio da interação com a disponibilidade hídrica, para a variável matéria seca da parte aérea (PA). As Figuras 7 e 8 ilustram, semelhantemente, a ausência de efeito dos inoculantes sobre as características estudadas da PA.

Tabela 2. Valores do teste F para os fatores estirpe, disponibilidade hídrica, nível de N e suas interações sobre as variáveis referentes ao teor relativo de clorofila (TRC1, TRC2 e TRC3), rendimento quântico máximo (F_v/F_m1 , F_v/F_m2 e F_v/F_m3) e condutância estomática da folha (CE).

F.V.	G.L.	Variáveis						
		TRC1	TRC2	TRC3	F_v/F_m1	F_v/F_m2	F_v/F_m3	CE
Estirpe (E)	4	0,180 ^{ns}	0,942 ^{ns}	0,271 ^{ns}	1,404 ^{ns}	1,267 ^{ns}	0,148 ^{ns}	0,654 ^{ns}
Irrigação (I)	1	0,717 ^{ns}	8,671 ^{**}	1,827 ^{ns}	3,475 ^{ns}	0,025 ^{ns}	43,290 ^{***}	0,607 ^{ns}
Nitrogênio (N)	1	2,658 ^{ns}	5,240 [*]	0,278 ^{ns}	0,487 ^{ns}	2,490 ^{ns}	0,524 ^{ns}	3,756 ^{ns}
Interação I x N	1	4,692 [*]	4,267 [*]	0,775 ^{ns}	0,709 ^{ns}	0,224 ^{ns}	0,732 ^{ns}	0,090 ^{ns}
Interação I x E	4	0,983 ^{ns}	0,572 ^{ns}	0,611 ^{ns}	1,372 ^{ns}	0,414 ^{ns}	0,501 ^{ns}	1,376 ^{ns}
Interação E x N	4	0,749 ^{ns}	1,503 ^{ns}	0,874 ^{ns}	0,295 ^{ns}	1,260 ^{ns}	0,819 ^{ns}	0,556 ^{ns}
Interação I x N x E	4	1,234 ^{ns}	0,661 ^{ns}	0,569 ^{ns}	0,308 ^{ns}	1,391 ^{ns}	0,994 ^{ns}	0,395 ^{ns}
C.V. (%)		10,37	9,21	6,74	20,1	1,71	4,28	50,92

F.V.: Fonte de variação; G.L.: Grau de liberdade; C.V.: Coeficiente de variação; ***, ** e *: Significativo a 0,1%, 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ^{ns}: Não significativo a 5%.

Tabela 3. Valores do teste F para os fatores estirpe, disponibilidade hídrica, nível de N e suas interações sobre as variáveis referentes ao potencial hídrico foliar (PHF), altura de planta (AP), diâmetro de caule (DC), número de folhas totalmente expandidas (NFTE), área foliar (AF) e matéria seca da parte aérea (MSPA).

F.V.	G.L.	PHF	AP	DC	NFTE	AF	MSPA
Estirpe (E)	4	1,416 ^{ns}	0,278 ^{ns}	0,279 ^{ns}	1,020 ^{ns}	0,677 ^{ns}	1,022 ^{ns}
Irrigação (I)	1	25,314 ^{***}	77,570 ^{***}	7,182 ^{**}	26,777 ^{***}	30,377 ^{***}	17,035 ^{***}
Nitrogênio (N)	1	0,247 ^{ns}	11,827 ^{**}	42,808 ^{***}	20,621 ^{***}	22,070 ^{***}	14,385 ^{***}
Interação I x N	1	0,031 ^{ns}	0,090 ^{ns}	0,536 ^{ns}	3,223 ^{ns}	6,373 [*]	2,420 ^{ns}
Interação I x E	4	2,031 ^{ns}	0,631 ^{ns}	0,683 ^{ns}	1,043 ^{ns}	0,189 ^{ns}	1,776 ^{ns}
Interação E x N	4	1,368 ^{ns}	0,549 ^{ns}	0,301 ^{ns}	0,463 ^{ns}	0,365 ^{ns}	0,177 ^{ns}
Interação I x N x E	4	1,579 ^{ns}	0,881 ^{ns}	0,53 ^{ns}	0,240 ^{ns}	0,222 ^{ns}	0,086 ^{ns}
C.V. (%)		50,04	10,02	11,91	6,5	25,83	21,28

F.V.: Fonte de variação; G.L.: Grau de liberdade; C.V.: Coeficiente de variação; ***, ** e *: Significativo a 0,1%, 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ^{ns}: Não significativo a 5%

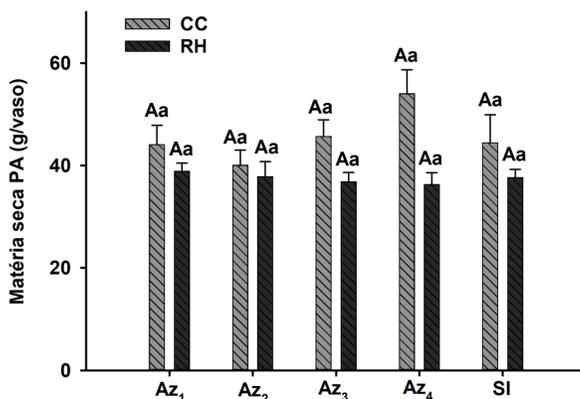


Figura 6. Valores da matéria seca da parte aérea (PA) para a interação entre os fatores estirpe (Az₁, Az₂, Az₃, Az₄ e SI – sem inoculação) e disponibilidade hídrica (CC – capacidade de campo; RH – restrição hídrica). Médias seguidas de mesma letra, maiúscula para disponibilidade hídrica e minúscula para estirpe, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Figura 7. Ausência de efeito dos inoculantes (Az₁, Az₂, Az₃, Az₄ e SI – sem inoculação) em função da interação com a disponibilidade hídrica (CC – capacidade de campo), para a variável altura de planta (AP).

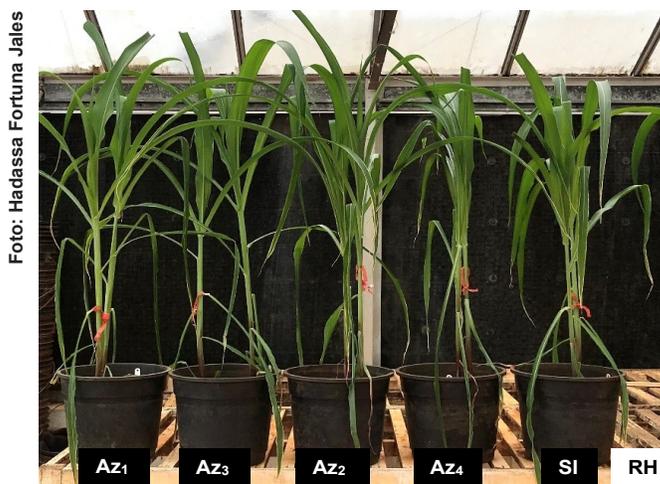


Figura 8. Ausência de efeito dos inoculantes (Az₁, Az₂, Az₃, Az₄ e SI – sem inoculação) em função da interação com a disponibilidade hídrica (RH – restrição hídrica), para a variável altura de planta (AP).

Foi constatado efeito significativo para a interação entre níveis de N e disponibilidade hídrica para o teor relativo de clorofila (TRC1 – 1ª avaliação; TRC2 – 2ª avaliação) e para a área foliar das plantas (AF), conforme ilustra a Figura 9. O N₁ aumentou de forma significativa o TRC1 no tratamento CC em relação ao N₂. Sob RH, não houve diferença do TRC1 entre os níveis de N. Todavia, o nível N₁ proporcionou maior síntese das moléculas de clorofila sob CC quando comparado à condição RH (Figura 9B).

O TRC2 foi maior no N₂ em comparação ao N₁, para a condição CC. Conforme apresentado na Figura 9C, sob restrição hídrica, os níveis de N não proporcionaram incrementos significativos. Na CC houve maior síntese das moléculas de clorofila que no tratamento com RH, quando as plantas foram submetidas ao N₂. Apesar de observado efeito significativo para as avaliações TRC1 e TRC2, na última (TRC3 – 3ª avaliação) não foi verificado efeito significativo, tanto para a interação quanto para os fatores analisados isoladamente (Tabela 2 e Figura 9D).

Observou-se também que o nível N₁ proporcionou maior AF em relação ao N₂, quando submetido a CC. Os níveis de N não afetaram a AF das plantas em condição de RH (Figura 9A). Entretanto, houve aumento significativo na AF em CC quando comparado ao RH.

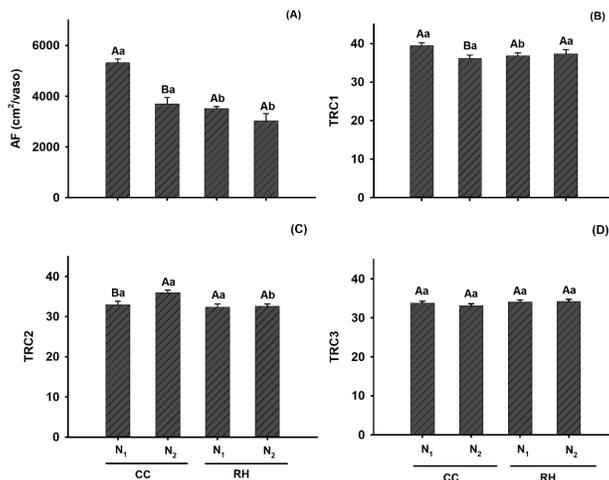


Figura 9. Valores médios da área foliar (AF) e do teor relativo de clorofila com suas respectivas avaliações (TRC1, TRC2 e TCR3) para a interação entre disponibilidade hídrica (CC – capacidade de campo; RH – restrição hídrica) e níveis de N (N₁ e N₂). Médias seguidas de mesma letra, maiúscula para níveis de N e minúscula para disponibilidade hídrica, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Verificou-se que o nível N_1 , independentemente de outros fatores, proporcionou aumento significativo em altura de planta (AP), área foliar (AF), diâmetro do caule (DC), número de folhas totalmente expandidas (NFTE) e matéria seca da parte aérea (MSPA), conforme demonstra a Tabela 4.

Tabela 4. Valores totais médios das variáveis teor relativo de clorofila (TRC1, TRC2 e TRC3), rendimento quântico máximo (F_v/F_m1 , F_v/F_m2 e F_v/F_m3), condutância estomática da folha (CE), potencial hídrico foliar (PHF), altura de planta (AP), diâmetro de caule (DC), número de folhas totalmente expandidas (NFTE), área foliar (AF) e matéria seca da parte aérea (MSPA), em função dos níveis de N

Níveis de N	Variáveis						
	TRC1	TRC2	TRC3	F_v/F_m1	F_v/F_m2	F_v/F_m3	CE
	-	-	-	-	-	-	mmol/(m ² s)
N_1	38,1a	32,6b	33,9a	0,76a	0,83a	0,79a	84,9a
N_2	36,7a	34,2a	33,6a	0,78a	0,82a	0,79a	68,0a
	PHF	AP	DC	NFTE	AF	MSPA	
	Mpa	cm	mm	-	cm ² vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	
N_1	-1,5a	96,7a	13,6a	8,4a	4418,4a	45,3a	
N_2	-1,6a	89,5b	11,4b	7,8b	3362,6b	37,8b	

Para cada variável, médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A disponibilidade hídrica em CC induziu aumento significativo do rendimento quântico máximo ($F_v/F_m 3 - 3^a$ avaliação), PHF, AP, DC, NFTE, TRC2, AF e MSPA em relação aos resultados avaliados para o tratamento com RH (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios das variáveis teor relativo de clorofila (TRC1, TRC2 e TRC3), rendimento quântico máximo ($F_v/F_m 1$, $F_v/F_m 2$ e $F_v/F_m 3$), condutância estomática da folha (CE), potencial hídrico foliar (PHF), altura de planta (AP), diâmetro de caule (DC), número de folhas totalmente expandidas (NFTE), área foliar (AF) e matéria seca da parte aérea (MSPA), em função da disponibilidade hídrica

Disponibilidade hídrica	Variáveis						
	TRC1	TRC2	TRC3	$F_v/F_m 1$	$F_v/F_m 2$	$F_v/F_m 3$	CE
	-	-	-	-	-	-	mmol/(m ² s)
CC	37,8a	34,5a	33,4a	0,74a	0,83a	0,82a	73,1a
RH	37,1a	32,5b	34,1a	0,80a	0,83a	0,76b	79,9a
	PHF	AP	DC	NFTE	AF	MSPA	
	Mpa	cm	mm	-	cm ² vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	
CC	-1,1a	102,3a	13,0a	8,5a	4509,8a	45,6a	
RH	-2,0b	83,9b	12,0b	7,8b	3271,2b	37,4b	

CC - capacidade de campo; RH - restrição hídrica. Para cada variável, médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A Figura 10 ilustra o aumento significativo em altura de planta para a condição de CC com relação ao tratamento com RH.

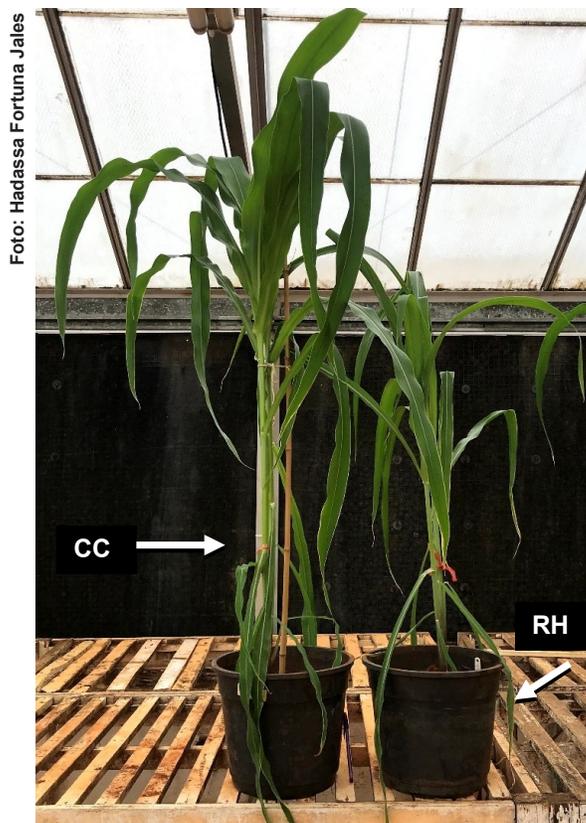


Figura 10. Efeito da disponibilidade hídrica (CC – capacidade de campo; RH – restrição hídrica) sobre a característica altura de planta (AP).

Análise sistema radicular

Para as variáveis analisadas, as interações entre os fatores disponibilidade hídrica, estirpe e níveis de N não foram significativas (Tabela 6). Logo, esses fatores apresentaram-se independentes de suas interações, podendo seus efeitos ser estudados isoladamente. A Figura 11 ilustra a ausência de efeito das estirpes ($p > 0,05$) por meio da interação com a disponibilidade hídrica, para a variável matéria seca da raiz.

Tabela 6. Valores do teste F para os fatores estirpe, disponibilidade hídrica, nível de N e suas interações sobre as variáveis referentes a matéria seca da raiz (MSR), comprimento, área superficial, diâmetro médio e volume de raiz

F.V.	G.L.	Variáveis				
		MSR	Comprimento	Área Superficial	Diâmetro	Volume
Estirpe (E)	4	0,417 ^{ns}	0,285 ^{ns}	0,359 ^{ns}	1,147 ^{ns}	0,787 ^{ns}
Irrigação (I)	1	1,144 ^{ns}	13,576 ^{***}	5,718 [*]	1,619 ^{ns}	0,635 ^{ns}
Nitrogênio (N)	1	28,655 ^{***}	16,430 ^{***}	28,412 ^{***}	7,543 ^{**}	21,480 ^{***}
Interação I x N	1	0,266 ^{ns}	0,587 ^{ns}	0,817 ^{ns}	0,898 ^{ns}	0,910 ^{ns}
Interação I x E	4	1,366 ^{ns}	0,663 ^{ns}	0,535 ^{ns}	0,510 ^{ns}	0,558 ^{ns}
Interação E x N	4	0,379 ^{ns}	1,930 ^{ns}	0,012 ^{ns}	1,648 ^{ns}	0,329 ^{ns}
Interação I x N x E	4	0,737 ^{ns}	0,294 ^{ns}	0,741 ^{ns}	0,605 ^{ns}	0,823 ^{ns}
C.V. (%)		27,16	14,81	16,98	12,8	25,01

F.V.: Fonte de variação; G.L.: Grau de liberdade; C.V.: Coeficiente de variação; ***, ** e *: Significativo a 0,1%, 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste Tukey; ns: Não significativo.

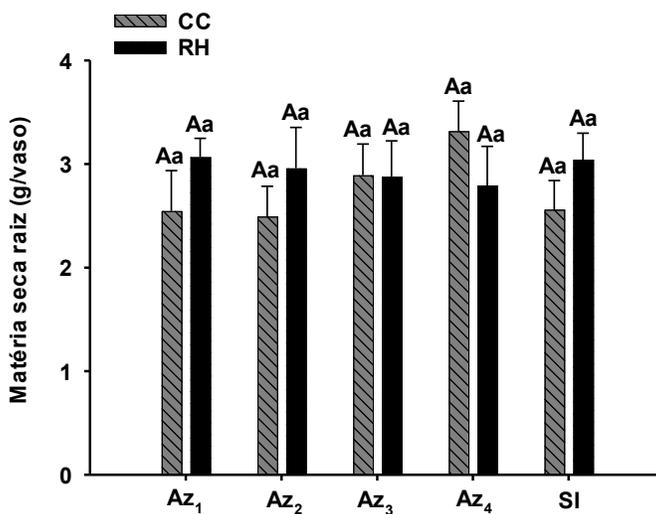


Figura 11. Valores da matéria seca de raiz para a interação entre os fatores estirpe (Az₁, Az₂, Az₃, Az₄ e SI – sem inoculação) e disponibilidade hídrica (CC – capacidade de campo; RH – restrição hídrica). Médias seguidas de mesma letra, maiúscula para disponibilidade hídrica e minúscula para estirpe, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

O nível N_1 , independentemente de outros fatores, proporcionou maior incremento para todas as características avaliadas de raiz, sendo elas: matéria seca (MSR), comprimento, área superficial, diâmetro médio e volume, em relação ao nível N_2 (Figura 12 e Tabela 7).

Tabela 7. Valores totais médios das variáveis matéria seca da raiz (MSR), comprimento, área superficial, diâmetro médio e volume de raiz, em função dos níveis de N

Nível de N	Variáveis				
	MSR	Comprimento	Área Superficial	Diâmetro	Volume
	g vaso ⁻¹	cm vaso ⁻¹	cm ² vaso ⁻¹	mm	cm ³ vaso ⁻¹
Nível 1 (N_1)	3,3a	5956,3a	1481,9a	0,80a	29608,7a
Nível 2 (N_2)	2,3b	5207,0b	1209,4b	0,74b	22815,3b

Para cada variável, médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Foto: Hadassa Fortuna Jales

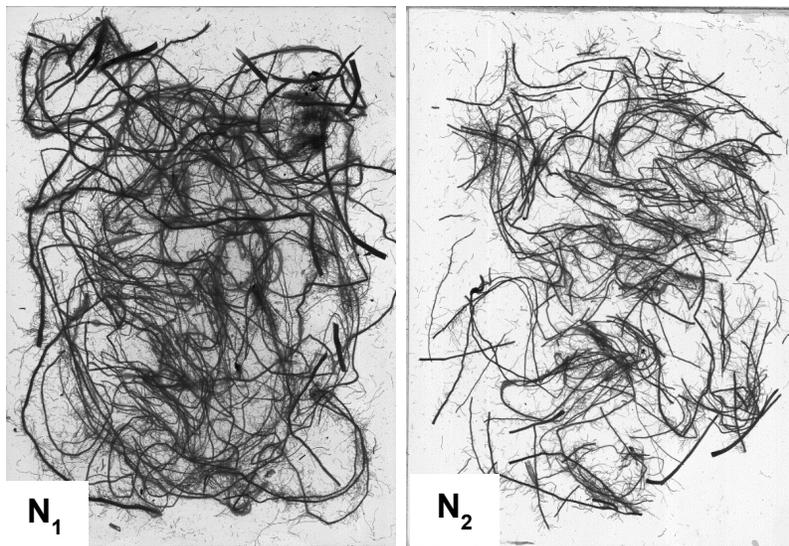


Figura 12. Efeito dos níveis de N (N_1 e N_2) sobre as características estudadas de raiz: matéria seca (MSR), comprimento, área superficial, diâmetro e volume.

A restrição hídrica promoveu um aumento do comprimento e área superficial de raiz em relação ao tratamento CC (Figuras 13, 14 e Tabela 8).

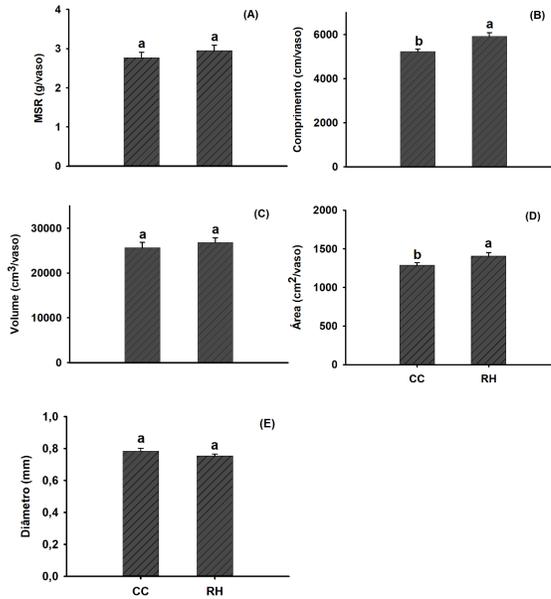


Figura 13. Efeitos da disponibilidade hídrica (CC – capacidade de campo; RH – restrição hídrica) sobre as variáveis estudadas de raiz. (A) matéria seca de raiz (MSR); (B) comprimento; (C) volume; (D) área superficial; (E) diâmetro médio. Para cada variável, médias (colunas) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Foto: Hadassa Fortuna Jales

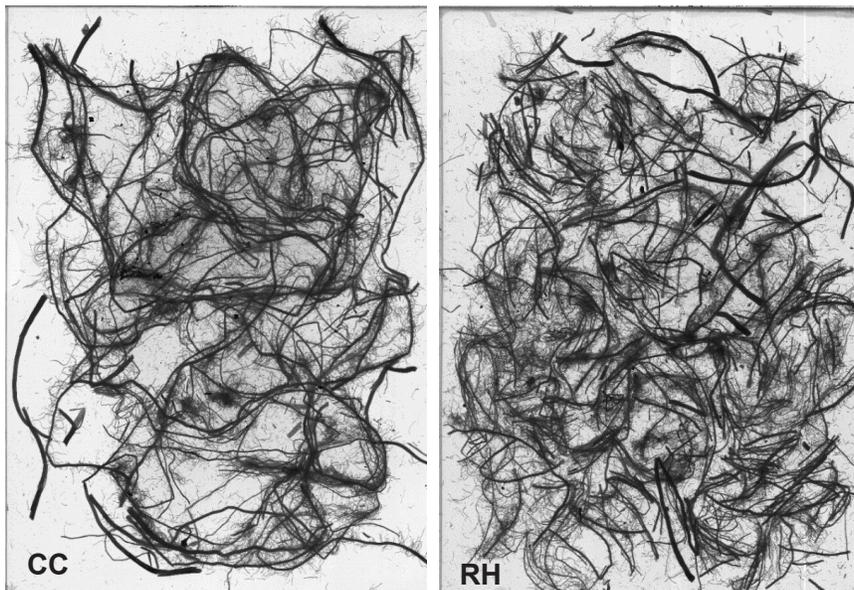


Figura 14. Efeito da disponibilidade hídrica (CC – capacidade de campo; RH – restrição hídrica) sobre as características estudadas de raiz: matéria seca (MSR), comprimento, área superficial, diâmetro e volume.

Tabela 8. Valores médios das variáveis matéria seca da raiz (MSR), comprimento, área superficial, diâmetro médio e volume de raiz, em função da disponibilidade hídrica.

Disponibilidade Hídrica	Variáveis				
	MSR	Comprimento	Área Superficial	Diâmetro	Volume
	g vaso ⁻¹	cm vaso ⁻¹	cm ² vaso ⁻¹	mm	cm ³ vaso ⁻¹
CC	2,7a	5241,1b	1284,6b	0,78a	25627,9a
RH	2,9a	5922,2a	1406,7a	0,75a	26796,1a

CC - capacidade de campo; RH - restrição hídrica. Para cada variável, médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Discussão

Análise parte aérea

Não foram constatados nesse trabalho efeitos de *A. brasilense* para todas as características avaliadas, independentemente dos níveis de N e das condições hídricas testados (Figuras 6, 7, 8 e Tabelas 2, 3). Estes resultados corroboram os de Hungria (2011) para os tratamentos que receberam 100% de N fertilizante, em ensaios conduzidos com o milho na safra de 2009/2010, em que, de forma geral, o efeito das bactérias foi anulado.

Skonieski et al. (2017) observaram os mesmos resultados que Hungria (2011) em inoculação do milho com *A. brasilense*, para as doses de 240 kg ha⁻¹ e 480 kg ha⁻¹ de N. De acordo com eles, a interação observada entre níveis de N e a inoculação indica a possibilidade de que as altas doses aplicadas em cobertura comprometeram o sucesso da inoculação com *A. brasilense*, principalmente com relação à FBN. Sobretudo, ocorre a rápida e reversível redução da atividade da nitrogenase, a qual tem sua ação inibida pela adição de NH₄⁺ ao solo (em consequência do alto custo energético na reação redox do N₂), reduzindo a fixação biológica de N₂ (Reis; Teixeira, 2005; Skonieski et al., 2017).

Destaca-se ainda que a sobrevivência e atividade de *A. brasilense* variam também com as condições de pH, concentração de O_2 , temperatura, condições da planta e outros fatores (Bashan et al., 2004; Oliveira et al., 2004; Hungria et al., 2010; Joe et al., 2012; Skonieski et al., 2017). Segundo Skonieski et al. (2017), a colonização dessas bactérias é fortemente afetada pelas condições ambientais e competições com outras estirpes e microrganismos nativos do solo. Essas podem ser algumas razões para não se ter observado efeitos de *A. brasilense* na planta de milho do presente trabalho, embora não tenham sido realizadas contagens de bactérias antes e depois das avaliações.

Apesar de observado efeito significativo dos tratamentos para as primeiras avaliações com relação ao teor relativo de clorofila (TRC1 e TRC2), na última (TRC3 – 3ª avaliação) não foi verificada efeito significativo, tanto para a interação quanto para os fatores analisados isoladamente (Figura 9B, C e D). No entanto, era esperado aumento do teor relativo de clorofila em função do aumento das doses aplicadas de N. Isso, pois, trabalhos têm demonstrado aumento no teor de clorofila da folha, com o aumento das doses de N aplicadas (Costa et al., 2008; Zuffo et al., 2012). Por outro lado, Silva et al. (2011) observaram que o valor máximo de clorofila proporcionado pela dosagem de $588 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N foi a mesma para aplicações da ordem de $150 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N para o capim Tifton 85. Esses resultados demonstram que, embora o aumento da disponibilidade de N resulte em maior síntese das moléculas de clorofila, em algum momento, possivelmente, será atingida a saturação (Lavres Júnior; Monteiro, 2006; Silva et al., 2011).

A área foliar das plantas com disponibilidade hídrica em CC foi 30,5% maior no N_1 que no N_2 (Figura 9A). Isso pode ser explicado pela quantidade adicionada de adubo nitrogenado ($N_1 - 180 \text{ kg ha}^{-1}$; $N_2 - 336 \text{ kg ha}^{-1}$). Quando em concentrações ótimas, o nitrogênio contribui para o desenvolvimento vegetativo e a formação das estruturas reprodutivas, que afetarão o enchimento de grãos e a produção da cultura (Asibi et al., 2019). Quando em condições supraótimas, pode haver inibição do crescimento. De acordo com Rosa (2017), em experimento com o milho, o acúmulo de N total foi mais intenso, sobretudo após o florescimento, enquanto antes desse período o acúmulo foi diminuindo de acordo com a redução dos DAE das plantas. Diante disso, o nível N_2 poderia se caracterizar, para aquele estágio fenológico da planta (34 DAE), um possível excesso, uma vez que a taxa de acúmulo nessa fase

é bem reduzida, o que promoveria, possivelmente, a redução do seu crescimento e área foliar.

Ao desdobrar a disponibilidade hídrica dentro de cada nível de N, foi constatado que, tanto para N_1 como para N_2 , a AF foi sempre maior para as plantas em condição de CC em relação à condição de RH. Esse resultado é coerente com o metabolismo vegetal uma vez que a água é essencial para a expansão dos tecidos vegetais. Nesse sentido, o crescimento em AF é proporcionado pela água, por meio da pressão de turgor (potencial de pressão da água - Ψ_p) que impulsiona a expansão da parede celular, conforme destacam Taiz et al. (2017).

Independentemente de outros fatores, o nível N_1 (180 kg ha⁻¹) proporcionou ganhos superiores no desenvolvimento das plantas de milho (Tabela 4). Isso pode ser confirmado pelo aumento em AP, DC, NFTE, AF e MSPA. O aporte de N em níveis adequados é de extrema importância ao metabolismo das plantas e promove a síntese de moléculas importantes nas vias metabólicas, tais como aminoácidos, proteínas, moléculas de clorofila (fotossíntese), atuação como ativador enzimático, dentre outras (Okumura et al., 2011). Além disso, o acréscimo de N ao solo estimula a proliferação dos pelos radiculares nas raízes, com o conseqüente desenvolvimento da parte aérea (Yamada; Abdalla, 2000).

No entanto, o nível N_2 não promoveu os mesmos resultados proporcionados pelo nível N_1 . Segundo Silva et al. (2015), a quantidade média de N exigida pela cultura do milho para produtividades da ordem de 11.190,78 kg ha⁻¹ seria de aproximadamente 300 kg ha⁻¹. Diante disso, embora o nível N_2 seja uma dose recomendada, objetivando-se altas produtividades, possivelmente, essa dose constituiu um excesso para aquele estágio fenológico da planta (34 DAE), promovendo a redução do seu crescimento em AP, DC, NFTE, AF e MSPA.

A condição hídrica CC, independentemente de outros fatores, proporcionou ganhos significativos para F_v/F_m , PHF, AP, DC, NFTE, AF e MSPA, em relação à RH (Figura 5 e Tabela 5). Esses resultados confirmam o que é descrito na literatura, uma vez que a água é a molécula central de todos os processos fisiológicos que ocorrem nas plantas e o meio principal de transporte de metabólitos e nutrientes, além de ser importante para a expansão dos tecidos vegetais (Lisar et al., 2012).

Nesse contexto, ao se considerar o potencial hídrico do solo (Ψ_w), sobretudo o potencial de pressão (Ψ_p), observa-se que à medida que o solo seca (RH), a água retrocede para os interstícios das partículas do solo, desenvolvendo uma pressão negativa que decresce o Ψ_p e, assim, o Ψ_w (Taiz et al., 2017). Deste modo, sabendo-se que o fluxo de água é governado pela diferença de Ψ_w solo-raiz e que o solo, quando em RH, apresenta Ψ_w negativo, a dificuldade que a planta apresentará para extrair a água adsorvida aos colóides do solo será cada vez maior. Por essa razão, é comum as plantas realizarem o ajustamento osmótico, decrescendo seu Ψ_s e, conseqüentemente, o Ψ_w , visando facilitar a absorção de água no solo.

Além disso, quanto menor for o status hídrico ou o teor relativo de água nas células das plantas, menor será o Ψ_p e, conseqüentemente, menor o Ψ_w das plantas. Esse fato corrobora os resultados obtidos nesse trabalho, os quais, sob condição de RH, as plantas apresentaram menor Ψ_w do que as plantas submetidas à condição de CC (Tabela 5).

Destaca-se ainda que, quando submetidas à seca, as plantas comumente apresentam desidratação celular e, portanto, os íons se concentram nas células tornando-se citotóxicos. Nesse contexto, paralelamente, o efeito do déficit hídrico promove acúmulo de ácido abscísico (ABA), responsável pelo fechamento estomático, sobretudo, ocorre redução das trocas gasosas e, conseqüentemente, diminuição da fotossíntese, culminando num menor crescimento em AP, DC, NFTE, AF e matéria seca total. Nesse sentido, o presente resultado sustenta as conclusões de Magalhães e Durães (2006), em que o déficit hídrico proporcionou plantas de menor AP, menor AF e colmo mais fino.

A relação $F_v/F_m - 1$ foi menor para as plantas submetidas à condição de RH em relação às plantas sob condição de CC (Tabela 5). Assim, possivelmente ocorreram danos ao fotossistema II (PSII) das plantas submetidas ao déficit hídrico, evidenciados pela diferença significativa nos valores de F_v/F_m . De acordo com Xu et al. (2009), a seca severa leva a um declínio no funcionamento (PSII), o que pode depender da espécie de planta, intensidade do estresse e estágio fenológico. Diante desse contexto, os presentes resultados demonstram que o déficit hídrico teve interferência sobre o rendimento quântico do PSII para o genótipo BRS 1040, confirmando menor tolerância deste genótipo ao déficit.

Análise sistema radicular

Da mesma forma que foi verificado para a parte aérea das plantas, o nível N_1 , independentemente de outros fatores, proporcionou maior incremento do sistema radicular das plantas de milho, evidenciado pelo maior acúmulo de matéria seca, comprimento, área superficial, diâmetro médio e volume de raiz, quando comparados com o nível N_2 (Figura 12 e Tabela 7). Isso, pois, trabalhos têm demonstrado que quando em concentrações ótimas, o acréscimo de N ao solo estimula a proliferação dos pelos radiculares nas raízes (Yamada; Abdalla, 2000).

Os resultados significativamente inferiores proporcionados pelo nível N_2 , expressos na Tabela 7, são atribuídos à baixa taxa de acúmulo de N no estágio fenológico em que as plantas se encontravam (Rosa, 2017). Nesse contexto, a dose de 336 kg ha^{-1} de N, até os 34 DAE, se caracterizou como um possível excesso. Os resultados obtidos em decorrência desse nível corroboram os descritos por Luo et al. (2015), que verificaram que o comprimento, a área superficial e o volume das raízes finas foram significativamente inibidas pelo excesso de N em plantas de *Populus simonii*.

A condição de RH, independentemente de outros fatores, promoveu maiores incrementos no comprimento e na área superficial do sistema radicular das plantas, quando comparadas sob condição de CC (Figuras 13, 14 e Tabela 8). A relação raiz/parte aérea aumenta mediante o estresse hídrico visando facilitar a absorção de água e manter a pressão osmótica das plantas, embora o peso e o comprimento das raízes diminuam para algumas espécies, como foi reportado, por exemplo, para beterraba (Lisar et al., 2012).

Nesse contexto, o aumento da relação raiz/parte aérea em condições de déficit hídrico tem sido relacionado ao conteúdo de ABA (nas raízes e ramos das plantas), como demonstrado para o milho por Lea et al. (1995). Este hormônio é responsável pelo fechamento estomático, além de promover a expressão de múltiplos genes envolvidos na defesa da planta contra o estresse hídrico. Destaca-se ainda que o déficit hídrico é responsável por promover redução da área foliar, desenvolvimento de extensos sistemas radiculares e, como já descrito, promover o aumento da relação raiz/parte aérea para algumas espécies de plantas (Lisar et al., 2012).

Conclusões

A inoculação de *Azospirillum brasilense* no milho não alterou a morfofisiologia e o crescimento da planta de milho, independentemente dos níveis de N, das condições hídricas e das estirpes testadas.

Independentemente das estirpes e das condições hídricas, a dose de 336 kg ha⁻¹ de N inibiu o crescimento da planta de milho em comparação àquele obtido com a dose de 180 kg ha⁻¹.

Independentemente das estirpes e dos níveis de N, a restrição hídrica potencializou o crescimento e os atributos morfofisiológicos do sistema radicular das plantas de milho.

Referências

ACOMPANHAMENTO da Safra Brasileira [de] Grãos: monitoramento agrícola. Brasília, DF: Conab, 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra/gaos>. Acesso em: 13 mar. 2021.

ASIBI, A. E.; CHAI, Q.; COULTER, J. A. Mechanisms of nitrogen use in maize. **Agronomy**, v. 9, n. 12, p. 775, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9120775>.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth: a critical assessment. In: SPARKS, D. L. (ed.). **Advances in agronomy**. London: Academic Press, 2010. v. 108, p. 77-136.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1139/w04-035>.

CONTINI, E.; MOTA, M. M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R. A.; SILVA, A. F.; SILVA, D. D.; MACHADO, J. R. A.; COTA, L. V.; COSTA, R. V.; MENDES, S. M. **Milho**: caracterização e desafios tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 45 p. (Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2).

COPERSA. **Catálogo 2017**: instrumentação e controlo: medidores de humidade – Watermark. [S.l.], 2017. Disponível em: https://www.hubel.pt/uploads/product_documents/HV_-_Catalogo_-_Copersa.pdf. Acesso em: 13 mar. 2021.

COSTA, K. A. de P.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA, I. P. de; ARAÚJO, J. L.; RODRIGUES, R. B. Doses e fontes de nitrogênio em pastagem de capimmarandu II - Nutrição nitrogenada da planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 4, p. 1601-1607, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000400024>.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3-14, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Data and analysis**. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data>. Acesso em: 21 nov. 2020.

GAZZONI, D. L. Como alimentar 10 bilhões de cidadãos na década de 2050? **Ciência e Cultura**, v. 69, n. 4, p. 33-38, 2017.

GUIMARÃES, P. S.; ROCHA, D. S.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z. Conteúdo de carboidrato foliar em híbridos de milho submetidos à restrição hídrica. **Evidência**, v. 19, n. 2, p. 93-112, 2019. DOI: <https://doi.org/10.18593/eba.v19i1.20201>.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1/2, p. 413-425, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

JOE, M. M.; KARTHIKEYAN, B.; CHAUHAN, P. S.; SHAGOL, C.; ISLAM, Md. R.; DEIVEEKASUNDARAM, M.; SA, T. Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 198-206, 2012.

LAVRES JÚNIOR, J.; MONTEIRO, F. A. Diagnose nutricional de nitrogênio no capim-aruaná em condições controladas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 5, p. 829-837, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832006000500009>.

LEA, P. J.; AI-SULAIT, A.; PALMER, S.; DAVIE, W. J. Absorção e metabolismo de nitrogênio sobre estresse hídrico. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL, 1., 1992. Belo Horizonte. **O milho em perspectiva: anais**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1995. p. 163-194.

LISAR, S. Y. S.; MOTAFAKKERAZAD, R.; HOSSAIN, M. M.; RAHMAN, I. M. M. **Water stress in plants: causes, effects and responses**. London: IntechOpen, 2012.

LUO, J.; ZHOU, J.; LI, H.; SHI, W.; POLLE, A.; LU, M.; SUN, X.; LUO, Z. Global poplar root and leaf transcriptomes reveal links between growth and stress responses under nitrogen starvation and excess. **Tree Physiology**, v. 35, n. 12, p. 1283-1302, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv091>.

MACHADO, A. T.; SODEK, L.; DOBEREINER, J.; REIS, V. M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 961-970, 1998.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 10 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 76).

OKUMURA, R. S.; MARIANO, D. C.; ZACCHEO, P. V. C. Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 4, n. 2, p. 226-244, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.5777/PAeT.V4.N2.13>.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; SILVA, E. E.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 295-299, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300005>.

PANDOLFO, C. M.; VOGT, G. A.; BALBINOT JÚNIOR, A. A.; GALLOTTI, G. J. M.; ZOLDAN, S. R. Desempenho de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado a doses de nitrogênio em cobertura. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 27, n. 3, p. 94-99, 2015.

PROGRAMA ABC Cerrado: fixação biológica de nitrogênio. Brasília, DF: Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2019. 121 p.

REIS, D. P. **Produtividade de milho e ecologia microbiana da rizosfera de plantas sob diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio**. 2015. 61 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2015.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Fixação biológica de nitrogênio: estado da arte. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R. L. (ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. p. 151-180.

ROSA, P. A. L. **Acúmulo de matéria seca, extração e exportação de nutrientes por híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense***. 2017. 101 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2017.

SILVA, M. R.; MARTIN, T. N.; PAVINATO, P. S.; BRUM, M. S. Estimativas da necessidade de nitrogênio para produção de grãos e silagem de milho. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 3, p. 12-24, 2015.

SILVA, R. V. M. M.; ROSSIELLO, R. O. P.; MORENZ, M. J. F.; BARBIERI JÚNIOR, E.; GOMES, R. L. T.; FILHO, S. T. C. Uso de clorofilometro na avaliação da adubação nitrogenada e potássica no capim Tifton 85. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 3, p. 828-839, 2011.

SKONIESKI, F. R.; VIÉGAS, J.; MARTIN, T. N.; NÖRNBERG, J. L.; MEINERZ, G. R.; TONIN, T. J.; BERNHARD, P.; FRATA, M. T. Effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization rates on maize plant yield and silage quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 9, p. 722-730, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-92902017000900003>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

XU, Z.; ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Are plant growth and photosynthesis limited by pre-drought following rewatering in grass? **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 13, p. 3737-3749, 2009. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093%2Fjxb%2Ferp216>.

YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. Como melhorar a eficiência da adubação nitrogenada do milho? **Biológica**, v. 25, n. 91, p. 30, 2000.

ZUFFO, A. M.; ANDRADE, F. R.; SCHOSSLER, T. R.; MILHOMEM, D. M.; PIAULINO, A. C. Eficiência na determinação indireta do nitrogênio foliar a partir do índice SPAD. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1-19, 2012.

Literatura Recomendada

EMBRAPA. **Fixação biológica de nitrogênio pode reduzir as emissões de GEE na agricultura**. Brasília, DF, 2015. Notícias. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8313328/fixacao-biologica-de-nitrogeniopode-reduzir-as-emissoes-de-gee-na-agricultura>. Acesso em: 13 mar. 2021.

BARROS, J. F.; CALADO, J. G. **A cultura do milho**. Évora: Universidade de Évora, 2014. 9 p.

COELHO, A. E.; TOCHETTO, C.; TUREK, T. L.; MICHELON, L. H.; FIOREZE, S. L. Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* em plantas de milho submetidas à restrição hídrica. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 186-192, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v16n1p186-192>.

FERNANDES, J. D.; CHAVES, L. H. G.; MONTEIRO FILHO, A. F.; VASCONCELLOS, A.; SILVA, J. R. P. Crescimento e produtividade de milho sob influência de parcelamento e doses de nitrogênio. **Revista Espacios**, v. 38, n. 8, p. 27-41, 2017.

HESSINI, K.; ISSAOUI, K.; FERCHICHI, S.; SAIF, T.; ABDELLY, C.; SIDDIQUE, K. H. M.; CRUZ, C. Interactive effects of salinity and nitrogen forms on plant growth, photosynthesis and osmotic adjustment in maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 139, p. 171-178, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.03.005>.

LIU, Z.; GAO, J.; GAO, F.; LIU, P.; ZHAO, B.; ZHANG, J. Photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure of summer maize response to different nitrogen supplies. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, article 576, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00576>.

MAGALHÃES, P. C.; LAVINSKY, A. O.; ÁVILA, R. G.; ALVES, J. C.; MELO, M. D.; GOMES JÚNIOR, C. C.; MELO, H. F. **Caracterização do sistema radicular e dos componentes da produtividade em quatro genótipos de milho cultivados sob déficit hídrico**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. 27 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 111).

MOREIRA, R. C.; VALADÃO, F. C. A.; VALADÃO JÚNIOR, D. D. Desempenho agrônomo do milho em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 62, p. 1-10, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.22491/rca.2019.2865>.

OLIVEIRA, T. F.; OLIVEIRA, V. J. B.; CLEMENTE, J. M.; AQUINO, L. A.; REIS, M. R.; FERNANDES, F. L. Extração e exportação de macronutrientes em lavouras de milho de alta produtividade. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 12, n. 3, p. 837-854, 2019. DOI: <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2019v12n3p837-854>.

PEIXOTO, C. P. **Curso de fisiologia vegetal**. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2020. v. 177, 218 p.

PENG, Z.; LIU, Y.; LI, Y.; ABAWI, Y.; WANG, Y.; MEN, M.; AN-VO, D. Responses of nitrogen utilization and apparent nitrogen loss to different control measures in the wheat and maize rotation system. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, article 160, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00160>.

SCUDELETTI, D. **Modos de inoculação de *Azospirillum brasilense* em cana-de-açúcar**. 2016. 54 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

SILVA, R. L. L.; SILVA, C. G. M.; MOREIRA, S. G.; GUTIÉRREZ, A. M. Marcha de absorção de nutrientes em cultivares de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 31., 2016, Bento Gonçalves, RS. **Resumos...** Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2016. p. 210-213.

ZEFFA, D. M.; PERINI, L. J.; SILVA, M. B.; SOUSA, N. V.; SCAPIM, C. A.; OLIVEIRA, A. L. M.; JÚNIOR, A. T. A.; GONÇALVES, L. S. A. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1-19, 2019.

Embrapa

Milho e Sorgo



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

