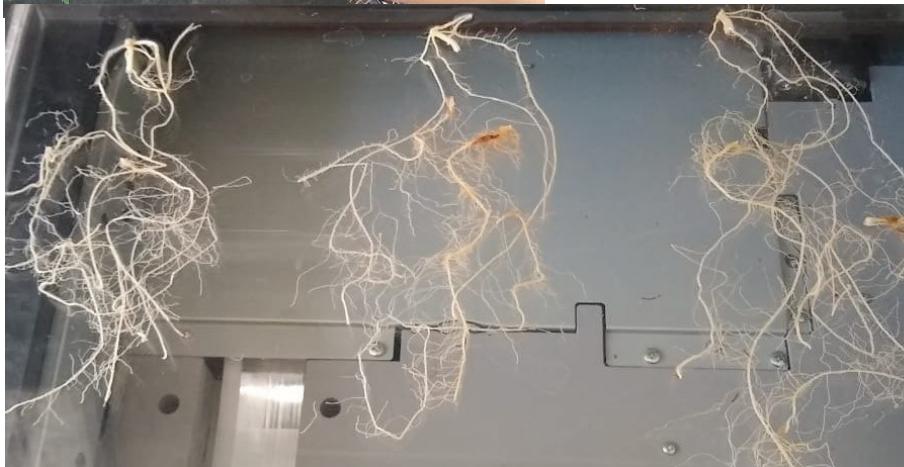


Interação Micorriza e Rizobactérias no Desenvolvimento Radicular e no Gradiente de Elongação da Folha de Milho



Irrigação das plântulas nos tubetes com água destilada (ao lado) e raízes das plântulas retiradas dos tubetes e lavadas para tomada de dados em equipamento (abaixo).



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

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
220**

**Interação Micorriza e Rizobactérias no
Desenvolvimento Radicular e no Gradiente
de Elongação da Folha de Milho**

Nayara Aparecida Miranda de Oliveira
Isabel Regina Prazeres de Souza
Mariana Amorim Almeida
Francisco Adriano de Souza
Ivanildo Evódio Marriel
Ubiraci Gomes de Paula Lana
Antônio Carlos de Oliveira
Camilo de Lelis Teixeira de Andrade

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2020*

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

Fotos da capa
Mariana Amorim Almeida

1^a edição
Publicação digital (2020)

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

Interação micorriza e rizobactérias no desenvolvimento radicular e no gradiente de elongação da folha de milho / Nayara Aparecida Miranda de Oliveira ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2020.

21 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 220).

1. Bactéria. 2. Fungo. 3. Raiz. 4. *Zea mays*. I. Oliveira, Nayara Aparecida Miranda de. II. Souza, Isabel Regina Prazeres de. III. Almeida, Mariana Amorim. IV. Souza, Francisco Adriano de. V. Marriel, Ivanildo Evódio. VI. Lana, Ubiraci Gomes de Paula. VII. Oliveira, Antônio Carlos de. VIII. Andrade, Camilo de Lelis Teixeira de. IX. Série.

CDD 571.82 (21. ed.)

Sumário

Resumo	05
Abstract	07
Introdução.....	08
Material e Métodos	09
Resultados e Discussão.....	12
Conclusão.....	18
Referências	19

Interação Micorriza e Rizobactérias no Desenvolvimento Radicular e no Gradiente de Elongação da Folha de Milho¹

Nayara Aparecida Miranda de Oliveira¹

Isabel Regina Prazeres de Souza²

Mariana Amorim Almeida³

Francisco Adriano de Souza⁴

Ivanildo Evódio Marriel⁵

Ubiraci Gomes de Paula Lana⁶

Antônio Carlos de Oliveira⁷

Camilo de Lelis Teixeira de Andrade⁸

Resumo – Os investimentos em pesquisas que possibilitam o uso de recursos biológicos na agricultura contribuem para uma produção mais sustentável e economicamente viável. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da interação entre espécies de rizobactérias do gênero *Bacillus* e fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Rhizoglomus clarum* CNPMS05 no gradiente de desenvolvimento da folha e na biomassa e morfologia da raiz de plântulas de milho (*Zea mays* L.). O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, em 2019. Foram analisados em plântulas de milho, com três folhas totalmente desenvolvidas, o comprimento e a largura de células epidermais na região do gradiente de desenvolvimento da folha, a largura da folha, os pesos seco e fresco e característica da morfologia radicular (área, comprimento, diâmetro e volume). O delineamento experimental foi em blocos casualizados com seis tratamentos e dois controles, com dez repetições cada. As análises estatísticas mostraram diferenças significativas entre os tratamentos empregando a micorriza e rizobactérias

¹ Graduanda em Engenharia Química UNIFEMM, Centro Universitário Monsenhor Messias, Sete Lagoas, MG

² Eng.-Agr., PhD. em Plant Science, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo;

³ Graduanda em Engenharia Química UNIFEMM, Centro Universitário Monsenhor Messias, Sete Lagoas, MG

⁴ Eng.-Agr., PhD. em Ecologia Molecular Microbiana, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo;

⁵ Eng.-Agr., DSc. em Solos e Nutrição de Plantas, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo;

⁶ Químico., DSc. em Genética, Analista da Embrapa Milho e Sorgo;

⁷ Eng.-Agr., DSc. em Estatística e Experimentação Agronômica, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo;

⁸ Eng.-Agr., PhD. em Engenharia de Irrigação, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo;

isoladamente ou em associação. Com relação aos valores dos dados radiculares de biomassa, eles não superaram o controle. Quanto aos dados de morfologia radicular, a maior área foi obtida no tratamento T2 (micorriza), 505 cm². Para as características de comprimento e volume, os tratamentos envolvendo as rizobactérias isoladamente ou em associação dessas tendem a apresentar os maiores valores. Relativamente à análise foliar, todos os tratamentos superaram o controle em relação ao comprimento final de célula, alcançando ou até mesmo superando o controle positivo (ácido giberélico). O comprimento da zona de elongação foliar apresentou incremento em dois dos seis tratamentos. Para as diferentes características avaliadas em plântulas de milho, aos 14 dias após plantio, os microrganismos empregados nesse estudo influenciaram mais a elongação celular da folha do que biomassa e morfologia de raiz.

Termos para indexação: *Bacillus* sp., fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Zea Mays* L., plântula, morfologia radicular, comprimento e largura de célula.

Interaction of mycorrhiza and rhizobacteria in root development and in the elongation gradient of maize leaf

Abstract – Investments in research that make possible the use of biological resources in agriculture contribute to a more sustainable and economically viable production. The present study aimed to evaluate the effect of the interaction of rhizobacteria species, genus *Bacillus*, and arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Rhizoglomus clarum* CNPMS05, on the leaf development gradient and on the biomass and root morphology of the maize seedlings (*Zea Mays L.*). The experiment was conducted in a greenhouse at Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, State of Minas Gerais, Brazil, in 2019. The maize seedlings with three expanded leaves were used to analyze the length and width of epidermal cells in the developmental gradient along the leaf, radicular dry and fresh weights and characteristic of root morphology (area, length, diameter and volume). The experimental design was in randomized blocks with six treatments and two controls, with ten repetitions each. Statistical analysis showed significant differences between treatments using mycorrhiza and rhizobacteria alone or in association. Regarding the biomass root data, they did not exceed the control. As for the root morphology data, the largest area was obtained with treatment T2 (mycorrhiza), 505 cm². For root length and volume, treatments involving rhizobacterias alone or in association tended to present the highest values. Regarding leaf analysis, all treatments exceeded the control in relation to the final epidermal cell length, reaching or even surpassing the positive control (gibberellic acid). The length of the leaf elongation zone increased in two of the six treatments. For the different characteristics evaluated in maize seedlings, at 14 days after planting, the microorganisms had more influence on leaf cell elongation than on root biomass and morphology.

Index terms: *Bacillus sp.*, Arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Zea mays L.*, seedling, root morphology, cell length and width.

Introdução

A necessidade da preservação dos recursos naturais manifesta a importância do investimento em pesquisas que façam da produção agrícola uma atividade sustentável. Paulo e Serra (2015) apontam que a demanda mundial por alimentos é alta, e os fertilizantes químicos são utilizados para que se produzam alimentos suficientes para supri-la. Entretanto eles são constituídos por nitratos e fosfatos, que ao serem usados nas plantações podem ser arrastados pela água da chuva para os rios ou se infiltrarem na terra, alcançando os lençóis freáticos (Paulo; Serra, 2015). Isso resulta, segundo os autores, em um fenômeno denominado eutrofização, no qual o excesso de nutrientes causa aumento de algas e plantas aquáticas, impedindo a passagem da luz solar, prejudicando o processo de fotossíntese, o que diminui a concentração de oxigênio na água. As bactérias aeróbicas presentes na água também consomem parte do oxigênio dissolvido, fazendo com que falte oxigênio para outras espécies, provocando sua morte (Paulo; Serra, 2015).

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) fazem parte de uma gama de microrganismos que são benéficos ao solo e podem auxiliar no desenvolvimento das plantas, porque podem colonizar o sistema radicular e suprir parte da demanda por nutrientes como nitrogênio, fósforo e ferro, além de produzir hormônios de crescimento ou eliminar patógenos do solo (Melo, 1998).

Dentre as RPCP encontra-se o gênero *Bacillus*, pertencente à família *Bacilliaceae*. Elas possuem forma de bastonete, são bactérias Gram-positivas, formam esporos, e podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas (Corrêa, 2009).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) estabelecem associações simbióticas mutualísticas com raízes da maioria das espécies de plantas (Wang; Qiu, 2006, Tawaraya 2003). Plantas em simbiose micorrízica apresentam, em geral, maior capacidade de aquisição de água e nutrientes (Tawaraya 2003). O micélio fúngico expande a área de solo explorada pelas raízes, ocorrendo maior obtenção de nutrientes em um volume de solo maior, o qual não seria alcançado sem as micorrizas (Souza et al., 2015; Berbara et al., 2006). As plantas, por sua vez, fornecem aos fungos compostos orgânicos (açúcares e lipídios) em troca de água e nutrientes (Bertolazi et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inoculação de rizobactérias do gênero *Bacillus* e FMA *Rhizoglomus clarum* no desenvolvimento radicular e foliar de plântulas de milho (*Zea mays* L.).

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo, por um período de quatorze dias, em condições de casa de vegetação, com sistema de controle de temperatura e umidade, em que as médias de temperatura e umidade relativa foram 31 °C e 42,5%, respectivamente. As unidades experimentais utilizadas foram tubetes contendo 250 g de solo de cerrado devidamente autoclavado. Foi utilizado o híbrido simples de milho DKB 345 PRO e oito tratamentos (Tabela 1). No plantio foram utilizadas duas sementes por tubete, que foram implantadas verticalmente em covetas de 3 cm de profundidade.

O inoculante micorrízico foi produzido em cultivo monoxênico asséptico com a estirpe *Rhizoglomus clarum* CNPMS05, segundo metodologia descrita por Souza e Berbara (1999).

As rizobactérias empregadas são do gênero *Bacillus* e pertencem à coleção da Embrapa Milho e Sorgo, com as seguintes identificações: rizobactéria 1 (*Bacillus* sp) e rizobactéria 2 (*Bacillus* sp., PSI06). A inoculação com as rizobactérias foi efetuada através da aplicação de 0,5 mL de suspensão de células contendo 10⁸ UFC/ ml (unidades formadoras de colônias) sobre as sementes, em cada tubete. O tratamento T5 (associação das duas rizobactérias) recebeu na coveta 0,5 mL de solução com a rizobactéria 1 e 0,5 mL de solução com a rizobactéria 2.

Nos tratamentos T₃ e T₄, o fungo micorrízico arbuscular (FMA *Rhizoglomus clarum* CNPMS05) foi adicionado no fundo das covetas, em seguida foram colocadas as sementes, e por último foi colocada a solução contendo a rizobactéria.

O controle não recebeu inoculação alguma, servindo como testemunha do crescimento natural da plântula. Em razão de promover aumento no comprimento da zona de elongação da folha de milho, por meio do aumento no comprimento da célula com concomitante redução na largura (Souza; MacAdam, 2001), o ácido giberélico, hormônio vegetal estimulador do crescimento e de-

senvolvimento da planta, que atua juntamente com fatores ambientais como a luz, a temperatura e a água, foi utilizado como controle positivo (Gupta; Chakrabarty, 2013). Em nosso estudo, o ácido giberélico foi utilizado como controle positivo em relação a dados foliares, por causar aumento no comprimento da zona de elongação foliar, uma vez que promove fortemente o crescimento da parte aérea com pouco efeito no alongamento da raiz (Tanimoto, 1990).

Tabela 1. Identificação dos tratamentos

Identificação	Tratamento
T ₁	Controle (sem inoculação)
T ₂	Fungo micorrízico arbuscular (FMA)
T ₃	FMA + Rizobactéria 2
T ₄	FMA + Rizobactéria 1
T ₅	Rizobactéria 1 + Rizobactéria 2
T ₆	Rizobactéria 2
T ₇	Rizobactéria 1
T ₈	Ácido giberélico (sem inoculação)

A irrigação foi feita empregando uma abordagem prática e simples. A primeira irrigação ocorreu imediatamente antes do plantio, aplicando-se água ultrapura, em pequenas quantidades, até que as primeiras gotas drenassem pela base dos tubetes. Dessa forma, assumiu-se que a umidade do solo dentro dos tubetes se encontrava na capacidade de campo. As irrigações foram então realizadas diariamente, empregando o mesmo critério, ou seja, elevar o solo à capacidade de campo, aplicando-se água lentamente.

No segundo dia, o tratamento T₈ recebeu a solução de ácido giberélico na concentração de $3,6 \times 10^{-5}$ M (Souza; MacAdam, 2001). O tratamento T₈ recebeu essa solução no segundo, sexto e décimo dia, com mesmo volume de irrigação do restante dos tratamentos; nos outros dias, ele recebeu água ultrapura como os demais.

No terceiro dia cada tubete recebeu 20 mL de solução nutritiva (Magnavaca et al., 1987), sendo a concentração de P reduzida para 25% da concentração original.

Os tubetes foram dispostos em mesa própria sob o delineamento de blocos casualizados. Essa mesa era rotacionada diariamente, visando garantir que todos os tratamentos recebessem as mesmas condições de luminosidade dentro da casa de vegetação.

O experimento foi colhido no décimo quarto dia após plantio, sendo cada plântula cortada bem rente ao solo quando apresentava três folhas totalmente desenvolvidas. Na colheita, folhas e raízes foram preparadas para as análises posteriores.

As folhas foram retiradas uma a uma, de fora para dentro, e a folha interna, quarta folha, foi utilizada para as análises e tomada dos dados. Da folha de interesse cortou-se um fragmento de 11 cm a partir da base, tendo a lígula como referência, o qual foi mantido em álcool etílico 96 °GL e a 4 °C por 24 h para remoção dos pigmentos. Após as 24 h trocou-se a solução de álcool etílico que permaneceu até o preparo da folha para análise microscópica (Sprangers et al., 2016). As raízes foram retiradas dos tubetes, lavadas em água corrente e conservadas em etanol 96%.

As medições de comprimento e largura de células epidermais da folha, parte abaxial, foram realizadas em microscópio ótico, marca Olympus BX60, nas magnificações de 200x ou 400x, dependendo do comprimento da célula. Os fragmentos de folha foram montados em lâmina, adicionados de glicerina a 30%, cobertos com lamínula, a qual foi selada com esmalte. O procedimento foi realizado em cinco repetições de cada tratamento, iniciando-se na base da folha, tendo como referência a lígula, a medição do comprimento e largura das células, perfazendo o total de 6 cm. As medições foram realizadas nas células das fileiras adjacentes à fileira de células estomatais, de forma a selecionar consistentemente o mesmo tipo de célula, conforme descrito por Sprangers et al. (2016). Essa mesma folha foi a utilizada para a medição da característica largura de folha, a qual foi tomada na parte mediana.

A análise morfológica das raízes foi feita através do sistema WinRhizo (WinRhizo, 2019), acoplado a um aparelho de aquisição de imagem (Scanner - Epson Expression 10000 XL, Epson America, Inc., USA), sendo determinados a área superficial, o comprimento, o volume e o diâmetro.

Foram realizadas também análises da biomassa das raízes, pesos fresco e seco, das plântulas. Para determinação do peso fresco, as raízes foram

retiradas do álcool e transferidas para tubos com água ultrapura, na qual permaneceram de um dia para o outro. No dia seguinte, as raízes foram secas em papel toalha, e o peso fresco foi obtido por meio de pesagem em balança analítica. As raízes foram armazenadas em envelopes de papel, e o peso seco foi obtido após secagem em estufa a 80 °C por três dias.

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados com os oito tratamentos. Inicialmente foram consideradas 10 plantas como repetições para cada tratamento, mas em razão da ocorrência de valores atípicos, algumas repetições foram excluídas com uso do método de Grubbs (GraphPad Software, 2020). Foram analisadas as seguintes variáveis: pesos fresco e seco das raízes, largura da folha, e os dados de morfologia obtidos por meio do WinRhizo. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste LSD, a 5% de probabilidade. As análises foram executadas utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2011).

Resultados e Discussão

Para a característica largura da folha (Tabela 2) houve diferença significativa entre os tratamentos, e no teste de médias o tratamento T₂ (micorriza) apresentou o menor valor para largura de folha de plântulas, 1,16 cm, sendo que os demais tratamentos não diferiram entre si. Em estudos com *Glomus tortuosum* em milho, Xu et al. (2016) mencionam que a largura da folha aumentou consideravelmente. Entretanto, os dados foram obtidos de plantas de milho de sete semanas, e em nosso estudo eram de duas semanas. Provavelmente, esse menor período de tempo não foi suficiente para se verificar alteração nessa característica. Estudos envolvendo largura foliar são importantes, uma vez que Guimarães et al. (2002) verificaram que, em alguns híbridos de milho, a área foliar de folhas avulsas correspondia a $\frac{3}{4}$ do produto entre a largura máxima da folha e seu comprimento. Além disso, equações matemáticas que correlacionam comprimento e largura de folhas com a área real servem como estimadores eficientes do desenvolvimento foliar das plantas de milho (Mondo et al., 2009).

Tabela 2. Largura foliar em resposta à inoculação com rizobactérias (*Bacillus* sp) e FMA *Rhizoglomus clarum*.

Tratamentos	Largura da folha (cm)
T ₁	1,64 a ₂
T ₂	1,16 a ₁
T ₃	1,72 a ₂
T ₄	1,58 a ₂
T ₅	1,72 a ₂
T ₆	1,58 a ₂
T ₇	1,64 a ₂
T ₈	1,50 a ₁ a ₂
CV%	20,57

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade. A identificação dos tratamentos está descrita na Tabela 1.

CV% - Coeficiente de variação

A Anova (dados não mostrados) apresentou diferença significativa para peso fresco de raiz, e pelo teste de médias verifica-se que os tratamentos T₂ (micorriza), T₄ (micorriza + rizobactéria1) foram os que apresentaram significativamente os menores valores, respectivamente, 0,22 g e 0,28 g (Tabela 3). Diferença significativa foi também apresentada para peso seco, e por meio do teste de médias verifica-se que os tratamentos T₂ (micorriza), T₃ (micorriza + rizobactéria 2), T₄ (micorriza + rizobactéria 1) apresentaram os menores valores, respectivamente, 0,033g, 0,037g e 0,030g. Entretanto as rizobactérias quando utilizadas isoladamente, ou em associação, tratamentos T₅, T₆ e T₇, tenderam a apresentar valores mais elevados, sendo a maior média de 0,052g, tratamento T₇ (rizobactéria 1). Nos tratamentos onde se empregou a micorriza, os pesos seco e fresco apresentaram valores menores. Trabalhos com milho avaliando biomassa de raiz em tratamento com micorriza, e que apresentaram aumentos, foram conduzidos por sete ou mais semanas (Salgado et al., 2017), período de tempo muito superior ao empregado nesse trabalho, que foi de 2 semanas. Possivelmente, esse período não foi suficiente para se verificar considerável aumento nos pesos fresco e seco de raiz, principalmente nos tratamentos envolvendo micorriza, cujos valores foram inferiores ao controle.

A Anova (dados não mostrados) apresentou diferenças significativas para as características de raiz avaliadas por meio do WinRhizo: área, comprimen-

to, diâmetro e volume de raiz (Tabela 3). O teste de médias mostra que, em relação à área de raiz, o tratamento T_2 (micorriza) apresentou o maior valor, 505 cm², sendo superior ao controle. Entretanto, não diferindo de T_3 (micorriza+rizobactéria 2), T_5 (rizobacteria1+rizobacteria2) e T_7 (rizobactéria 1), cujos valores variaram, respectivamente, 455, 423 e 431 cm². Contudo, o menor valor foi apresentado por T_4 (micorriza + rizobactéria 1), 340 cm². Verifica-se que os valores isolados da micorriza (T_2) e da rizobactéria 1 (T_7) foram superiores em relação ao valor destes tratamentos utilizando-as conjuntamente (T_4). Quanto ao diâmetro, os tratamentos T_5 (rizobactéria 1+ rizobactéria 2) e T_8 (ácido giberélico) apresentaram os menores valores, 0,378 mm e 0,365 mm, sendo que os demais não diferiram do controle não inoculado. O desenvolvimento da área radicular está ligado diretamente com a eficiência da planta na aquisição de nutrientes e água do solo (Souza et al., 2018), sendo as raízes finas sobretudo importantes na ciclagem da água, nutrientes e carbono.

Importante verificar na Tabela 3 que tanto para as rizobactérias isoladamente quanto para a associação de ambas, os valores de comprimento e volume de raiz tenderam a ser maiores. Os valores médios observados de comprimento e volume de raiz foram, respectivamente, 764 cm e 0,879 cm³ para T_5 , 713 cm e 0,904 cm³ para T_6 e 758 cm e 0,952 cm³ para T_7 . Souza et al. (2018), utilizando rizobactéria do gênero *Bacillus* em milho em condições hidropônicas, verificaram aumento da área de superfície radicular. Similarmente, Velloso (2019), empregando *Bacillus thuringienses* B116 e *B. megaterium* B119, verificou aumento da área de raízes grossas, em genótipos de milho, contudo em condição de estresse hídrico.

Tabela 3. Biomassa e parâmetros radiculares avaliados em plântulas de milho em resposta à inoculação com rizobactérias do gênero *Bacillus* e o fungo *MA Rhizoglomus clarum* CNPM505.

Tratamentos	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Área (cm ²)	Comprimento (cm)	Diâmetro (mm)	Volume (cm ³)
T ₁	0,60	a ₃	0,043	a ₂ a ₃	426	624
T ₂	0,22	a ₁	0,033	a ₁ a ₂	505	a ₃
T ₃	0,55	a ₃	0,037	a ₁ a ₂	455	a ₁ a ₂
T ₄	0,28	a ₁ a ₂	0,030	a ₁	340	a ₁
T ₅	0,50	a ₂ a ₃	0,044	a ₂ a ₃	423	a ₂ a ₃
T ₆	0,44	a ₁ a ₂ a ₃	0,043	a ₂ a ₃	426	a ₂ a ₃
T ₇	0,54	a ₃	0,052	a ₃	431	a ₂ a ₃
T ₈	0,46	a ₂ a ₃	0,036	a ₁ a ₂	385	a ₁ a ₂
CV%	45,44	26,94	16,76	30,65	4,19	30,46

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade. A identificação dos tratamentos está descrita na Tabela 1.

CV% - Coeficiente de variação.

Avaliar o efeito dos microrganismos no comprimento da zona de elongação foliar é extremamente importante, uma vez que o crescimento é governado pela elongação celular e taxa de divisão celular (Sprangers et al., 2016). Os gráficos de comprimento (Figura 1) das células epidermais ao longo da região de desenvolvimento foliar foram elaborados empregando o programa tablecurve-2D (Systat Software Inc., San Jose, Califórnia). A curva gerada por esse programa, e que melhor se ajustou aos dados biológicos, facilitando identificar a região de cessamento da elongação celular foi Eq 8189 EMGCum (a, b, c, d, e). Verifica-se no cabeçalho dos gráficos da Figura 1 que os coeficientes de determinação (r^2) apresentaram valores elevados, variando de 0,57 a 0,82.

Em relação à média da largura e comprimento das células epidermais ao final da zona de elongação foliar (dados não mostrados), os resultados foram, respectivamente: T_1 -controle não inoculado (29 e 157 μm), T_2 -micorriza (29 e 200 μm), T_3 -micorriza + rizobactéria 2 (28 e 192 μm), T_4 -micorriza + rizobactéria 1 (32 e 186 μm), T_5 -rizobactéria 1 + rizobactéria 2 (34 e 204 μm), T_6 -rizobactéria 2 (31 e 202 μm), T_7 -rizobactéria 1 (26 e 197 μm) e T_8 -ácido giberélico, controle positivo (23 e 188 μm). Verifica-se que todos os tratamentos superaram o controle em relação ao comprimento final de célula, alcançando o controle positivo (ácido giberélico). Em plântulas de milho, cultivadas em solo com ácido giberélico, Souza e MacAdam (2001) verificaram aumento no comprimento e na redução na largura de células epidermais na zona de elongação celular. O mesmo foi obtido nesse trabalho, em que o tratamento com ácido giberélico (T_8) foi utilizado como controle positivo por aumentar o comprimento da célula, permitindo demonstrar que os microrganismos empregados nesse estudo superaram o controle.

Na Figura 1, considerando o ponto de inflexão, a partir do qual a curva não mais apresenta crescimento (seta vermelha), os valores do comprimento da zona de elongação celular nos diferentes tratamentos foram, aproximadamente, T_1 -controle (2,60 cm), T_2 -micorriza (2,80 cm), T_3 -micorriza + rizobactéria 2 (2,60 cm), T_4 -micorriza + rizobactéria 1 (3,50 cm), T_5 -rizobactéria 1 + rizobactéria 2 (4,50 cm), T_6 -rizobactéria 2 (2,60 cm), T_7 -rizobactéria 1 (2,60 cm) e T_8 -ácido giberélico, controle positivo (4,20 cm). Em relação ao controle, os tratamentos T_4 (micorriza + rizobactéria 1) e T_5 (rizobactéria 1 + rizobactéria 2) foram os que se destacaram, sendo que a associação das duas rizobactérias,

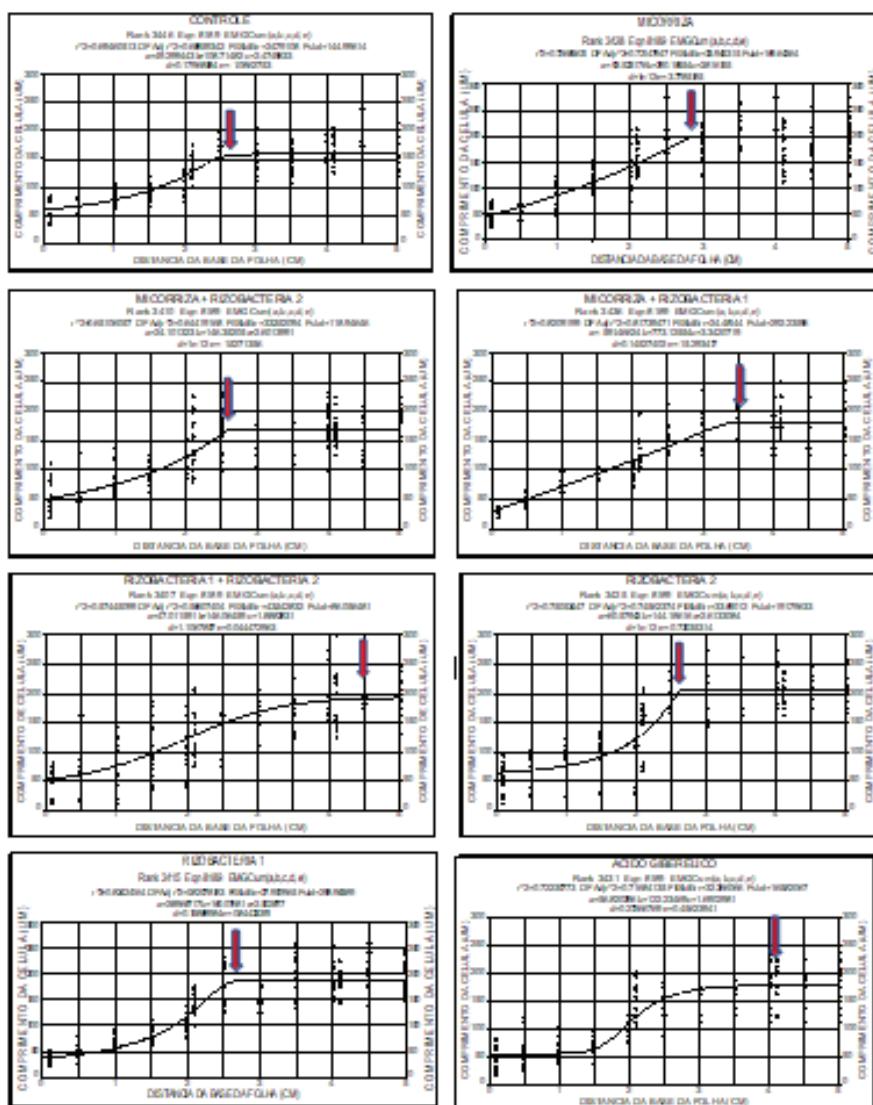


Figura 1. Gráficos de distância da base da folha, tendo a lígula como referência x comprimento da célula em resposta a inoculação com rizobactérias do gênero *Bacillus* e com FMA Rhizoglomus clarum CNPMS05. Seta vermelha indica o ponto de inflexão na curva de crescimento, a partir do qual não se tem mais crescimento no sentido do comprimento da célula.

T_5 , foi superior ao controle positivo (Figura 1). Em milho e arroz, Ahmad et al. (2017) obtiveram aumento no comprimento da parte aérea e de raiz no tratamento com *B. subtilis* estirpe 330-2. Crescimento no sentido da expansão e características relacionadas a este, como comprimento final, área ou volume de diferentes órgãos, determinam importantes funções da planta como a interceptação de luz e transpiração por meio da área foliar e extração de água via comprimento de raiz (Dignat et al., 2013).

Para determinadas características, principalmente na zona do gradiente de desenvolvimento foliar, os microrganismos empregados nesse estudo foram capazes de influenciar a elongação celular.

Conclusões

Nesse estudo, com plântulas de milho, verificou-se que a inoculação com micorriza foi capaz de aumentar a área de raiz, e a inoculação com as rizobactérias, isoladamente ou em associação, tendeu a apresentar maiores valores para comprimento e volume de raiz. Em relação à biomassa de raiz, pesos seco e fresco foram menores nos tratamentos envolvendo micorriza. Este resultado se deve, provavelmente, ao fato de que o período de 14 dias após plantio, para colheita do experimento, não tenha sido suficiente para permitir às plântulas expressarem efeito da micorriza nessa característica.

Relativamente à média do comprimento das células epidermais ao final da zona de elongação foliar, verificou-se que todos os tratamentos foram superiores ao controle, alcançando o controle positivo (ácido giberélico), permitindo demonstrar incremento nessa característica em razão dos microrganismos empregados nesse estudo. E os tratamentos, T_4 (micorriza + rizobactéria 1) e T_5 (rizobactéria 1 + rizobactéria 2) apresentaram aumento no comprimento da zona de elongação foliar, em relação ao controle, sendo que o T_5 superou o controle positivo.

Referências

- AHMAD, Z.; WU, J.; CHEN, L.; DONG, W. Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. **Scientific Reports**, v. 7, article 1777, 2017.
- BERBARA, R. L. L.; SOUSA, F. A. de; FONSECA, H. M. A. C. Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p. 53-88.
- BERTOLAZI, A. A.; CANTON, G. C.; AZEVEDO, I. G.; CRUZ, Z. M. A.; SOARES, J. M.; SANTOS, W. O.; RAMOS, A. C. O papel das ectomicorrizas na biorremediação de metais pesados no solo. **Natureza on line**. v. 8, n. 1, p. 24-31, 2010.
- CORRÊA, A. P. F. **Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus* sp. P7**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- DIGNAT, G.; WELCKER, C.; SAWKINS, M.; RIBAUT, J. M.; TARDIEU, F. The growths of leaves, shoots, roots and reproductive organs partly share their genetic control in maize plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, n. 6, p. 1105-1119, 2013.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GRAPHPAD SOFTWARE. **QuickCalcs**. Disponível em: <<https://www.gra-ppad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>>. Acesso em: 30 set. 2020.
- GUIMARÃES, D. P.; SANS, L. M. A.; MORAES, A. V. C. Estimativa da área foliar de cultivares de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24., 2002, Florianópolis. **Resumos...** Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo: Embrapa Milho e Sorgo; Florianópolis: Epagri, 2002. p. 96.

GUPTA, R.; CHAKRABARTY, S. K. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 9, e25504, 2013. Disponível em:

<<https://translate.google.com/translate?hl=ptBR&sl=en&u=https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4002599/&prev=search>>. Acesso em: 25 fev. 2020.

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O.; CLARCK, R. B. Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 201-212.

MELO, I. S. de. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 87-116.

MONDO, V. H. V.; CARVALHO, S. J. P.; LABONIA, V. D. S.; DOURADO NETO, D.; CICERO, S. M. Comparação de métodos para estimativa de área foliar em plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 8, n. 3, p. 233-246, 2009.

PAULO, L. R.; SERRA, V. C. J. Estudo de caso envolvendo uma indústria de fertilizantes na cidade de porto Nacional/TO. **Sistema e Gestão**, v. 10, n. 2, p. 316-323, 2015. Disponível em: <<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:F0TVzZzpn3oJ:cientifica.org.br/index.php/cientifica/article/download/117/83+&cd=3&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>>. Acesso em: 16 jul. 2020.

Salgado, F. H. M.; MOREIRA, F. M. S.; Siqueira, J. O.; Barbosa, R. H.; Paulino, H. B.; Carneiro, M. A. C. Arbuscular mycorrhizal fungi and colonization stimulant in cotton and maize. **Ciência Rural**, v. 47, n. 6, e20151535, 2017.

SOUZA, S. M. de; OLIVEIRA, C. A.; ANDRADE, D. L.; CARVALHO, C. G. de; RIBEIRO, V. P.; PASTINA, M. M.; MARRIEL, I. E.; LANA, U. G. de P.; GOMES, E. A. **Cepas de *Bacillus* e *Azospirillum* aumentam o crescimento e a absorção de nutrientes em milho em condições hidropônicas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 31 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 184).

SOUZA F. A. de; BERBARA, R. L. L. Ontogeny of Glomus clarum in Ri T-DNA transformed roots. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 343-350, 1999.

SOUZA, M. de P.; BARBOSA, P. H.; SALGADO, F. H. M.; CARNEIRO, M. A. C. Fungos micorrízicos arbusculares e estimulantes da micorrização na cultura do milho e do algodão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 35., 2015, Natal. **O solo e suas múltiplas funções:** anais. Natal: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2015.

SOUZA, I. R. P. de; MACADAM, J. W. Gibberellic acid and dwarfism effects on the growth dynamics of B73 maize (*Zea mays* L.) leaf blades: a transient increase in apoplastic peroxidase activity precedes cessation of cell elongation. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 52, n. 361, p. 1673-1682, 2001.

Sprangers, K.; Avramova, V.; Beemster, G. T. Kinematic analysis of cell division and expansion: quantifying the cellular basis of growth and sampling developmental zones in *Zea mays* leaves. **Journal of Visualized Experiments**, v. 118, e54887, 2016.

TANIMOTO, E. Gibberelin requirement for the normal growth of roots. In: TAKAHASHI, N.; PHINNEY, B. O.; MACMILLAN, J. (Ed.). **Gibberelins**. New York: Springer-Verlag, 1990. p. 229-240.

TAWARAYA, K. Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 49, n. 5, p. 665-668, 2003.

VELLOSO, V. C. C. **Caracterização de cepas de *Bacillus* e avaliação do seu potencial de promoção de crescimento em genótipos de milho**. 2019. 127 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2019.

WANG, B.; QIU, Y. L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**, v. 16, p. 299-363, 2006.

WINRHIZO. **Análise de imagem para ciência de plantas**. Chemin Sainte-Foy: Instruments Regent, 2019. Disponível em:

<https://translate.google.com/translate?hl=ptBR&sl=en&u=https://regent.qc.ca/assets/winrhizo_software.html&prev=search>. Acesso em: 25 fev. 2020.

XU, H.; LU, Y.; ZHU, X. Effects of arbuscular mycorrhiza on osmotic adjustment and photosynthetic physiology of maize seedlings in black soils region of northeast China. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, e160392, 2016.

Embrapa
Milho e Sorgo