



CAROLINE OLIVEIRA DOS REIS

**ANÁLISE DA INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DE
Bacillus spp. EM MILHO SOB DÉFICIT HÍDRICO**

**LAVRAS-MG
2022**

CAROLINE OLIVEIRA DOS REIS

**ANÁLISE DA INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DE *Bacillus spp.* EM
MILHO SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutora.

PhD. Paulo César Magalhães
Orientador

**LAVRAS-MG
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

dos Reis, Caroline Oliveira.

Análise da inoculação de *Azospirillum brasilense* e
de *Bacillus* spp. em milho sob déficit hídrico / Caroline Oliveira dos
Reis. - 2022.

63 p.

Orientador(a): Paulo César Magalhães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Rizobactérias. 2. Déficit hídrico. 3. Milho. I. Magalhães,
Paulo César. II. Título.

CAROLINE OLIVEIRA DOS REIS

**ANÁLISE DA INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DE *Bacillus spp.* EM
MILHO SOB DÉFICIT HÍDRICO
INOCULATION ANALYSIS OF *Azospirillum brasilense* AND *Bacillus spp.* IN MAIZE
UNDER WATER DEFICIT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 15 de junho de 2022.
Dra. Marinês Ferreira Pires Lira UFLA
Dra. Isabel Regina Prazeres de Souza EMBRAPA
Dr. Adriano Bortolotti da Silva UNIFENAS
Dr. Thiago Corrêa de Souza UNIFAL

PhD. Paulo César Magalhães
Orientador

**LAVRAS-MG
2022**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Salvador e Solange por todos os ensinamentos, pela dedicação a minha educação, e principalmente por toda a fé que sempre tiveram na minha capacidade.

Ao meu noivo Vitor, meu grande amor, por todo o carinho, companheirismo, amparo e inspiração. Você foi essencial nesta conquista!

Ao meu orientador Dr. Paulo César que além do seu papel acadêmico, sempre desenvolveu o papel de um grande mestre, aconselhando, oferecendo sua sabedoria, puxando a orelha quando necessário e acalentando nas horas difíceis. Gratidão!

A todos os demais Doutores que estiveram presentes em alguma etapa no longo caminho da conquista deste título. Dr. Adriano Bortolotti, por ter sido meu primeiro orientador, me introduzindo ao mundo da pesquisa. Dr. Thiago, por ter me acolhido no mestrado e por todos os conhecimentos transmitidos. Dra. Isabel, pela parceria nos experimentos desta pesquisa.

Aos meus amigos Lorena, Roniel, Daniele, Éder e Carlos, pela parceria e ensinamentos durante todo o período que trabalhamos juntos na Embrapa.

Aos meus amigos de Lavras Antônio e Carlos por terem me acolhido em sua casa. Vivemos momentos memoráveis. Muitas saudades!

Ao meu amigo Gilberto por seus trabalhos excepcionais nos experimentos. Você foi essencial para a realização desta pesquisa!

A Embrapa Milho e Sorgo por possibilitar o desenvolvimento dos ensaios de pesquisa em suas dependências.

Aos funcionários da Embrapa Milho e Sorgo. Obrigada pela recepção!

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada.

A Universidade Federal de Lavras – Ufla.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma fizeram parte desta caminhada, seja na forma de educador e incentivador ou até mesmo torcedor.

Muito Obrigada!

“A ciência mais útil é aquela cujo fruto é o mais comunicável.”

(Leonardo Da Vinci)

RESUMO GERAL

A seca afeta severamente a produtividade das plantas e reduz a viabilidade econômica da agricultura. Os recursos hídricos limitados e o alto custo da irrigação são fatores importantes que forçam agricultores a reduzir a irrigação, exigindo estratégias de gestão que minimizem os custos, sem, contudo, sacrificar o desempenho da cultura. Neste contexto, a técnica de irrigação subótima se torna uma alternativa interessante. Do mesmo modo, o uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) pode ter um papel promissor no enfrentamento dos efeitos deletérios da baixa disponibilidade de água. Frente ao exposto, estirpes homólogas de *Azospirillum brasilense* e de *Bacillus* spp foram inoculadas em sementes de milho híbrido e dois ensaios foram conduzidos. O primeiro ensaio, realizado em casa de vegetação, teve por objetivo avaliar os efeitos da inoculação e da coinoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* e da mistura de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* spp no desenvolvimento radicular, nas respostas fisiológicas e no desempenho produtivo de híbridos de milho com características contrastantes a seca (DKB390 e P30F53), e expostos a dois regimes hídricos (Capacidade de Campo e Déficit Hídrico). O segundo ensaio foi desenvolvido em campo, com o objetivo de avaliar os efeitos potenciais da inoculação e da coinoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* e de *Bacillus* spp. no desenvolvimento e desempenho produtivo de milho híbrido DKB390 submetido à diferentes gradientes de irrigação. As plantas foram expostas à três regimes hídricos: irrigação plena, déficit hídrico moderado e déficit severo. Os resultados observados no experimento em casa de vegetação mostraram que os inoculantes promoveram efeitos benéficos para ambos os genótipos de milho expostos a condição de déficit hídrico, com consequente aumento na produção de grãos. A rizobactéria *Azospirillum brasilense* promoveu aumento de todas as características radiculares analisadas no híbrido DKB390. A coinoculação com *Azospirillum* + *Bacillus*, foi responsável por promover maiores médias em todos os parâmetros avaliados para o híbrido P30F53. Na relação Fv/Fm houve inibição do fotossistema II apenas em plantas expostas ao déficit hídrico após sete dias de estresse, contudo o inoculante *Azospirillum brasilense* proporcionou maiores valores tanto para o DKB390, quanto para o P30F53. Diferentes materiais genéticos, com comportamentos divergentes à seca, se comportam de forma diferente em relação à associação planta – bactéria. No segundo ensaio as análises apontaram que as RPCPs interferiram na regulação das enzimas antioxidantes analisadas, atenuando o dano oxidativo em plantas sob déficit hídrico. O tratamento *Azospirillum* + *Bacillus* atuou no desenvolvimento do sistema radicular, gerando incremento no número de raízes e na formação de raízes mais longas, profundas e finas. Os tratamentos *Azospirillum brasilense* e a combinação *Azospirillum*+*Bacillus*, promoveram maior massa de espigas e massa de grãos em comparação aos demais tratamentos, em plantas expostas à déficit hídrico severo.

Palavras-chave: *Zea mays* L. *Azospirillum brasilense*. *Bacillus* spp. Déficit hídrico. Sistema de irrigação por aspersão Line-source. Coinoculação.

GENERAL ABSTRACT

Drought severely affects plant productivity and reduces the economic viability of agriculture. Limited water resources and the high cost of irrigation are important factors that force farmers to reduce irrigation, requiring management strategies that minimize costs, without, however, sacrificing crop performance. In this context, the suboptimal irrigation technique becomes an interesting alternative. Likewise, the use of plant growth-promoting rhizobacteria (RPCP) may have a promising role in coping with the deleterious effects of low water availability. In view of the above, homologous strains of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus* spp were inoculated in hybrid maize seeds and two assays were conducted. The first experiment, carried out in a greenhouse, aimed to evaluate the effects of inoculation and co-inoculation of strains of *Azospirillum brasilense* and the mixture of *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* spp on root development, physiological responses and productive performance of corn hybrids with contrasting drought characteristics (DKB390 and P30F53), and exposed to two water regimes (Field Capacity and Water Deficit). The second trial was carried out in the field, with the objective of evaluating the potential effects of inoculation and co-inoculation of strains of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus* spp. on the development and productive performance of DKB390 hybrid maize submitted to different irrigation gradients. The plants were exposed to three water regimes: full irrigation, moderate water deficit and severe water deficit. The results observed in the greenhouse experiment showed that the inoculants promoted beneficial effects for both maize genotypes exposed to water deficit conditions, with a consequent increase in grain yield. The rhizobacterium *Azospirillum brasilense* promoted an increase in all root characteristics analyzed in the hybrid DKB390. Co-inoculation with *Azospirillum* + *Bacillus* was responsible for promoting higher averages in all parameters evaluated for the hybrid P30F53. In the Fv/Fm ratio there was inhibition of photosystem II only in plants exposed to water deficit after seven days of stress, however the inoculant *Azospirillum brasilense* provided higher values for both DKB390 and P30F53. Different genetic materials, with divergent behaviors to drought, behave differently in relation to the plant-bacteria association. In the second assay, the analyzes showed that the RPCP interfered in the regulation of the analyzed antioxidant enzymes, attenuating the oxidative damage in plants under water deficit. The *Azospirillum* + *Bacillus* treatment acted on the development of the root system, generating an increase in the number of roots and the formation of longer, deeper and thinner roots. The treatments *Azospirillum brasilense* and the combination *Azospirillum* + *Bacillus*, promoted greater mass of ears and mass of grains in comparison to the other treatments, in plants exposed to severe water deficit.

Keywords: *Zea mays* L. *Azospirillum brasilense*. *Bacillus* spp. Water deficit. Line-source sprinkler irrigation system. Co-inoculation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 CULTURA DO MILHO	11
2.2 DÉFICIT HÍDRICO E ESTRATÉGIAS DE RESISTÊNCIA DAS PLANTAS	12
2.3 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS	14
2.4 PROMOÇÃO E PROTEÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL POR RPCPs EM CONDIÇÕES DE SECA	15
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	18
4 REFERÊNCIAS	19
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	26
ARTIGO 1	26
1 INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
3 RESULTADOS	30
4 DISCUSSÃO	36
5 CONCLUSÃO	38
AGRADECIMENTOS	38
REFERÊNCIAS	39
ARTIGO 2	43
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 INOCULANTES	45
2.2 CONDIÇÕES AMBIENTAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	46
2.3 ANÁLISES	47
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
3 RESULTADOS	49
3.1 CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA RADICULAR E CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES NA PLANTA	49
3.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	51
3.3 COMPONENTES PRODUTIVOS	52
4 DISCUSSÃO	53
5 CONCLUSÃO	56
AGRADECIMENTOS	57
REFERÊNCIAS	58

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO GERAL

As práticas agrícolas modernas aumentaram drasticamente o rendimento das culturas nos últimos 50 anos, principalmente resultantes da aplicação intensiva de fertilizantes, do aumento de áreas irrigadas e do desenvolvimento de híbridos. Em contrapartida, condições ambientais estressantes estão se tornando cada vez mais limitantes para a produtividade em sistemas agrícolas, impedindo que as plantas expressem todo o seu potencial genético de rendimento. Dentre os fatores de estresse, o déficit hídrico é uma das principais ocorrências e afeta negativamente o desenvolvimento das lavouras.

A falta de água induz várias mudanças morfológicas, fisiológicas e químicas em plantas. Em geral, o déficit hídrico reduz a absorção de água e nutrientes nos sistemas radiculares, provoca enrolamento foliar e diminuição da taxa de fotossíntese e de condutância estomática, limita ainda a translocação de fotoassimilados, resultando em menor taxa de crescimento e redução da biomassa seca, representando, em última análise, uma ameaça à segurança alimentar (CARVALHO et al., 2021).

A cultura do milho (*Zea mays* L.) é um dos sistemas agrícolas mais importantes e extensivos do mundo por causa da miríade de produtos derivados desta planta. O milho é particularmente sensível à falta de água e outros estresses ambientais em torno da floração. Esta alta sensibilidade ao estresse hídrico significa que sob condições limitadas de disponibilidade de água, é difícil implementar estratégias de manejo de irrigação sem incorrer em importantes perdas de rendimento. Daryanto et al. (2016) observaram uma redução média de 39% no rendimento de milho submetido a seca, entre os anos de 1980 e 2015. No entanto, os híbridos de milho podem responder de forma distinta a diferentes regimes hídricos.

Os microrganismos componentes do ecossistema do solo desempenham um papel importante na regulação da fertilidade, na ciclagem de nutrientes e na manutenção da diversidade de plantas, alterando sua susceptibilidade a doenças e a estresses abióticos. Os mais bem estudados microrganismos associados a plantas incluem os fungos micorrízicos, as bactérias fixadoras de nitrogênio e as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs); estas últimas representam uma ampla gama de bactérias colonizadoras de raízes, capazes de produzir diversas enzimas e metabólitos que ajudam as plantas a tolerar estresses como a seca.

A utilização de RPCPs tem sido uma estratégia atraente e sustentável no aumento da produção sob déficit hídrico. Essas bactérias têm um papel importante no crescimento e

desenvolvimento das culturas, melhorando a fertilidade do solo, aumentando a absorção de nutrientes e promovendo tolerância das plantas aos estresses ambientais, por meio da produção de fitohormônios e outras substâncias secretadas. Vários gêneros de rizobactérias como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* e *Serratia* foram investigados visando melhorar o crescimento e a produtividade de plantas sob déficit hídrico (DANISH ZAFAR-ULHYE, 2019; KAZEMINASAB et al., 2016; KANWAL et al., 2017; ZAFAR-UL-HYE et al., 2019).

Se por um lado vários estudos foram desenvolvidos e sabe-se dos efeitos benéficos da inoculação de rizobactérias em diversas culturas, por outro lado, o uso de preparações formuladas, consistindo em uma única espécie ou cepa, muitas vezes resulta em baixo desempenho na agricultura. Uma das razões de tal falha deve-se ao fato de um único agente microbiano não ser ativo em todos os ambientes de solo. Uma maneira de superar este problema é incluir diferentes espécies ou cepas de microrganismos benéficos na mesma formulação microbiana. A aplicação de misturas binárias ou múltiplas imitaria a situação natural, podendo ampliar o espectro de atividade. As bactérias do solo podem atuar de forma isolada ou em associações com outros microrganismos. A interação ou a combinação com diferentes organismos no solo é capaz de produzir inúmeros efeitos benéficos nas plantas por sinergia (DARTORA et al., 2016).

Neste contexto, o objetivo desta tese foi avaliar os efeitos potenciais da inoculação e da coinoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* e de *Bacillus* spp. na melhora da tolerância à falta d'água de genótipos de milho com características bem conhecidas e contrastantes a seca, sob cenários de estresse hídrico continuado, aplicados ao longo do ciclo da cultura.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta de ciclo anual, monocotiledônea, com metabolismo C4, pertencente à família Poaceae. É um dos cereais mais antigos cultivados, e uma cultura multiuso com extensa adaptabilidade a diferentes condições agroclimáticas. É cultivado na maior parte do mundo devido ao alto potencial de produção de grãos (CHAKRABORTY et al., 2021), a sua dupla finalidade (grão e forragem) (SAH et al., 2016), e a sua ampla utilização como matéria-prima para a alimentação humana e animal, além da sua aplicação em diversas cadeias industriais, como na produção de cosméticos, combustíveis, entre outros (DUARTE et al., 2011).

As plantas de milho apresentam metabolismo fotossintético C₄, sendo caracterizadas como eficientes no uso de água. Entretanto, os estresses abióticos como o déficit hídrico é um fator que interfere nas atividades fisiológicas da planta e, portanto, na produção dos grãos e de matéria seca (DJEMEL et al., 2019; ZEFFA et al., 2019). Em muitos países, o milho é produzido em áreas que recebem cerca de 300-500 mm de precipitação, o que está próximo ou abaixo do nível crítico para a obtenção de um bom rendimento (QURESHI et al., 2010). Nas condições em que o milho é explorado no Brasil, segundo Magalhães et al. (2002), para expressar seu potencial produtivo, esta cultura necessita de em média 600 mm de precipitação e temperaturas entre 25 e 30 °C, variando de acordo com o material genético.

O mercado do milho brasileiro na safra 2020/2021 apresentou graves problemas climáticos, como a seca, que reduziu de sobremaneira a produtividade das lavouras (CONAB, 2022). Daryanto et al (2016), examinando dados de publicações sobre as respostas do milho à seca entre os anos de 1980 e 2015, concluíram que a redução do rendimento foi de cerca de 39%. O déficit hídrico em milho reduz a atividade fotossintética, altera o metabolismo oxidativo, causa instabilidade da membrana (FAHAD et al., 2017; ZHENG et al., 2016), afeta a condutância estomática e diminuiu a área foliar e a eficiência do uso da água, entre outros danos (ALGHABARI et al., 2016).

2.2 Déficit hídrico e estratégias de resistência das plantas

Seca é um termo meteorológico utilizado para designar situações de perda substancial de umidade da superfície do solo para a atmosfera. Também pode surgir devido ao menor abastecimento de água através das chuvas ou qualquer outra fonte de precipitação para o solo (ASLAM et al., 2013). O rápido aquecimento que vem ocorrendo desde o final da década de 1970 na maior parte do mundo, aumentou a evaporação e provavelmente alterou os padrões de circulação atmosférica, os quais contribuíram para uma tendência de secagem terrestre (DAI, 2010). Isso fez com que a seca se tornasse um novo “normal” climático, com frequência e duração cada vez maiores, com flutuações inter e intra- anuais, e efeitos socioeconômicos e ecológicos mais graves, especialmente para a produção agrícola (LU et al., 2006).

O déficit hídrico afeta as relações planta-água tanto no nível celular quanto na planta inteira, o que leva a várias respostas fenotípicas e fisiológicas específicas e não específicas (BECK et al., 2007). A água é um elemento crucial para a sobrevivência das plantas e essencialmente necessária para o transporte de nutrientes. No geral, o déficit hídrico reduz a acessibilidade, a absorção, e a translocação de nutrientes como nitrogênio (N), fósforo (P),

potássio (K), entre outros, que são cruciais para o crescimento das plantas, levando a um metabolismo prejudicado nas células e tecidos (FAROOQ et al., 2009).

A planta responde a seca em diferentes níveis – morfológico, anatômico, bioquímico, fisiológico e molecular (HEWEDY et al., 2020; ULRICH et al., 2019; WILMOWICZ et al., 2020). Para evitar o estresse hídrico, algumas espécies diminuem as perdas de água reduzindo transpiração, ao passo que investem no desenvolvimento de sistemas radiculares profundos para facilitar a absorção de água (ZAGAR et al., 2017). A Falta de água causa perda de turgescência e acesso limitado ao CO₂, devido ao fechamento estomático e danos aos componentes do fotossistema I e II, resultando em declínio na fotossíntese (JALEEL et al., 2007). O estresse por seca também tem impacto significativo sobre os pigmentos fotossintéticos como clorofila a, b e carotenóides (FU; HUANG, 2001; LIU et al., 2016).

Entre os principais responsáveis pela redução no desenvolvimento da planta devido à seca, está o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que danificam a integridade estrutural e funcional de organelas celulares (AHMAD, 2010). As plantas desenvolveram mecanismos-chave para aliviar os efeitos nocivos do excesso de EROs acumulados e proteger a estabilidade do metabolismo celular, melhorando a produtividade e o rendimento (AHANGER; AGARWA, 2017; AHANGER; AHMAD, 2019). Os principais mecanismos que atenuam os efeitos deletérios incluem: (a) melhor regulação osmótica, (b) sistema antioxidante e (c) acúmulo de metabólitos secundários. O sistema antioxidante é constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que coordenam a proteção do metabolismo da planta, eliminando o excesso de EROs (AHMAD, 2010).

Os mecanismos de resistência de plantas à seca têm sido bem estudados nos últimos anos, e diversos genes de resistência à seca foram identificados (HE et al., 2019; LIU et al., 2013; WANG et al., 2016; XIANG et al., 2017; ZHANG et al., 2020). Porém novas estratégias eficazes e ecologicamente corretas para melhorar esta resistência são necessárias. A utilização exógena de RPCPs por inoculação de sementes, irrigação radicular ou pulverização foliar é um método eficaz para melhorar a resistência à seca (AHMAD et al., 2019; HUANG et al., 2019; ZHANG et al., 2012).

Microrganismos associados às raízes das plantas minimizam os efeitos nocivos do estresse, retardando as mudanças induzidas pela murcha e pela seca (condutância estomática, fotossíntese e descoloração das folhas), aumentando o teor de aminoácidos e a produção de prolina, reduzindo o teor de H₂O₂ e aumentando os fenólicos totais em plantas (ALAMGIR, 2018; ARUN et al., 2020; KHADKA; UPHOFF, 2019; KUMAR et al., 2020), além de aumentar a fixação de nitrogênio, absorção de nutrientes, a produção de sideróforos, fitohormônios e

metabólitos secundários, a síntese de exopolissacarídeos (EPS) e muitos outros compostos orgânicos (EGAMBERDIEVA et al., 2017; ETESAMI; MAHESHWARI, 2018; GOSWAMI; DEKA, 2020; NASEEM et al., 2018).

2.3 Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) referem-se a bactérias de vida livre no solo e rizobactérias (RPCPs) que colonizam a rizosfera das raízes (RAMAKRISHNA et al., 2019). A rizosfera é um ambiente edáfico conhecido por hospedar uma ampla variedade de microrganismos. Vários destes microrganismos são bactérias que não só colonizam a rizosfera, mas também podem penetrar nas plantas, colonizando os tecidos internos do vegetal, estabelecendo assim, associações benéficas e desempenhando importante papel na manutenção e/ou incremento do crescimento vegetal, quer seja em ecossistemas naturais ou manejados (COMPANT et al., 2010).

A população da comunidade microbiana do solo varia de acordo com a espécie vegetal, em vista da liberação de exsudados pela raiz que causam alterações químicas e físicas na rizosfera, o que pode beneficiar ou inibir o crescimento microbiano nessa região (MCNEAR JR, 2013). As bactérias do solo são em sua maioria benéficas, envolvendo-se direta ou indiretamente na promoção do crescimento e produção das plantas (PRASAD et al., 2019). As funções mais proeminentes das RPCPs envolvem a fixação de N, a solubilização de fosfato, a liberação de fitormônios, a manutenção da composição do solo, a resistência sistêmica induzida contra pragas, insetos e patógenos e a mitigação de estresses abióticos como a salinidade e a seca (NOVO et al., 2018, PATHANIA et al., 2020). Alguns exemplos de RPCPs incluem *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pantoea*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia* (CHIAPPERO et al., 2019; PATHANIA et al., 2020).

As rizobactérias veem ocupando um lugar de destaque na agricultura devido aos múltiplos benefícios que trazem as plantas e por suas características biológicas como fácil multiplicação em massa, amplo espectro de ação, alta adaptabilidade em diversos ambientes, compatibilidade com outros microrganismos e principalmente por serem favoráveis ao meio ambiente (SANTOYO et al., 2012). A grande maioria dos primeiros inoculantes fabricados continha apenas uma espécie de microrganismo. Contudo na última década, o uso de inoculantes contendo microrganismos de “diferentes tipos” vem expandido. A ideia é combinar linhagens ou espécies atuando em diferentes processos microbianos, de modo que os benefícios combinados de cada um resultem em maiores benefícios. Exemplos de inoculantes mistos são aqueles que combinam

microrganismos cujos principais processos são a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (por exemplo, *Azospirillum* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Rhizobium* spp.) e produção de fitohormônios (por exemplo, *Azospirillum* spp., *Pseudomonas* spp.), ou solubilização de fosfato (por exemplo, *Bacillus* spp.) e controle biológico (por exemplo, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.).

O gênero *Azospirillum* é capaz de colonizar muitas espécies de plantas cultivadas melhorando o crescimento, desenvolvimento e a produtividade (DAR et al., 2018). A promoção do crescimento das plantas por *Azospirillum brasilense* ocorre como consequência da combinação de vários mecanismos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos (BASHAN; BASHAN, 2010), possivelmente agindo de forma aditiva ou como efeito cascata. Os benefícios trazidos pela associação desta bactéria com as plantas são a síntese de várias substâncias reguladoras do crescimento, como os fitormônios (BARNAWAL et al., 2019); fixação biológica do N (REVOLTI et al., 2018); solubilização de fosfato e ferro (GALINDO et al., 2016; REVOLTI et al., 2018); biocontrole de fitopatógenos (DAR et al., 2018) e proteção das plantas contra estresses abióticos (KAUSHAL, 2019).

Dentre a comunidade microbiana rizosférica, os membros do gênero *Bacillus* estão entre os residentes do solo mais abundantes e que possuem várias características de promoção de crescimento de plantas. Os efeitos destes microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas são amplos. A adição de inoculantes contendo estirpes de *Bacillus* spp. no solo pode acelerar a reciclagem e a disponibilidade de nutrientes (COELHO et al., 2007), solubilizar e mineralizar o fósforo presente na matéria orgânica e em fontes inorgânicas (RICHARDSON, 2001) e enriquecer biologicamente o solo. De modo geral, os efeitos benéficos vão desde a germinação de sementes até a produção de grãos (LAZARETTI; BETTIOL, 1997). A eficiência das espécies de *Bacillus* sobre outras rizobactérias tem sido constantemente atribuída à sua capacidade de produzir esporos resistentes a estresses ambientais (PADMAVATHI, 2016).

2.4 Promoção e Proteção do Crescimento Vegetal por RPCPs em condições de seca

As bactérias são conhecidas por sobreviver a condições de estresse abiótico, empregando uma variedade de mecanismos fisiológicos, incluindo o acúmulo de solutos compatíveis, síntese de exopolissacarídeos, produção de antibióticos e formação de esporos. As RPCPs empregam modificações físicas, químicas e biológicas semelhantes nas plantas para ajudá-las a sobreviver e florescer sob condições de estresse como a seca (AHLUWALIA et al., 2021). Estudos comprovam a hipótese de que as rizobactérias permitem que as plantas agrícolas mantenham a produtividade sob diferentes condições de estresse por meio do emprego de modificações físicas,

químicas e biológicas (ETESAMI; BEATTIE, 2017; ETESAMI, 2018; KAUSHAL; WANI, 2016; KUMAR, 2015; SHRIVASTAVA; ULLAH et al., 2015). Vários gêneros de rizobactérias como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* e *Serratia* são associados à melhora no crescimento e na produtividade de plantas sob estresse hídrico (KAZEMINASAB et al., 2016; KANWAL et al., 2017; MISHRA; SINGH, 2010; ZAFAR-UL-HYE et al., 2019).

As raízes são as primeiras a perceber as condições de seca que se avizinham e decretar a resposta primária da planta, adaptando-se para maximizar a absorção de água e nutrientes. Estresses abióticos como a seca causam diminuição nos níveis de produção de fitormônios como giberelinas, citocininas e auxinas, reduzindo assim o crescimento e desenvolvimento das plantas (KAUSHAL; WANI, 2016; NGUMBI; KLOEPPER, 2016). As RPCPs podem equilibrar os níveis de hormônios vegetais sintetizando e secretando fitormônios, facilitando assim o aumento da área de superfície e comprimento das raízes, o número de pelos radiculares e o crescimento geral do sistema radicular (VACHERON et al., 2013).

Durante o estresse hídrico, uma das respostas primárias de uma planta é o fechamento dos estômatos para limitar a perda de água por transpiração (SHARMA et al., 2012), causando por consequência, redução nas taxas fotossintéticas. Esses baixos níveis, por sua vez, afetam as reações do ciclo de Calvin, resultando em menor consumo de NADPH e ATP. Assim, a regeneração de aceptores de elétrons também diminui, levando à produção excessiva de EROs (CHIAPPERO et al., 2019). Espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete, radicais superóxido, e o radical hidroxila, quando presentes em altas quantidades trazem efeitos deletérios as desoxirriboses, quebra de fitas, remoção de nucleotídeos e morte celular, são alguns efeitos do acúmulo excessivo de EROs (MILLER et al., 2010; SHARMA et al., 2012).

Para reduzir esse acúmulo excessivo, as plantas possuem enzimas não oxidativas e oxidativas chamadas enzimas de eliminação. Estas incluem superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase, glutatona redutase e peroxidase. No entanto, sob condições de estresse abiótico como a seca, a atividade dessas enzimas é alterada e reduzida, tornando-as incapazes de realizar as funções reguladoras das EROs (CHIAPPERO et al., 2019; ETESAMI, MAHESHWARI, 2018). As RPCPs aumentam a concentração e a atividade dessas enzimas, reduzindo assim o acúmulo de EROs (TIMMUSK et al., 2014). Assim, pode-se entender que as rizobactérias podem atenuar o dano oxidativo em plantas sob estresse hídrico, interferindo na regulação da defesa antioxidante.

A redução inicial no crescimento das plantas durante o estresse hídrico é primeiramente trazida à tona pela diminuição da taxa de crescimento das superfícies assimilatórias seguida pela inibição da fotossíntese. A diminuição das taxas de fotossíntese durante a seca pode ser atribuída a fatores estomáticos e não estomáticos (DRAKE et al., 2017; LIU et al., 2019). As restrições estomáticas da fotossíntese podem ser descritas como assimilação ineficiente de CO₂ nas folhas e cavidades subestomáticas devido ao fechamento prematuro dos estômatos. As restrições não estomáticas da fotossíntese surgem quando há diminuição da atividade de Rubisco, na atividade do cloroplasto, na disponibilidade de ATP, no nitrogênio foliar e no comprometimento dos fotossistemas I e II (GAION et al., 2018, LIU et al., 2019).

As rizobactérias melhoram as taxas de fotossíntese em plantas sob condições de estresse com a produção de fitohormônio citocinina. A citocinina influencia tanto as características estruturais quanto funcionais da fotossíntese. Este hormônio amplifica a condutância estomática e promove a divisão e diferenciação celular nos estágios iniciais do desenvolvimento foliar, levando a um aumento do número de feixes vasculares, melhora do xilema e do floema (CHERNYADEV, 2000); aumentam os números de cloroplastos em níveis celulares (OKAZAKI et al., 2009), melhoram a síntese de pigmentos fotossintéticos, como clorofila e carotenóides (CORTLEVEN; SCHMÜLLING, 2015). Pode-se então inferir que as RPCPs auxiliam na melhoria das taxas de fotossíntese pela produção de fitormônios como a citocinina.

Além dos ajustes e melhorias nos mecanismos próprios das plantas, os microrganismos também possuem a capacidade de secretar substâncias que auxiliam na tolerância das plantas a seca. Os exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos naturais secretados por bactérias que ajudam os micróbios a sobreviver a condições inóspitas, estando envolvidos em vários papéis, como fixação na superfície, formação de biofilme, fornecimento de nutrientes, retenção de água, interações planta-micróbio, proteção contra patógenos e estresses abióticos (KAUSHAL; WANI, 2016; KHAN; BANO, 2019). Em plantas sob estresse hídrico, o EPS liberado pelo RPCPs ajudam na prevenção da dessecação, formando biofilmes hidrofílicos na superfície da raiz e, assim, permitindo que a água seja liberada em uma taxa mais lenta. Eles também ajudam a melhorar a agregação, estrutura e permeabilidade do solo e agregação de raízes. Isso é possível pela posterior liberação e absorção de EPS na superfície dos agregados do solo com a ajuda de mecanismos como pontes de cátions, forças de Van der Waal, adsorção de ânions (VURUKONDA et al., 2016; KHAN; BANO, 2019).

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A agricultura é considerada o setor mais vulnerável às mudanças climáticas. Explorar a interação planta-micróbio é uma abordagem relevante que visa aumentar a produção de alimentos para uma população crescente no atual cenário de mudanças climáticas. A inoculação de sementes de milho com RPCPs é capaz de influenciar positivamente o crescimento das plantas e aumentar a produção da cultura. Sob condições ambientais desfavoráveis, como no déficit hídrico, as rizobactérias possuem um papel importante, auxiliando no sistema de defesa e conferindo adaptação e tolerância em plantas. Embora a formulação de várias rizobactérias não adicione dificuldades técnicas significativas em comparação com a formulação de uma única bactéria, a interação dos microrganismos dentro dessas formulações é amplamente desconhecida. Neste sentido tornam-se necessários mais estudos a fim de reunir conhecimentos aprofundados sobre os mecanismos associados as RPCPs, as interações planta-microrganismos e a compatibilidade entre populações microbianas, a fim de abrir caminho para aplicação em escala de campo, objetivando construir um sistema agrícola saudável e sustentável.

REFERÊNCIAS

AHLUWALIA, O.; SINGH, P. C.; BHATIA, R. A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. **Resources, Environment and Sustainability**, v. 5, 100032, 2021.

AHANGER, M.A.; AGARWAL, R.M. Salinity stress induced alterations in antioxidant metabolism and nitrogen assimilation in wheat (*Triticum aestivum* L) as influenced by potassium supplementation. **Plant Physiol. Biochem**, v. 115, p. 449-460, 2017.

AHMAD, P. Growth and antioxidant responses in mustard (*Brassica juncea* L.) plants subjected to combined effect of gibberellic acid and salinity. **Arch. Agron. Soil Sci.**, v. 56, p. 575-588, 2010.

AHMAD, S.; KAMRAN, M.; DING, R.; MENG, X.; WANG, H.; AHMAD, I.; FAHAD, S.; HAN, Q. Exogenous melatonin confers drought stress by promoting plant growth, photosynthetic capacity and antioxidant defense system of maize seedlings. **PeerJ**, v. 7, e. 7793, 2019.

ALGHABARI, F. et al. Gibberellin-sensitive rht alleles confer tolerance to heat and drought stresses in wheat at booting stage. **J. Cereal Sci.**, v. 70, p. 72-78, 2016.

ALAMGIR, A. N. M. Phytoconstituents-Active and Inert Constituents, Metabolic Pathways, Chemistry and Application of Phytoconstituents, Primary Metabolic Products, and Bioactive Compounds of Primary Metabolic Origin. In: Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts; Rainsford, K.D., Ed.; Progress in Drug Research; **Springer: Cham**, v.74, p. 25-164, 2018.

ASLAM, M.; ZAMIR, M.; AFZAL, I.; YASEEN, M.; MUBEEN, M.; SHOAIIB, A. Drought stress, its effect on maize production and development of drought tolerance through potassium application. **Cercetari Agronomice in Moldova**, v. 46, p. 99-114, 2013.

ARUN, K. D.; SABARINATHAN, K. G.; GOMATHY, M.; KANNAN, R.; BALACHANDAR, D. Mitigation of drought stress in rice crop with plant growth-promoting abiotic stress-tolerant rice phyllosphere bacteria. **J. Basic Microbiol.**, v. 60, p. 768-786, 2020.

BARNAWAL, D.; SINGH, R.; SINGH, R. P. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Drought Tolerance: Regulating Growth Hormones and Osmolytes. In: PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. **Woodhead Publishing**, p 107-128. 2019.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth-A Critical Assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.

BECK, E. H.; FETTIG, S.; KNAKE, C.; HARTIG, K.; BHATTARAI, T. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. **Journal of Biosciences**, v. 32, p. 501-510. 2007.

CARVALHO, M.; GOUVINHAS, I.; CASTRO, I.; MATOS, M.; ROSA, E.; CARNIDE, V.; BARROS, A. Drought stress effect on polyphenolic content and antioxidant capacity of cowpea pods and seeds. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 207, n. 2, p. 197-207, 2021.

CHIAPPERO, J.; CAPPELLARI, L. R.; ALDERETE, L. G. S.; PALERMO, T. B.; BANCHIO, E. Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita* grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content. **Industrial Crops and Products**, v. 139, 111553, 2019.

COELHO, L. F.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; AMBROSANO, G. M. B. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* spp. com rizosferas de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 31, p. 1413-1420, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. Safra 2021/22, v. 9, n.7 - Sétimo levantamento, p. 1-93, 2022.

CORTLEVEN, A.; SCHMÜLLING, T. Regulation of chloroplast development and function by cytokinin, **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 16, p. 4999-5013, 2015.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, 2010.

DAI, A. G. Drought under global warming: a review, **WIREs Climatic Change**, v. 2, p. 45-65, 2010.

DJEMEL, A.; ÁLVAREZ-IGLESIAS, L.; SANTIAGO, R.; MALVAR, R. A.; PEDROL, N.; REVILLA, P. Algerian maize populations from the Sahara Desert as potential sources of drought tolerance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 1, p. 1-13, 2019.

DARTORA, J.; MARINI, D.; GONÇALVES, E. D. V.; GUIMARÃES, V. F. Coinoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 6, p. 545-550, 2016.

DAR, Z. M.; MASOOD, A.; MUGHAL, A. H.; ASIF, M.; MALIK, M. A. Review on Drought Tolerance in Plants Induced by Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 3, p. 2802-2804, 2018.

DARYANTO, S.; WANG, L.; JACINTHE, P. A. Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. **PLoS ONE**, v. 11, e. 0156362, 2016.

DRAKE, J. E.; POWER, S. A.; DUURSMA, R. A.; MEDLYN, B. E.; ASPINWALL, M. J.; CHOAT, B.; TISSUE, D. T. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis for four tree species under drought: a comparison of model formulations. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 247, p. 454-466, 2017.

DUARTE, A. P.; GERAGE, A. C.; CECCON, G.; SILVA, V. A.; CRUZ, J. C.; BIANCO, R.; SOUZA, E. D.; PEREIRA, F. C.; SOARES FILHO, R. Milho Safrinha. In: CRUZ, J. C.; MAGALHÃES, P. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; MOREIRA, J. A. A. Milho: o produtor

pergunta, a Embrapa responde Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 306-324, 2011.

EGAMBERDIEVA, D.; RECKLING, M.; WIRTH, S. Biochar-based Bradyrhizobium inoculum improves growth of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) under drought stress. **Eur. J. Soil Biol.**, v. 78, p. 38-42, 2017.

ETESAMI, H.; BEATTIE, G. A. Plant-Microbe Interactions in Adaptation of Agricultural Crops to Abiotic Stress Conditions. In: Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., Prasad, R. (eds) Probiotics and Plant Health. **Springer**, Singapore, 2017.

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 156, p. 225-246, 2018.

FAHAD, S.; BAJWA, A. A.; NAZIR, U.; ANJUM, S. A.; FAROOQ, A.; ZOHAIB, A.; SADIA, S.; NASIM, W.; ADKINS, S.; SAUD, S.; IHSAN, M. Z.; ALHARBY, H. WU, C.; WANG, D. H. J. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. **Front. Plant. Sci.**, v. 8, p. 1147, 2017.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agron. Sustain. Dev.**, v. 29, p. 185-192, 2009.
FU, J.; HUANG, B. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. **Environ. Exp. Bot.**, v. 45, p. 105-114, 2001.

GAION, L. A.; MONTEIRO, C. C.; CRUZ, F. J. R.; ROSSATTO, D. R.; LÓPEZ-DÍAZ, I.; CARRERA, E.; LIMA, J. E.; PERES, L. E. P.; CARVALHO, R. F. Constitutive gibberellin response in grafted tomato modulates root-to-shoot signaling under drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 221, p. 11-21, 2018.

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; SANTINI, J. M. K.; et al. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, p. 1-18, 2016.

GOSWAMI, M.; DEKA, S. Plant growth-promoting rhizobacteria- alleviators of abiotic stresses in soil: A review. **Pedosphere**, v. 30, p. 40-6, 2020.

HE, Y.; PANTIGOSO, H. A.; WU, Z.; VIVANCO, J. M. Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. **J. Appl. Microbiol.**, v. 127, n. 1, p. 196-207, 2019.

HEWEDY, O. A.; ABDEL LATEIF, K. S.; SELEIMAN, M. F.; SHAMI, A.; ALBARAKATY, F. M.; EL-MEIHY, R. M. Phylogenetic diversity of *Trichoderma* strains and their antagonistic potential against soil-borne pathogens under stress conditions. **Biology**, v. 9, p. 189, 2020.

HUANG, B.; CHEN, Y. E.; ZHAO, Y. Q.; DING, C. B.; LIAO, J. Q.; HU, C.; ZHOU, L. J.; ZHANG, Z. W.; YUAN, S.; YUAN, M. Exogenous melatonin alleviates oxidative damages and protects photosystem II in maize seedlings under drought stress. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 677, 2019.

- JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 59, p. 150-157, 2007.
- KANWAL, S.; ILYAS, N.; BATOOL, N.; ARSHAD, M. Amelioration of drought stress in wheat by combined application of PGPR, compost, and mineral fertilizer. **Journal of Plant Nutrition**, v. 40, n. 9, p. 1250-1260, 2017.
- KAUSHAL, M. Portraying Rhizobacterial Mechanisms in Drought Tolerance: A Way Forward Toward Sustainable Agriculture. In: PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. **Woodhead Publishing**, p. 195-216, 2019.
- KAUSHAL, M.; WANI, S. P. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. **Ann Microbiol**, v. 66, p. 35-42, 2016.
- KAZEMINASAB, A.; YARNIA, M.; LEBASCHY, M. H.; MIRSHAKARI, B.; REJALI, F. The effect of vermicompost and PGPR on physiological traits of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) plant under drought stress. **Journal of Medicinal Plants and By-product**, v. 5, n. 2, p. 135-144, 2016.
- KHADKA, R. B.; UPHOFF, N. Effects of Trichoderma seedling treatment with system of rice intensification management and with conventional management of transplanted rice. **PeerJ**, v. 7, 5877, 2019.
- KHAN, N.; BANO, A. Exopolysaccharide producing rhizobacteria and their impact on growth and drought tolerance of wheat grown under rainfed conditions. **PLoS One**, v. 14, n. 9, p. e0222302, 2019.
- KUMAR, A.; SINGH, S.; GAURAV, A. K.; SRIVASTAVA, S.; VERMA, J. P. Plant growth-promoting bacteria: Biological tools for the mitigation of salinity stress in plants. **Front. Microbiol.**, v. 11, 1216, 2020.
- LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1-2, p. 89-96, 1997.
- LIU, F.; XING, S.; MA, H.; DU, Z.; MA, B. Cytokinin producing, plant growth promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, p. 9155-9164, 2013.
- LIU, F.; MA, H.; PENG, L.; DU, Z.; MA, B.; LIU, X. Effect of the inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on the photosynthetic characteristics of *Sambucus williamsii* Hance container seedlings under drought stress. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.
- LU, S.; SU, W.; GUO, Z. Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 47, p.132-138, 2009.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; GOMIDE, R. L. Fisiologia do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. (Circular técnica 22).

MILLER, G.; SUSUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant Cell Environ.**, v. 33, p. 453-467, 2010.

MISHRA, A. K.; SINGH, V. P. A review of drought concepts. **Journal of Hydrology**, v. 391, n. 1, p. 202-216, 2010.

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

NGUMBI, E.; KLOEPPER, J. Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects, **Applied Soil Ecology**, v. 105, p. 109-125, 2016.

NOVO, L. A. B.; CASTRO, P. M. L.; ALVARENGA, P.; DA SILVA, E. F. Plant Growth–Promoting Rhizobacteria-Assisted Phytoremediation of Mine Soils. **Bio-Geotechnologies. Mine Site Rehabilitation**, v. 1, p. 281-295. 2018.

OKAZAKI, K.; KABEYA, Y.; SUZUKI, K.; MORI, T.; ICHIKAWA, T.; MATSUI, M.; NAKANISHI, H.; MIYAGISHIMA, S. The Plastid Division1 and 2 Components of the Chloroplast Division Machinery Determine the Rate of Chloroplast Division in Land Plant Cell Differentiation. **The Plant Cell**, v. 21, n. 6, p. 1769-1780, 2009.

PADMAVATHI, T. Effect of *Bacillus* sp and *Glomus monosporum* on growth and antioxidant activity of Bell Pepper (*Capsicum Annuum*) under salinity stress. **Journal of Global Agriculture and Ecology.**, v. 6, p. 57-67, 2016.

PATHANIA, P.; RAJTA, A.; SINGH, P. C.; BHATIA, R. Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 30, 101842, 2020.

PRASAD, M.; SRINIVASAN, R.; CHAUDHARY, M.; CHOUDHARY, M.; JAT, L. K. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture: perspectives and challenges. In: PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. **Woodhead Publishing**, p. 129-157, 2019.

QURESHI, M.; HANJRA, M. Global water crisis and future security in an era of climate change. **Food Policy.**, v. 35, p. 365-377, 2010.

RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, K. Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, v. 138, p. 10-18, 2019.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany**, v. 2012, 2012.

SHRIVASTAVA, P.; KUMAR, R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 123-131, 2015.

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

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, n. 28, p. 897-906. 2001.

SAH, S. K.; REDDY, K. R.; LI, J. X. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. **Front Plant Sci.**, v. 7, 571, 2016.

SANTOYO, G.; CARMEN, M.; GOVINDAPPA, O. M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **Biocon. Sci. Technol.**, v. 22, p. 855-872, 2012.

TIMMUSK, S.; ISLAM, A.; ABD, E. D.; LUCIAN, C.; TANILAS, T.; KANNASTE, A. et al. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. **PLoS One**, v. 9, p. 1-13, 2014.

ULLAH, A.; HENG, S.; MUNIS, M. F. H.; FAHAD, S.; YANG, X. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review, **Environmental and Experimental Botany**, v. 117, p. 28-40, 2015.

ULRICH, D. E. M.; SEVANTO, S.; RYAN, M.; ALBRIGHT, M. B. N.; JOHANSEN, R. B.; DUNBAR, J. M. Plant-microbe interactions before drought influence plant physiological responses to subsequent severe drought. **Sci. Rep.**, v. 9, 249, 2019.

VACHERON, J.; DESBROSSES, G.; BOUFFAUD, M. L.; TOURAINE, B.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; MULLER, D.; LEGENDRE, L.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; PRIGENT-COMBARET, C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Front. Plant Sci.**, v. 4, p. 356, 2013.

VURUKONDA, S. S. K. P.; VARDHARAJULA, S.; SHRIVASTAVA, M.; SKZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 184, p. 13-24, 2016.

WANG, X.; WANG, H.; LIU, S.; FERJANI, A.; LI, J.; YAN, J.; YANG, X.; QIN, F. Genetic variation in *ZmVPP1* contributes to drought tolerance in maize seedlings. **Nature genetics**, v. 48, n. 10, p. 1233- 1241, 2016.

WILMOWICZ, E.; KUCKO, A.; GOLINSKA, P.; BURCHARDT, S.; PRZYWIECZERSKI, T.; SWIDZINSKI, M.; BRZOZOWSKA, P.; KAPUSCINSKA, D. Abscisic acid and ethylene in the control of nodule-specific response on drought in yellow lupine. **Environ. Exp. Bot.**, 169, 103900, 2020.

ZAFAR-UL-HYE, M.; DANISH, S.; ABBAS, M.; AHMAD, M.; MUNIR, T. M. ACC deaminase producing PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* and *Agrobacterium fabrum* along with biochar improve wheat productivity under drought stress. **Agronomy**, v. 9, p. 343, 2019.

ZEFFA, D. M.; PERINI, L. J.; SILVA, M. B.; DE SOUSA, N. V.; SCAPIM, C. A.; OLIVEIRA, A. L. M. et al. (2019) *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, e0215332, 2019.

ZHANG, L.; GAO, M.; HU, J., ZHANG, X.; WANG, K.; ASHRAF, M. Modulation Role of abscisic acid (ABA) on growth, water relations and glycinebetaine metabolism in two maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 3, p. 3189-3202, 2012.

ZHANG, X.; MI, Y.; MAO, H.; LIU, S.; CHEN, L.; QIN, F. (2020b). Genetic variation in *ZmTIP1* contributes to root hair elongation and drought tolerance in maize. **Plant biotechnology journal, Journal Pre-proof**, v. 18, n. 5, p. 1271-1283, 2020.

ZHENG, M. et al. Seed priming in dry direct-seeded rice: consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under drought stress. **Plant Growth Regul.**, v. 78, p. 167-178, 2016.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 – Norma NBR 6022 (ABNT 2018)

Inoculação e coinoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp. em genótipos de milho sob déficit hídrico

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da inoculação e da coinoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp. no desenvolvimento radicular, nas respostas fisiológicas e no desempenho produtivo de dois híbridos de milho, sob diferentes regimes hídricos. O experimento foi realizado em casa de vegetação, onde estirpes de *Azospirillum brasilense*, e mistura de estirpes de *Bacillus* spp. + *Azospirillum brasilense* foram inoculados em sementes de dois híbridos de milho com características contrastantes a seca (DKB390 e P30F53), expostos a dois regimes hídricos (Capacidade de Campo e Déficit Hídrico). Ao atingirem o pré florescimento as plantas foram mantidas em déficit hídrico por 14 dias, e após este período, foram analisados a morfologia do sistema radicular, o teor relativo de clorofila na folha, a eficiência quântica máxima do FSII, e os parâmetros de produção. Com relação as características morfológicas da raiz, resultados opostos foram observados entre os híbridos sob déficit hídrico, onde houve aumento em todos os fatores avaliados para o DKB390, quando inoculado com Azos, diferentemente do que ocorreu com o P30F53. Os inoculantes promoveram efeitos benéficos para ambos os genótipos de milho expostos a condição de déficit hídrico, com consequente aumento na produção de grãos. A coinoculação com *Azospirillum*+*Bacillus*, foi responsável por promover maiores médias em todos os parâmetros avaliados para o híbrido sensível a seca (P30F53). Para o teor relativo de clorofila, quando as plantas foram irrigadas durante todo seu ciclo, o inoculante *Azospirillum* conferiu os maiores valores relativos de clorofila em ambos os genótipos de milho. Na relação Fv/Fm houve inibição do fotossistema II apenas em plantas expostas ao déficit hídrico após sete dias de estresse, contudo o inoculante *Azospirillum* proporcionou maiores valores tanto para o DKB390 quanto para o P30F53. Desta forma estes resultados sugerem que a interação planta-bactéria está ligada ao material genético, onde híbridos de milho com comportamentos divergentes à seca, apresentam respostas diferentes a inoculação com RPCPs.

Palavras-chave: Morfologia radicular. Produção. RPCPs. *Bacillus* spp. *Zea mays* L.

1. INTRODUÇÃO

No cenário atual, as lavouras enfrentam vários tipos de estresse de natureza biótica e abiótica, sendo o déficit hídrico um dos principais estresses abióticos e um importante fator limitante para a produção agrícola por causar distúrbios no desenvolvimento das plantas e quebra de produção, levando assim a perdas econômicas e declínio da disponibilidade de alimentos. Estudos anteriores mostram que a perda de grãos induzida pela seca é responsável por mais da metade das perdas totais acarretadas por desastres naturais (JALEEL et al., 2009).

O milho é uma das culturas fundamentais no mundo todo (FAO, 2019), e é um importante alimento e recurso industrial (IBRAHIM et al., 2016), contudo sua produção pode ser limitada pela seca. Com base em dados publicados entre os anos de 1980 e 2015, a produtividade do milho sofreu redução de até 39% em escala global devido à falta de água (DARYANTO et al., 2016). Portanto encontrar estratégias de mitigação para enfrentar o impacto da escassez de água na produção de milho é de suma importância.

A raiz é o principal órgão que ancora a planta no solo e é essencial para a absorção de água e nutrientes. O desenvolvimento da raiz é altamente plástico e flexível, agindo como um sistema sensorial em um ambiente em constante mudança, ao ajustar sua morfologia e reduzindo a exposição ao estresse (PIERIK; TESTERINK, 2014). A maioria dos estudos em seleção genética focam principalmente em melhorar as características dos tecidos acima do solo para tolerar a esses estresses, enquanto as raízes (a 'metade oculta' da arquitetura de uma planta) ainda são uma fonte subutilizada de melhoria de cultivo (KOEVOETS et al. 2016).

Até o momento, o desenvolvimento de novos genótipos (ATKINSON; URWIN, 2012; BAKHSH; HUSSAIN, 2015; DAS et al., 2021), assim como a aplicação de produtos químicos inorgânicos e orgânicos, são as práticas mais utilizadas para melhorar a tolerância do milho à seca. No entanto, algumas desvantagens estão associadas a essas abordagens, uma vez que são demoradas, onerosas e trabalhosas (ATKINSON; URWIN, 2012). A aplicação de microrganismos benéficos como bioinoculantes surge como uma das ferramentas biotecnológicas ambientalmente corretas e sustentáveis.

No solo rizosférico há abundância de comunidades microbianas, incluindo microrganismos benéficos que exibem traços promotores de crescimento em plantas. Esses microrganismos benéficos, ou seja, bactérias, fungos e algas proporcionam efeitos favoráveis em plantas sob diversos estresses ambientais (GOUDA et al., 2018; TIWARI; LATA, 2018). Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs) colonizam raízes, e levam ao aumento no seu comprimento, no número de raízes laterais, e em determinadas plantas, nos nódulos dessas raízes,

dentre outras propriedades. As RPCPs também modificam o funcionamento deste órgão e melhoram a nutrição da planta através da melhoria na absorção de água, da fixação de nitrogênio e de mecanismos de solubilização de fosfato, que aumentam o crescimento e o rendimento de várias culturas, resultando em maiores produções (SINGH; SENEVIRATNE, 2017).

Os microrganismos do gênero *Azospirillum* colonizam o interior e a superfície das raízes de gramíneas (BALDANI et al., 1997; HUERGO et al., 2008). São conhecidos pela sua capacidade de produzir fitormônios reguladores do crescimento vegetal como o ácido indol-acético, auxinas, giberelinas e citocininas e liberá-los sobre o sistema radicular das plantas colonizadas, alterando sua morfologia e fisiologia (HARTMANN; ZIMMER, 1994). As RPCPs como as do gênero *Bacillus*, tal qual o *Azospirillum*, são importantes para o desenvolvimento de plantas, uma vez que, liberam hormônios (AIA) que modificam a morfologia radicular, aumentando sua biomassa e conseqüentemente, oferecendo maior capacidade de exploração de água e nutrientes do solo, produção de sideróforos e antagonismo contra microrganismos fitopatogênicos (KHAN, 2017; GAZOLA et al., 2015).

As RPCPs do solo podem atuar de forma isolada ou em associações com outras RPCPs. A interação ou a combinação com diferentes organismos no solo é capaz de produzir inúmeros efeitos benéficos nas plantas (DARTORA et al., 2016) por sinergia. Existem vários exemplos de coinoculação com *Azospirillum*, em diversas culturas, como a realizada com *Bradyrhizobium* em soja (CHIBEBA et al., 2015; HUNGRIA et al., 2013), *Rhizobium tropici* no feijão (RODRIGUES et al., 2016; HUNGRIA et al., 2013]), e *Paenibacillus polymyxa* em trigo (YEGORENKOVA et al., 2016), entre outros.

Mesmo diante dos diversos estudos abordando a coinoculação de diferentes microrganismos em plantas, poucos exploram os efeitos da inoculação contendo duas ou mais cepas de RPCPs combinadas, e a relação da interação planta-bactéria, um fator chave devido a influência do ambiente da rizosfera na sobrevivência e ação das bactérias promotoras de crescimento (ZEFFA et al., 2019; MARINI et al., 2015). A identificação e seleção de genótipos responsivos à inoculação são essenciais para garantir a repetibilidade e aumento do rendimento das plantas (MARTINS et al., 2012). O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da inoculação de *Azospirillum brasilense* e da sua coinoculação com *Bacillus* spp., no desenvolvimento radicular, nos aspectos fisiológicos e no desempenho produtivo de dois híbridos de milho contrastantes quanto a tolerância a seca, sob diferentes regimes hídricos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas - MG, Brasil, coordenadas geográficas: 19°28' S, 44°15'08'' W, e altitude média de 732 m. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3x2x2, consistindo em: dois inoculantes (*Azospirillum brasilense* (Azos), e mistura de estirpes de *Bacillus* spp. + *Azospirillum brasilense* (Azos+Bac) e um controle (sem inoculante); dois híbridos de milho (DKB390 PRO 3 e P30F53 VYHR); e dois regimes hídricos (Capacidade de Campo e Déficit Hídrico). Cada tratamento foi composto por quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por duas plantas por vaso.

Os inoculantes utilizados foram obtidos a partir da mistura de duas estirpes de *Azospirillum brasilense* homólogas (CMS11 e CMS1626), na proporção 1:1, e da mistura, também na proporção de 1:1, de estirpes de *Azospirillum brasilense* com estirpes de *Bacillus* spp pré-selecionadas como eficientes na produção de exopolissacarídeos “in vitro”, todos pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos (CMMF) da Embrapa Milho e Sorgo.

As estirpes selecionadas foram cultivadas em caldo de soja trip-caseína, durante 72h, a temperatura de 29°C sob agitação constante. Após esse período, as culturas de cada estirpe foram centrifugadas, ressuspensas em solução salina (0,85% NaCl) e ajustadas para densidade ótica igual a 1,0 em absorbância a 500 nm, que equivale a aproximadamente 10⁸ células viáveis por mL (REIS, 2015). A inoculação nas sementes foi realizada, utilizando-se como veículo o carvão vegetal moído e goma de fécula de mandioca como aderente.

Sementes de híbridos de milho DKB390 PRO3 e P30F53 VYHR, contrastantes em relação ao déficit hídrico, sendo respectivamente tolerante e sensível, foram plantadas em vasos de 20 kg, contendo Latossolo Vermelho distrófico previamente corrigido e adubado. O potencial hídrico do solo foi monitorado diariamente nos períodos da manhã e da tarde (9:00 e 15:00), com o auxílio de tensiômetro (Watermark modelo 200SS, Irrometer, Califórnia, EUA), instalado no centro dos vasos de cada repetição, na profundidade de 20 cm. Estes sensores detectam a tensão de água no solo com base na resistência elétrica e foram acoplados a medidores digitais (Watermark meter) da mesma empresa. A reposição hídrica até a capacidade de campo (CC) foi realizada através da irrigação, em função da curva de retenção de água do solo.

No pré-florescimento, os tratamentos hídricos foram impostos. No tratamento Capacidade de Campo (CC), o solo recebeu reposição hídrica diariamente na quantidade necessária para atingir sua CC. No Déficit Hídrico, a indução do estresse foi realizada com a

aplicação diária de apenas 50% da água total necessária para atingir a CC, isto é, até que o potencial matricial no solo atingisse um valor aproximado de -100 KPa, sendo esse déficit mantido por 14 dias.

No primeiro e no sétimo dia após a imposição dos tratamentos hídricos, foram realizadas análises das seguintes características ecofisiológicas: teor relativo de clorofila na folha (Unidades SPAD) (SPAD, MINOLTA SPAD 502 OSAKA, JAPAN), e eficiência quântica máxima do Fotossistema II (FV/FM) (POCKET PEA CHLOROPHYLL FLUORIMETER).

Após 14 dias de déficit hídrico, a irrigação de todas as plantas foi reestabelecida e mantida em nível adequado (capacidade de campo) até o fim do ciclo. As espigas foram colhidas e os seguintes parâmetros foram analisados: comprimento de espigas (CE), diâmetro de espigas (DE), número de grãos na fileira (NGF), massa da espiga (ME), massa de grãos (MG).

Para a análise da morfologia do sistema radicular foi utilizado o sistema de análise de imagens WinRhizo Pro 2007 (REGENT INSTRUMENTS, SAINTE-FOY, QC, CANADÁ) acoplado a um scanner profissional (EPSON, EXPRESSION 10000 XL, EPSON AMERICA, INC., USA) equipado com unidade de luz adicional (TPU). Os procedimentos para a obtenção das imagens foram realizados conforme descrito por Souza et al. (2012). Foram determinadas as seguintes características da raiz: comprimento total (CTR), área superficial (ASR), diâmetro médio (DMR), volume (VR), e ainda o comprimento e volume de raiz por classe de diâmetro. As raízes foram classificadas segundo três classes de diâmetro: raízes muito finas (\emptyset inferior a 0,5 mm), raízes finas ($0,5 > \emptyset < 2,0$ mm) e raízes grossas ($\emptyset > 2,0$ mm). A definição destas classes foi baseada no critério de classificação de raízes proposto por Bohm (1979). Em seguida, a massa seca foi determinada com a secagem das raízes em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até essas atingirem massa constante, e posteriormente foi realizada sua pesagem.

Para análise estatística dos resultados, foi utilizada a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Scott-Knott, a 0,05% de significância ($P \leq 0.05$), no programa estatístico Sisvar versão 4.3 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, LAVRAS, BRASIL).

3. RESULTADOS

Os inoculantes de maneira geral promoveram efeitos benéficos para ambos os genótipos de milho expostos a condição de déficit hídrico, aumentando a produção (Tabela 1). Sendo a coinoculação com Azos+Bac, responsável por promover maiores médias em todos os parâmetros avaliados para o híbrido sensível a seca e para o tolerante, com exceção do CE. Quando as plantas foram mantidas sob irrigação ótima durante todo o ciclo da cultura, a inoculação com *Azospirillum* isolado (Azos), resultou em acréscimo nas médias de todos os parâmetros para o

DKB390. A combinação de Azos+Bac resultou em maiores ME e MG para o híbrido P30F53 (Tabela 1).

Tabela 1. Comprimento de Espigas (CE), Diâmetro de Espigas (DE), Número de Grãos na fileira (NFG), Massa de Espigas (ME), Massa de Grãos (MG), de dois milhos híbrido (DKB390 e P30F53) submetidos a dois regimes hídricos (Déficit hídrico e Capacidade de Campo) e tratados com diferentes inoculantes (Cont = Controle, Azos = *Azospirillum brasilense*, Azos + Bac = Combinação entre *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp).

	Déficit Hídrico									
	CE (cm)		DE (cm)		NFG		ME (g)		MG (g)	
	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53
Cont	10.75Ba	10.37Ba	45.54Aa	37.04Bb	27.50Ba	14.25Bb	135.66Aa	125.43Ba	125.17Aa	96.40Bb
Azos	12.87Aa	12.50Aa	42.51Aa	41.38Aa	26.50Ba	24.75Aa	128.94Aa	126.85Ba	113.35Ba	104.19Ba
Azos+Bac	11.12Ba	11.75Aa	42.91Aa	45.07Aa	29.00Aa	26.00Aa	143.55Aa	154.04Aa	129.95Aa	139.49Aa
CV%	7.78		6.99		8.84		6.36		6.81	
	Capacidade de Campo									
	CE (cm)		DE (cm)		NFG		ME (g)		MG (g)	
	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53
Cont	11.12Bb	13.87Aa	46.29Ba	47.26Aa	24.25Ba	26.00Ba	115.95Ca	92.30Cb	102.20Ca	69.76Cb
Azos	13.25Aa	13.62Aa	49.10Aa	46.21Ab	27.00Aa	21.25Cb	178.92Aa	124.91Bb	155.62Aa	110.46Bb
Azos+Bac	11.62Bb	12.50Ba	47.19Ba	46.31Aa	29.50Aa	30.25Aa	134.94Bb	156.64Aa	118.43Bb	136.68Aa
CV%	5.74		3.06		9.76		5.88		7.87	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na vertical, ou minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de significância ($P>0,05$).

Em relação ao teor relativo de clorofila na folha, não houve diferença estatística para o DKB390, quando submetido ao déficit hídrico. Já para o P30F53, plantas inoculadas com Azos apresentaram maior índice SPAD no início do período de déficit hídrico (1DTH), porém esse resultado não se manteve com o avanço do estresse (Figura 4A). Quando as plantas foram cultivadas durante todo seu ciclo com irrigação, o inoculante Azos conferiu maiores valores relativos de clorofila para ambos os genótipos nos dois períodos de avaliação (Figura 1B).

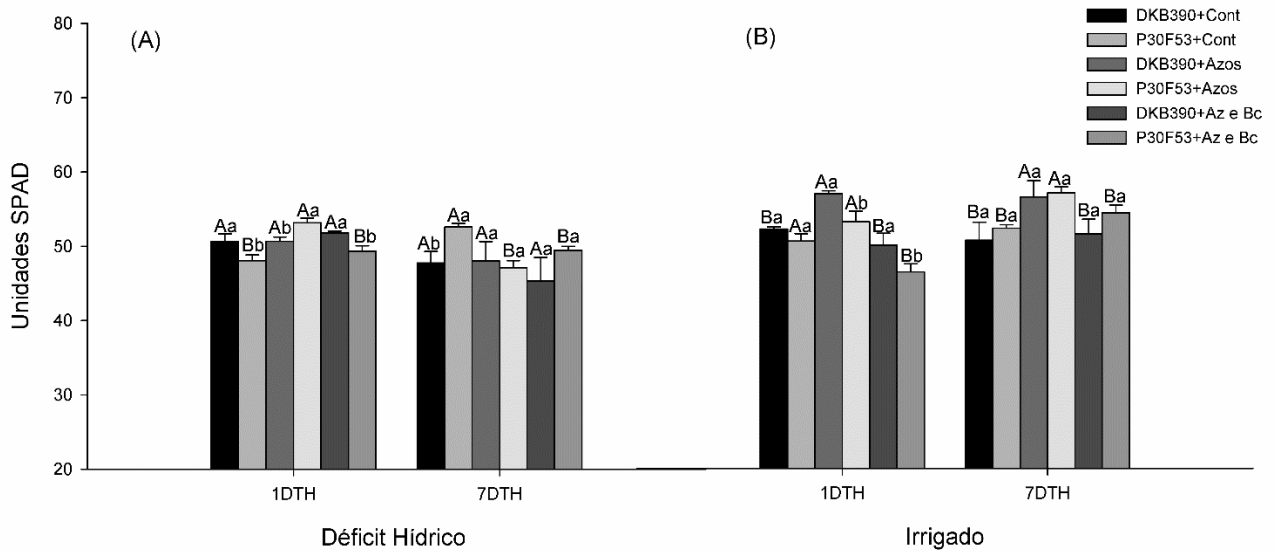


Figura 1. Teor relativo de clorofila na folha (Unidades SPAD) de dois híbridos de milho (DKB390 e P30F53), tratados com diferentes inoculantes (Cont = Controle, Azos = *Azospirillum brasilense*, Azos+Bac = *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp.) e mantidos sob dois regimes hídricos (Déficit hídrico e Capacidade de campo). Avaliação com um (1DTH) e sete dias (7DTH) de tratamento hídrico. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para inoculante, ou minúscula para híbridos, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de significância ($P > 0,05$).

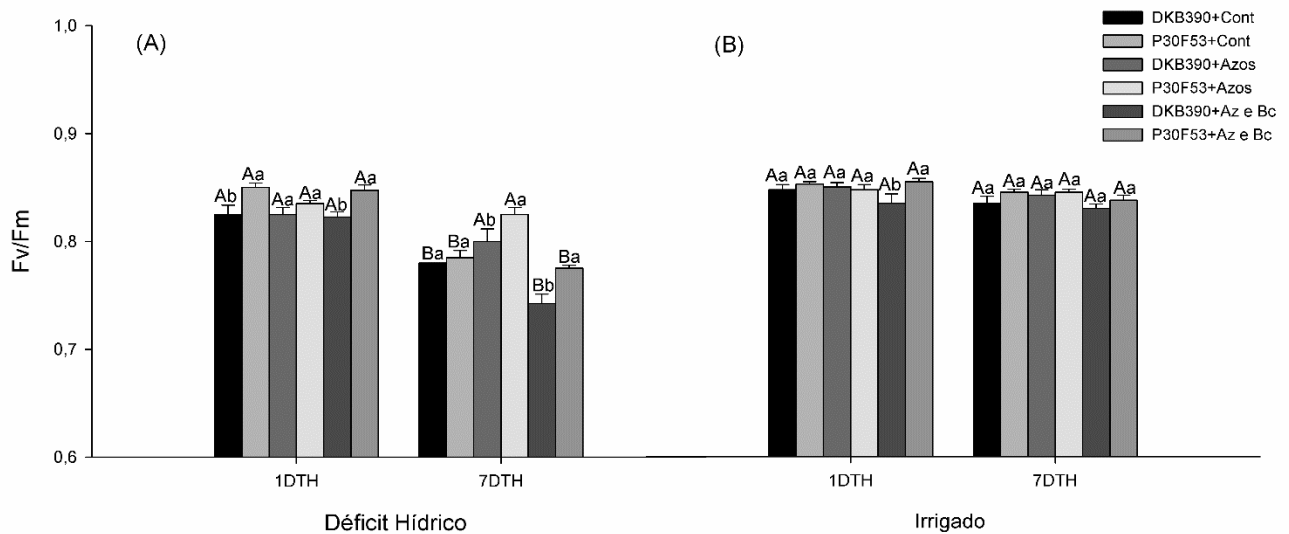


Figura 2. Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) de dois híbridos de milho (DKB390 e P30F53) tratados com diferentes inoculantes (Cont = Controle, Azos = *Azospirillum brasilense*, Azos+Bac = *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp.) e mantidos sob dois regimes hídricos (Déficit hídrico e Capacidade de campo). Avaliação com um (1DTH) e sete dias (7DTH) de tratamento hídrico. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para inoculante, ou minúscula para híbridos, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de significância ($P > 0,05$).

De maneira geral, considerando que valores menores que 0,75 para a relação FV/FM seriam indicativos de condições inibitórias do FSII, essa inibição ocorreu apenas em plantas expostas ao déficit hídrico após sete dias de estresse (7DTH), contudo o inoculante Azos proporcionou

maiores valores tanto para o DKB390, quanto para o P30F53 (Figura 2A). Para tratamentos cultivados sob Capacidade de Campo, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 2B).

Na análise das características morfológicas de raiz, sob condição de déficit hídrico, para o híbrido tolerante a seca, DKB390, a inoculação com *Azospirillum* (Azos) proporcionou um acréscimo na média dos parâmetros avaliados, exceto para DMR. A inoculação com *Azospirillum* + *Bacillus* (Azos+Bac) proporcionou aumento apenas em DMR e VR. Entretanto, nessa condição de estresse, o oposto foi verificado com o híbrido susceptível, P30F53, onde apenas no tratamento sem inoculação (Controle) as médias foram estatisticamente superiores aos tratamentos com inoculantes. Quando cultivado sob condição ótima de irrigação (Capacidade de Campo), o híbrido DKB390 não apresentou diferenças na morfologia de suas raízes entre controle e uso de inoculantes, exceto para a característica MSR, que na presença dos inoculantes apresentou valores maiores. Já para o híbrido P30F53, a inoculação de Azos+Bac promoveu aumento nas características CTR, ASR e VR, quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Comprimento Total de Raiz (CTR), Área Superficial de Raiz (ASR), Diâmetro Médio de Raiz (DMR), Volume de Raiz (VR) e Massa Seca de Raiz (MSR), dos híbridos de milho DKB390 e P30F53 submetidos a dois regimes hídricos (Déficit hídrico e Capacidade de Campo) e tratados com diferentes inoculantes (Cont = Controle, Azos = *Azospirillum brasilense*, Azos+Bac = Combinação entre *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp.).

	Déficit Hídrico									
	CTR (cm)		ASR (cm ²)		DMR (mm)		VR (cm ³)		MSR (g)	
	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53
Cont	1806.95Bb	9857.05Aa	639.12Bb	2389.17Aa	1.36Ab	2.15Aa	123.77Bb	338.62Aa	10.74Bb	21.66Aa
Azos	3409.20Aa	3386.17Ba	1167.30Aa	1124.72Ba	1.21Aa	1.22Ba	159.27Aa	170.37Ba	12.97Aa	12.77Ca
Azos+Bac	2345.20Bb	3979.95Ba	824.52Bb	1358.10Ba	1.21Aa	1.25Ba	146.82Aa	198.72Ba	11.21Bb	17.26Ba
CV%	12.24		20.92		13.63		19.37		11.45	
	Capacidade de Campo									
	CTR (cm)		ASR (cm ²)		DMR (mm)		VR (cm ³)		MSR (g)	
	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53	DKB390	P30F53
Cont	2881.82Aa	3086.21Ba	952.70Ab	1136.84Ba	1.25Ab	1.58Aa	180.22Aa	189.29Ba	12.09Bb	13.56Aa
Azos	2378.87Ab	3519.38Ba	993.48Aa	1103.08Ba	1.42Aa	1.30Ba	183.54Aa	205.52Ba	13.83Aa	13.12Aa
Azos+Bac	2520.85Ab	4042.89Aa	1031.12Ab	1541.52Aa	1.34Aa	1.21Ba	186.16Ab	311.13Aa	13.45Aa	13.73Aa
CV%	13.07		9.28		10.35		8.05		7.19	

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na vertical, ou minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de significância (P>0,05).

Ao separar as raízes dos genótipos de milho em classes de diâmetro, foi possível observar como que se caracterizaram, detalhadamente, os sistemas radiculares de ambos os híbridos. O híbrido P30F53 apresentou maiores médias para todos os parâmetros radiculares avaliados,

quando as plantas foram expostas a seca (Déficit Hídrico) e não inoculadas com nenhum microrganismo (Controle). Com relação ao DKB390, a inoculação com cepas de *Azospirillum*, resultou em maior comprimento de raízes muito finas (CRMF) e de raízes finas (CRF), quando comparado aos demais tratamentos, sob restrição hídrica (Fig. 3 A, C e E). Plantas deste mesmo genótipo cultivadas sob irrigação ótima (Capacidade de Campo), apresentaram menor desenvolvimento de raízes muito finas e finas (CRMF e CRF), investindo assim em comprimento de raízes grossas (CRG) (Fig. 3 B, D e F). Imagens dos sistemas radiculares podem ser observadas na figura 4.

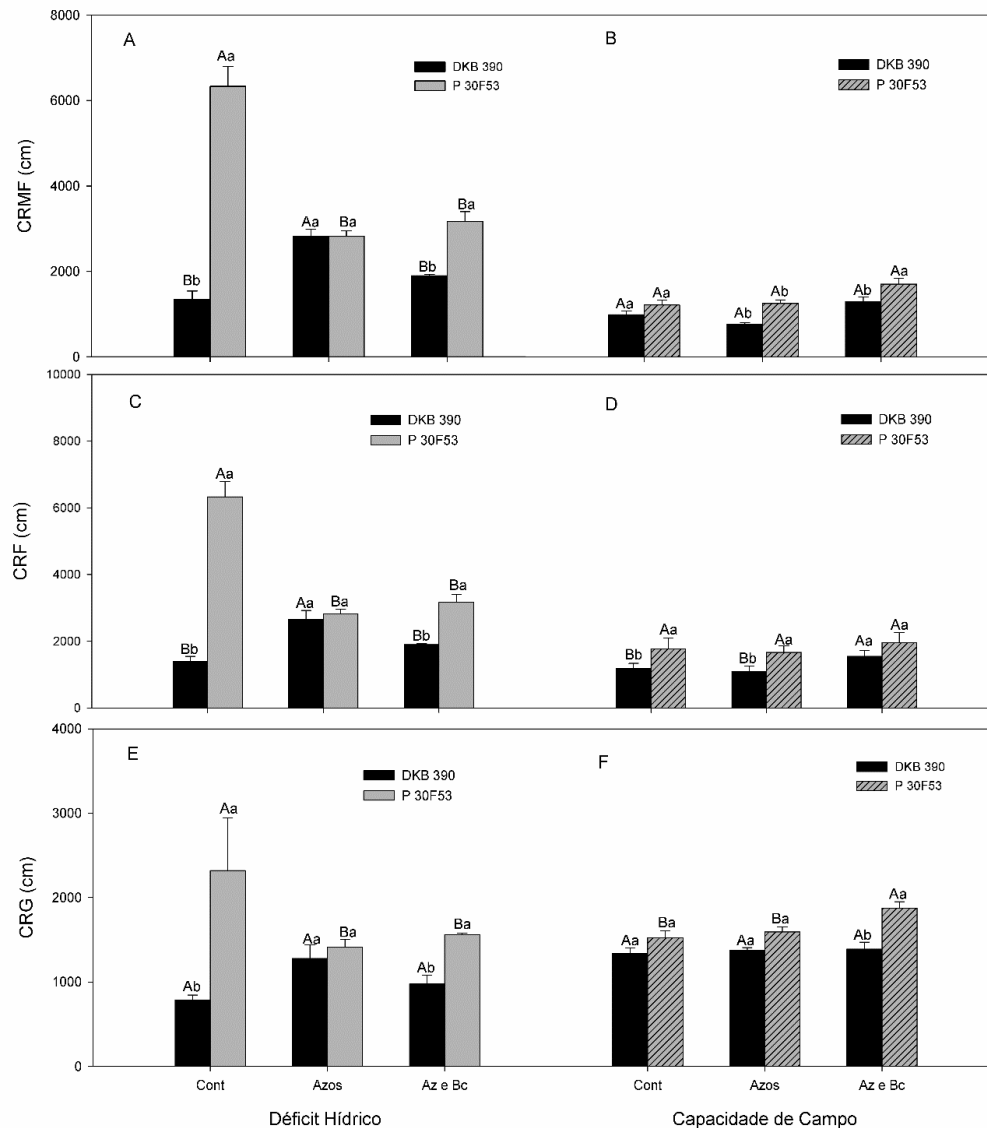


Figura 3. Comprimento de raízes de acordo com a classe de diâmetro. CRMF - Comprimento de raízes muito finas, CRF - comprimento de raízes finas e CRG - comprimento de raízes grossas, dos híbridos de milho DKB390 e P30F53, tratados com inoculantes (Cont = Controle, Azos = *Azospirillum brasilense*, Azos+Bac = *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp.) e submetidos a dois regimes hídricos: Déficit hídrico (A, C e E) e capacidade de campo (B, D e F). Médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os tratamentos

inoculados. Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem entre si para os híbridos, pelo teste de Scott-Knott à 5% de significância ($P>0,05$).

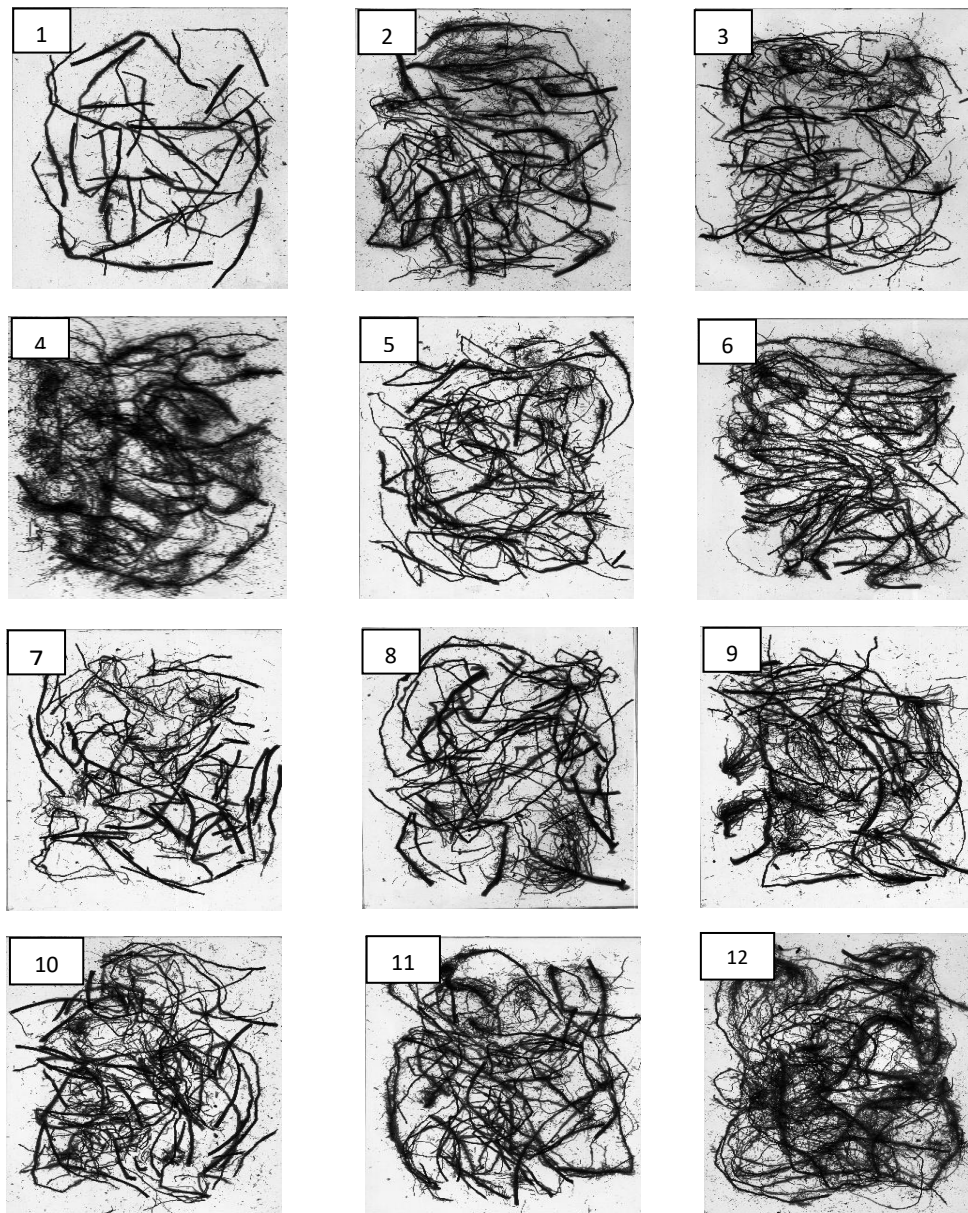


Figura 4. Sistema radicular de híbridos de milho (DKB390 e P30F53), tratados com diferentes inoculantes (Cont = Controle, Azos = *Azospirillum brasilense*, Azos+Bac = *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp.) e mantidos sob dois regimes hídricos (Déficit hídrico e capacidade de campo). (1) DKB390/Controle/Déficit hídrico. (2) DKB390/Azos/Déficit hídrico. (3) DKB390/Azos+Bac/Déficit hídrico. (4) P30F53/Controle/Déficit hídrico. (5) P30F53/Azos/Déficit hídrico. (6) P30F53/Azos+Bac/Déficit hídrico. (7) DKB 390/Controle/Capacidade de Campo. (8) DKB390/Azos/Capacidade de Campo. (9) DKB390/Azos+Bac/Capacidade de Campo. (10) P30F53/Controle/Capacidade de Campo. (11) P30F53/Azos/Capacidade de Campo. (12) P30F53/Azos+Bac/Capacidade de Campo. Imagens digitalizadas em escâner de mesa, usando o programa Winrhizo.

4. DISCUSSÃO

O estresse hídrico enfraquece a atividade metabólica do milho, diminui o acúmulo de biomassa e reduz a taxa fotossintética ao diminuir o teor de clorofila nas folhas, o que inevitavelmente leva a uma diminuição no rendimento do milho (SONG et al., 2019). A coinoculação de *Azospirillum* + *Bacillus* resultou no aumento no comprimento de espigas (CE), diâmetro de espigas (DE), número de grãos na fileira (NFG), massa de espigas (ME) e massa de grãos (MG) (Tabela 1). Em estudo sobre o uso de RPCPs em milho, Brum et al. (2016) relataram seus efeitos positivos nas características de rendimento e produtividade, independente do estágio de crescimento e do genótipo testado. De acordo com Naseri et al. (2013), a coinoculação de duas bactérias diazotróficas (*Azotobacter* e *Azospirillum*), resultou no aumento do número de grãos em espigas, possivelmente devido à produção de compostos promotores como os fitormônios auxinas e giberelinas. Díaz-Zorita et al. (2015), evidenciaram, em diversos ensaios de campo, principalmente na América Latina e Ásia, aumento de cerca de 10% no rendimento de grãos em cereais em resposta à inoculação com *Azospirillum* sp.

A diminuição no teor de clorofila é um fenômeno comumente observado (PIRBALOUTI et al., 2017) e uma consequência negativa do déficit hídrico, que, no entanto, tem sido considerada como uma característica adaptativa em plantas cultivadas em condições de seca. Neste estudo a inoculação de milho sob déficit hídrico com Azos, afetou o índice de clorofila foliar, promovendo valores superiores aos encontrados no milho não inoculado (Figura 1A). Plantas cultivadas sob irrigação durante todo seu ciclo, também apresentaram maior teor relativo de clorofila na folha com a inoculação desta bactéria promotora de crescimento em plantas (BPCPs) (Figura 1B). Este resultado corrobora com aqueles descritos por Longhini et al. (2016), que avaliaram a interrelação planta - *Azospirillum*, e encontraram um aumento em vários pigmentos fotossintéticos. Barassi et al. (2006) relataram melhorias nos parâmetros fotossintéticos das folhas, incluindo conteúdo de clorofila e condutância estomática, com maior produção de biomassa e aumento da altura da planta em milho inoculado com *Azospirillum brasilense*.

Os efeitos do estresse hídrico e RPCPs na fotossíntese das plantas foram determinados avaliando as mudanças nos valores da relação Fv/Fm. A razão Fv/Fm é a eficiência máxima na qual a luz é absorvida pelo PSII e é usada como um indicador sensível do desempenho fotossintético da planta. Assim, uma redução nos valores deste parâmetro (menor que 0,75) indica os efeitos destrutivos do estresse no PSII e declínio na fotossíntese da planta (YAGHOUBIAN et al., 2016). No presente estudo, o comprometimento da atividade do PSII foi induzido por estresse hídrico de longo prazo, contudo a inoculação de *Azospirillum brasilense* melhorou a relação

Fv/Fm. Esse aumento pode estar relacionado à redução do estresse foto-oxidativo (Figura 2A e B). Resultados semelhantes foram relatados anteriormente em trigo (SINGH; JHA, 2016), grão de bico (KUMAR et al., 2016), milho (ROJAS-TAPIAS et al., 2012) e milheto (CHANDRA et al., 2018).

A distribuição, o comprimento e o diâmetro, e as propriedades do sistema radicular, determinam o acesso das plantas à água e, assim, estabelecem limites na tolerância à condição de restrição hídrica. O sistema radicular das plantas de milho, é composto sobretudo por raízes grossas e finas, as raízes grossas apresentam funções de ancoragem e tipicamente estabelecem a arquitetura geral do sistema radicular, controlando a profundidade e capacidade das plantas em crescer em direção as camadas mais profundas do solo (HENRY et al., 2012). As raízes finas são a parte mais ativa do sistema radicular na absorção de água e compreendem a maior parte do comprimento e área de superfície desses sistemas radiculares (COMAS et al., 2013).

O híbrido P30F53 desenvolveu um sistema radicular mais longo, com maior área superficial e volume, quando exposto ao déficit hídrico, sem nenhuma inoculação (Tabela 2). Esses resultados provavelmente estão relacionados as suas características genéticas, as quais permitem que esses sejam caracterizados como sensíveis ou tolerantes a condição de restrição hídrica, dado que ao provocar a secagem superficial do solo, há o estímulo para expansão das raízes, as quais se aprofundam no solo em busca de umidade (GONÇALVES, 2013). Nessas condições, as plantas mais sensíveis investem no desenvolvimento do sistema radicular, aumentando o comprimento das raízes.

Situação interessante foi observada no cultivo do P30F53 sob irrigação ótima. Não havendo restrição hídrica, o sistema radicular tendeu a se desenvolver menos e apenas superficialmente, no entanto a coinoculação com Azos+Bac, aumentou o comprimento total de raiz (CTR), área superficial de raiz (ASR) e o volume de raiz (VR) deste genótipo (Tabela 2). Estudos têm demonstrado que os efeitos benéficos do *A. brasilense* nas plantas podem ser potencializados pela coinoculação com outros microrganismos. Em estudo com sementes de milho coinoculadas com cianobactérias e *Azospirillum brasilense*, Zambrano et al. (2019) determinaram que a coinoculação promove maior desenvolvimento dos genótipos testados, principalmente devido ao seu efeito no crescimento do sistema radicular, com grande potencial para seu uso na cultura do milho.

Segundo Magalhães et al (2014), diferente do P30F53, o genótipo DKB390 investe principalmente em mecanismos fisiológicos em nível de parte aérea para manutenção da produtividade, por minimizar a perda de água, o que diminui a dependência de investimentos em nível de raiz para aumentar a captura de água. Neste contexto, a inoculação com cepas de

Azospirillum brasilense, melhorou o comprimento de raízes muito finas (CRMF) e comprimento de raízes finas (CRF) deste genótipo quando exposto ao déficit hídrico (Fig. 2 A, C). O volume de solo explorado pelas raízes e o contato íntimo entre a superfície radicular e o solo, são necessários para a absorção efetiva da água pelas raízes, sendo esse contato maximizado quando a planta emite raízes de menor diâmetro, aumentando a área superficial e a capacidade de absorção de água. De acordo com Pedreira *et al.* (2017), o crescimento das raízes em gramíneas inoculadas com *A. brasilense* está relacionado à produção e liberação de fitormônios como auxinas, às plantas, que estimula a diferenciação nos tecidos meristemáticos.

A inoculação de *Azospirillum* em milho pode estimular o desenvolvimento do sistema radicular, aumentando a resistência ao estresse hídrico, promovendo maior teor de clorofila nas folhas, maior fotossíntese e em consequência, resultando em maior produção. Neste trabalho, assim como o observado por Quadros *et al.* (2014) os híbridos estudados responderam de forma diferente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, sugerindo que o genótipo da planta desempenha papel importante na colonização pelas bactérias, o que deve estar relacionado com a relação rizosfera/bactéria e, por isto, faz-se necessário o estudo de híbridos de milho que tenham boa resposta agrônômica à inoculação.

5. CONCLUSÃO

Assim como relatado anteriormente por diversos autores, observamos no presente estudo respostas positivas do uso de *Azospirillum brasilense* em milho sob déficit hídrico, promovendo a superação deste estresse por meio de melhora nas características fisiológicas e morfológicas das plantas. No entanto, a coinoculação de estirpes de *Bacillus* spp. + *Azospirillum brasilense*, contribuiu dentre outras questões, para um aumento no desempenho produtivo de ambos os híbridos de milho. Para algumas características avaliadas notou-se que a resposta do milho à inoculação depende do híbrido testado. Mais investigações são necessárias afim de explorar questões como modos de ação, formulação, aplicação, estabilidade em condições de campo e triagem de cepas eficientes e compatíveis com cada genótipo de plantas.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro. A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada.

REFERÊNCIAS

- ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **J. Exp. Bot.**, v. 63, n. 10, p. 3523-3543, 2012.
- BAKHSH, A.; HUSSAIN, T. Engineering crop plants against abiotic stress: current achievements and prospects. **Emir. J. Food Agric.**, v. 27, p. 24-39, 2015.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, 1997.
- BARASSI, C. A.; AYRAULT, G.; CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; SOBERO, M. T. Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. **Sci Horti**, v. 109, p. 8-14, 2006.
- BOHM, W. Methods of studying root system. Berlin: **Springer Verlag**, 1979.
- BRUM, M. S.; CUNHA, V. D. S.; STECCA, J. D. L.; GRANDO, L. F. T.; MARTIN, T. N. 2016. Components of corn crop yield under inoculation with *Azospirillum brasilense* using integrated crop-livestock system. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 485-492, 2016.
- CHANDRA, D.; SRIVASTAVA, R.; GLICK, B. R.; SHARMA, A. K. Drought-Tolerant *Pseudomonas* spp. improve the growth performance of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) under non-stressed and drought-stressed conditions. **Pedosphere**, v. 28, p. 227-240, 2018.
- CHIBEBA, A. M.; GUIMARÃES, M. D. F.; BRITO, O. R.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **Am J Plant Sci**, v. 6, p. 1641-1649, 2015.
- COMAS, L. H.; BECKER, S. R.; CRUZ, V. M. V.; BYRNE, P. F.; DIERIG, D. A. 2013. Root traits contributing to plant productivity under drought. **Front Plant Sci**, v. 4, p. 1-16, 2013.
- DARYANTO, S.; WANG, L.; JACINTHE, P. A. Drought effects on root and tuber production: a meta-analysis. **Agric. Water Manag.** v. 176, p. 122-131, 2016.
- DARTORA, J.; MARINI, D.; GONÇALVES, E. D. V.; GUIMARÃES, V. F. Coinoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 20, n. 6, p. 545-550, 2016.
- DAS, R. R.; VINAYAN, M. T.; SEETHARAM, K.; PATEL, M.; PHAGNA, R. K.; SINGH, S. B.; SHAHI, J. P.; SARMA, A.; BARUA, N. S.; BABU, R.; ZAIDI, P. H. Genetic gains with genomic versus phenotypic selection for drought and waterlogging tolerance in tropical maize (*Zea mays* L.). **The Crop Journal**, v. 9, n. 6, p. 1438-1448, 2021.
- DÍAZ-ZORITA, M.; CANIGIA, M. V. F.; BRAVO, O. Á.; BERGER, A.; SATORRE, E. H. Field Evaluation of Extensive Crops Inoculated with *Azospirillum* sp. In: **Handbook for Azospirillum**. Springer, 2015, p 435-445.
- FAO, 2019. Faostat. Verified. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 27/07/2021.
- GAZOLA, T.; DOMINGUES, M. C. C.; DIAS, M. F.; CIPOLA FILHO, M. L.; BELAPART, D.; CASTRO, E. B. de. Efeitos da inoculação de *Azospirillum brasilense* em área de pastagem. **Revista Unimar Ciências**, v. 24, p. 40-48, 2015.

GONÇALVES, J. G. R. **Identificação de linhagens de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerantes à seca**. 2013. 82p. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.

GOUDA, S.; KERRY, R. G.; DAS, G.; PARAMITHIOTIS, S.; SHIN, H. S.; PATRA, J. K. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiol. Res.** v. 206, p. 131-140, 2018.

HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: OKON, Y. (Ed). *Azospirillum/plant associations*. Boca Raton: **CRC Press**, p. 15-39, 1994.

HENRY, Amelia et al. Root attributes affecting water uptake of rice (*Oryza sativa*) under drought. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 13, p. 4751-4763, 2012.

HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, 2008, p. 17-35.

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

IBRAHIM, M. M.; EL-BAROUDY, A. A.; TAHA, A. M. Irrigation and fertigation scheduling under drip irrigation for maize crop in sandy soil. **Int. Agrophys.** v. 30, p. 47-55, 2016.

JALEEL, C. A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; INES, J.; AL-JUBURI, H. J.; CHANG-XING, Z.; HONG-BO, S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiol Plant**, v. 31, p. 427-436, 2009.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; RIZVI, A.; SAIF, S. Inoculation effects of associative plant growth promoting Rhizobacteria on the performance of legumes. In: ZAIDI, A, KHAN, M, MUSARRAT, J. editors. **Microbes for Legume Improvement**. Springer, Cham. 2017, p. 261-276.

KOEVOETS, I. T.; VENEMA, J. H.; ELZENGA, J. T. M.; TESTERINK, C. Roots withstanding their environment: Exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1335, 2016.

KUMAR, M.; MISHRA, S.; DIXIT, V.; KUMAR, M.; AGARWAL, L.; CHAUHAN, P. S.; NAUTIYAL, C. S. Synergistic effect of *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Signal. Behav**, v. 11, e1071004, 2016.

LONGHINI, V. Z.; SOUZA, W. C. R.; ANDREOTTI, M.; SOARES, N. A.; COSTA, N. R. Inoculation of diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization in topdressing in irrigated corn. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 2, p. 338-347, 2016.

MARINI, D.; GUIMARÃES, V. F.; DARTORA, J.; LANA, M. C.; PINTO JÚNIOR, A. S. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, v. 62, n. 1, p. 117-123, 2015.

MARTINS, F. A. D.; ANDRADE, A. T.; CONDÉ, A. B. T.; GODINHO, D. B.; CAIXETA, C. G.; COSTA, R. L.; POMELA, A. W. V.; SOARES, C. M. S. Avaliação de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, p. 103-110, 2012.

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

NASERI, R.; MOGHADAM, A.; DARABI, F.; HATAMI, A.; TAHMASEBEI, G. R. The effect of deficit irrigation and *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* on grain yield, yield components of maize (SC 704) as a second cropping in western Iran. **Bull Env Pharmacol Life Sci**, v. 2, p. 104-112, 2013.

PEDREIRA, B. C. E.; BARBOSA, P. L.; PEREIRA, L. E. T.; MOMBACH, M. A.; DOMICIANO, L. F.; PEREIRA, D. H.; FERREIRA, A. Tiller density and tillering on *Brachiaria brizantha* cv. Marandu pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 4, p. 1039-1046, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9034>>.

PIERIK, R.; TESTERINK, C. The art of being flexible: How to escape from shade, salt, and drought. **Plant Physiology**, v. 166, p. 5-22, 2014.

PIRBALOUTI, A. G.; MALEKPOOR, F.; SALIMI, A.; GOLPARVAR, A. Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimumciliatum* and *Ocimumbasilicum*) under reduced irrigation. **Scientia Horticulturae**, v. 201, n. 15, p. 114-122, 2017.

QUADROS, P. D. de; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F. da; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; CAMARGO, F. A. de O. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 61, n. 2, p. 209-218, 2014.

REIS, D. P. **Produtividade de milho e ecologia microbiana da rizosfera de plantas sob diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio.** 61p, 2015. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del Rei, São João Del Rei.

RODRIGUES, R. A. F.; ARF, O.; PORTUGAL, J. R.; CORSINI, D. C. Co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* in common beans grown under two irrigation depths. **Revista Ceres**, v. 63, n. 2, p. 198-207, 2016.

ROJAS-TAPIAS, D.; MORENO-GALVÁN, A.; PARDO-DÍAZ, S.; OBANDO, M.; RIVERA, D.; BONILLA, R. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Appl. Soil Ecol**, v. 61, p. 264-272, 2012.

SINGH, J. S.; SENEVIRATNE, G. Agro-environmental sustainability. In: *Managing Environmental Pollution*. **Springer International Publishing**, Dordrecht, Netherlands, v. 2, p. 229, 2017.

SINGH, R. P.; JHA, P. N. The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). **PLoS One**, v. 11, e0155026, 2016.

SONG, Song et al. Production of terephthalic acid from corn stover lignin. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 15, p. 4934-4937, 2019.

SOUZA, T. C.; CASTRO, E. M.; MAGALHÃES, P. C.; ALVES, E. T.; PEREIRA, F. J. 2012. Early characterization of maize plants in selection cycles under soil flooding. **Plant Breed**. v. 131, n. 4, p. 493-501, 2012.

TIWARI, S.; LATA, C. Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: an overview. **Front. Plant Sci.** v. 9, p. 1-12, 2018.

YAGHOUBIAN, Y.; SIADAT, S.; TELAVAT, M. M.; PIRDASHTI, H. Quantify the response of purslane plant growth, photosynthesis pigments and photosystem II photochemistry to cadmium concentration gradients in the soil. **Russ. J. Plant Physiol**, v. 63, p. 77-84, 2016.

YEGORENKOVA, I. V.; TREGUBOVA, K. V.; BURYGIN, G. L.; MATORA, L. Y.; IGNATOV, V. V. Assessing the efficacy of co-inoculation of wheat seedlings with the associative bacteria *Paenibacillus polymyxa* 1465 and *Azospirillum brasilense* Sp245. **Canadian journal of microbiology**, v. 62, n. 3, p. 279-285, 2016.

ZAMBRANO, G. F.; SOUZA, A. D.; ZUCARELI, C.; SARKIS Y. J.; AMARAL, H.; COSTA, M. R.; RAIA, D.; GARCIA, A.; GUIMARÃES, M. F. Efecto de la inoculación con cianobacterias y coinoculación con *Azospirillum brasilense* sobre características fitométricas en maíz. **Bioagro**, v. 31, n. 3, 2019.

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

ARTIGO 2 - Norma NBR 6022 (ABNT 2018)

EFETOS DA INOCULAÇÃO COMBINADA DE RIZOBACTÉRIAS EM MILHO SOB DIFERENTES REGIMES DE IRRIGAÇÃO

RESUMO

O estresse por seca é um estresse que causa grandes prejuízos na produtividade agrícola a cada ano. Em resposta, as plantas passam por várias modificações podendo ter danos permanentes e resultando em quebra na produção. Várias adaptações e estratégias de mitigação são necessárias para lidar com o déficit hídrico. As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) podem desempenhar um papel significativo no alívio do estresse hídrico em plantas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito potencial da inoculação única e da coinoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* e de *Bacillus* spp. no desenvolvimento e desempenho produtivo de milho sob três regimes de irrigação. Estirpes homólogas de *Azospirillum brasilense* (Azos), de *Bacillus* spp (Bac), bem como da mistura de estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp. (A+B), todos na proporção 1:1 foram inoculadas em sementes do híbrido de milho DKB390 Pro3. O experimento foi conduzido em campo e ao atingirem o estágio de desenvolvimento V6, as plantas foram submetidas à três regimes hídricos: irrigação plena (reposição de 100% da evapotranspiração da cultura), déficit hídrico moderado (redução de 59% da lâmina de água da irrigação plena) e déficit hídrico severo (reposição de 32% da lâmina de água da irrigação plena). Os resultados mostraram que sob déficit hídrico, o tratamento A+B atuou no desenvolvimento do sistema radicular, promovendo incremento no número de raízes e na formação de raízes mais longas, profundas e finas. Sob regime de irrigação plena, os inoculantes Azos, Bac e A+B, aumentaram a concentração de N na parte aérea das plantas. Em plantas sob déficit hídrico, a coinoculação de A+B resultou em maiores concentrações de N e P na parte aérea das plantas. Houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em plantas com irrigação plena, bem irrigadas na presença de rizobactérias. As RPCPs também interferiram na regulação das enzimas antioxidantes analisadas, atenuando o dano oxidativo em plantas sob déficit hídrico. Os tratamentos Azos e a combinação A+B, promoveram maior massa de espigas e massa de grãos em comparação aos demais tratamentos, em plantas expostas à déficit hídrico severo. A inoculação de Azos e a coinoculação A+B também resultou em aumento de, respectivamente, 13,3% e 15,2% na produção de plantas com irrigação plena.

Palavras-chave: *Zea mays* L.. Irrigação por aspersão Line-source. *Azospirillum* Brasilense. *Bacillus* spp.

1. INTRODUÇÃO

A seca é um estresse multidimensional, de difícil monitoramento, de natureza recorrente e geralmente não se limita a uma região ou período de tempo específico (SALEHI-LISAR, BAKHSHAYESHAN-AGDAM, 2016). Para resistir à falta de água, as plantas usam diferentes mecanismos de enfrentamento do estresse, como sinalização por síntese de espécies reativas de oxigênio, produção de hormônios do estresse como etileno e ácido abscísico e mudanças na morfologia da raiz e do caule (ETESAMI et al., 2015; CHIAPPERO et al., 2019; BHAT et al., 2021). É imperativo desenvolver métodos que possam aumentar os níveis de tolerância de uma planta a seca, permitindo um melhor crescimento e produção de safras, a fim de satisfazer a necessidade cada vez maior de alimentos. Existem muitas pesquisas voltadas para o desenvolvimento de tecnologias que promovam práticas agrícolas sustentáveis, que favorecem o aumento da produtividade da cultura, bem como maior tolerância ao déficit hídrico (ALI et al., 2011; ANSARY et al., 2012; PARK et al., 2017; ZAFAR-UL-HYE et al., 2014). Em alguns métodos, as interações planta-microrganismos benéficos são exploradas e são consideradas áreas promissoras para o foco de desenvolvimentos agrícolas sustentáveis.

Microrganismos benéficos do solo, como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) produzem grandes quantidades de substâncias que promovem o crescimento das plantas (CAMELE et al., 2019). Eles são capazes de produzir exopolissacarídeos, fitohormônios, compostos voláteis, induzir o acúmulo de osmólitos e antioxidantes, de regular positiva ou negativamente genes responsivos ao estresse e alterar a morfologia radicular (LIM, KIM et al., 2013; TIMMUSK et al., 2014; VURUKONDA et al., 2016), influenciando direta e indiretamente o crescimento e a morfologia das plantas, e conseqüentemente, aumentando o desenvolvimento e a produção. Uma característica notável é sua capacidade de auxiliar plantas em ambientes estressados. Eles podem proteger as plantas contra os efeitos prejudiciais de vários estresses ambientais, como secas e temperaturas elevadas (CHUKWUNEME et al., 2020; HASSAN et al., 2020; PEREIRA et al., 2020). Muitos gêneros de bactérias são classificados como RPCPs, dentre estas destacam-se as bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, dentre outras (BALDANI, BALDANI, 2005; FUKAMI et al., 2018).

A coinoculação de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas é considerada uma abordagem inovadora na melhoria do rendimento e da qualidade das culturas (GAVILANES et al., 2020; MARIMUTHU et al., 2002; PEREIRA et al., 2020). A ideia é combinar linhagens ou espécies atuando em diferentes processos microbianos, de modo que as características combinadas de cada uma resultem em maiores benefícios e, em última análise, maiores

rendimentos. Exemplos de inoculantes mistos são aqueles que combinam microrganismos cujos principais processos são a fixação de nitrogênio como no caso de *Bradyrhizobium* spp. e *Rhizobium* spp., a produção de fitohormônios como *Azospirillum* spp. e *Pseudomonas* spp., a solubilização de fosfato realizada como por exemplo por *Bacillus* spp., ou o controle biológico por *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. (SANTOS et al., 2019). A aplicação de misturas imitaria a situação natural, tendo o potencial de ampliar o espectro de atividade de promoção do crescimento em plantas.

Uma característica importante do uso de *Azospirillum* é que a inoculação é mais bem sucedida e lucrativa quando outros microrganismos são coinoculados (BASHAN; HOLGUIN, 1997). Existem vários exemplos de coinoculação com *Azospirillum brasilense*, em diversas culturas, como *Bradyrhizobium* em soja (CHIBEBA et al., 2015; HUNGRIA et al., 2015), *Rhizobium tropici* em feijão (HUNGRIA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016), *Paenibacillus polymyxa* em trigo (YEGORENKOVA et al., 2016), entre outros. Porém poucos relatos trazem informações sobre a coinoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* ssp. na cultura do milho. Estes dois gêneros são conhecidos e estudados há décadas, *Azospirillum* por causa da sua capacidade de fixação de nitrogênio e produção de fito-hormônios (FUKAMI et al., 2016; FUKAMI et al., 2018; HUNGRIA et al., 2010) e *Bacillus* por sua eficiência em solubilizar fosfato, produzir ácidos orgânicos e proteger as plantas contra patógenos (DE ABREU et al., 2017; GOMES et al., 2014; SUBRAMANIAN; SMITH, 2015;).

A combinação de bactérias associativas mostra várias vantagens, como maior tolerância a ambientes com condições adversas, aumento na capacidade de competir com a comunidade microbiana nativa e melhora no crescimento das plantas em comparação com a inoculação única (KRUSUWAN; THAMCHAIPENET, 2016; YEGORENKOVA et al., 2016). A eficiência da coinoculação está intimamente relacionada à concentração celular de cada uma, seleção adequada das linhagens, método de inoculação e o genótipo da planta. Sendo assim, são necessárias pesquisas para gerar conhecimento visando a produção de novas formulações de inoculantes com bactérias mistas (CASSÁN et al. 2015). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito potencial da inoculação e da coinoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* e de *Bacillus* spp. no desenvolvimento e desempenho produtivo de milho sob três regimes de irrigação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Inoculantes

Os inoculantes utilizados, pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo, foram obtidos a partir da mistura de duas estirpes de *Azospirillum brasilense* homólogas (CMS11 e CMS1626), de estirpes de *Bacillus* spp. e da mistura das estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp., todos na proporção 1:1.

As estirpes selecionadas foram cultivadas em caldo de soja triplicaseína, durante 72h, a temperatura de 29°C sob agitação constante. Após esse período, as culturas de cada estirpe foram centrifugadas, ressuspensas em solução salina (0,85% NaCl) e ajustadas para densidade óptica igual a 1,0 em absorbância a 500 nm, que equivale a aproximadamente 10⁸ células viáveis por mL (REIS, 2015). A inoculação nas sementes foi realizada, utilizando-se como veículo o carvão vegetal moído e goma de fécula de mandioca como aderente.

2.2 Condições ambientais e delineamento experimental

O ensaio foi conduzido no campo experimental na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas – MG, Brasil, situada nas coordenadas geográficas: 19°28' S, 44°15'08'' W e altitude média de 732 m. A região tem clima tropical semiúmido, com clima quente e verões chuvosos e invernos secos, classificados como Cwa de acordo com Köppen (ALVARES et al., 2013). A estação chuvosa é geralmente de outubro a março e a estação seca de abril a setembro. O solo característico do local é classificado como do tipo Latossolo Vermelho Distrófico Argiloso, de fertilidade média.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com quatro repetições. Cada parcela foi composta por quatro linhas, com 4,25 m de comprimento, onde foram plantadas quatro sementes do híbrido de milho DKB390 PRO3 por metro e 0,70 m de distância entre linhas. A área útil da parcela foi constituída pelas duas linhas centrais. No plantio foi realizada adubação de base sendo aplicados 400kg/ha da fórmula 08-28-16 (NPK). Além da adubação de plantio, foi realizada adubação complementar com 118Kg/ha de N divididos em duas coberturas.

A área foi irrigada uniformemente desde a semeadura até 30 dias após o plantio (estádio de desenvolvimento V6), quando foram impostos os diferentes regimes hídricos, irrigação plena – 100%, déficit hídrico moderado – 59% e déficit hídrico severo – 32%, por meio do sistema de irrigação *Line-source* assim como mostrados na tabela 1. O manejo da irrigação foi feito com o auxílio da planilha eletrônica IrrigaFácil, realizando o balanço de água no solo diariamente (ALBUQUERQUE, ANDRADE, 2001). A água aplicada foi medida após cada evento de irrigação em coletores instalados no centro das parcelas experimentais, e sempre posicionados logo acima do dossel da cultura, acompanhando o crescimento das plantas. Foram computadas

as lâminas de água de irrigação e eventuais precipitações. Para minimizar a distorção do padrão de aspersão, a irrigação foi aplicada em condições de vento calmo ou fraco.

Tabela 1. Temperaturas máxima (T Max °C) e mínima (T Min °C), evapotranspiração (mm) (ALLAN et al., 1998) e quantidade de água recebida pelas plantas (lâmina de irrigação + precipitação (mm)) durante o período de experimental.

Mês	T Max °C	T Min °C	ET ₀ (mm)	Lâminas de Irrigação (mm) + Precipitação (mm)		
				100%	59%	32%
Abril	23.42	21.82	79.00	179.0	171.3	167.2
Mai	21.68	20.02	97.05	106.6	63.4	41.8
Junho	19.41	17.41	89.24	115.9	50.2	17.4
Julho	18.26	16.13	99.93	115.7	54.5	0.0
Agosto	21.23	19.37	127.48	132.7	53.4	0.0
Setembro	25.02	22.89	129.74	51.3	21.5	0.0
= Total			622.44	701.2	414.3	226.4

2.3 Análises

A arquitetura da raiz foi determinada utilizando a metodologia “Shovelomics”, descrita por Trachsel e colaboradores (2011), com modificações. As raízes foram escavadas, tomando-se o cuidado para retirá-las inteiras, sacudidas levemente para remoção da fração do solo aderida à coroa. O solo restante foi então removido embebendo a coroa da raiz em detergente neutro na concentração de 0,5%. Posteriormente as partículas de solo restantes foram removidas por enxágue com baixa pressão. As raízes limpas foram avaliadas por meio da tomada de dado das seguintes características: número de raízes da coroa (NRC), ângulo de crescimento das raízes da coroa (ACRC), comprimento médio de raízes da coroa (CRC) e diâmetro médio de raízes da coroa, tomado a 5 cm da inserção do caule (DRC).

Para a determinação da concentração dos macronutrientes Nitrogênio (N) e Fósforo (P), plantas inteiras foram coletadas, levadas à estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até obtenção de massa constante, moídas em moinho do tipo Willy e o conteúdo destes nutrientes foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Silva (2009).

A extração das enzimas foi feita pela maceração de 300 mg de folha em nitrogênio líquido, adicionando-se 1,2 mL do tampão de extração constituído de: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% de PVPP e 5 mM de ácido ascórbico. O

extrato foi centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C no período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises de todas as enzimas. As atividades das enzimas foram expressas por miligramas (mg) de proteínas que foram determinadas pelo método de Bradford (1976) utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela capacidade em inibir a fotoredução do cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977). A mistura reacional foi constituída de 100 µL de extrato enzimático e 1,9 mL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM, riboflavina 2 µM. A mistura foi iluminada com uma lâmpada de 20 W por 10 minutos. As leituras foram realizadas a 560 nm e uma unidade de SOD correspondeu à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições de ensaio.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 240 nm por 3 minutos. A mistura reacional foi incubada a 28 °C e foi constituída de 25 µL de extrato enzimático e 1 mL do meio reacional contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) e 0,1 mL de H₂O₂ a 400 mM. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 mM⁻¹ cm⁻¹ (HAVIR; MCHALE, 1987).

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do ascorbato a 290 nm por 3 minutos. A mistura reacional foi incubada a 28 °C e foi constituída de 100 µL de extrato enzimático e 1,8 mL do meio reacional contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), H₂O₂ 5 mM, ácido ascórbico 5 mM e água destilada. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (NAKANO, ASADA, 1981).

A atividade da guaiacol peroxidase (GPX) foi determinada pela oxidação do guaiacol a 470 nm por 3 minutos, de acordo com Lin e Wang (2002) com modificações. A mistura reacional foi constituída de 60 µL de extrato enzimático e 1,34 mL de meio reacional contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,5), guaiacol 60 mM, H₂O₂ 1 mM. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

Após a colheita, foram determinadas a massa das espigas (ME), massa dos grãos (MG), massa de 100 grãos (M100G) e a produção total de cada parcela extrapolada em kg por hectare. Todos os dados foram corrigidos considerando o percentual de 13% de umidade base úmida.

2.4 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Skott-Knott, a 0,05% de significância ($P \leq 0.05$), no programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

3. RESULTADOS

3.1 Características do sistema radicular e concentração de nutrientes na planta

A morfologia e arquitetura das raízes da coroa de plantas do milho híbrido DKB390 foram influenciadas pela inoculação com RPCPs e pela quantidade de água aplicada durante o ciclo da cultura. O número de raízes da coroa (NRC) não diferiu dentre os tratamentos para os regimes de irrigação de 100% e 32%. Com relação ao déficit hídrico moderado, lâmina de 59%, os inoculantes *Azospirillum brasilense* (Azos), *Bacillus* spp. (Bac) e *Azospirillum+Bacillus* (A+B), promoveram maior número de raízes em comparação ao tratamento sem inoculantes (Cont), sendo Azos e Bac os tratamentos que propiciaram os maiores NRC dentre as lâminas de irrigação em estudo (Tabela 2).

Raízes de plantas de milho cultivadas sob regime de irrigação plena apresentaram maior ângulo de crescimento de raiz (ACRC) quando inoculadas com Azos e A+B, e conseqüentemente raízes mais superficiais. Com a imposição de déficit hídrico moderado e severo, os tratamentos Cont, Azos e Bac, apresentaram maiores médias de ACRC. A combinação de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* spp. (A+B) foi responsável por menores ângulos de crescimento nestas condições de irrigação, resultando, portanto, em raízes mais profundas (Tabela 2).

Tabela 2. Número de raízes da coroa (NCR), ângulo de crescimento de raízes da coroa (ACRC), comprimento de raízes da coroa (CRC) e diâmetro de raízes da coroa (DRC) de plantas de milho cultivadas em diferentes regimes de irrigação (100%, 59% e 35%) e inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Azos), *Bacillus* sp. (Bac) e com a combinação de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* sp. (A+B).

Inoc/Lâm	-----NRC-----			-----ACRC (°)-----		
	100%	59%	32%	100%	59%	32%
Cont	12.25Aa	11.00Ca	11.25Aa	25.0Bb	37.5Aa	40.0Aa
Azos	13.25Ab	14.75Aa	11.00Ac	37.5Aa	30.0Aa	35.0Aa
Bac	12.00Ab	14.50Aa	11.25Ab	27.5Bb	32.5Ab	40.0Aa
A+B	11.50Ab	13.00Ba	11.75Ab	35.0Aa	20.0Bb	22.5Bb
CV(%)		7.84			7.67	
Inoc/Lâm	-----CRC (cm)-----			-----DRC (mm)-----		
	100%	59%	32%	100%	59%	32%
Cont	13.50Ba	13.00Ba	11.48Ab	4.89Aa	4.54Aa	4.68Aa
Azos	13.10Ba	12.32Ba	11.50Aa	4.32Aa	4.63Aa	3.81Bb
Bac	12.75Ba	12.42Ba	11.00Aa	4.24Aa	4.86Aa	3.62Bb
A+B	20.62Aa	15.05Ab	11.00Ab	4.41Aa	4.15Aa	3.85Bb
CV(%)		17.28			8.33	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical ou minúscula na horizontal, não diferem entre si para o

teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$).

O comprimento e o diâmetro do sistema radicular são características relacionadas a performance das culturas sob estresse hídrico. A inoculação de A+B possibilitou aumento do comprimento das raízes da coroa (CRC) em plantas bem irrigadas (100%) e em plantas cultivadas sob déficit hídrico moderado (59%). Em plantas submetidas à déficit hídrico severo (32%), não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 2).

A inoculação de rizobactérias não influenciou o diâmetro das raízes da coroa (DRC) de plantas bem irrigadas e nem daquelas cultivadas sob déficit hídrico moderado. Todos os tratamentos foram estatisticamente semelhantes nas condições de irrigação de 100% e 59%. Sob maior restrição hídrica (32%) os tratamentos Azos, Bac e A+B apresentaram raízes mais finas em comparação ao tratamento Cont (Tabela 2).

Em plantas cultivadas sob regime de irrigação plena (100%), a inoculação com Azos, Bac e A+B promoveu maior concentração de nitrogênio (N) na parte aérea das plantas em comparação às plantas não inoculadas (Cont). Com a redução da lâmina de irrigação para 59%, não houve diferença entre os tratamentos. Já sob déficit hídrico severo, maiores concentrações de N foram encontradas nos tratamentos Cont e A+B (Fig. 1).

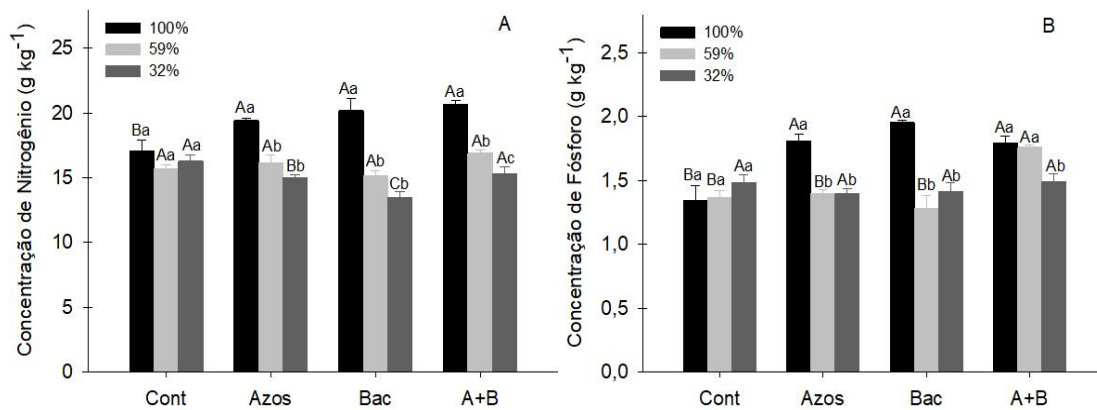


Figura 1. Concentração dos macronutrientes Nitrogênio (A) e Fósforo (B) nos tecidos de plantas de milho cultivadas sob diferentes regimes de irrigação (100%, 59% e 35%) e inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Azos), *Bacillus* sp. (Bac) e com a combinação de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* sp. (A+B). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro da mesma condição de irrigação. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro das diferentes condições de irrigação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si para o teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$).

Com relação ao macro nutriente fósforo, o uso de RPCPs também foi responsável por uma maior concentração deste elemento na parte aérea de plantas cultivadas no regime de

irrigação plena (100%). O tratamento A+B manteve essa concentração alta e maior que os demais tratamentos mesmo com a exposição ao déficit hídrico moderado (59%). Na condição de déficit hídrico severo (32%) todos os tratamentos foram estatisticamente iguais (Fig. 1).

3.2 Atividade Enzimática

No que se refere a atividade enzimática antioxidante, a inoculação com estirpes de *Azospirillum brasilense* (Azos) promoveu maior atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) quando comparado aos demais tratamentos, em todos os regimes de irrigação em estudo (100%, 59% e 32%) (Fig. 2A).

A atividade da enzima guaiacol peroxidase (GPX) em células de plantas do milho híbrido DKB390 cultivadas sob regime de irrigação plena, foi maior nos tratamentos Cont e Azos. Com a redução da quantidade de água aplicada para 59%, o tratamento Bac promoveu maior atividade de GPX. Em plantas expostas ao déficit hídrico severo (39%), maiores atividades desta enzima foram observadas com o uso das RPCPs Azos e Bac (Fig. 2B).

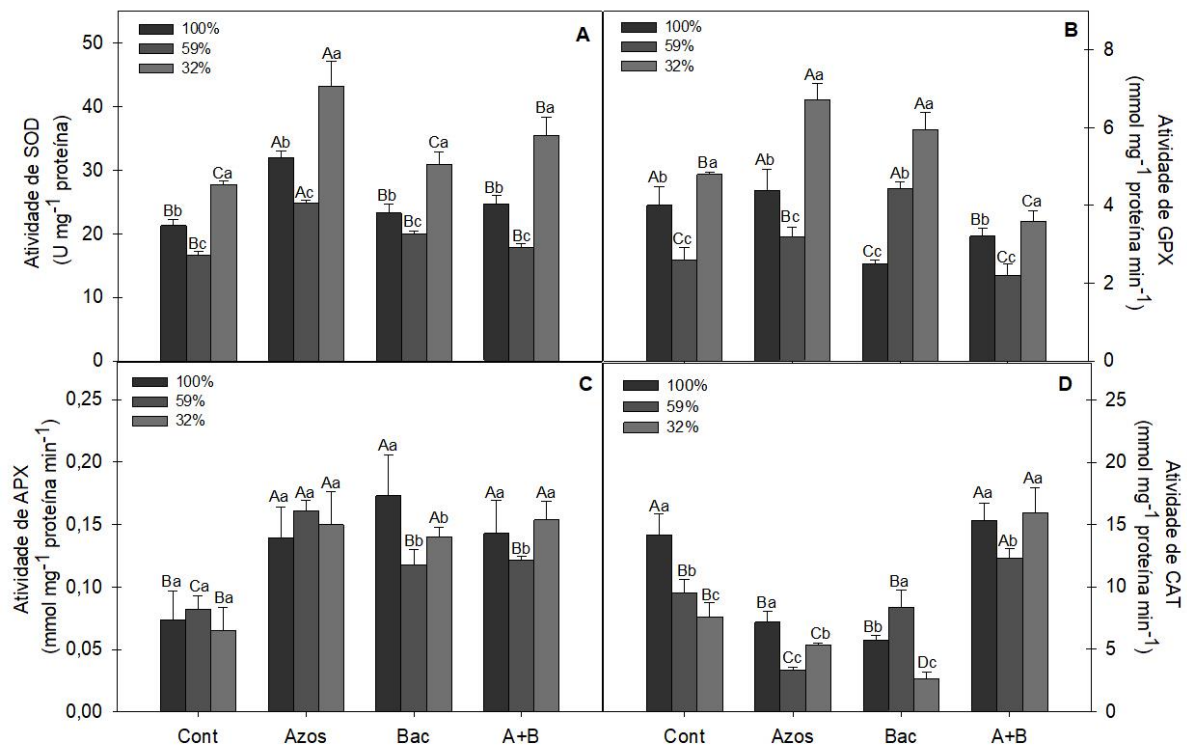


Figura 2. Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A), GPX (B), APX (C) e CAT (D) em plantas de milho cultivadas em diferentes regimes de irrigação (100%, 59% e 35%) e inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Azos), *Bacillus* sp. (Bac) e com a combinação de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* sp. (A+B). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro da mesma condição de irrigação. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro das diferentes condições de irrigação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si para o teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$).

De modo geral a inoculação com rizobactérias promotoras de crescimento resultou em maior atividade da ascorbato peroxidase (APX) em plantas tratadas com estes microrganismos, quando em comparação ao tratamento não inoculado, em todos os regimes de irrigação (Fig. 2C).

Sobre a atividade da enzima catalase (CAT), em plantas com irrigação plena, a combinação de estirpes de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* spp promoveu atividade estatisticamente semelhante à observada no tratamento Controle. Contudo nos regimes de déficit hídrico moderado e severo, este mesmo tratamento foi superior aos demais (Fig. 2D).

3.3 Componentes produtivos

Com relação aos atributos produtivos em plantas mantidas nos regimes de irrigação plena e déficit hídrico moderado, o tratamento com RPCPs não gerou aumento na massa de espigas (ME) em comparação ao tratamento controle não inoculado (Cont). Em plantas expostas à déficit hídrico severo, os inoculantes Azos e A+B resultaram em espigas com maior massa em relação aos demais tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Massa de espigas (ME), massa grãos (MG) e massa de 100 grãos (M100G) de plantas de milho cultivadas em diferentes regimes de irrigação (100%, 59% e 35%) e inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Azos), *Bacillus* sp. (Bac) e com a combinação de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* sp. (A+B).

Inoc/Lâm	ME (g)			MG (g)			M100G (g)		
	100%	59%	32%	100%	59%	32%	100%	59%	32%
Cont	180.25Aa	154.92Ab	103.37Bc	148.02Ba	130.15Aa	77.52Bb	30.82Aa	25.87Bb	21.65Ac
Azos	194.35Aa	150.20Ab	110.12Ac	166.80Aa	126.15Ab	89.24Ac	32.62Aa	26.90Bb	22.37Ab
Bac	155.45Ba	139.07Bb	89.12Cc	133.77Ba	120.77Aa	70.27Bb	29.75Aa	22.50Bb	20.65Ab
A+B	187.82Aa	155.00Ab	113.15Ac	168.87Aa	130.57Ab	95.75Ac	34.90Aa	31.85Aa	21.52Ab
CV(%)		20.76			20.67			21.12	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical ou minúscula na horizontal, não diferem entre si para o teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$).

A inoculação das sementes de milho com estirpes das rizobactérias Azos e A+B também resultou em aumento da massa de grãos (MG), tanto em plantas com irrigação plena, quanto naquelas submetidas à regime hídrico de 32%. Sob déficit hídrico moderado, não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 3).

Também não houve diferença estatística ($p < 0.05$) ente os tratamentos para massa de 100 grãos (M100G) em plantas bem irrigadas e aquelas submetidas a déficit hídrico severo. Em plantas cultivadas sob déficit hídrico moderado, o tratamento A+B foi superior aos demais para

este atributo. Vale ressaltar ainda que a combinação das rizobactérias *Azospirillum*+*Bacillus*, manteve a M100G igual mesmo com a redução do regime de irrigação de 100% para 59% (Tabela 3).

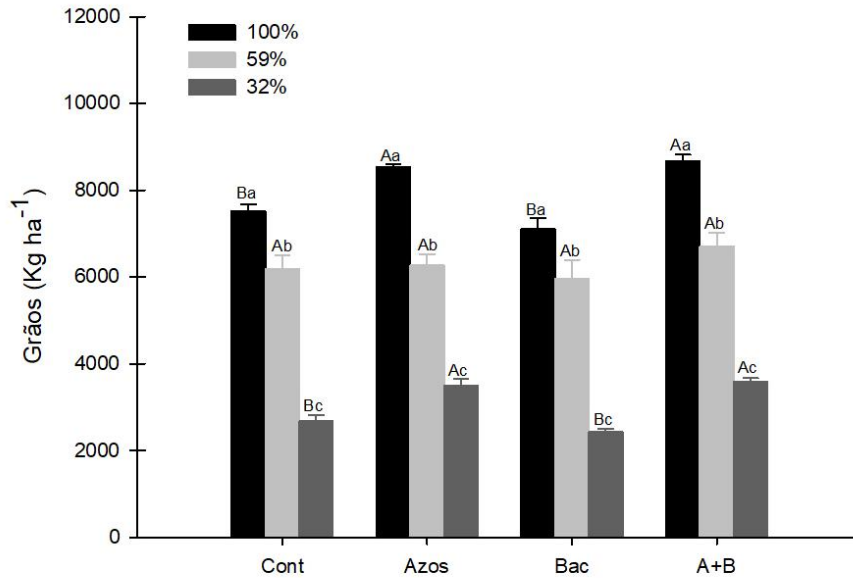


Figura 3. Rendimento de grãos de milho (Kg ha⁻¹) de plantas cultivadas em diferentes regimes de irrigação (100%, 59% e 35%) e inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Azos), *Bacillus* sp. (Bac) e com a combinação de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* sp. (A+B). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro da mesma condição de irrigação. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro das diferentes condições de irrigação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si para o teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$).

Analisando a produção de grãos em kg ha⁻¹, notou-se que o tratamento com *Azospirillum brasilense* e a combinação *Azospirillum*+*Bacillus* gerou aumento na produção do híbrido DKB390 cultivado sob regime de irrigação plena (100%), bem como sob déficit hídrico severo (32%). Para a condição de irrigação de 59%, o uso de rizobactérias não aumentou a produção de grãos, sendo todos os tratamentos estatisticamente iguais (Fig. 3).

4. DISCUSSÃO

As raízes são as primeiras estruturas das plantas a perceberem as condições de seca que se avizinham e decretar a resposta primária, adaptando-se para maximizar a absorção de água e de nutrientes. As inoculações individuais de estirpes de *Azospirillum brasilense* e de *Bacillus* spp. foram responsáveis pela produção de um maior número de raízes, com menor diâmetro, em milho sob déficit hídrico moderado e severo. A inoculação combinada de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* spp. também atuou no desenvolvimento do sistema radicular, promovendo além de incremento no número de raízes, aumento na formação de raízes mais longas, profundas e finas,

em plantas cultivadas sob déficit hídrico, proporcionando assim, uma melhor exploração do solo.

Felici e colaboradores (2008), em estudo sobre a inoculação única e coinoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* em *Lycopersicon esculentum*, relataram que ambas as bactérias promoveram um aumento no desenvolvimento do sistema radicular das plantas em aplicações individuais. Já as co-inoculadas dessas RPCPs não geraram diferença significativa nas plantas em relação ao tratamento controle. Por outro lado, assim como observado no presente estudo, em pesquisas anteriores sobre combinações de RPCPs, a maioria dos microrganismos usados em misturas não interferiram negativamente entre si (MARIMUTHU et al., 2002; VESTBERG et al., 2004). Pode-se sugerir então que a co-presença de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp. na raiz de milho não neutraliza seus respectivos mecanismos de fitoestimulação.

Os benefícios da inoculação com *Azospirillum* estão relacionados à melhoria na aquisição de importantes recursos vegetais, como aumento da absorção de água, nitrogênio, fósforo e outros minerais (FUKAMI et al., 2017). O nitrogênio e o fósforo estão entre os principais elementos que a planta precisa em maiores quantidades para uma boa nutrição. O nitrogênio é um constituinte essencial de nucleotídeos, lipídios de membrana e aminoácidos. O fósforo desempenha um papel importante na fotossíntese, respiração, armazenamento, transferência de energia, divisão e alongamento celular (AGBODJATO et al., 2016).

Os resultados deste estudo mostram que o tratamento de plantas de milho com irrigação plena, com estirpes dos inoculantes Azos, Bac e A+B, aumentou a concentração de N na parte aérea das plantas em respectivamente 10,9%, 18,2% e 21,2% quando comparados ao controle não inoculado. Ardakani et al. (2011) relatam que inoculação de sementes de trigo com *Azospirillum brasilense* aumentou o teor de NPK da planta em 21%, 17% e 25% respectivamente. De acordo com Marques e colaboradores (2020) a presença desta mesma rizobactéria em milho irrigado proporcionou maior absorção de nutrientes e alteração na arquitetura radicular das plantas de milho, resultando em maior exploração do solo por essas raízes.

Assim como as RPCPs do gênero *Azospirillum*, a adição de inoculantes contendo estirpes de *Bacillus* spp. no solo pode acelerar a reciclagem e a disponibilidade de nutrientes (COELHO et al., 2007), além de solubilizar e mineralizar o fósforo presente na matéria orgânica e em fontes inorgânicas (OTEINO et al., 2015; RICHARDSON, 2001) e enriquecer biologicamente o solo. Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* estão entre os microrganismos solubilizadores de fosfato mais eficientes (TILAK et al., 2005).

O uso de inoculantes também mostrou efeito positivo no acúmulo de nutrientes em plantas submetidas a seca. De acordo com os dados aqui observados, a inoculação conjunta de A+B possibilitou maiores concentrações de N e P na parte aérea das plantas cultivadas sob déficit

hídrico. O estresse hídrico influencia a disponibilidade e o transporte de nutrientes do solo para as plantas, pois estes são transportados para as raízes pela água (NAYLOR; COLEMAN-DERR, 2018). No entanto mudanças nas características do sistema radicular como no comprimento, espessura e ângulo de crescimento da raiz, promovidas pelas rizobactérias, resultam em melhor capacidade de aquisição de nitrogênio e fósforo mesmo diante de condições de falta de água (CHEN et al., 2013).

Durante as interações planta-microrganismos, as bactérias do solo produzem vários compostos químicos para fins de sinalização. Essas moléculas, que são produzidas por RPCPs na rizosfera, são conhecidas como padrões moleculares associados a microrganismos. Eles incluem aminoácidos simples e açúcares, bem como grandes polissacarídeos e proteínas (ROSIER et al., 2018). Esses padrões moleculares podem desencadear sistemas de defesa da planta, fazendo com que elas produzam espécies reativas de oxigênio (EROs), o que resulta na ativação de diferentes sistemas antioxidantes (CHANDRA et al., 2021). Este fato pode explicar os resultados observados no presente trabalho, onde houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peróxido (APX), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em plantas sob irrigação plena e na presença de rizobactérias.

Em plantas expostas ao déficit hídrico o sistema de defesa também é estimulado, resultando em aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que afetam o estado regulatório redox das células vegetais (LAXA et al., 2019). Bactérias promotoras de crescimento de plantas são conhecidas por produzir antioxidantes como ácidos fenólicos e açúcares solúveis, bem como induzir enzimas de defesa antioxidante em favor da resistência da planta em condições de estresse hídrico (NOTUNUNU et al., 2022). Os resultados observados no presente estudo indicam que as RPCPs interferiram na regulação das enzimas antioxidantes analisadas, atenuando o dano oxidativo em plantas sob déficit hídrico.

Em plantas cultivadas sob déficit hídrico moderado e severo, os tratamentos Azos, Bac e A+B apresentaram uma maior atividade da APX em comparação ao tratamento controle não inoculado. Com relação a enzima antioxidante SOD, a inoculação isolada de estirpes de *Azospirillum brasilense* promoveu maior atividade desta enzima quando comparada aos demais tratamentos testados. A atividade da GPX também foi influenciada pela presença de rizobactérias, onde a inoculação isolada de estirpes Azos e de Bac aumentou a atividade desta enzima em plantas de milho expostas a déficit hídrico severo. Com relação a enzima antioxidante CAT, sua atividade foi estimulada principalmente pela coinoculação de A+B, sendo este tratamento estatisticamente superior aos demais.

Batool et al. (2020) mostraram que *Bacillus subtilis* melhorou a atividade da catalase em

68%, da superóxido dismutase em 63% e da guaiacol peroxidase (GPX) em 51%, em plantas de batata sob forte estresse hídrico. Assim como relatado para o uso de *Bacillus* spp., o *Azospirillum brasilense* também é citado como promotor do alívio de estresse pelo aumento dos mecanismos de defesa contra espécies reativas de oxigênio (KAUSHAL; WANI, 2016; NGUMBI, KLOEPPER, 2016). Bulegon et al. (2016) mostraram que a inoculação foliar com *Azospirillum brasilense* é eficaz em aumentar as atividades de SOD e CAT sob estresse hídrico severo.

Com relação as características produtivas, para alguns parâmetros como ME e M100G, não foi possível observar efeito significativo dos inoculantes quando comparados ao controle não inoculado, em plantas sob irrigação plena. Por outro lado, destaca-se a ação dos tratamentos *Azospirillum brasilense* e a combinação *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* spp., sobre a ME e MG de plantas expostas à déficit hídrico severo. De acordo com Ohland et al. (2005), a massa de espigas e a massa de grãos são características influenciadas pela disponibilidade de nutrientes e de água durante o enchimento de grãos, logo, pode-se deduzir que os tratamentos Azos e A+B, levaram à uma melhora na aquisição destes recursos pelas plantas.

Díaz-Zorita et al. (2015), evidenciaram em diversos estudos de campo, principalmente na América Latina e Ásia, um aumento em média de 10% na produtividade de grãos de cereais em resposta à inoculação com *Azospirillum* spp. No presente estudo, a inoculação de Azos e a coinoculação A+B resultou em aumento nos percentuais de rendimento superiores aos citados por esses autores, sendo respectivamente 13,3% e 15,2% em plantas cultivadas sob irrigação plena. Mazzucheli et al. (2014) avaliaram o efeito da inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* no crescimento e na produção de milho safrinha no norte do Paraná, e concluíram que a utilização de *Azospirillum brasilense* nas sementes aumentou em 21,9% a produtividade do milho, quando comparados ao tratamento controle.

5. CONCLUSÃO

A inoculação de sementes de milho com RPCPs é capaz de influenciar positivamente o crescimento das plantas e aumentar a produção da cultura. Sob condições ambientais desfavoráveis, como no déficit hídrico, as rizobactérias possuem um papel importante, auxiliando no sistema de defesa e conferindo adaptação e tolerância em plantas.

Em nosso estudo, foram encontrados comportamentos diferenciados entre a inoculação única e conjunta de rizobactérias em plantas, quanto às características fitométricas, nutricionais, bioquímicas e de produção de milho. A coinoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* spp. se destacou na maioria das variáveis estudadas, o que mostra o alto potencial de uso combinado desses microrganismos para um melhor desenvolvimento e produção da cultura

do milho.

O *Azospirillum brasilense* demonstra um papel de bactéria “ajudante”, uma vez que seu efeito primário se dá no aumento do desenvolvimento radicular como maior área de superfície, e maior comprimento radicular, aumentando assim a probabilidade de associação bem-sucedida. Este consórcio de inoculação, parece funcionar bem com bactérias do gênero *Bacillus* incorporadas, auxiliando no fornecimento de outros nutrientes, produzindo maior atividade de enzimas antioxidantes e aumentando capacidade das plantas de crescerem melhor.

Embora a formulação de várias rizobactérias não adicione dificuldades técnicas significativas em comparação com a formulação de uma única bactéria, a interação dos microrganismos dentro dessas formulações é amplamente desconhecida. Tornam-se necessários mais estudos a fim de reunir conhecimentos aprofundados sobre os mecanismos associados as RPCPs, as interações planta-microrganismos e a compatibilidade entre populações microbianas, a fim de abrir caminho para aplicação em escala de campo, objetivando construir um sistema agrícola saudável e sustentável.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro. A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada.

REFERÊNCIAS

- AGBODJATO, N. A.; NOUMAVO, P. A.; ADJANOHOON, A.; AGBESSI, L.; BABA-MOUSSA, L. Synergistic Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Chitosan on In Vitro Seeds Germination, Greenhouse Growth, and Nutrient Uptake of Maize (*Zea mays* L.). **Biotechnology Research International**, v. 2016, 11 p., 2016.
- ALLEN, Richard G. et al. Crop Evapotranspiration-Guidelines for computing crop water requirements-FAO Irrigation and drainage paper 56. **Fao, Rome**, v. 300, n. 9, p. D05109, 1998.
- ALBUQUERQUE, P. E. P.; ANDRADE, C. L. T. (2001) Planilha eletrônica para a programação da irrigação de culturas anuais. Circular Técnica 10. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brazil. Disponível em:
https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/13765/1/Circ_10.pdf
- ALAHMAD, S.; EL HASSOUNI, K.; BASSI, F.M.; DINGLASAN, E.; YOUSSEF, C.; QUARRY, G.; AKSOY, A.; MAZZUCOTELLI, E.; JUHÁSZ, A.; ABLE, J.A.; CHRISTOPHER, J.; VOSS-FELS, K. P.; HICKEY, L. T. A major root architecture QTL responding to water limitation in durum wheat. **Front. Plant Sci.**, v. 10, p. 1-18, 2019.
- ALI, S. K. Z.; SANDHYA, V.; GROVER, M.; RAO, L. V.; VENKATESWARLU, B. Effect of inoculation with a thermos tolerant plant growth promoting *Pseudomonas putida* strain AKMP7 on growth of wheat (*Triticum* spp.) under heat stress. **J.Plant Interact.** v. 6, p. 239-246, 2011.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES, G. O. N.; CALVES, J. L.; SPAROVEK, G.; Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift.**, v. 22, p. 711-728, 2013.
- ANSARY, M. H.; RAHMANI, H. A.; ARDAKANI, M. R.; PAKNEJAD, F.; HABIBI, D.; MAFAKHERI, S. Effect of *Pseudomonas* fluorescent on proline and phytohormonal status of maize (*Zea mays* L.) under water deficit stress. **Ann Biol Res.** v. 3, p. 1054-1062, 2012.
- ARDAKANI, M. R. MAZAHARI, D.; MAFAKHERI, S.; A. MOGHADDAM, A. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v. 17, p. 181-192, 2011.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990 e 1996). **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549- 579, 2005.

BATOOL, T., ALI, S., SELEIMAN, M.F. et al. Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. **Sci Rep**, v. 10, p. 16975, 2020.

BHAT, M. A.; MIR, R. A.; et al. 2021. Mechanistic insights of CRISPR/Cas-mediated genome editing towards enhancing abiotic stress tolerance in plants. **Physiol Plant**, p. 1255-1268.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

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

CAMELE I, ELSHAFIE H S, CAPUTO L, SAKR S H, DE FEO V. 2019. *Bacillus mojavensis*: Biofilm formation and biochemical investigation of its bioactive metabolites. **J Biol Res**, v. 92, p. 8296, 2019.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growthpromoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440-459, 2014.

CASSÁN, F.; OKON, Y.; CREUS, C. M. Handbook for *Azospirillum*: technical issues and protocols. **Springer International Publishing**, Cham, 2015.

CHANDRA, P.; WUNNAVA, A.; VERMA, P.; Amaresh CHANDRA, A.; SHARMA, R. K. Strategies to mitigate the adverse effect of drought stress on crop plants- influences of soil bacteria: A review. **Pedosphere**, v. 31, n. 3, p. 496–509, 2021.

CHEN, Y.; YAN, F.; CHAI, Y. R.; LIU, H. X.; KOLTER, R.; LOSICK, R.; GUO, J. H. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 848-864, 2013.

CHIAPPERO, J.; DEL ROSARIO CAPPELLARI, L. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita* grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content. **Ind Crops Prod.**, v. 139, p. 111553, 2019.

CHIBEBA, A.M., GUIMARÃES, M.F., BRITO, O.R., NOGUEIRA, M.A., ARAUJO, R.S., HUNGRIA, M. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences.**, v. 6, n. 10, p.1641, 2015.

CHUKWUNEME, C. F.; BABALOLA, O. O.; KUTU, F. R.; OJUEDERIE, O. B. 2020. Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize. **J Plant Interact**, v. 15, p. 93-105, 2020.

COELHO, L. F.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; AMBROSANO, G. M. B. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* spp. com rizosferas de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 31, p. 1413-1420, 2007.

DE ABREU, C. S.; FIGUEIREDO, J. E.; OLIVEIRA, C. A.; DOS SANTOS, V. L.; GOMES, E. A.; RIBEIRO, V. P.; BARROS, B. A.; LANA, U. G.; MARRIEL, I. E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genet Mol Res**, v. 16, p. 1, 2017.

DÍAZ-ZORITA, M.; CANIGIA, M. V. F.; BRAVO, O. Á.; BERGER, A.; SATORRE, E.H., 2015. Field Evaluation of Extensive Crops Inoculated with *Azospirillum* sp. In: Handbook for *Azospirillum*. Springer, p. 435-445, 2015.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. et al. Indole-3-acetic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: Bacterial traits required in rhizosphere. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), Rhizosphere and/Or Endophytic Competence By Beneficial Bacteria. In: Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem, Springer International Publishing, Cham, p. 183-258, 2015.

FELICI, C.; VETTORI, L.; TOFFANIN, A.; NUTI, M. Development of a strain specific genomic marker for monitoring a *Bacillus subtilis* biocontrol strain in the rhizosphere of tomato. **FEMS Microbiol. Ecol.**, in press, 2008.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 3, p. 2-13, 2016.

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 153, 2017.

FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 73, p. 1-12, 2018.

GAVILANES, F. Z.; ANDRADE, D. S.; ZUCARELI, C.; HORÁCIO, E. H.; YUNES, J. S.; BARBOSA, A. P.; RIBEIRO, L. A.; CRUZATTI, L. G.; MADDELA, N. R.; GUIMARÃES, M. F. Co-inoculation of *Anabaena cylindrica* with *Azospirillum brasilense* increases maize grain yield. **Rhizosphere**.

GOMES, E. A.; SILVA, U. de C.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, C. A. O.; LANA, U. G. de P. Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 13, n. 1, p. 69-81, 2014.

HASSAN, A. H. A.; HOZZEIN, W. N.; MOUSA, A. S. M.; RABIE, W.; ALKHALIFAH, D. H. M.; SELIM, S.; ABDELGAWAD, H. Heat stress as an innovative approach to enhance the antioxidant production in *Pseudoaerobicola* and *Bacillus* isolates. **Sci Rep**. v. 10, p. 15076, 2020.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol** 84, 450–455, 1987.

- 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 Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biol Fertil Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013.
- HUNGRIA, M. NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to -improve yield and sustainability. **Am J Plant Sci**, v. 6, p. 811-817, 2015.
- KAUSHAL, M.; WANI, S. Rhizobacterial-plant interactions: strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress. **Agric. Ecosyst. Environ.** v. 231, p. 68-78, 2016.
- KRUASUWAN, W.; THAMCHAIPENET, A. Diversity of culturable plant growth-promotin bacterial endophytes associated with sugarcane roots and their effect of growth by co-inoculation of diazotrophs and actinomycetes. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 4, p. 1074-1087, 2016.
- LAXA, M.; LIEBTHAL, M.; TELMAN, W.; CHIBANI, K.; DIETZ, K. J. The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. **Antioxidants**, v. 8, p. 94, 2019.
- LIM J H, KIM S D. 2013. Induction of drought stress resistance by multifunctional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. **Plant Pathol J**, v. 29, p. 201-208, 2013.
- LIN, J.; WANG, G. Doubled CO₂ could improve the drought tolerance better in sensitive cultivars than in tolerant cultivars in spring wheat. **Plant Sci**, v. 163, p. 627–637, 2002.
- LIRA-SALDIVAR, R.; HERNANDEZ, A.; VALDEZ, L.; CÁRDENAS, A.; IBARRA, L.; HERNÁNDEZ, M.; RUIZ, N. *Azospirillum brasilense* and *Glomus intraradices* co-inoculation stimulates growth and yield of cherry tomato under shadehouse conditions. **Phyton-Int J Exp Bot**, v. 83, p. 133-138, 2014.
- MARIMUTHU, S.; SUBBIAN, P.; RAMAMOORTHY, V.; SAMIYAPPAN, R. Synergistic effect of combined application of *Azospirillum* and *Pseudomonas* fluorescence with inorganic fertilizer on root rot incidence and yield of cotton. **J. Plant Dis. Protect**, v. 109, n. 6, p. 569-577, 2002.
- MARQUES, D. M.; MAGALHÃES, P. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES JUNIOR, C. C.; SILVA, A. B.; MELO, I. G.; DE SOUZA, T. C. *Azospirillum brasilense* favors morphophysiological characteristics and nutrient accumulation in maize cultivated under two water regimes. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 19, p. 1, 2020.
- MAZZUCHELLI, R. de C. L.; SOSSAI, B. F.; ARAÚJO, F. F. de. Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Colloquium Agrariae**, v. 10, n. 2, p. 40-47, 2014.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiol**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NAYLOR, D.; COLEMAN-DERR, D. Drought stress and root-associated bacterial communities. **Front Plant Sci.** v. 8, p. 2223, 2018.

NGUMBI, E.; KLOEPPER, J. Bacterial mediated drought tolerance: current and future prospects. **Applied Soil Ecology**, v. 105, p. 109-125, 2016.

NOTUNUNU, I.; MOLELEKI, L.; ROOPNARAIN, A.; ADELEKE, R. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the molecular responses of maize under drought and heat stresses: A review. **Pedosphere**, v. 32, n. 1, p. 90-106, , 2022.

OHLAND, R. A. A. et al. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. *Ciência e Agrotecnologia, lavras*, v. 29, n. 3, p. 538-544, 2005.

OTEINO, N.; LALLY, R. D.; KIWANUKA, S.; LLOYD, A.; RYAN, D.; GERMAINE, K. J.; DOWLING, D. N. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Front. Microbiol.** v. 6, p. 745, 2015.

PARK, Y. G.; MUN, B. G.; KANG, S. M.; HUSSAIN, A.; SHAHZAD, R.; SEO, C. W.; KIM, A. Y.; LEE, S. U.; OH, K. Y.; LEE, D. Y.; LEE, I. J.; YUN, B. W. 2017. *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. **Plos One**, v. 12, p. e0173203, 2017.

PEREIRA, S. I. A.; ABREU, D. MOREIRA, H.; VEJA, A.; CASTRO, P. M. L. 2020. Plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and nutrient use efficiency in maize (*Zea mays* L.) underwater deficit conditions. **Heliyon**, v. 6, p. 05106, 2020.

REIS D. P. Produtividade de milho e ecologia microbiana da rizosfera de plantas sob diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del Rei. São João Del Rei - MG, 1-61, 2015.

RICHARDSON, A. E.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; STEVENS, C. J.; TRIMMER, M.; WEIDER, L. J.; WOODWARD, G.; LEITCH, I. J. 2017. Impacts of nitrogen and phosphorus: from genomes to natural ecosystems and agriculture. **Front. Ecol. Evol.** v. 5, p. 70, 2017.

RODRIGUES, E. P.; SOARES, C. P.; GALVÃO, P. G.; IMADA, E. L.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; ROUWS, L. F. M.; DE OLIVEIRA, A. L. M.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Identification of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 strain using transposon mutagenesis. **Front. Microbiol.** v. 7, p. 1572, 2016.

ROSIER, A.; MEDEIROS, F. H. V.; BAIS, H. P. 2018. Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plantmicrobe interactions. **Plant Soil.** v. 428, p. 35-55, 2018.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Inoculantes microbianos: revendo o passado, discutindo o presente e vislumbrando um futuro de destaque para o uso de bactérias benéficas na agricultura. 2019.

- SALEHI-LISAR, S. Y.; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, H. Drought stress in plants: Causes, consequences, and tolerance. In: Hossain, M., Wani, S., Bhattacharjee, S., Burritt, D., Tran, L.S. (Eds.), **Drought Stress Tolerance in Plants**, v. 1. Springer, Cham, p. 1-16, 2016.
- SILVA, F. C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, p. 1-370, 2009.
- SUBRAMANIAN, S.; SMITH, D. L. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome-from an agriculture perspective. *Front Plant Sci.*, v. 6, p. 909, 2015.
- TILAK, K.V.B. R.; RANGANAYAKI, N.; PAL, K. K.; DE, R.; SAXENA, A. K. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. **Current Science**. v. 89, p. 136-150, 2005.
- TIMMUSK, S.; ISLAM, A.; ABD E. L. D.; LUCIAN, C.; TANILAS, T.; KA NNASTE, A.; et al. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. **PLoS One**, v. 9, p. 1-13, 2014.
- TRACSEL, S.; KAEPLER, S. M.; BROWN, K. M.; LYNCH, J. P. Shovelomics: high throughput phenotyping of maize (*Zea mays* L.) root architecture in the field. **Plant Soil** v. 341, p. 75-87, 2011.
- VESTBERG, M.; KUKKONEN, S.; SAARI, K.; PRIKKA, P.; HUTTUNEN, J.; TAINIO, L.; DEVOS, N.; WEEKERS, F.; KEVERS, C.; THONART, P.; LEMOINE, M.C.; CORDIER, C., ALABOUVETTE, C.; GIANINAZZI, S. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. **Appl. Soil Ecol.** v. 27, p. 243-258, 2004.
- VURUKONDA, S. S. K. P.; VARDHARAJULA, S.; SHRIVASTAVA, M.; SKZ, A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiol Res.** v.184, p. 13-24, 2016.
- YEGORENKOVA, I. V.; TREGUBOVA, K. V.; BURYGIN, G. L.; MATORA, L. Y.; IGNATOV, V. V. Assessing the efficacy of co-inoculation of wheat seedlings with the associative bacteria *Paenibacillus polymyxa* 1465 and *Azospirillum brasilense* Sp245. **Canadian journal of microbiology**, v. 62, n. 3, p. 279-285, 2016.
- ZAFAR-UL-HYE, M.; FAROOQ, M. H.; ZAHIR, Z. F.; HUSSAIN, M.; HUSSAIN, A. Application of ACC-deaminase containing rhizobacteria with fertilizer improves maize production under drought and salinity stress. **Int J Agric Biol**, v. 16, p. 591-596, 2014.