



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA**  
**DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**LEANE CASTRO DE SOUZA**

**CRESCIMENTO, ASPECTOS FISIOLÓGICOS E METABOLISMO DO  
NITROGÊNIO EM PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS A DEFICIÊNCIA  
HÍDRICA E CONCENTRAÇÕES DE BRASSINOSTERÓIDES E  
AZOSPIRILLUM**

**BELÉM**  
**2021**

**LEANE CASTRO DE SOUZA**

**CRESCIMENTO, ASPECTOS FISIOLÓGICOS E METABOLISMO DO  
NITROGÊNIO EM PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS A DEFICIÊNCIA  
HÍDRICA E CONCENTRAÇÕES DE BRASSINOSTERÓIDES E  
AZOSPIRILLUM**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Doutorado em Agronomia: Área de Concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Shigueru Okumura.

**BELÉM**

**2021**

**LEANE CASTRO DE SOUZA**

**CRESCIMENTO, ASPECTOS FISIOLÓGICOS E METABOLISMO DO  
NITROGÊNIO EM PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS A DEFICIÊNCIA  
HÍDRICA E CONCENTRAÇÕES DE BRASSINOSTERÓIDES E  
AZOSPIRILLUM**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Doutorado em Agronomia: Área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora. Orientador: Prof. Dr. Ricardo Shigueru Okumura

**BANCA EXAMINADORA**

*R. Shigueru Okumura*

---

Prof. Dr. Ricardo Shigueru Okumura - Orientador  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA**

*Glauco André dos Santos Nogueira*

---

Dr. Glauco André dos Santos Nogueira – 1º Examinador  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA**

*Glauco André dos Santos Nogueira*

---

Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto -2º Examinador  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA**

*Gilmara Pereira da Silva*

---

Dr<sup>a</sup>. Gilmara Pereira da Silva - 3º Examinador  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE RORAIMA - UERR**

*Myriam Galvão Neves*

---

Dr<sup>a</sup>. Myriam Galvão Neves - 4º Examinador

**BELÉM  
2021**

*Aos meus pais Maria de Nazaré Oliveira de Castro de Souza e Antonio Juares Oliveira de Souza, pelo amor e educação e aos meus irmãos Luma Castro de Souza e Leandro Castro de Souza, pela amizade e carinho.*

*OFEREÇO*

*Ao meu lindo e amado esposo Cleiton Roberto Neves da Silva, pelo amor, paciência e apoio nos momentos difíceis e a minha querida filha Lys Roberta Castro Neves, motivo da minha vida.*

*DEDICO*

*“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar ao contrário.”*

*(Albert Einstein)*

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, por sempre me abençoar e dar forças para que eu nunca desistisse dos meus sonhos, mesmo com todas as dificuldades que apareceram no caminho.

Aos meus pais Maria de Nazaré Oliveira de Castro de Souza e Antonio Juares Oliveira de Souza, pela determinação e luta na minha formação e dos meus irmãos.

A minha amada irmã Luma Castro de Souza e querido irmão Leandro Castro de Souza pelo amor, força e confiança.

Ao meu esposo Cleiton Roberto Neves da Silva, que sempre esteve comigo, nos momentos bons e ruins, me apoiando e incentivando e por ter me ajudado desde a implantação do experimento até a rodagem da estatística. A minha amada filha Lys Roberta Castro Neves, por ser uma filha adorável. Amo vocês. Muito Obrigada!

Ao meu orientador Prof Dr. Ricardo Shigueru Okumura, por ter aceitado me orientar e por ter sido sempre prestativo.

Ao Prof. Dr. Candido Ferreira de Oliveira Neto, amigo e eterno orientador (desde a graduação), agradeço ao apoio, a partilha do saber e as contribuições para realização do trabalho. Obrigada por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica. Agradeço-lhe imensamente!

Aos meus amigos do grupo de pesquisa Estudos da Biodiversidade em plantas superiores (EBPS) Gustavo, Rayssa, Evely, Sara, Ana Carolina. Obrigada pela amizade, por terem me ajudado na condução e análise do meu experimento e por terem me recebido de braços abertos na família EBPS.

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Belém por abrir as portas para que eu pudesse realizar o Doutorado, proporcionando-me a busca de conhecimento técnico e científico.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a concretização desse sonho, estimulando-me a buscar o conhecimento. Obrigada!

## RESUMO

O estresse abiótico, em destaque ao déficit hídrico, reduz a produtividade das culturas vegetais, impactando negativamente a sustentabilidade agrícola. Para minimizar esses efeitos nocivos na agricultura, várias práticas agronômicas e fisiológicas estão sendo estudadas, tais como o uso de bactérias e de atenuadores de estresse hídrico, como os Brassinosteróides que são reguladores de crescimento. Considerando a relevância socioeconômica da cultura do milho e sua sensibilidade quando exposta ao déficit hídrico, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação do Brassinosteroides e do azospirillum no crescimento, aspectos fisiológicos e metabolismo do nitrogênio durante a fase vegetativa de plantas de milho submetidas a deficiência hídrica. O experimento foi executado em casa de vegetal, no período de dezembro de 2019 a janeiro 2020, utilizando-se plantas de milho, o híbrido K9606 VIP3. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x3, com seis repetições, totalizando 72 unidades experimentais. O primeiro fator corresponde a dois regimes hídricos (presença e ausência de deficiência hídrica). O segundo fator corresponde a inoculação via semente (no momento da semeadura) do *Azospirillum brasilense* e ausência de inoculação. E o terceiro fator corresponde a aplicação de três concentrações de brassinosteróides (0, 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$  Br). Antes do semeio, uma parte das sementes de milho foram inoculadas com azospirillum e outra não. Com quinze e trinta dias após o plantio foi realizada a aplicação de brassinosteroides (0, 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$  Br). Dez dias após a última aplicação de brassinosteroide, foi aplicado o estresse nos tratamentos que receberiam o estresse. Após sete dias da aplicação de deficiência hídrica às plantas de milho foram coletadas para análise bioquímicas, sendo separadas em folha e raiz. Assim, realizou-se as avaliações relacionadas ao crescimento e fisiologia das plantas. A ausência de inoculação com *Azospirillum brasilense* e pulverização dos brassinosteróides na concentração 0,6  $\mu\text{M}$  em plantas de milho em condições de estresse hídrico, apresentou incrementos no número de folha. As plantas com deficiência hídrica inoculadas com bactéria e aplicação de brassinosteróides na maior concentração, mitigaram as influências negativas ocasionadas pelo estresse, apresentando um aumento no conteúdo relativo de água nas plantas de milho. As plantas com brassinosteróides na concentração 0,3  $\mu\text{M}$  e inoculadas, atenuou os efeitos do estresse hídrico, proporcionando um aumento na clorofila a. Enquanto, para a clorofila b, apenas a presença do hormônio na concentração 0,3  $\mu\text{M}$  promoveu um acréscimo dos valores desse parâmetro. A interação dos brassinosteróides com a bactéria proporcionaram um incremento dos carboidratos solúveis totais nas folhas e nas raízes das plantas de milho submetidas ao estresse hídrico. Em condições de estresse hídrico, as plantas de milho sem inoculação e pulverização de 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteroides, promoveu um incremento no teor de amido nas folhas. Nas raízes, apenas a presença da bactéria sem ou com aplicação de 0,3  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides proporcionou aumento do amido. O uso da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* via semente e a aplicação de brassinosteróides, amenizam os efeitos negativos no metabolismo do nitrogênio nas folhas e raízes causadas pela ocorrência da deficiência hídrica na cultura do milho.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L, estresse abiótico, hormônio vegetal, inoculação, nitrogênio.

## ABSTRACT

Abiotic stress, in particular the water deficit, reduces the productivity of vegetable crops, negatively impacting agricultural sustainability. To minimize these harmful effects on agriculture, several agronomic and physiological practices are being studied, such as the use of bacteria and water stress attenuators, such as Brassinosteroids, which are growth regulators. Considering the socioeconomic relevance of corn culture and its sensitivity when exposed to water deficit, the objective of the present study was to evaluate the action of Brassinosteroides and azospirillum on growth, physiological aspects and nitrogen metabolism during the vegetative phase of corn plants submitted to water deficiency. The experiment was carried out in a greenhouse, from December 2019 to January 2020, using corn plants, the hybrid K9606 VIP3. The experimental design used was completely randomized, in a 2x2x3 factorial scheme, with six replications, totaling 72 experimental units. The first factor corresponds to two water regimes (presence and absence of water deficiency). The second factor corresponds to seed inoculation (at the moment of sowing) of *Azospirillum brasilense* and absence of inoculation. And the third factor corresponds to the application of three concentrations of brassinosteroids (0, 0.3 and 0.6  $\mu\text{M}$  Br). Before sowing, a part of the corn seeds were inoculated with azospirillum and another part was not. Brassinosteroids (0, 0.3 and 0.6  $\mu\text{M}$  Br) were applied fifteen and thirty days after planting. Ten days after the last brassinosteroid application, stress was applied to the treatments that would receive the stress. Seven days after the application of water deficiency to corn plants, they were collected for biochemical analysis, being separated into leaf and root. Thus, evaluations related to plant growth and physiology were carried out. The absence of inoculation with *Azospirillum brasilense* and spraying of brassinosteroids at a concentration of 0.6  $\mu\text{M}$  in corn plants under water stress conditions, showed increases in leaf number. Plants with water deficiency inoculated with bacteria and application of brassinosteroids in the highest concentration, mitigated the negative influences caused by stress, presenting an increase in the relative water content in corn plants. Plants with brassinosteroids in a concentration of 0.3  $\mu\text{M}$  and inoculated, attenuated the effects of water stress, providing an increase in chlorophyll a. While, for chlorophyll b, only the presence of the hormone at a concentration of 0.3  $\mu\text{M}$  promoted an increase in the values of this parameter. The interaction of brassinosteroids with the bacteria provided an increase in total soluble carbohydrates in the leaves and roots of corn plants subjected to water stress. Under water stress conditions, corn plants without inoculation and spraying 0.6  $\mu\text{M}$  of brassinosteroids, promoted an increase in the starch content in the leaves. In the roots, only the presence of the bacteria without or with the application of 0.3  $\mu\text{M}$  of brassinosteroids provided an increase in starch. The use of the plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* via seed and the application of brassinosteroids, alleviate the negative effects on nitrogen metabolism in leaves and roots caused by the occurrence of water deficiency in the corn crop.

**Key words:** *Zea mays L*, abiotic stress, plant hormone, inoculation, nitrogen.

## ÍNDICE

	Páginas
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIACÕES.....	XI
1 CONTEXTUALIZAÇÃO.....	11
2 HIPÓTESES E OBJETIVOS DA PESQUISA.....	19
2.1 HIPÓTESES.....	19
2.2 OBJETIVOS.....	19
2.2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 CAPITULO I: CRESCIMENTO E ASPECTOS FISIOLÓGICOS EM MILHO SUBMETIDAS A DEFICIÊNCIA HÍDRICA E CONCENTRAÇÕES DE BRASSINOSTERÓIDES E AZOSPIRILLUM.....	20
3.1 RESUMO.....	20
3.2 INTRODUÇÃO.....	21
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.5 CONCLUSÕES.....	40
3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	40
4 CAPITULO II: METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM MILHO SUBMETIDO A DEFICIÊNCIA HÍDRICA, A BRASSINOSTERÓIDES E AZOSPIRILLUM.....	45
4.1 RESUMO.....	45
4.2 INTRODUÇÃO.....	46
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.5 CONCLUSÕES.....	66
4.6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	67

## ÍNDICE DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I.....20

Tabela 1. Número de folhas, altura da planta, diâmetro do colmo, massa seca da raiz, colmo e folha em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides em plantas de milho.....30

Tabela 2. Conteúdo relativo de água, Clorofila a,b e Carotenóides em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides em plantas de milho.....32

Tabela 3. Carboidratos solúveis totais, Sacarose e Amido em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides em folhas de plantas de milho.....35

Tabela 4. Carboidratos solúveis totais, Sacarose e Amido em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides em raízes de plantas de milho.....38

CAPÍTULO II.....45

Tabela 1. Amônio, Proteína e Redutase do nitrato em folhas de plantas de milho em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides.....51

Tabela 2. Glicina betaína, Glutamina sintetase, Nitrato, Prolina e aminoácidos em folhas de plantas de milho em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides.....55

Tabela 3. Amônio, Proteína e Redutase do nitrato em raízes de plantas de milho em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides.....60

Tabela 4. Glicina betaína, Glutamina sintetase, Nitrato, Prolina e aminoácidos em raízes de plantas de milho em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides.....63

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I.....	20
Figura 01. Croqui do experimento (doze plantas dispostas em cada bancada na casa de vegetação).....	23
Figura 02. Atributos de fertilidade e granulometria do solo.....	23
Figura 03. Irrigação (A), semeadura (B) e germinação (C) das plantas de milho.....	25
Figura 04. Aplicação de brassinosteroides 15 DAP (A) e 30 DAP (B) com pulverizador manual.....	26
Figura 05. Plantas de milho irrigadas e com estresse.....	27
CAPÍTULO II.....	45
Figura 01. Preparação das sementes para o plantio, A) (inoculante sólido), B) (sementes de milho), C) (água destilada), D) (homogeneização) e E) (inoculação das sementes).....	48

## LISTA DE ABREVIACÕES

UFRA: Universidade Federal Rural da Amazônia

ICA: Instituto de Ciências Agrárias

IBRA: Instituto Brasileiro de Análises

EBPS: Estudos da biodiversidade em plantas superiores

KWS sementes: Klein Wanzleben e Saat

Br: Brassinosteroides

V3: três folhas completamente expandidas

V7: sete folhas completamente expandidas

DAP: Dias após o plantio

CRA: conteúdo relativo de gua

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O milho é um vegetal pertencente à família das gramíneas, ou Poaceae, possuindo o segundo lugar como o cereal mais produzido no país (CONAB 2019).

Em todo o mundo a safra de milho cresceu de 591 milhões para 1 bilhão de toneladas desde as safras de 2000 até 2018, constituindo um acréscimo de 82% na área. O uso do grão como na constituição de ração animal, na produção de frangos e suínos foi um dos motivos desse aumento (CONTINI et al, 2019). A produção no Brasil está em cerca de 245 milhões de toneladas, constituindo um acréscimo de 1,6% em comparação aos dados de 2018/19, tornando-se um recorde, de acordo com dados evidenciados pela CONAB (2019) sobre o primeiro levantamento de safra de grãos do ano de 2019 para 2020.

Ao longo do seu desenvolvimento, as plantas de maneira geral, podem ser expostas a uma série de estresses ambientais. O estresse abiótico que mais reduz a produtividade das culturas, impactando negativamente a sustentabilidade agrícola é o déficit hídrico proveniente da seca (KERRY et al., 2018). Esta condição adversa afeta os cereais, como o milho, desde da germinação, desempenho das plântulas até o enchimento dos grãos. Para Jaleel et al. (2008) e Farooq et al. (2009), a redução no crescimento ocorre devido à perda de pressão de turgor das células, fazendo com que se iniba os processos, tais como alongamento, divisão e diferenciação celular.

Nesse sentido, pelo fato de a cultura do milho ser conhecida pela sua alta sensibilidade ao estresse hídrico (WELCKER et al., 2007), pesquisas relacionadas à tolerância à seca podem trazer aumento no crescimento e no rendimento da cultura em regiões com déficit hídrico (LI et al., 2009).

Foram observadas alterações na condutância estomática, desestruturação de membranas, redução da atividade das enzimas antioxidativas, das trocas gasosas e da eficiência do fotossistema II (PSII) em Estudos realizados por Bhargava e Sawant, (2013) e Almeida et al. (2014) em plantas em condições de baixa disponibilidade hídrica.

Assim, é desejável a adoção de técnicas para o cultivo em condições de deficiência hídrica, as quais proporcione uma maior tolerância ao estresse pela cultura

do milho. Para minimizar os efeitos nocivos da deficiência hídrica no solo para as culturas, várias práticas agronômicas e fisiológicas estão sendo aplicadas, tais como o uso de bactérias e de atenuadores de estresse hídrico como os brassinosteróides que são reguladores de crescimento. Com o intuito de entender os vários fatores envolvidos para a seleção de estirpes de bactérias eficientes na promoção de crescimento das grandes culturas, o estudo das interações entre planta e microrganismos vem se intensificando nos últimos anos (FERREIRA et al., 2014).

Em várias partes do mundo a utilização de bactérias na formulação de inoculantes, ou biofertilizantes, vem sendo utilizada e estudada, sendo relatado que estas tecnologias podem diminuir os custos de produção e impacto ambiental e aumentar a produtividade das culturas (ISAWA et al., 2010; BHATTACHARYYA e JHA, 2012). As mais conhecidas incluem membros do gênero *Azospirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus* e *Arthrobacter*, sendo que algumas delas são encontradas na superfície das raízes enquanto outras invadem os tecidos das plantas, sem ocasionar sintomas aparentes de doença, quando são conhecidas como endofíticas (STURZ e NOWAK, 2000; ROSENBLUETH e MARTINEZ-ROMERO, 2006; HARDOIM et al., 2008).

As bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* estão localizados na subdivisão proteobactéria, na qual se encontram a maioria das bactérias gramnegativas, em forma de bastonete, podendo ser uniflageladas (flagelo polar) com um movimento vibratório característico, quando crescidas em meio líquido e, quando crescidas em meio sólido, além do flagelo polar desenvolvem flagelos laterais adicionais. São bactérias diazotróficas associativas endofíticas facultativas, mas que podem sobreviver no solo na forma de cistos (MOREIRA et al., 2010).

Apesar de terem o potencial de atuarem como organismos fixadores de N, um dos principais mecanismos que explica os efeitos benéficos da inoculação de sementes de plantas cultivadas com bactérias do gênero *Azospirillum* é a sua capacidade de produzir e metabolizar uma série de hormônios vegetais e de compostos que atuam diretamente na regulação do crescimento da planta, principalmente do sistema radicular (BASHAN et al., 2004).

Efeitos positivos da inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* sobre parâmetros associados com a fotossíntese, bem como parâmetros do crescimento de plantas, foram observados na cultura do trigo por Elanchezhian e Panwar (1997) e Bashan et al. (2006) em cultivo protegido, sem estresse. No presente estudo, contudo, mesmo na ausência de estresse, os efeitos da bactéria sobre a fotossíntese de plantas de milho não foram verificados. Zawoznik et al. (2011) observaram que plantas de cevada inoculadas com *Azospirillum brasilense* apresentaram melhor crescimento em ambiente salino, em comparação com plantas não inoculadas.

Entende-se que os resultados associados à inoculação de sementes com bactérias do gênero *Azospirillum* são bastante dinâmicos, considerando as constituições genéticas da planta e do hospedeiro, bem como as condições ambientais de cada estudo. Couillerot et al. (2013), por exemplo, obtiveram incremento significativo para o acúmulo de biomassa de plantas de milho inoculadas em conjunto com *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens* e *Glomus intraradices* apenas para os estádios iniciais do desenvolvimento.

Além das bactérias promotoras de crescimento, os brassinosteróides (Br), entre os vários compostos, especialmente o brassinolídeo, protege as plantas de uma série de estresses tanto abióticos como bióticos, além de serem conhecidos por regular o crescimento e aumentar a produtividade de plantas (JAGER et al., 2008; KUTSCHERA & WANG, 2012).

A aplicação exógena dos brassinosteróides sob condições de estresses é considerada uma abordagem promissora afim de obter ganhos em produtividade agrícola conjuntamente com a proteção ambiental (SHAHZAD et al., 2018). Nomura et al. (2007) observaram que existe influência dos brassinosteróides no desenvolvimento de sementes de ervilha, nas quais o nível máximo de Br ativos ocorreu durante a fase de rápido crescimento das sementes. Há relatos também de aumento do teor de lipídios em grãos de trigo devido à ação dos Br (HNILICKA et al., 2009).

Desde 1979, com a identificação do brassinolídeo em pólen de *Brassica napus*, o uso dos brassinosteróides no incremento da produtividade agrícola tem sido verificado na agricultura. A síntese do brassinolídeo e de seus análogos possibilitou elucidar o seu mecanismo de ação e suas interações com outros hormônios de crescimento vegetal. Assim, o brassinolídeo e seus compostos são reconhecidos coletivamente como

brassinosteróides (MANDAVA, 1988). Os brassinolídeo, 28-homobrasinolídeo e o 24-epibrassinolídeo são os brassinosteróides mais ativos e amplamente usados em estudos experimentais (VARDHINI et al., 2006).

A aplicação exógena do brassinosteróide foi testada em diferentes culturas agrícolas com a finalidade de compreender os mecanismos de ação deste composto em diferentes estádios de desenvolvimento de diferentes espécies. Em plantas de pepino (*Cucumis sativus*) tratadas com Br, foi verificada resistência das plantas à seca (PUSTOVOITOVA et al., 2001). Em soja (*Glycine max* L.), aplicação de Br no início da floração em plantas submetidas a estresse hídrico, aumentou a tolerância à seca e as perdas de rendimento foram minimizadas (ZHANG et al., 2008). Aplicação exógena de Br aliviou os efeitos negativos da seca em milho (*Zea mays*), reforçando as atividades enzimáticas antioxidantes e os teores de proteínas, água e prolina (ANJUM et al., 2011).

Também a aplicação de Br melhorou a tolerância à seca em arroz (*Oryza sativa*) associado à maior potencial de água dos tecidos, aumento da síntese de metabólitos e aumento da capacidade do sistema antioxidante (FAROOQ et al., 2010).

Nesse contexto, diante dos danos que a baixa disponibilidade hídrica pode ocasionar, torna-se necessário a busca por tecnologias que sejam capazes de minimizar os efeitos deletérios para as plantas, em razão disso, é de grande importância conhecer a ação dos brassinosteróides e do Azospirillum, que de acordo com estudos anteriores, são capazes de mitigar os danos ocasionados pelo déficit hídrico.

A hipótese geral do trabalho é a de que os parâmetros de crescimento e fisiologia em plantas de milho sob estresse hídrico sofrem alterações em função das concentrações de brassinosteróides e azospirillum e que o metabolismo do nitrogênio em plantas de milho com deficiência hídrica sofre mudanças em função das concentrações de brassinosteróides e azospirillum.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação do brassinosteróides e do azospirillum no crescimento, aspectos fisiológicos e metabolismo do nitrogênio durante a fase vegetativa de plantas de milho submetidas a deficiência hídrica.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, J. P. N.; PINHEIRO, C. L.; LESSA, B. F. C.; GOMES, F. M.; MEDEIROS FILHO, S. Estresse hídrico e massa de sementes na germinação e crescimento de

plântulas de *Amburana cearensis* (Allemão) AC Smith. *Revista Ciência Agronômica*, v. 45, n. 4, p. 777-787, 2014.

ANJUM, S. A.; WANG, L. C.; FAROOQ, M.; HUSSAIN, M.; XUE, L. L.; AND ZOU, C. M. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *Journal of Agronomy and Crop Science*, v. 197, n. 3, p. 177–185, 2011.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L.E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.50, n.8, p.521-577, 2004.

BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J.J.; LEYVA, L.A.; HERNANDEZ, J.P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils*, Firenze, v.42, n.4, p.279-285, 2006.

BHARGAVA, S.; SAWANT, K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression (Review). *Plant Breeding*, v. 132, n. 1, p. 21-32, 2013.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

CONAB. Primeiro levantamento da safra 2019/20 de grãos indica produção de 245 milhões de t. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3080-primeiro-levantamento-da-safra-2019-20-de-graos-indica-producao-de-245-8-milhoes-de-t>>. 2019. Acesso em: 12 de dezembro de 2019.

CONTINI, E.;MOTA, M. M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R. A.; SILVA, A. F.;SILVA, D. D.; MACHADO, J. R. A.; COTA, L. V.; COSTA, R. V.; MENDES, S. M. Milho - Caracterização e Desafios Tecnológicos. Embrapa, 2019.

COUILLEROT, O.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; WALKER, V.; VON FELTEN, A.; JANSA, J.; MAURHOFER, M.; DÉFAGO, G.; PRIGENT-COMBARET, C.; COMTE, G.; CABALLEROMELLADO, J.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* consortia for promotion of maize growth. *Applied Microbiology Biotechnology*, Münster, v.97, n.10, p.4639-4649, 2013.

ELANCHEZHIAN, R.; PANWAR, J.D.S. Effects of 2,4-D and *Azospirillum brasilense* on nitrogen fixation, photosynthesis and grain yield in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, Berlin, v.178, n.1, p.129-133, 1997.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; BASRA, S. M. A.; DIN, I. U. Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*. v. 195, n. 4, p. 262-269, 2009a.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; LEE, D. J.; CHEEMA, S. A.; AZIZ, T. Comparative time course action of the foliar applied glycine betaine, salicylic acid, nitrous oxide, brassinosteroids and spermine in improving drought resistance of rice. *Journal of Agronomy and Crop Science*. V. 196, n. 5, p. 336-345. 2010.

FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G.; Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 655-665, 2014.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, Netherlands, v.16, n.10, p. 463–471, 2008.

HNILICKA, F.; HNILICKOVA, H.; MARTINKOVA, J.; BLAHA, L.; KADLEC, P. Impact of 24-epibrassinolide on chemical structure and energy content in wheat grain. *Vagos*, v. 83, p. 17–22. 2009.

ISAWA, T.; YASUDA, M.; AWASAKI, H.; MINAMISAWA, K.; SHINOZAKI, S.; NAKASHITA, H. *Azospirillum* sp. strain B510 enhances rice growth and yield. *Microbes and Environments*, Ibaraki, v. 25, n. 1, p. 58-61, 2010.

JAGER, C. E.; SYMONS, G. M.; ROSS, J. J.; REID, J. B. Do brassinosteroids mediate the water stress response? *Physiologia Plantarum*, v. 133, n. 2, p. 417-425, 2008.

JALEEL, C. A et al. Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, [s.l.], v. 61, n. 2, p.298-303, fev. 2008.

KERRY, R. G.; PATRA, S.; GOUDA, S.; PATRA, J. K.; DAS, G. Microbes and Their Role in Drought Tolerance of Agricultural Food Crops. 2018. In: *Microbial Biotechnology*. Springer, Singapore. p. 253-273, 2018.

KUTSCHERA, U.; WANG, Z. Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian Perspective (Darwin review). *Journal of Experimental Botany*, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2012.

LI, Y.; SPERRY, J. S.; SHAO, M.; Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. *Environmental and Experimental Botany*, v.66, p.341-346, 2009.

MANDAVA, N. B. Plant Growth-Promoting Brassinosteroids. *Annals Rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology*, v. 39, p. 23–52. 1988.

NOMURA, T.; UENO, M.; YAMADA, Y.; TAKATSUTO, S.; TAKEUCHI, Y.; YOKOTA, T. Roles of Brassinosteroids and Related mRNAs in Pea Seed Growth and Germination. *Plant Physiology*, v. 143, p. 1680–1688. 2007. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093096>.

PUSTOVOITOVA, T. N.; ZHDANOVA, N. E.; ZHOLKEVICH, V. N. Epibrassinolide increases plant drought resistance. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, v. 376, p. 36-38, 2001.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, México, v.19, n.8, p.827-837, 2006.

SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; CHE, Z.; REHMAN, A.; CHEEMA, S. A.; SHARMA, A.; ... ZHAORONG, D. Role of 24-epibrassinolide (EBL) in mediating heavy metal and pesticide induced oxidative stress in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 147, p. 935–944. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.066>.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, Canadá, v. 15, n.1, p. 183-190, 2000.

VARDHINI, B. V.; ANURADHA, S.; RAO, S. S. R. Brassinosteroids - a great potential to improve crop productivity. *Indian Journal of Plant Physiology*, v. 11, p. 1–12. 2006.

WELCKER, C.; BOUSSUGE, B.; BENCIVENNI, C.; RIBAUT, M.; TARDIEU, F. Are source and sink strengths genetically linked in maize plants subjected to water déficit?: a QTL study of the responses of leaf growth and of Anthesis-Silking Interval to water déficit. *Journal of Experimental Botany*, v.58, p.339-349, 2007.

ZAWOZNIK, M.S.; AMENEIROS, M.; BENAVIDES, M.P.; VÁZQUEZ, S.; GROPPA, M.D. Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. *Applied Microbiology Biotechnology*, Münster, v.90, n.4, p.1389- 1397, 2011.

ZHANG, M.C.; ZHAI, Z. X.; TIAN, X. L.; DUAN, L. S.; LI, Z. H. Brassinolide alleviated the adverse effect of water deficits on photosynthesis and the antioxidant of soybean (*Glycine max L.*). *Plant Growth Regulation*, v. 56. n. 3, p. 257-264, 2008.

## 2 HIPÓTESES E OBJETIVOS DA PESQUISA

### 2.1 HIPÓTESES

- Os parâmetros de crescimento (em fase vegetativa) e aspectos fisiológicos de plantas de milho sob estresse hídrico sofrem alterações em função das concentrações de brassinosteróides e azospirillum;
- O metabolismo do nitrogênio em plantas de milho com deficiência hídrica sofre mudanças em função das concentrações de brassinosteróides e azospirillum.

### 2.2 OBJETIVOS

#### 2.2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação do brassinosteróides e do azospirillum no crescimento, aspectos fisiológicos e metabolismo do nitrogênio durante a fase vegetativa de plantas de milho submetidas a deficiência hídrica.

#### 2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar através das variáveis de crescimento (a altura das plantas, diâmetro do colmo, número de folhas), da fisiologia (Clorofila a, b, total e Carotenóides, Sacarose, Amido e Carboidratos Solúveis Totais nas folhas e raízes) e da produção de biomassa (massa seca da raiz, folha e colmo) o comportamento das plantas de milho sob ação de brassinosteróides e azospirillum quando submetidas a deficiência hídrica.
- Verificar através do comportamento metabólico do nitrogênio (Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ); a Atividade da enzima redutase do nitrato (RN); o Amônio livre ( $\text{NH}_4^+$ ); os Aminoácidos solúveis totais; os Teores de proteínas solúveis; a Prolina; a Glicina betaína e a Atividade da glutamina sintetase) os efeitos das concentrações de brassinosteróides e azospirillum em plantas de milho submetidas a deficiência hídrica.

### 3 CAPITULO I: CRESCIMENTO E ASPECTOS FISIOLÓGICOS EM MILHO SUBMETIDAS A DEFICIÊNCIA HÍDRICA E CONCENTRAÇÕES DE BRASSINOSTERÓIDES E AZOSPIRILLUM

#### 3.1 RESUMO

Diante dos efeitos que as mudanças climáticas ocasionam na produção agrícola, há a necessidade de se buscar práticas de manejos que sejam mais eficientes, a fim de se minimizar alterações decorrentes do déficit hídrico. Assim, estudos com bactérias promotoras de crescimento como a *Azospirillum brasilense*, bem como de hormônios como os brassinosteroides que são atenuadores de deficiência de água no solo, vem sendo cada vez mais desenvolvidos. Objetivou-se avaliar a influência do brassinosteróide e *Azospirillum brasilense* no crescimento e aspectos fisiológicos de plantas de milho submetidas a condições de deficiência hídrica. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetal com um híbrido de milho (K9606 VIP3). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x3, com seis repetições, totalizando 72 unidades experimentais. O primeiro fator corresponde a dois regimes hídricos (presença de deficiência hídrica e ausência de deficiência hídrica). O segundo fator corresponde a inoculação via semente (no momento da semeadura) do *Azospirillum brasilense* e ausência de inoculação. E o terceiro fator corresponde a aplicação de três concentrações de Brassinosteróides (0, 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$  Br). Determinou-se a altura das plantas, diâmetro do colmo, número de folhas, massa seca da raiz, folha e colmo, conteúdo relativo de água, clorofila a, b, total e carotenoides, sacarose, amido e carboidratos solúveis totais nas folhas e raízes. A clorofila a foi maior no tratamento com estresse e inoculados e concentração 0,3  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides. As plantas estressadas, inoculadas, os valores de carboidratos foram maiores nos tratamentos com concentrações 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$ . Na concentração 0,6  $\mu\text{M}$  as plantas estressadas e inoculadas obtiveram maior conteúdo relativo de água. A interação dos brassinosteróides com a *Azospirillum brasilense* proporcionaram um incremento no conteúdo relativo de água, na clorofila a e no teor de carboidratos solúveis totais nas folhas e nas raízes das plantas de milho submetidas ao estresse hídrico. Os brassinosteroides de forma isolada, mitigou as influências negativas ocasionadas pela deficiência hídrica, proporcionando incrementos no número de folha, na clorofila b e no teor de amido nas folhas

**Palavras-chave:** mudanças climáticas; hormônio; bactéria; *Zea mays*

### 3.2 INTRODUÇÃO

A agricultura é uma atividade bastante influenciada tanto por condições climáticas quanto meteorológicas, onde pode-se esperar que alterações no clima venham a afetar a produtividade das culturas agrícolas, ameaçando-as ou proporcionando-lhes oportunidades para melhoras (GORNALL et al., 2010). Nesse sentido, tem sido uma grande preocupação de pesquisadores e governos em todo o mundo estudar os impactos das mudanças climáticas objetivando compreender o que pode ser feito, a fim de mitigar seus efeitos e, ou, se adequar a essas alterações nas diversas atividades humanas (SANTOS et al 2011).

A cultura do milho é bastante conhecida pela sua alta sensibilidade ao estresse hídrico (WELCKER et al., 2007), em função disso, pesquisas referentes à tolerância à seca podem proporcionar um incremento no crescimento e no rendimento da cultura em regiões com déficit hídrico (LI et al., 2009).

Visando atenuar os efeitos maléficos causados as plantas de milho, existem vários hormônios que estão envolvidos na modulação da resposta dos vegetais ao estresse, dentre eles os brassinosteróides (Br), estes, são um tipo de fitormônios esteroides com influência no crescimento da planta (VARDHINI, 2012; BAJGUZ; PIOTROWSKA-NICZYPORUK, 2014).

Além da utilização de hormônios como os brassinosteróides, a utilização de adubação nitrogenada, importante para o crescimento e produção nas plantas de milho, é fundamental para que elas consigam expressar seu máximo potencial agrícola, uma vez que o nitrogênio é o nutriente mais requerido pelas plantas (DUVICK, 2005).

Para alcançar altas produtividades na cultura do milho, é de suma importância analisar fontes alternativas de nitrogênio e entender como ocorre a sua absorção e assimilação pelas plantas (OLIVEIRA, 2016). Bactérias diazotróficas, tais como a *Azospirillum brasilense*, são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico onde este pode servir de aporte suplementar para o cultivo de gramíneas (FIBACH-PALDI; BURDMAN; OKON, 2012).

Diante dos efeitos que as mudanças climáticas ocasionam na produção agrícola, há a necessidade de se buscar práticas de manejos que sejam mais eficientes, a fim de se

minimizar alterações decorrentes do déficit hídrico. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a influência do brassinosteróide e *Azospirillum brasilense* no crescimento e aspectos fisiológicos de plantas de milho submetidas a condições de deficiência hídrica.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Condição experimental e material vegetal

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetal, que pertence a Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), localizado em Belém-Pará, cujas coordenadas geográficas são 01° 27' 21" S, 48° 30' 16" W, no período de 10 de Dezembro de 2019 a 28 de Janeiro 2020. Nessa região, a temperatura média está em torno de 26,5°C, com instabilidade do ar significativa e umidade média em torno de 84% (Bastos et al., 2002).

Para a realização do experimento utilizou-se as sementes de milho oriundas da empresa KWS sementes (Klein Wanzleben e Saat), o híbrido K9606 VIP3, desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental, que apresenta alta estabilidade produtiva, alto rendimento, boa amplitude de plantio e espigas com pedúnculo decumbente. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x3, com seis repetições, totalizando 72 unidades experimentais (Figura 01). O primeiro fator corresponde a dois regimes hídricos (presença de deficiência hídrica e ausência de deficiência hídrica). O segundo fator corresponde a inoculação via semente (no momento da semeadura) do *Azospirillum brasilense* e ausência de inoculação. E o terceiro fator corresponde a aplicação de três concentrações de brassinosteróides (0, 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$ ).

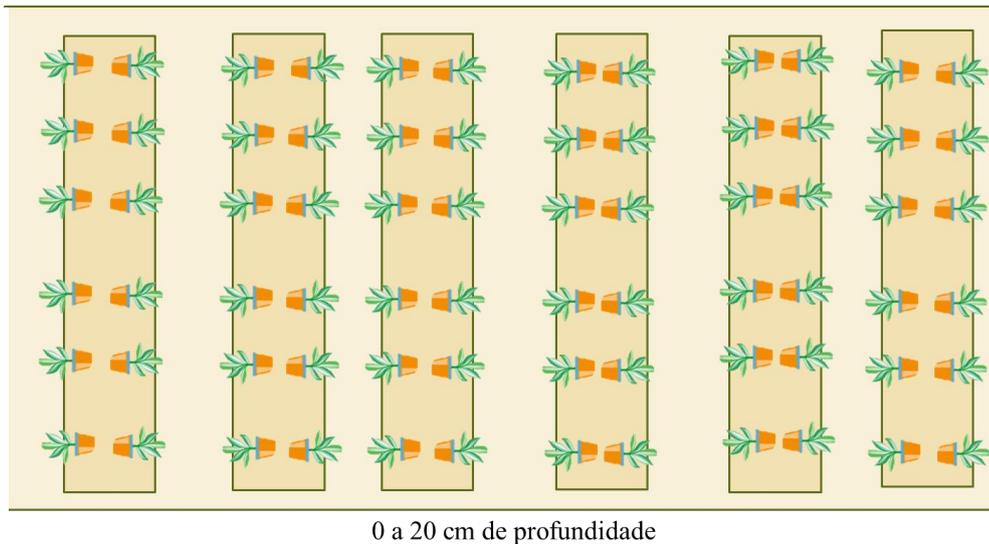


Figura 01. Croqui do experimento (doze plantas dispostas em cada bancada na casa de vegetação).

Assim, para execução do experimento, utilizou-se 72 baldes com capacidade de 15 Kg cada (diâmetro superior: 30 cm; diâmetro inferior: 26 cm; altura: 33 cm), sendo preenchido com um solo coletado na camada de 0 a 20 cm de profundidade (Amostras do horizonte superficial de um Latossolo Amarelo Distrófico, textura média) no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da UFRA. Após a realização da coleta do solo, as amostras foram previamente peneiradas para retirada de impurezas e homogeneizadas. Logo após, foi retirada uma porção dessas amostras e submetida a análises químicas e granulométricas, a fim de caracterizar a fertilidade e a textura do solo.

Realizou-se a análise química do solo, para fins de fertilidade (Figura 02), no qual foi determinada no laboratório de solo do Instituto Brasileiro de Análises (IBRA), de acordo com os métodos descritos pelo IAC (2001) e EMBRAPA (2009) obtendo-se os seguintes resultados:

Parâmetros	Metodologia	Un. medida	Faixas encontradas na área de estudo <sup>2</sup>
<b>Físicos do solo</b>		g/Kg	
Argila (HMFS + NaOH)	IAC		99
Silte (HMFS + NaOH)			102
Areia Total (HMFS + NaOH)			799
Textura			Arenosa
<b>Química do solo</b>			

M. O (Oxidação)	IAC	g/dm <sup>3</sup>	34
COT (Cálculo)			20
Ph (CaCl <sup>2</sup> )		–	5,3
pH Tampão (SMP)			6,41
H <sup>o</sup> + Al <sup>3</sup> (Cálculo)		mmolc/dm <sup>3</sup>	27
Al <sup>3</sup> ( KCl)			0
H <sup>o</sup> (Cálculo)			27
C.T.C. (Cálculo)			72,1
S.B. (Cálculo)			45,1
V% (Cálculo)		%	63
m% (Cálculo)			0
Al na CTC (Cálculo)			0
H na CTC (Cálculo)			37,4
<b>Macronutrientes</b>			
(NO <sub>3</sub> + NH <sub>4</sub> ) - N Total	–	ppm	2388
(Ac. Salicílico)			
Fósforo (P) (Resina)	IAC	mg/dm <sup>3</sup>	77
Potássio (K) (Resina)		mmolc/dm <sup>3</sup>	2,5
Magnésio (Mg) (Resina)			14
Cálcio (Ca) (Resina)			28
Enxofre (S)		mg/dm <sup>3</sup>	10
Na (Mehlich)	Embrapa	mmolc/dm <sup>3</sup>	0,6
Ca/K (Cálculo)	–	–	11,2
Ca/Mg (Cálculo)			2
Mg/K (Cálculo)			5,6
<b>Micronutrientes</b>			
Ferro (Fe) (Mehlich)	EMBRAPA	mg/dm <sup>3</sup>	168
Manganês (Mn) (Mehlich)			15,5
Cobre (Cu) (Mehlich)	–		0,1
Zinco (Zn) (Mehlich)	EMBRAPA		18
Boro (B) (Água Quente)	IAC		2,51
Molibdênio (Mo) (Água Rêgia)	–		0,2

Figura 02. Atributos de fertilidade e granulometria do solo

### 3.3.2 Preparação das sementes para o plantio

Antes do semeio, as sementes de milho que foram inoculadas com *Azospirillum* foram separadas. Assim, misturou-se 200 g de inoculante (sólido turfoso milho – *Zea mays*, *Azospirillum brasilense* - Estirpes AbV5 e AbV6) em 1 ml de água destilada, logo em seguida adicionou-se as sementes e se fez o plantio.

A irrigação foi feita diariamente adicionando-se água até atingir a capacidade de campo de cada balde, sendo essa observada através do escoamento no fundo dos baldes. As plantas de milho foram obtidas a partir da germinação inicial de cinco sementes por vaso, com posterior manutenção de apenas uma planta, por meio do desbaste (Figura 03).

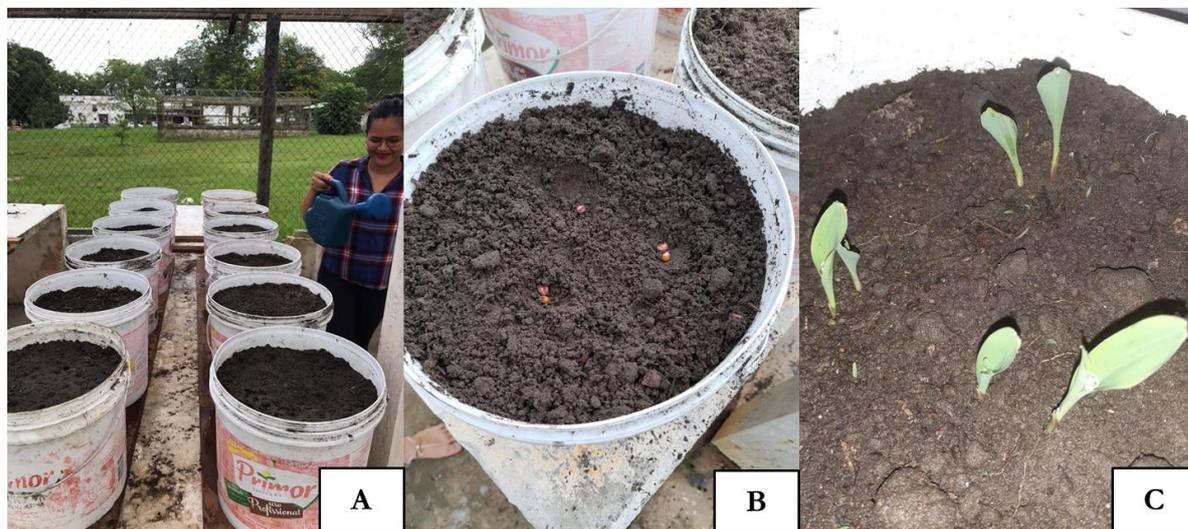


Figura 03. Irrigação (A), semeadura (B) e germinação (C) das plantas de milho.

### 3.3.3 Aplicação de brassinosteróides em plantas de milho

Quinze dias após o plantio foi realizada a primeira aplicação de brassinosteróides nas concentrações 0 (Plantas controle, sem aplicação de brassinosteróides); 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteroides (Sigma-Aldrich, USA), as soluções foram preparadas dissolvendo o soluto em etlianol seguido de diluição com água Milli-Q [etlianol: água (v / v) = 1: 10.000] (Ahammed et al. 2013); as plantas estavam no estágio V3 (três folhas completamente expandidas). Assim, para a aplicação utilizou-se 72 ml de brassinosteroides em cada aplicação. Inicialmente separou-se 100 ml de brassinosteroides para a concentração de 0,3  $\mu\text{M}$  e 100 ml para a concentração de 0,6  $\mu\text{M}$ . Nos 100 ml de cada concentração foram adicionados 5 ml de tween20 como agente surfactante.

Ao todo foram realizados duas aplicações, a primeira, 15 dias após o plantio (DAP) com as plantas no estágio V3 e a segunda 30 DAP com plantas no estágio V7 (sete folhas completamente expandidas). A aplicação foi feita aplicando 3 ml de brassinosteroides, com pulverizador manual, por planta na face adaxial (em cima) das

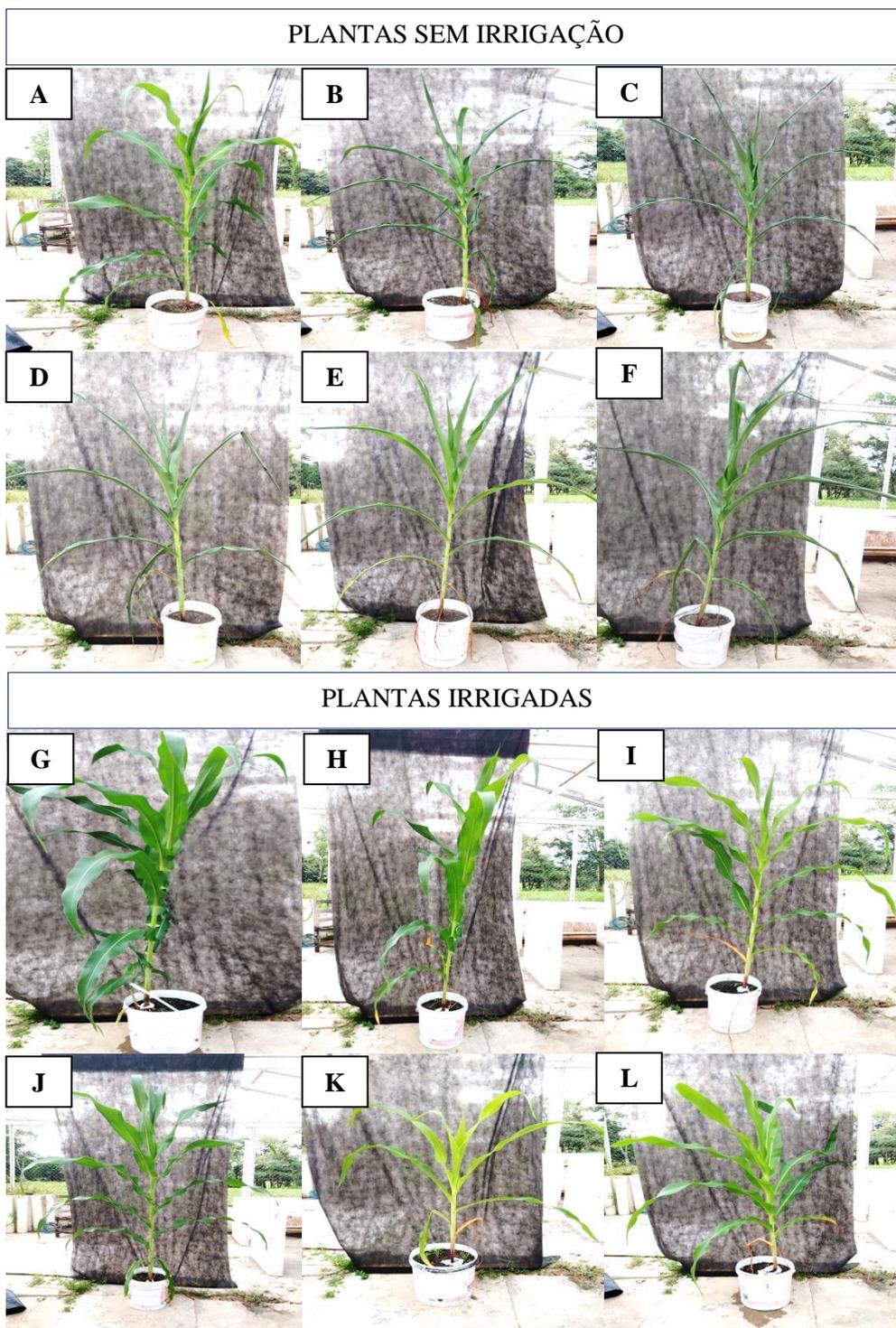
folhas do terço médio das plantas, sempre no final da tarde (17h e 18h), com a finalidade de evitar perdas por evaporação e deriva (Figura 04).



Figura 04. Aplicação de brassinosteroides 15 DAP (A) e 30 DAP (B) com pulverizador manual.

#### 3.3.4 Aplicação do estresse hídrico

Dez dias após a última aplicação de brassinosteroides, as plantas foram submetidas a deficiência hídrica severo nos tratamentos que receberiam o estresse, com suspensão total da água (disponibilidade hídrica 0%). Os demais tratamentos continuaram recebendo água até a retirada do experimento.



\*BR: Brassinosteroides (0; 0,3; 0,6  $\mu\text{M}$ ); SB/CB: Sem bactéria/Com bactéria.

A) Plantas com BR na concentração 0,6  $\mu\text{M}$  e SB; B) Plantas com BR na concentração 0,3  $\mu\text{M}$  e SB; C) Plantas sem BR e SB; D) Plantas com BR na concentração 0,6  $\mu\text{M}$  e CB; E) Plantas com BR na concentração 0,3  $\mu\text{M}$  e CB; F) Plantas sem BR e CB; \* Plantas sem irrigação.

G) Plantas com BR na concentração 0,6  $\mu\text{M}$  e SB; H) Plantas com BR na concentração 0,3  $\mu\text{M}$  e SB; I) Plantas sem BR e SB; J) Plantas com BR na concentração 0,6  $\mu\text{M}$  e CB; K) Plantas com BR na concentração 0,3  $\mu\text{M}$  e CB; L) Plantas sem BR e CB. \* Plantas irrigadas.

FIGURA 05. Plantas de milho irrigadas e com estresse.

Cinco dias após a aplicação do estresse, as plantas passaram a apresentar sinais de murchamento das folhas. Assim, com sete dias após a suspensão da irrigação, foi realizada a retirada das plantas.

### 3.3.5 Coleta e armazenamento do material

A coleta das plantas ocorreu ao 47º DAP às 04:30 h. A determinação do conteúdo relativo de água (CRA) foi feita in vivo, selecionando-se ainda em casa de vegetação, folhas primárias completamente expandidas de cada uma das repetições para a retirada dos discos.

Logo após, as plantas foram separadas em folha, colmo e raiz, sendo as raízes lavadas em água corrente. Estes foram armazenados em sacos de papéis e colocados na estufa de ventilação de ar forçada a 65°C por 48 h. Após a secagem foram pesados as folhas e as raízes e moída em moinho tipo Wiley, sendo devidamente armazenado em tubos de falcon onde foram conduzidas as análises bioquímicas no laboratório de estudos da biodiversidade em plantas superiores (EBPS).

### 3.3.6 Variáveis de crescimento

As determinações para os parâmetros de crescimento foram baseadas em mensurações realizadas no final do período experimental, obtendo as seguintes variáveis:

- Altura de Planta: medida da superfície do solo até o ápice da planta, através do uso de uma régua milimetrada. O resultado foi expresso em cm.
- Diâmetro do Colmo: medido a 4cm acima do solo utilizando-se um paquímetro digital 200 mm da Digimes. Resultado foi expresso em mm.
- Número de Folhas: foi realizada a contagem do número de folhas completamente expandida totais presentes nas plantas.

### 3.3.7 Determinação da biomassa

Para a determinação da biomassa, as folhas e os caules foram colocados em sacos de papel kraft e acondicionados em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C, enquanto as raízes foram lavadas, na qual o solo aderido as mesmas raízes foi totalmente removido, e depois de retirada a umidade excessiva, foram também conduzidas à estufa. Os materiais vegetais foram secos até atingir peso constante, mensurando-se suas biomassas (g planta<sup>-1</sup>).

### 3.3.8 Determinações das variáveis bioquímicas

Foram determinados o Conteúdo relativo de água em folhas, através do método utilizado por Slavick (1979). Os teores de Clorofila a, Clorofila b, Clorofila total e Carotenoides através do método descrito por Lichthenthaler (1987). A determinação das concentrações de Sacarose foi determinada segundo o método Van Handel (1968). E o método utilizado para a obtenção das concentrações de Amido e de Carboidratos Solúveis Totais foi segundo Dubois et al. (1956).

### 3.3.9 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) pelo teste F ( $p < 0,05$ ) e as medias obtidas foram submetidas ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa computacional SISVAR versão 5.4 (Ferreira, 2010).

## 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao comparar os tratamentos, plantas com e sem inoculação, nas mesmas condições de estudo (com deficiência hídrica e nas doses de brassinosteróides), observa-se que as plantas de milho na ausência de *Azospirillum brasilense* e dosagem 0,6 µM de brassinosteróides, apresentaram maiores números de folhas (15,00Aα) quando comparado com os tratamentos inoculados (12,50Aαβ) conforme observado na Tabela 1. Isso demonstra que a ação conjunta do *Azospirillum brasilense* e dosagem 0,6 µM de brassinosteróides não foi eficiente para proporcionar um aumento no número de folhas quando em condições de déficit hídrico, no entanto, a aplicação de brassinosteróides de forma isolada, sem bactéria, proporcionou um incremento no número de folhas das

plantas de milho quando submetidas ao estresse hídrico, isso pode ter ocorrido pelo fato dos brassinosteróides atuarem nos processos de alongamento celular, diferenciação do xilema, alongamento de raízes e caules, dominância apical e expansão foliar (BAJGUAZ et al, 2009). Os brassinosteróides de maneira geral, contribuem de forma efetiva nos mecanismos de tolerância das plantas a diversos tipos de estresses abióticos (LARRÉ et al., 2011).

Tabela 1. Número de folhas, altura da planta, diâmetro do colmo, massa seca da raiz, colmo e folha em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides em plantas de milho.

Irrigação	Inoculação	Brassinosteróides ( $\mu\text{M}$ )		
		0	0,3	0,6
Número de folhas				
Irigado	Presença	15,25Aaa*	13,75Aaa	14,25Aaa
Irigado	Ausência	14,50Aaa	14,00Aaa	14,75Aaa
Déficit hídrico	Presença	14,00Aaa	13,75Aaa	12,50Aa $\beta$
Déficit hídrico	Ausência	15,25Aaa	12,75Aba	15,00Aaba
CV (%)	9,80			
Altura de planta (cm)				
Irigado	Presença	65,00Aaa	49,25Aaa	43,50Aa $\beta$
Irigado	Ausência	71,75Aaa	55,00Aaa	64,75Aaa
Déficit hídrico	Presença	59,25Aaa	54,75Aaa	51,25Aaa
Déficit hídrico	Ausência	64,25Aaa	48,75Aaa	60,75Aaa
CV (%)	24,20			
Diâmetro do colmo (mm)				
Irigado	Presença	21,53Aaa	16,35Aaa	19,76Aaa
Irigado	Ausência	23,77Aaa	16,73Aaa	18,23Aaa
Déficit hídrico	Presença	20,13Aaa	17,56Aaa	14,33Aaa
Déficit hídrico	Ausência	20,50Aaa	16,47Aaa	15,65Aaa
CV (%)	29,63			
Matéria seca da raiz (g)				
Irigado	Presença	51,25Aaa	50,00Aaa	38,75Aaa
Irigado	Ausência	51,25Aaa	43,75Aaa	62,50Aaa
Déficit hídrico	Presença	53,75Aaa	46,25Aaa	41,25Aaa
Déficit hídrico	Ausência	52,50Aaa	40,00Aaa	53,75Aaa
CV (%)	54,97			
Matéria seca do colmo (g)				
Irigado	Presença	50,00Aaa	40,00Aaa	43,75Aaa
Irigado	Ausência	60,00Aaa	45,00Aaa	40,00Aaa
Déficit hídrico	Presença	41,25Aaa	30,00Aaa	28,75Aaa
Déficit hídrico	Ausência	37,50Aaa	33,75Aaa	45,00Aaa
CV (%)	44,26			
Matéria seca das folhas (g)				
Irigado	Presença	40,00Aaa	31,25Aaa	31,25Aaa
Irigado	Ausência	42,50Aaa	31,25Aaa	36,75Aaa
Déficit hídrico	Presença	36,25Aaa	25,00Aaa	26,25Aaa

Déficit hídrico	Ausência	36,25Aαα	28,75Aαα	31,25Aαα
CV (%)	25,41			

\*Médias seguidas de mesma letra (letras maiúsculas para regimes hídricos, letras minúsculas para doses de brassinosteróides e letras gregas para inoculação com *Azospirillum brasilense*) não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Na concentração 0  $\mu\text{M}$  de brassinosteróide, os tratamentos com deficiência hídrica na ausência de inoculação apresentaram maior número de folhas do que as plantas que receberam aplicação de 0,3  $\mu\text{M}$ , não diferindo, entretanto, estatisticamente das plantas que receberam a maior concentração (0,6  $\mu\text{M}$ ). Esse resultado demonstra que em condições de estresse hídrico e ausência de bactéria, as plantas de milho apresentaram maior número de folhas, na menor e maior concentração de brassinosteróides, isso pode ter ocorrido devido o tempo de exposição dos tratamentos ao déficit hídrico (7 dias) não ter sido suficiente para causar um decréscimo nas folhas, possivelmente porque o solo ainda permanecia úmido, pois o estresse hídrico está diretamente ligado com a quantidade de água existente no solo (FARIAS, 2005).

Para o parâmetro altura da planta, observa-se que os tratamentos irrigados na ausência de inoculação e na maior concentração de brassinosteróides apresentaram maiores valores (64,75Aαα) de altura em relação as plantas na presença de inoculante nas mesmas condições de estudo (43,50Aαβ), demonstrando que a aplicação do análogo de brassinosteróide na concentração 0,6  $\mu\text{M}$  estimulou o crescimento das plantas quando em condições de suprimento hídrico. Isso se deve provavelmente, ao fato dos brassinosteróides terem a função de promover o aumento do tamanho das células, e conseqüentemente está envolvido no alongamento do caule.

O diâmetro do colmo, a massa seca da raiz, do colmo e da folha não sofreram efeito significativos (Tabela 01).

Ao analisar a Tabela 2, observa-se que o conteúdo relativo de água, foi maior nos tratamentos irrigados tanto na presença ou ausência de inoculantes e em todas as concentrações de brassinosteróides em comparação com as plantas controle. Essa redução do conteúdo relativo de água nas plantas sob estresse hídrico ocorreu provavelmente devido à baixa quantidade de água disponível no solo, além disso com a transpiração as plantas acabam perdendo água para a atmosfera tornando-se assim murcha, uma vez que a planta não consegue retirar água do solo.

A determinação do conteúdo de água na planta (%) é utilizada em estudos de adaptação de plantas a condições de seca (JONES, 2007). Fioreze et al. (2011) estudaram o comportamento de cultivares de soja submetidos a intensa restrição hídrica. Esses autores observaram que o conteúdo relativo de água (%) dos genótipos que foram submetidos a um intenso déficit hídrico reduziu em comparação aos grupos que foram bem irrigados, sendo o mesmo observado no presente trabalho.

Segundo Cooper et al., (2012), essa retenção pode estar relacionada à maior densidade e ao maior conteúdo de argila, resultando em uma grande proporção de microporos e conseqüentemente, maior retenção de água. Conforme a quantidade de água no solo diminui, a sucção do solo aumenta e a absorção de água pelas raízes dificulta, até que, no ponto de murcha permanente, a sucção do solo excede a sucção que pode ser exercida pela planta, e a absorção tende a cessar. Contudo, estudos (CHAUM et al., 2010; PAIXÃO et al., 2014) mostram que mesmo quando se alcança um ponto baixo de umidade no solo, uma quantidade pequena de água permanece a entrar na planta, porém não é suficiente para manter o crescimento.

As plantas na ausência de inoculação, irrigadas e concentração 0,3 µM de brassinosteróides, apresentaram maiores conteúdo relativo de água que as plantas inoculadas na mesma condição estudada. O mesmo aconteceu para os tratamentos com estresse, onde na ausência de *Azospirillum brasilense* e em todas as concentrações de brassinosteróides, as plantas sem bactéria apresentaram maior conteúdo relativo de água que as plantas inoculadas (TABELA 2). Além disso, na concentração 0,6 µM de brassinosteróides, as plantas com deficiência hídrica na presença de inoculação obtiveram maior conteúdo relativo de água.

Tabela 2. Conteúdo relativo de água, Clorofila a,b e Carotenóides em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides em plantas de milho.

Irrigação	Inoculação	Brassinosteróides (µM)		
		0	0,3	0,6
Conteúdo relativo de água (%)				
Irigado	Presença	90,29Aα*	89,38Aαβ	91,66Aα
Irigado	Ausência	91,36Aα	92,34Aα	91,38Aα
Déficit hídrico	Presença	56,34Bcβ	62,61Bbβ	70,88Baβ
Déficit hídrico	Ausência	76,51Baα	77,77Baα	79,32Baα
CV (%)	2,2			
Clorofila a (mg. kg <sup>-1</sup> MF)				
Irigado	Presença	0,038Aα	0,018Baα	0,014Aα

Irrigado	Ausência	0,017Aaα	0,021Aaα	0,022Aaα
Déficit hídrico	Presença	0,018Aba	0,045Aaα	0,010Aba
Déficit hídrico	Ausência	0,032Aaα	0,027Aaα	0,025Aaα
CV (%)	61,28			
Clorofila b ( mg. kg <sup>-1</sup> MF )				
Irrigado	Presença	0,022Aaα	0,017Aaα	0,011Aaα
Irrigado	Ausência	0,037Aaα	0,015Baα	0,018Aaα
Déficit hídrico	Presença	0,021Aaα	0,041Aaα	0,035Aaα
Déficit hídrico	Ausência	0,044Aaα	0,052Aaα	0,029Aaα
CV (%)	64,15			
Carotenóides ( mg. kg <sup>-1</sup> MF )				
Irrigado	Presença	0,15Aaα	0,15Aaα	0,12Aaα
Irrigado	Ausência	0,16Aaα	0,14Aaα	0,13Aaα
Déficit hídrico	Presença	0,12Aaα	0,15Aaα	0,13Aaα
Déficit hídrico	Ausência	0,14Aaα	0,15Aaα	0,18Aaα
CV (%)	38,91			

\*Médias seguidas de mesma letra (letras maiúsculas para regimes hídricos, letras minúsculas para doses de brassinosteróides e letras gregas para inoculação com *Azospirillum brasilense*) não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se na Tabela 2 que a clorofila a foi maior no tratamento com deficiência hídrica na presença de inoculação na concentração 0,3 μM de brassinosteróides em relação as plantas irrigadas. Observa-se também que na concentração 0,3 μM de brassinosteróides, os tratamentos com deficiência hídrica na presença de inoculação apresentaram maiores teores de clorofila a em comparação com as demais concentrações (0 μM e 0,6 μM). Era esperado, em relação aos pigmentos fotossintéticos, que o uso de *Azospirillum brasilense* auxiliasse na manutenção dos teores de clorofila, uma vez que a inoculação com esta bactéria faz com que se estimule a síntese de novas moléculas de clorofila, conforme demonstrado em trigo (BASHAN et al., 2006).

Para a variável clorofila b, as plantas com deficiência hídrica, na ausência de inoculação e concentração 0,3 μM de brassinosteróides apresentaram maiores teores do que os tratamentos com irrigação na mesma condição de estudo. Para a variável carotenóides, não foram verificados efeitos significativos (TABELA 2). Li et al., (2012), dizem que a ação benéfica dos brassinosteróides podem ser observada no conteúdo dos pigmentos, provocada pela redução da degradação da clorofila, fazendo com que ocorra a elevação dos teores de Clorofila a, Clorofila b e conseqüentemente Clorofila total como demonstra os estudos em *Chorispora bungeana*, das quais foram tratadas em condições de estresse hídrico com aplicação de brassinosteróides.

Estudos realizados com araçazeiro submetidas a deficiência hídrica, não verificaram diferença significativa para clorofila a, b, total e carotenóides (Freire et al. 2009). Estes resultados corroboram com os encontrados por Taiz e Zeiger (2004) que afirmam que os teores de clorofilas não sofrem alterações ambientais (como déficit hídrico), a não ser com o efeito da luz e da temperatura, pois são determinados geneticamente.

Na tabela 3, observa-se os parâmetros carboidratos solúveis totais, sacarose e amido nas folhas de plantas de milho. A variável carboidratos solúveis totais nas folhas das plantas de milho, foram maiores nas plantas irrigadas na presença de inoculantes e na concentração 0  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides em relação as plantas com deficiência hídrica. Entretanto, na ausência de inoculante, nessa mesma concentração, as plantas com estresse obtiveram maiores valores. Além disso, as plantas com deficiência hídrica nas concentrações 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides, tanto na presença quanto ausência de inoculação, apresentaram maiores valores de carboidratos solúveis totais que as plantas irrigadas na mesma condição.

A elevação do teor de carboidratos, observados em condições de deficiência hídrica no experimento, pode retratar um acúmulo de osmorreguladores, afim de reduzir os efeitos do estresse, ocasionando assim uma redução do potencial hídrico celular a nível do solo, retardando dessa forma a desidratação celular e atenuando assim os efeitos nocivos do estresse hídrico (ROXANA et al., 2014). Esses compostos podem ter sido acumulados devido à elevação da sua biossíntese ou pela degradação de moléculas maiores, tais como o amido (SANTELIA e LAWSON, 2016). Resultados similares relacionados ao crescente teor de carboidratos foram verificados por Dianat et al. (2016), ao estudarem sobre *Lippia citriodora* em condição de estresse hídrico.

Na concentração 0 e 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides na presença de inoculação, as plantas irrigadas apresentaram maiores valores de carboidratos solúveis totais em relação as com deficiência hídrica. No entanto, na ausência de bactéria, as plantas com estresse nas maiores concentrações de brassinosteróides 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$  apresentaram maiores valores em relação aos tratamentos irrigados (TABELA 3). As plantas irrigadas na presença de inoculação, nas concentrações 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides apresentaram maiores valores de carboidratos solúveis totais que as plantas irrigadas na ausência de bactéria nas mesmas concentrações. Enquanto para as

plantas estressadas, os tratamentos sem inoculação nas concentrações 0 e 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides foram maiores.

Na concentração 0,3  $\mu\text{M}$ , as plantas irrigadas na presença de inoculação apresentaram maiores valores de carboidratos solúveis totais. O mesmo ocorrendo com os tratamentos irrigados na ausência de inoculação na concentração 0,3  $\mu\text{M}$ , não diferindo, entretanto, da concentração 0 (TABELA 3). Enquanto para as plantas estressadas, na presença de inoculante, os valores de carboidratos solúveis totais foram maiores nos tratamentos com concentrações 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides. Já na ausência de inoculante, as plantas estressadas apresentaram maiores valores na concentração 0  $\mu\text{M}$ . Há relatos de que os brassinosteróides desempenham um papel regulador no metabolismo de carboidratos, uma vez que ao se aplicar esses hormônios, eles promovem um aumento nas atividades de enzimas que são ligadas ao metabolismo de açúcares (SCHLUTER et al., 2002; YU et al., 2004) e a concentração de carboidratos em espécies distintas (SCHLUTER et al., 2002; YU et al., 2004; LISSO et al. 2006; DALIO et al., 2011).

Tabela 3. Carboidratos solúveis totais, Sacarose e Amido em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides em folhas de plantas de milho.

Irrigação	Inoculação	Brassinosteróides ( $\mu\text{M}$ )		
		0	0,3	0,6
Carboidratos solúveis totais ( $\text{mmol de Glu.g}^{-1}$ )				
Irrigado	Presença	2,16Aba	2,45Ba $\alpha$	2,21Bba
Irrigado	Ausência	2,08Baba	2,21Ba $\beta$	2,01Bb $\beta$
Déficit hídrico	Presença	2,04Bb $\beta$	3,10Aa $\alpha$	3,15Aa $\beta$
Déficit hídrico	Ausência	3,82Aa $\alpha$	3,17Aca	3,41Aba
CV (%)		2,97		
Sacarose ( $\text{mg sacarose g}^{-1} \text{MS}$ )				
Irrigado	Presença	21,98Bca	26,70Ba $\alpha$	23,98Bba
Irrigado	Ausência	20,63Bb $\beta$	22,39Ba $\beta$	21,06Bab $\beta$
Déficit hídrico	Presença	37,15Aa $\beta$	30,43Ac $\beta$	34,43Aba
Déficit hídrico	Ausência	38,68Aa $\alpha$	33,30Aba	34,42Aba
CV (%)		3,11		
Amido ( $\text{mmol de GLU/g}$ )				
Irrigado	Presença	0,257Aa $\alpha$	0,328Aa $\alpha$	0,226Aa $\alpha$
Irrigado	Ausência	0,199Aba	0,344Aa $\alpha$	0,219Baba
Déficit hídrico	Presença	0,293Aa $\alpha$	0,334Aa $\alpha$	0,234Aa $\beta$

Déficit hídrico	Ausência	0,250Aba	0,356Aaba	0,482Aaa
CV (%)	25,51			

\*Médias seguidas de mesma letra (letras maiúsculas para regimes hídricos, letras minúsculas para doses de brassinosteróides e letras gregas para inoculação com *Azospirillum brasilense*) não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 3, também se observa que para o parâmetro sacarose nas folhas, as plantas com deficiência hídrica, tanto na presença quanto ausência de inoculação e em todas as concentrações de brassinosteróides, apresentaram maiores valores em comparação com as plantas irrigadas nas mesmas condições. Em plantas sob restrição hídrica, o nível de sacarose é aumentado de maneira progressiva, e isso ocorre em função da biossíntese de sacarose, em que este aumento provavelmente é promovido pelo conseqüente aumento da atividade da enzima sacarose fosfato sintase, uma vez que esta atua na célula fotossintética do citosol, com a função de proteger a integridade das membranas e das proteínas (HOEKSTRA et al., 2001), quando submetidas em condições de estresse hídrico. Vieira et al., (2013) constataram que a cultivar UFUS Riqueza apresentou, em condições de controle (1213,75 µg/g) e estressadas (1387,917 µg/g), a maior quantidade de sacarose presentes nas raízes primárias. Em seguida destacou-se a cultivar MG/BR 46 Conquista na condição controle (693,75 µg/g) e estressada (1014,583 µg/g), e por último a cultivar UFUS Xavante na condição controle (664,583 µg/g) e estressada (782,917 µg/g).

As plantas irrigadas na presença de inoculante e em todas as concentrações de brassinosteróides apresentaram maiores valores de sacarose que as plantas irrigadas sem inoculação. Enquanto as plantas estressadas, na ausência de bactéria, obtiveram maiores valores nas concentrações 0 e 0,3 µM que as plantas inoculadas nas mesmas concentrações. Sala et al., (2007), afirmam que os benefícios relacionados a inoculação com bactérias diazotróficas na cultura do milho, depende de vários fatores, tais como o genótipo da planta, as estirpes selecionadas e as inter-relação entre ambos e o meio ambiente.

Os tratamentos irrigados na presença de inoculante e concentração 0,3 µM de brassinosteróides, mostraram maiores valores de sacarose. Enquanto na ausência de inoculante, os maiores valores foram encontrados também na concentração 0,3 µM, porém não diferiu estatisticamente dos valores encontrados na concentração 0,6 µM. Já

as plantas com deficiência hídrica, tanto na presença quanto ausência de inoculante, os valores de sacarose foram maiores nas concentrações 0  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides (TABELA 3).

Para o parâmetro amido (TABELA 3) as plantas com deficiência hídrica na ausência de inoculação apresentaram os maiores valores na concentração 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides em relação as plantas irrigadas. Além disso, na ausência de inoculação as plantas estressadas na concentração 0,6  $\mu\text{M}$  apresentaram maiores valores de amido. Sendo considerado uma molécula complexa de carboidrato, o amido é constituído principalmente de glicose de extensas cadeias interligadas através de ligações glicosídicas, essa molécula também é a principal forma de armazenamento de energia nas plantas (COLLI, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2017).

Em determinadas condições nas folhas das plantas, a molécula de amido pode ser hidrolisada e transportada para o sistema radicular, do qual é o principal órgão de reserva das plantas, assim essas moléculas serão oxidadas com a finalidade de se utilizar a energia presente nelas afim de se realizar as atividades metabólicas essenciais, uma vez que os açúcares na forma mais simples que são aproveitados pelos vegetais. Além disso, a conversão de amido em sacarose é a principal via e estratégia de defesa das plantas onde elas buscam propiciar o equilíbrio osmótico e assim atenuar os efeitos causados pela deficiência hídrica no sistema, possibilitando dessa maneira que atividades essenciais continuem sendo desenvolvidas (GEIGENBERGER et al., 1997).

As plantas irrigadas na ausência de inoculação, obtiveram menores valores de amido na concentração 0  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides, não diferindo dos valores encontrados na concentração 0,6  $\mu\text{M}$ . Enquanto para as plantas estressadas, sem inoculação foram maiores na maior concentração de brassinosteróides, não diferindo dos valores encontrados na concentração 0,3  $\mu\text{M}$ .

Na Tabela 4, observa-se os parâmetros carboidratos solúveis totais, sacarose e amido nas raízes das plantas de milho, onde é possível observar que os tratamentos irrigados inoculados e sem a presença de brassinosteróides (0  $\mu\text{M}$ ) apresentaram maiores valores de carboidratos solúveis totais, entretanto, nas concentrações 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides, as plantas com deficiência hídrica obtiveram maiores valores. Enquanto na ausência de inoculação, as plantas estressadas obtiveram maiores valores dessa variável em todas as concentrações de brassinosteróides.

Tabela 4. Carboidratos solúveis totais, Sacarose e Amido em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com *Azospirillum* e concentrações de brassinosteróides em raízes de plantas de milho.

Irrigação	Inoculação	Brassinosteróides ( $\mu\text{M}$ )		
		0	0,3	0,6
Carboidratos solúveis totais ( $\text{mmol de Glu.g}^{-1}$ )				
Irrigado	Presença	0,615Aba	0,734Ba $\alpha$	0,656Bba
Irrigado	Ausência	0,630Baba	0,661Ba $\beta$	0,599Bb $\beta$
Déficit hídrico	Presença	0,536Bb $\beta$	0,944Aa $\alpha$	0,946Aa $\beta$
Déficit hídrico	Ausência	1,037Aba	0,927Aca	1,149Aa $\alpha$
CV (%)	3,32			
Sacarose ( $\text{mg sacarose g}^{-1}$ MS)				
Irrigado	Presença	7,92Bba	9,33Ba $\alpha$	8,29Bba
Irrigado	Ausência	7,21Bb $\beta$	7,91Ba $\beta$	7,45Bab $\beta$
Déficit hídrico	Presença	12,97Aa $\beta$	10,65Ac $\beta$	11,95Aba
Déficit hídrico	Ausência	13,44Aa $\alpha$	11,51Aca	12,04Aba
CV (%)	3,15			
Amido ( $\text{mmol de GLU/g}$ )				
Irrigado	Presença	0,072Ba $\beta$	0,089Ba $\beta$	0,148Aa $\alpha$
Irrigado	Ausência	0,271Aa $\alpha$	0,268Aa $\alpha$	0,251Aa $\alpha$
Déficit hídrico	Presença	0,460Aa $\alpha$	0,512Aa $\alpha$	0,086Aba
Déficit hídrico	Ausência	0,102Ba $\beta$	0,154Aa $\beta$	0,194Aa $\alpha$
CV (%)	39,88			

\*Médias seguidas de mesma letra (letras maiúsculas para regimes hídricos, letras minúsculas para doses de brassinosteróides e letras gregas para inoculação com *Azospirillum brasilense*) não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Na presença de inoculação, as plantas irrigadas apresentaram maiores valores de carboidratos solúveis totais na raiz nas concentrações 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$ , em relação as plantas irrigadas sem inoculação nas mesmas concentrações. Enquanto as plantas com deficiência hídrica, sem inoculação, obtiveram maiores valores nas concentrações 0 e 0,6  $\mu\text{M}$  em relação as plantas com estresse na presença de bactéria. As plantas irrigadas inoculadas tiveram maiores valores na concentração 0,3  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides. Assim como as plantas irrigadas na ausência de inoculante na mesma concentração de brassinosteróides, não diferindo, entretanto, dos valores encontrados na concentração zero (TABELA 4).

As plantas com estresse na presença de inoculação apresentaram menores valores de carboidratos solúveis totais na concentração 0  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides.

Enquanto na ausência de inoculante, o menor valor foi observado na concentração 0,3  $\mu\text{M}$ .

Observa-se ainda, que para o parâmetro sacarose, os tratamentos com deficiência hídrica, com ou sem inoculação e em todas as concentrações de brassinosteróides, apresentaram maiores valores em relação aos tratamentos irrigados.

Na presença de inoculação, as plantas irrigadas obtiveram maiores valores de sacarose em todas as concentrações de brassinosteróides em relação as plantas irrigadas sem inoculação. Entretanto, na ausência de inoculante, as plantas com deficiência hídrica obtiveram maiores valores dessa variável nas concentrações 0 e 0,3  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides quando comparadas com as plantas com deficiência hídrica inoculadas.

Na concentração 0,3  $\mu\text{M}$ , na presença de inoculante, as plantas irrigadas apresentaram maiores valores de sacarose, assim como na ausência de inoculação, não diferindo esta por sua vez dos valores encontrados na concentração 0,6  $\mu\text{M}$  (TABELA 4). Enquanto também nas plantas irrigadas na ausência de inoculação, os maiores valores de sacarose foram observados na concentração 0,3  $\mu\text{M}$ , não diferindo dos valores obtidos nos tratamentos de maior concentração de brassinosteróides. Para os tratamentos com estresse, tanto na presença quanto na ausência de inoculação, os menores valores dessa variável foram encontrados na concentração 0,3  $\mu\text{M}$ .

Observando a variável amido nas raízes das plantas (TABELA 4), as plantas com deficiência hídrica obtiveram maiores valores na presença de inoculação nas concentrações 0 e 0,3  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides em relação as irrigadas. Entretanto, na ausência de inoculação, as plantas irrigadas na concentração 0  $\mu\text{M}$  apresentaram maiores valores. Além disso, os maiores valores também foram encontrados nas plantas irrigadas, na ausência de inoculação, nas concentrações 0 e 0,3  $\mu\text{M}$  de brassinosteróides. Já as plantas com deficiência hídrica, os maiores valores foram obtidos na presença de inoculação nas concentrações 0 e 0,3  $\mu\text{M}$ . Os tratamentos com estresse na presença de inoculação, apresentaram menores valores de amido na maior concentração de brassinosteróides. REIS et al. (2000) relataram que em muitos casos, a ausência de resposta à inoculação com bactérias diazotróficas nas sementes, tem sido relacionada ao uso inadequada de linhagens. No entanto, há consenso de que o genótipo da planta é o principal fator para que se tenha sucesso na associação entre planta e microrganismo.

### 3.5 CONCLUSÕES

A interação dos brassinosteróides com a *Azospirillum brasilense* proporcionaram um incremento no conteúdo relativo de água, na clorofila a e no teor de carboidratos solúveis totais nas folhas e nas raízes das plantas de milho submetidas ao estresse hídrico.

Os brassinosteroides de forma isolada, mitigou as influências negativas ocasionadas pela deficiência hídrica, proporcionando incrementos no número de folha, na clorofila b e no teor de amido nas folhas

### 3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ahanuned GJ, Choudhary SP, Chen S, et al (2013) Role of brassinosteroids in alleviation of phenanthrene-cadmium co-contamination-induced photosynthetic inhibition and oxidative stress in tomato. J Exp Bot 64:199-213 .doi: 10.1093/jxb/ers323

BAJGUAZ, A. Isolation and characterization of brassinosteroids from algal cultures of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Trebouxiophyceae). Journal of Plant Physiology, v.166, p.1946-1949, 2009.

BAJGUZ, A.; PIOTROWSKA-NICZYPORUK, A. Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, monosaccharide and protein content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry, v. 80, p. 176-183. 2014.

Bashan, Y.; Bustillos, J. J.; Leyva, L. A.; Hernandez, J. P.; Bacilio, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. Biology and Fertility of Soils, v.42, n.4, p.279-285, 2006.

BASTOS, T.X.; PACHECO, N.A.; NECHET, D.; SÁ, T.D.A. Aspectos climáticos de Belém nos últimos cem anos. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 31p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 128). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/389773>>. Acesso em: 10 mar. 2020.

COLLI, S. Outros reguladores: brassinosteróides, poliaminas, ácidos jasmônico e salicílico. In: KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 2 ed., cap. 14, p. 296-302.

Dalio, R.J.D., Pinheiro, H.P., Sodek, L, Haddad, C.R.B. 2011. The effect of 24-epibrassinolide and clotrimazole on the adaptation of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. To salinity. Acta Physiol. Plantarum, 33: 1887-1896.

Dianat, M., Saharkhiz, M. J., Tavassolian, I. 2016. Salicylic acid mitigates drought stress in *Lippia citriodora* L.: Effects on biochemical traits and essential oil yield. Bioc. Agri. Biotechnol. 8, 286-293.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, Washington-DC , v. 28, n. 3, p.350-356, 1956.

DUVICK, D. N. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). Advances in Agronomy, v. 86, p. 83-145, 2005.

EI; Y.; SPERRY; J. S.; SHAO, M.; Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. Environmental and Experimental Botany, v.66, p.341-346, 2009.

EMBRAPA – Manual de Análises químicas de solos, plantas e fertilizantes, 2ª edição, 2009.

FARIAS, José Renato Bouças. Dinâmica da água no sistema solo-água-atmosfera: déficit hídrico em culturas. ITEM. N. 68, p. 32-37, 4º trimestre, 2005.

FERREIRA, D. F. Programa computacional Sisvar – UFLA, versão 5.4, 2010.

FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiology Letters, v. 326, p. 99-108, 2012.

Fioreze, S. L., L. G. Pivetta, A. Fano, F. R. Machado and V. F. Guimarães, 2011: Comportamento de genótipos de soja submetidos a déficit hídrico intenso em casa de vegetação. Revista Ceres, 58, 342-349.

FREIRE, C. S.; MOURA, A. R. de.; SILVA, M. A. V. da.; SILVA, M. A.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Avaliação do crescimento inicial, teor de clorofila a, b e

carotenóides em plantas jovens de araçazeiro submetidas à deficiência hídrica. VI Semana Nacional de Ciência e Tecnologia – UFRPE. 2009.

GEIGENBERGER, P.; REIMHOLZ, R.; GEIGER, M.; MERLO, L.; CANALE, V.; STITT, M. Regulation of sucrose and starch *in vivo* in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta*, Berlin, v. 201, n. 4, p. 502-518, abr. 1997.

Gornall, J.; Betts, R.; Burke, E.; Clark, R.; Camp, J.; Willet, K.; Wiltshire, A. 2010. Implications of climate change for agricultural productivity in the *in* twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 365: 2973-2989.

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanism of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, Amsterdam, v. 6, p.431-438, 2001.

IAC-Análise química para avaliação da fertilidade solos tropicais, Instituto Agronômico de Campinas, 2001.

Jones, H. G., 2007: Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58, 119-130.

LARRÉ, C. F., MORAES, D. M., LOPES, N. F. Qualidade fisiológica de sementes de arroz tratadas com solução salina e 24-epibrassinolídeo. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 33, n.1, p.86-94, 2011.

LI, Y. H. et al. Effect of 24-epibrassinolide on drought stress-induced changes in *Chorispora bungeana*. *Biol. Plant.* 56, 192–196, 2012.

LICHTHENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick SP, Kaplan (ed) *Methods in Enzymology*, v.148. Academic Press, San Diego. P.350-382. 1987.

Lisso, J., Altmann, T., Mussig, C. 2006 Metabolic changes in fruits of the tomato *in vivo*. *Phytochem.*, 67: 2232-2238.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.19, p.227–247, 2000.

Roxana, E., Vignolo, F., Vos, D., 2014. Model Elevated CO<sub>2</sub> mitigates drought and temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes. *Plant Science*.

SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P. D. da; CARDOSO, E. J. B. N. Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas. In: SILVEIRA, A.P. da; FREITAS, S. dos S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: IAC, 2007. Cap. 6, p. 97-116.

Santelia, D., Lawson, T., 2016. Rethinking Guard Cell Metabolism. *Plant physiol.* 172, 371– 1392.

SANTOS, R. S.; 2, COSTA, L. C.; , SEDIYAMA, G. C.; 2 , LEAL, B. G.; 3 OLIVEIRA, R. A.; 2 JUSTINO, F. B. Avaliação da relação seca/produzividade agrícola em cenário de mudanças climáticas. *Revista Brasileira de Meteorologia*, v.26, n.2, 313 – 321, 2011.

Schluter U., Kopke D., Altmann T., Mussig C. 2002. Analysis of carbohydrate metabolism of CPD antisense plants and the brassinosteroid-deficient *cbb1* mutant. *Plant Cell and Environment*, 25: 783-791.

SLAVICK, B. *Methods of studying plant water relations*. New York, Springer Verlag. P. 449. 1979.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Transporte de solutos. In: \_\_\_\_\_ . *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2017, 6 ed., cap. 6, p.143-164.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry*, v. 22: p. 280- 283, 1968.

VARDHINI, B. V. Application of brassinolide mitigates saline stress of certain metabolites of sorghum grown in Karaikal. *Journal of Phytology*, v. 4, n. 4, p. 1-3. 2012.

VIEIRA, F. C. F.; SANTOS JUNIOR, C. D.; NOGUEIRA, A. P. O.; DIAS, A. C. C.; HAMAWAKI, O. T.; BONETTI, A. M. Aspectos fisiológicos e bioquímicos de cultivares de soja submetidos a déficit hídrico induzido por PEG 6000. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v.29, n. 2, p. 543-552, 2013.

WELCKER, C.; BOUSSUGE, B.; BENCIVENNI, C.; RIBAUT, M.; TARDIEU, F. Are source and sink strengths genetically linked in maize plants subjected to water deficit?:

a QTL study of the responses of leaf growth and of Anthesis-Silking Interval to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, v.58, p.339-349, 2007.

Yu, J.Q., Huang, L.F., Hu, W.H., Zhou, Y.H., Mao, W.H., Ye, S.F., Nogués S. 2004. A role for brassinosteroid in the regulation of photosynthesis in *Cucumis sativus*. *J. Experimental Botany*, 55: 1135-1143.

## 4 CAPÍTULO II: METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM MILHO SUBMETIDO A DEFICIÊNCIA HÍDRICA, A BRASSINOSTERÓIDES E AZOSPIRILLUM

### 4.1 RESUMO

O metabolismo do nitrogênio nas plantas é afetado intensamente pelo estresse hídrico, o que acaba resultando na redução da síntese de proteínas e acumulação de aminoácidos, amônia e poliaminas livres. Assim, estudos com *Azospirillum brasilense*, bem como de hormônios atenuadores de deficiência hídrica tais como os brassinosteroides, vem sendo cada vez mais desenvolvidos. Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da aplicação de brassinosteróide e azospirillum no metabolismo do nitrogênio em plantas de milho submetidas a condições de estresse hídrico. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetal, com um híbrido de milho (K9606 VIP3). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x3, com seis repetições. O primeiro fator corresponde a dois regimes hídricos (presença de deficiência hídrica e ausência de deficiência hídrica). O segundo fator corresponde a inoculação via semente (no momento da semeadura) do *Azospirillum brasilense* e ausência de inoculação. E o terceiro fator corresponde a aplicação de três concentrações de brassinosteróides (0, 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$ ). Determinou-se o nitrato; redutase do nitrato; amônio livre; aminoácidos solúveis totais; proteínas solúveis; prolina; glicina betaína e a glutamina sintetase. As plantas de milho submetidas a deficiência hídrica apresentaram valores mais elevados de amônio, menores concentrações de proteínas nas folhas e de glutamina. A redutase do nitrato apresentou redução de sua atividade nas folhas sob condições de estresse, tanto na ausência como presença da bactéria. As plantas com deficiência hídrica inoculadas ou não e nas concentrações de Br, apresentaram maiores valores de glicina. Houve um incremento de nitrato nas plantas estressadas. Plantas com deficiência hídrica obtiveram incremento de prolina. As plantas com deficiência hídrica tanto na presença quanto na ausência da bactéria apresentaram sempre os maiores teores de aminoácidos. A aplicação de *Azospirillum brasilense* interfere positivamente no metabolismo do nitrogênio tanto na folha quanto na raiz da cultura do milho durante a ocorrência de deficiência hídrica, assim como a aplicação de brassinosteróides. O uso da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* via semente e a aplicação de brassinosteróides, amenizam os efeitos negativos no metabolismo do nitrogênio nas folhas e raízes causadas pela ocorrência da deficiência hídrica na cultura do milho.

**Palavras-chave:** hormônio; bactéria; *Zea mays*

## 4.2 INTRODUÇÃO

Nas maiores áreas produtoras do Brasil, as perdas de produtividade nas safras de milho estão relacionadas a disponibilidade de água de cada região (Hernández et al. 2015), uma vez que a cultura é sensível a deficiência hídrica, principalmente nas fases do florescimento ao enchimento dos grãos. O metabolismo do nitrogênio nas plantas também é afetado intensamente pelo estresse hídrico, o que acaba resultando na redução da síntese de proteínas e acumulação de aminoácidos, amônia e poliaminas livres (Rabe 1993).

Os brassinosteróides (Br) é um tipo de fitormônio com influência significativa na promoção do crescimento e está associado a vários processos fisiológicos, dentre eles a melhora da resposta a diversos estresses abióticos, devido ao fato de estar envolvido na ativação dos mecanismos de proteção contra estresses oxidativos e na alteração estrutural e permeabilidade das membranas celulares. Ele é eficiente em incrementar a resistência, principalmente a altas temperaturas, seca e salinidade (Vardhini 2012).

Além da aplicação de hormônios como os brassinosteróides, a utilização de bactérias *Azospirillum brasilense* apresenta-se como uma alternativa promissora para melhorar o crescimento de gramíneas como o milho através da fixação do nitrogênio.

O modo de ação da bactéria *Azospirillum brasilense* quando associada com gramíneas, dispões de liberação de fitohormônios, fixação de nitrogênio atmosférico, redução do nitrato e aumento do poder de absorção de minerais pelas plantas (James 2000). De acordo com Spaepen, Vanderleyden e Okon (2009) a bactéria *Azospirillum brasilenses* é capaz de produzir fitohormônios (auxina, citocinina e giberelinas) que podem induzir o crescimento radicular e conseqüentemente melhorar absorção de água e nutrientes pelas plantas.

Diante deste contexto, são escassos os trabalhos relacionando os efeitos dos brassinosteroides e da *Azospirillum brasilenses* na cultura do milho submetidas a deficiência hídrica. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da aplicação de brassinosteróide e azospirillum no metabolismo do nitrogênio em plantas de milho submetidas a condições de estresse hídrico.

### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetal, que pertence a Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), localizado em Belém-Pará, cujas coordenadas geográficas são 01° 27' 21" S, 48° 30' 16" W, no período de 10 de Dezembro de 2019 a 28 de Janeiro 2020. Nessa região, a temperatura média está em torno de 26,5°C, com instabilidade do ar significativa e umidade média em torno de 84% (Bastos et al., 2002).

Para a realização do experimento utilizou-se as sementes de milho oriundas da empresa KWS sementes (Klein Wanzleben e Saat), o híbrido K9606 VIP3, desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental, que apresenta alta estabilidade produtiva, alto rendimento, boa amplitude de plantio e espigas com pedúnculo decumbente. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x3, com seis repetições, totalizando 72 unidades experimentais (Figura 01). O primeiro fator corresponde a dois regimes hídricos (presença de deficiência hídrica e ausência de deficiência hídrica). O segundo fator corresponde a inoculação via semente (no momento da semeadura) do *Azospirillum brasilense* e ausência de inoculação. E o terceiro fator corresponde a aplicação de três concentrações de brassinosteróides (0, 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$ ).

Assim, para execução do experimento, utilizou-se 72 baldes com capacidade de 15 Kg cada (diâmetro superior: 30 cm; diâmetro inferior: 26 cm; altura: 33 cm), sendo preenchido com um solo coletado na camada de 0 a 20 cm de profundidade (Amostras do horizonte superficial de um Latossolo Amarelo Distrófico, textura média) no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da UFRA. Após a realização da coleta do solo, as amostras foram previamente peneiradas para retirada de impurezas e homogeneizadas. Logo após, foi retirada uma porção dessas amostras e submetida a análises químicas e granulométricas, a fim de caracterizar a fertilidade e a textura do solo.

Realizou-se a análise química do solo, para fins de fertilidade, no qual foi determinada no laboratório de solo do Instituto Brasileiro de Análises (IBRA), de acordo com os métodos descritos pelo Iac (2001) e Embrapa (2009) obtendo-se os seguintes resultados: = 99 g/Kg; Silte = 102 g/Kg; Areia Total = 799 g/Kg; Textura arenosa; M. O =34 g/dm<sup>3</sup>; COT =20 g/dm<sup>3</sup>; pH (CaCl<sup>2</sup>)=5,3; pH Tampão (SMP)=6,41 mmolc/dm<sup>3</sup>; H<sup>o</sup> + Al <sup>3</sup>= 27 mmolc/dm<sup>3</sup>; Al <sup>3</sup> ( KCl)= 0 mmolc/dm<sup>3</sup>; H<sup>o</sup> = 27

mmolc/dm<sup>3</sup>; C.T.C. =72,1 mmolc/dm<sup>3</sup>; S.B. =45,1%; V% =63%; m% =0%; Al na CTC = 0; H na CTC = 37,4; (NO<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>) - N Total = 2388 ppm; Fósforo (P) = 77 mg/dm<sup>3</sup>; Potássio (K) = 2,5 mmolc/dm<sup>3</sup>; Magnésio (Mg) = 14 mmolc/dm<sup>3</sup>; Cálcio (Ca) = 28 mmolc/dm<sup>3</sup>; Enxofre (S)= 10 mg/dm<sup>3</sup>; Na = 0,6 mmolc/dm<sup>3</sup>; Ca/K = 11,2; Ca/Mg = 2; Mg/K = 5,6; Ferro (Fe) = 168 mg/dm<sup>3</sup>; Manganês (Mn) = 15,5 mg/dm<sup>3</sup>; Cobre (Cu) = 0,1 mg/dm<sup>3</sup>; Zinco (Zn) = 18 mg/dm<sup>3</sup>; Boro (B) = 2,51 mg/dm<sup>3</sup>; Molibdênio (Mo) = 0,2 mg/dm<sup>3</sup>. Levando-se em consideração: Prof.: 0 a 20 cm e densidade 1,0.

Antes do semeio, as sementes de milho que foram inoculadas com *Azospirillum* foram separadas. Assim, misturou-se 200 g de inoculante (sólido turfoso milho – *Zea mays*, *Azospirillum brasilense* - Estirpes AbV5 e AbV6) em 1 ml de água destilada, logo em seguida adicionou-se as sementes e se fez o plantio (FIGURA 01).

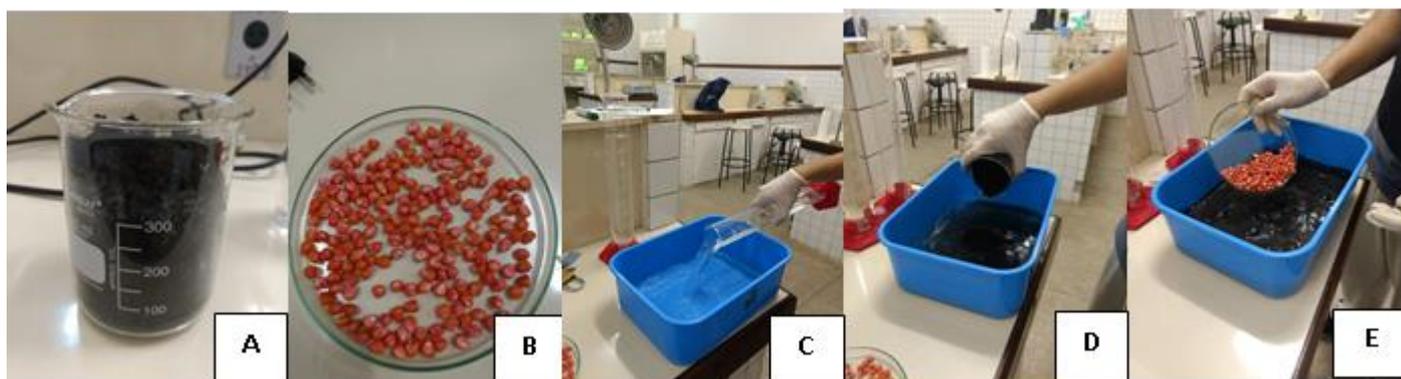


Figura 01. Preparação das sementes para o plantio, A) (inoculante sólido), B) (sementes de milho), C) (água destilada), D) (homogeneização) e E) (inoculação das sementes).

A irrigação foi feita diariamente adicionando-se água até atingir a capacidade de campo de cada balde, sendo essa observada através do escoamento no fundo dos baldes. As plantas de milho foram obtidas a partir da germinação inicial de cinco sementes por vaso, com posterior manutenção de apenas uma planta, por meio do desbaste.

Quinze dias após o plantio foi realizada a primeira aplicação de brassinosteróides nas concentrações 0 (Plantas controle, sem aplicação de brassinosteróides); 0,3 e 0,6  $\mu$ M Br (Sigma-Aldrich, USA), as soluções foram preparadas dissolvendo o soluto em etilanol seguido de diluição com água Milli-Q [etilanol: água (v / v) = 1: 10.000] (Ahammed et al. 2013); as plantas estavam no

estádio V3 (três folhas completamente expandidas). Assim, para a aplicação utilizou-se 72 ml de eponobassinolídeo em cada aplicação. Inicialmente separou-se 100 ml de eponobassinolídeo para a concentração de 0,3  $\mu\text{M}$  e 100 ml para a concentração de 0,6  $\mu\text{M}$ . Nos 100 ml de cada concentração foram adicionados 5 ml de tween20 como agente surfactante.

Ao todo foram realizados duas aplicações, a primeira, 15 dias após o plantio (DAP) com as plantas no estágio V3 e a segunda 30 DAP com plantas no estágio V7. A aplicação foi feita aplicando 3 ml de eponobassinolídeo por planta na face adaxial (em cima) das folhas do terço médio das plantas, sempre no final da tarde (17h e 18h), com a finalidade de evitar perdas por evaporação e deriva.

Dez dias após a última aplicação de eponobassinolídeo, foi aplicado o estresse hídrico severo nos tratamentos que receberiam o estresse, com suspensão total da água (Disponibilidade hídrica 0%). Os demais tratamentos continuaram recebendo água até a retirada do experimento. Sete dias após a suspensão da irrigação, foi realizada a retirada das plantas.

A coleta das plantas ocorreu ao 47° DAP às 04:30 h. Logo após, as plantas foram separadas em folha, colmo e raiz, sendo as raízes lavadas em água corrente. Estes foram armazenados em sacos de papéis e colocados na estufa de ventilação de ar forçada a 65°C por 48 h. Após a secagem foram pesados as folhas e as raízes e moída em moinho tipo Wiley, sendo devidamente armazenado em tubos de falcon onde foram conduzidas as análises bioquímicas no laboratório de estudos da biodiversidade em plantas superiores (EBPS).

Avaliou-se os seguintes parâmetros: Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), utilizando-se o método preconizado por Cataldo et al. (1975); a Atividade da enzima redutase do nitrato (RN) determinada empregado o método *in vivo* preconizado por Hageman e Hucklesby (1971); o Amônio livre ( $\text{NH}_4^+$ ) determinado de acordo com o método de Weatherburn (1967); os Aminoácidos solúveis totais, determinados segundo o método descrito por Peoples et al. (1989); os teores de Proteínas solúveis, determinados pelo método descrito por Bradford (1976); a Prolina, de acordo com o método empregado por Bates, Waldren e Teare (1974), com adaptações feitas por Lobato e Ferreira; a Glicina betaína, determinado pelo método preconizado por Grieve e Grattan (1983), e a Atividade da glutamina sintetase, determinada pelo método “*in vitro*” segundo Kamachi et al. (1991).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) pelo teste F ( $p < 0,05$ ) e as medias obtidas foram submetidas ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa computacional SISVAR versão 5.4 (Ferreira, 2010).

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar o amônio nas folhas de milho, apenas os regimes hídricos (Irigado e deficiência hídrica), na condição dos outros fatores iguais, inoculados e nas concentrações 0  $\mu\text{M}$  e 0,3  $\mu\text{M}$  brassinosteroides, observa-se que houve diferença significativa (TABELA 1). Onde as plantas de milho submetidas a deficiência hídrica apresentaram valores mais elevados de amônio nas folhas. Esse resultado está ligado provavelmente ao fato da bactéria do gênero *Azospirillum*, poder atuar no crescimento das plantas por meio da redução do nitrato que está na raiz, à amônio. Ferreira et al. (1987) observaram, por exemplo, que bactérias desse gênero podem atuar no crescimento vegetal através da redução do  $\text{NO}_3^-$  nas raízes das plantas. Assim, as plantas não gastariam energia para fazer a redução do nitrato até amônia, sendo essa energia podendo ser direcionada para outros processos vitais do metabolismo das plantas (Reis Junior et al. 2008).

Houve diferença significativa para o amônio ao comparar as plantas de milho irrigadas e com deficiência hídrica na ausência da inoculação com a *azospirillum*, somente na dose de 0  $\mu\text{M}$  brassinosteroides. Nesse caso nem o brassinosteróide e nem a bactéria influenciaram a concentração de amônio, no qual as plantas submetidas a deficiência de água apresentaram as maiores concentração de amônio na folha. Esses resultados se devem provavelmente a redução da atividade de glutamina sintetase. Isso porque, mesmo que essa enzima possua substrato (amônio) suficiente para a ativação desta enzima, a falta de energia (ATP) e a redução de glutamato no meio celular, por meio de um possível decréscimo da taxa fotossintética e do metabolismo dos aminoácidos, são essenciais para que a atividade desta enzima seja mantida (Oliveira Neto 2008).

Ao analisar apenas as concentrações de brassinosteróides (0; 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$ ), na condição dos outros fatores iguais, observa-se que houve diferença significativa entre as doses de brassinosteroides em plantas irrigadas na ausência da *azospirillum*. Indicando

que as concentrações de amônio foi diminuindo na presença de brassinosteróide e sem efeito atenuador da bactéria (TABELA 1).

Observa-se ainda, que também houve diferença significativa nas plantas com deficiência hídrica tanto na presença quanto na ausência da azospirillum nas diferentes doses de brassinosteroides, no qual as plantas de milho que sofreram deficiência hídrica na presença da bactéria apresentaram os menores valores de amônio na dose de 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteroides, indicando que a presença da bactéria associada a maior dosagem de brassinosteróide causou decréscimo nas concentrações de amônio na folha. Enquanto, as plantas de milho que sofreram deficiência hídrica na ausência da bactéria apresentaram maiores concentrações de amônio na dose 0  $\mu\text{M}$  de brassinosteroides e menores nas doses 0,3  $\mu\text{M}$  de brassinosteroides e 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteroides, indicando que as doses de brassinosteróide contribuíram para reduzir a concentração de amônio na condição de deficiência hídrica sem influência da bactéria.

Quando se analisa somente a ação da azospirillum, ou seja, dois fatores (presença e ausência), estando os outros fatores em condições iguais, verifica-se que houve diferença significativa apenas nas plantas submetidas a deficiência hídrica nas doses 0  $\mu\text{M}$  e 0,3  $\mu\text{M}$ . No qual, na dose 0  $\mu\text{M}$  de brassinosteroides, as maiores concentrações de amônio nas plantas foram observadas na ausência da bactéria e na dose 0,3  $\mu\text{M}$  brassinosteroides as maiores concentrações foram verificadas na presença da bactéria (TABELA 1).

Tabela 1. Amônio, Proteína e Redutase do nitrato em folhas de plantas de milho em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides.

Irrigação	Inoculação	Brassinosteróides ( $\mu\text{M}$ )		
		0	0,3	0,6
Amônio ( $\text{mmol NH}_4^+ \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{MS}$ )				
Irrigado	Presença	5,81Baa*	5,56Baa	4,21Aaa
Irrigado	Ausência	6,70Baa	3,71Aba	2,82Aba
Déficit hídrico	Presença	9,09Aa $\beta$	10,19Aaa	3,50Aba
Déficit hídrico	Ausência	12,43Aaa	3,03Ab $\beta$	2,27Aba
CV (%)	22,61			
Proteína (mg de proteína/ g MS)				
Irrigado	Presença	20,84Aaa	26,34Aaa	22,88Aa $\beta$
Irrigado	Ausência	22,10Aba	23,66Aaba	28,69Aaa
Déficit hídrico	Presença	14,83Bba	23,36Aaa	24,07Aaa

Déficit hídrico	Ausência	7,95Bbβ	20,26Aαα	24,17Aαα
CV (%)	15,9			
Redutase do nitrato (μmoles de NO <sup>-2</sup> .g. <sup>-1</sup> MS)				
Irigado	Presença	1,69Aba	1,83Abβ	2,39Aαα
Irigado	Ausência	1,75Aba	2,24Aαα	2,10Aaba
Déficit hídrico	Presença	0,32Bba	1,03Baβ	0,83Baα
Déficit hídrico	Ausência	0,09Bca	1,57Baα	1,01Bba
CV (%)	16,04			

\*Médias seguidas de mesma letra (letras maiúsculas para regimes hídricos, letras minúsculas para doses de brassinosteróides e letras gregas para inoculação com *Azospirillum brasilense*) não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Quando se analisa somente os regimes hídricos para a concentração de proteína nas folhas, verifica-se que houve diferença estatística comparando as plantas de milho irrigadas e com deficiência hídrica na presença da inoculação com a *azospirillum*, na dose de 0 μM de brassinosteroides. O mesmo ocorreu nas plantas irrigadas e com deficiência hídrica na ausência da *azospirillum* e 0 μM de brassinosteroides (TABELA 1). Assim, as plantas de milho submetidas a deficiência hídrica apresentaram menores concentrações de proteínas nas folhas. Esse resultado demonstra que quanto menor o potencial hídrico do solo, maior a atividade das enzimas proteolíticas que são responsáveis pela degradação das proteínas de reserva das plantas, reduzindo os teores destas nas folhas, além da redução da síntese “de novo” das mesmas durante a falta de água (Freitas 2014).

Estudos realizados por Paula et al. (2013), encontraram valores das médias das plantas analisadas no período seco uma redução nos teores de proteínas solúveis totais de 34% em comparação com as plantas analisadas no período chuvoso. Esse tipo de estresse, possivelmente interfere no metabolismo bioquímico da planta basicamente e a planta muda o comportamento metabólico como uma forma de defesa contra falta de água.

Observa-se (TABELA 1) que quando se analisa apenas as concentrações de Brassinosteróides, ocorre diferença significativa no teor de proteínas das plantas submetidas as doses de brassinosteroides em plantas irrigadas na ausência da *azospirillum*, no qual as maiores concentrações de proteína foram verificadas na dose 0,6 μM e menor na dose 0 μM e dose 0,3 μM de brassinosteroides. Também houve diferença significativa em plantas que sofreram deficiência hídrica na ausência da

bactéria. Observa-se ainda, que houve diferença significativa nas plantas com deficiência hídrica apenas na presença da azospirillum nas diferentes doses de brassinosteroides.

Quando se analisa apenas a ação da azospirillum, verifica-se que houve diferença significativa apenas nas plantas submetidas a deficiência hídrica na dose 0  $\mu\text{M}$  de brassinosteroides. Também houve diferença nas plantas que receberam irrigação na dose 0,6  $\mu\text{M}$ , ou seja, as plantas irrigadas na maior dosagem de brassinosteroides apresentaram o maior teor de proteína sem a presença da bactéria, indicando que a bactéria nessa dosagem teve efeito negativo em relação a produção de proteínas.

Ao analisar apenas os regimes hídricos (TABELA 1) para a redutase do nitrato nas folhas, verifica-se que houve diferença estatística comparando as plantas de milho irrigadas e com deficiência hídrica na presença e na ausência da inoculação com a azospirillum, em todas as doses de brassinosteroides.

Assim, a redutase do nitrato apresentou redução de sua atividade nas folhas sob condições de estresse hídrico, tanto na ausência como na presença da bactéria. Esses resultados evidenciam que a deficiência hídrica nas plantas reduz a quantidade total da atividade funcional da enzima redutase do nitrato, onde a falta de água no solo diminui a atividade dessa enzima em virtude da redução do fluxo de água pela corrente transpiratória e com isso também o fluxo de nitrato para as folhas, uma vez que essa enzima é altamente dependente de seu substrato (Sharner e Boyer 1976).

Oliveira Neto (2011), demonstram que a enzima redutase do nitrato exibe uma alta relação síntese: degradação mostra-se particularmente sensível a redução do potencial de água em plantas. A baixa concentração de  $\text{CO}_2$  é outro fator que contribui bastante para a redução da atividade da RN (Kaiser e Huber 2001), quando as plantas se encontram em deficiência hídrica, uma das muitas reações fisiológicas empregadas pela planta para reduzir a perda d'água é o fechamento estomático, que acaba impedindo, ou pelo menos dificultando, as trocas gasosas. Andrade-Netto (2005) estudando o sombreamento em *Coffea arabica* relacionou o decréscimo da atividade da RN ao fechamento dos estômatos.

Ao analisar somente as concentrações de brassinosteróides para a redutase do nitrato nas folhas, ocorre diferença significativa das plantas submetidas as doses de Br em plantas irrigadas na presença e na ausência da azospirillum, no qual as maiores

concentrações de redutase do nitrato na presença da bactéria foi encontrado na dose 0,6  $\mu\text{M}$  e menor na dose 0  $\mu\text{M}$  e dose 0,3  $\mu\text{M}$  de brassinosteroides. Enquanto, na ausência da bactéria a maior dose foi observada na dose 0,3  $\mu\text{M}$ , não diferindo da 0,6  $\mu\text{M}$ . Também houve diferença significativa na redutase do nitrato em plantas que sofreram deficiência hídrica na ausência e na presença da bactéria. Na presença o maior teor de redutase do nitrato foi observado na dose 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ . Enquanto, na ausência o maior teor foi encontrado na dose 0,3  $\mu\text{M}$ .

Observando-se apenas a ação da azospirillum na redutase do nitrato, verifica-se que houve diferença significativa nas plantas submetidas a irrigação na dose de 0,3  $\mu\text{M}$  e nas plantas que sofreram deficiência hídrica na dose 0,3  $\mu\text{M}$ , indicando que na dose de 0,3  $\mu\text{M}$  as plantas irrigadas e as com deficiência hídrica apresentaram o maior teor de redutase do nitrato sem a presença da bactéria, indicando que a bactéria e essa dosagem teve efeito negativo em relação a produção da redutase (TABELA 1).

Ao analisar a glicina-betaína nas folhas de milho apenas os regimes hídricos (TABELA 2), observa-se que houve diferença estatística comparando as plantas de milho irrigadas e com deficiência hídrica na presença e na ausência da inoculação com a azospirillum em todas as doses de brassinosteroides. Onde é possível observar que as plantas com deficiência hídrica inoculadas ou não e nas concentrações de brassinosteroides, apresentaram maiores valores de glicina em relação as plantas irrigadas. Na dose 0  $\mu\text{M}$  os maiores valores de glicina na presença da bactéria foram observados nas plantas com deficiência hídrica. O mesmo foi observado para as doses 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ . Enquanto, na ausência da bactéria a maior concentração de glicina foi encontrada nas plantas que sofreram deficiência hídrica em todas as doses de brassinosteroides.

A prolina, a glicina-betaína e os carboidratos, entre os compostos orgânicos, são os solutos mais comumente acumulados em plantas quando em condições de estresse (Ashraf et al. 2011). Além do ajustamento osmótico, esses solutos exercem um papel na estabilização de enzimas/proteínas e na proteção da integridade da membrana (Bohnert e Jensen 1996). O incremento nos níveis de glicina-betaína está associado à função de ser um excelente ajustador osmótico em espécies vegetais, onde ocorre uma sinalização particular e aumento na síntese deste aminoácido consequentemente (Silva et al. 2009). Em plantas jovens de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), Carlin e Santos (2009)

obtiveram resultados semelhantes, onde se observou um acréscimo de glicina-betaína sob deficiência hídrica, porém não foi considerado proteção osmótica.

Tabela 2. Glicina betaína, Glutamina sintetase, Nitrato, Prolina e aminoácidos em folhas de plantas de milho em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com *Azospirillum* e concentrações de brassinosteróides.

Irrigação	Inoculação	Brassinosteroides ( $\mu\text{M}$ )		
		0	0,3	0,6
Glicina betaína ( $\mu\text{g}$ de glicina betaína/g MS.)				
Irigado	Presença	9,00Ba $\beta$ *	8,96Ba $\alpha$	9,60Ba $\alpha$
Irigado	Ausência	9,94Ba $\alpha$	9,25Ba $\alpha$	10,03Ba $\alpha$
Déficit hídrico	Presença	26,11Aa $\beta$	18,29Ac $\beta$	22,37Ab $\beta$
Déficit hídrico	Ausência	30,21Aa $\alpha$	22,70Ac $\alpha$	23,98Aba
CV (%)	3,85			
Glutamina sintetase (mmoles de $\gamma$ -glutamil-hidroximato / kg MS de tecido/hora.)				
Irigado	Presença	19,78Aba	21,43Aa $\alpha$	18,77Ab $\beta$
Irigado	Ausência	18,94Aa $\alpha$	19,58Aa $\beta$	19,91Aa $\alpha$
Déficit hídrico	Presença	9,17Bba	12,35Ba $\alpha$	12,84Ba $\alpha$
Déficit hídrico	Ausência	8,39Bba	11,89Ba $\alpha$	12,20Ba $\alpha$
CV (%)	4,61			
Nitrato ( $\mu\text{moles}$ de $\text{NO}_3^-/\text{g}$ MS)				
Irigado	Presença	1,23Bb $\beta$	0,86Bc $\beta$	1,71Ba $\beta$
Irigado	Ausência	2,44Ba $\alpha$	1,77Bba	2,05Bba
Déficit hídrico	Presença	5,58Ab $\beta$	5,05Ac $\beta$	6,19Aa $\beta$
Déficit hídrico	Ausência	7,13Aa $\alpha$	5,95Ac $\alpha$	6,72Aba
CV (%)	4,61			
Prolina ( $\mu\text{moles}$ Pro/g MS)				
Irigado	Presença	3,09Bba	4,03Ba $\alpha$	3,46Bba
Irigado	Ausência	3,20Ba $\alpha$	3,17Ba $\beta$	3,31Ba $\alpha$
Déficit hídrico	Presença	9,17Aa $\beta$	5,22Ac $\beta$	7,78Ab $\beta$
Déficit hídrico	Ausência	12,90Aa $\alpha$	6,93Ac $\alpha$	8,73Aba
CV (%)	5,39			
Aminoácidos ( $\mu\text{moles}$ de A.A .g. <sup>-1</sup> MS)				
Irigado	Presença	95,34Bba	104,37Ba $\alpha$	99,25Baba
Irigado	Ausência	96,07Ba $\alpha$	101,26Ba $\alpha$	98,58Ba $\alpha$
Déficit hídrico	Presença	139,97Aa $\beta$	128,33Ab $\beta$	134,15Aaba
Déficit hídrico	Ausência	150,50Aa $\alpha$	135,84Aba	131,66Aba
CV (%)	3,38			

\*Médias seguidas de mesma letra (letras maiúsculas para regimes hídricos, letras minúsculas para doses de brassinosteróides e letras gregas para inoculação com *Azospirillum brasilense*) não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Ao analisar somente as concentrações de brassinosteróides, observa-se que houve diferença significativa para a glicina apenas nas plantas com deficiência hídrica tanto na presença quanto ausência da *Azospirillum* nas doses de brassinosteroides, no

qual as plantas de milho que sofreram deficiência hídrica na presença da bactéria apresentaram os valores mais elevados de glicina na dose 0  $\mu\text{M}$  e menores na de 0,3  $\mu\text{M}$ . O mesmo comportamento foi verificado nas plantas de milho que sofreram deficiência hídrica na ausência da bactéria, onde a maior concentração de glicina foi encontrada na dose 0  $\mu\text{M}$  e menor na de 0,3  $\mu\text{M}$ .

Quando se analisa a ação da azospirillum isolada, verifica-se que houve diferença significativa nas concentrações de glicina nas plantas irrigadas somente na dose 0  $\mu\text{M}$ . Observou-se também diferença significativas nas plantas submetidas a deficiência hídrica nas doses 0  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ . No qual, as maiores concentrações de glicina nas plantas irrigadas ou com deficiência hídrica foram observadas na ausência da azospirillum (TABELA 2).

Em relação aos teores de glutamina sintetase, observa-se ao analisar somente os regimes hídricos que houve diferença estatística entre as plantas irrigadas e com deficiência hídrica na presença e na ausência da azospirillum em todas as doses de brassinosteroides. Onde é possível observar que as plantas com deficiência hídrica apresentaram menores valores de glutamina em relação as irrigadas. Esses resultados demonstram que quando em condições de deficiência hídrica, a enzima passa a ser menos efetiva por conta das baixas concentrações de ATPs no meio celular, reduzindo o açúcar disponível para a produção de energia e de poderes redutores uma vez que esta enzima é dependente de energia oriunda da atividade fotossintética nas folhas e do processo respiratório nas raízes (Swarbreck et al. 2011; Tercé-Laforgue et. al. 2013).

Verificando apenas as doses de Br nas demais condições iguais, observa-se que houve diferença estatística de glutamina apenas nas plantas irrigadas na presença da bactéria e nas plantas com deficiência hídrica tanto na presença quanto na ausência da azospirillum. Para as plantas irrigadas na presença da azospirillum o maior teor de glutamina sintetase foi na dose 0,3  $\mu\text{M}$  e para as plantas com deficiência hídrica na presença da bactéria o maior teor de glutamina foi nas doses 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ . O mesmo foi observado nas plantas com deficiência hídrica na ausência da azospirillum (TABELA 2).

Ao se analisar a ação da azospirillum isolada, observa-se que houve diferença significativa nas concentrações de glutamina apenas nas plantas irrigadas nas doses 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ .

Analisando o teor de nitrato nas folhas de milho considerando os regimes hídricos (TABELA 2) observa-se que ocorreu diferença estatística de plantas irrigadas e com deficiência hídrica na presença e na ausência de azospirillum em todas as doses de brassinosteroides. Indicando que houve um incremento de nitrato nas plantas estressadas, onde esse acréscimo se deve provavelmente a redução da atividade da redutase do nitrato e do bombeamento de nitrato do vacúolo para o citoplasma celular.

Analisando o teor de nitrato nas folhas de milho considerando as doses de Br foi encontrado diferença estatística em todas as doses com ou sem presença de azospirillum. Onde, observa-se que nas plantas irrigadas na presença de azospirillum o maior teor de nitrato foi observado na dose 0,6  $\mu\text{M}$  e para as plantas irrigadas com ausência da bactéria o maior teor de nitrato na folha foi verificado na dose 0  $\mu\text{M}$ . Enquanto, nas plantas que sofreram deficiência hídrica na presença da azospirillum foram encontrados o maior teor de nitrato na dose 0,6  $\mu\text{M}$  e para as plantas com deficiência hídrica sem a aplicação da bactéria o maior teor de nitrato na dose 0  $\mu\text{M}$ .

Ao analisar apenas a ação da azospirillum nas folhas, observa-se que ocorreu diferença estatística tanto nas plantas irrigadas como nas com deficiência hídrica em todas as doses de brassinosteroides. Onde nas plantas irrigadas o teor de nitrato foi maior na ausência da bactéria nas doses 0  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$  (TABELA 2). Enquanto, nas plantas com deficiência o teor de nitrato teve o mesmo comportamento, apresentando maiores teores na ausência da bactéria 0  $\mu\text{M}$  ; 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$  de brassinosteroides.

Quando se analisa o teor de prolina nas folhas levando em consideração os regimes hídricos observa-se que ocorreu diferença estatística entre o teor de prolina nas plantas irrigadas e com deficiência hídrica tanto na presença como na ausência de azospirillum em todas as doses de brassinosteroides. Demonstrando que as plantas com deficiência hídrica obtiveram um incremento no teor de prolina em relação as plantas irrigadas. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Filippou et al. (2014), do qual relataram que, frequentemente, como um dos efeitos do estresse hídrico, observaram incrementos do conteúdo de prolina como forma de atenuar as implicações da escassez de água em espécies vegetais.

Para Silva et al. (2012), plantas em condições de deficiência hídrica, os incrementos nos teores de prolina podem ser com o aumento da atividade de enzimas

proteolíticas, que quando às plantas encontram-se em condições adversas, começam a promover uma maior disponibilidade deste aminoácido livre. A prolina livre é um “ $\alpha$ -aminoácido”, da qual possui um grupo amino ligado a dois átomos de carbono e sua principal característica como osmoprotetor deve-se à redução do potencial osmótico da célula, mantendo assim um equilíbrio hídrico entre o vacúolo e o citoplasma (Kavi Kishor et al. 2005, Ashraf et al. 2011). Estudos evidenciam que um critério para estudos de tolerância à seca é o acúmulo de prolina livre, sendo este osmoprotetor utilizado como indicador bioquímico-fisiológico de estresse hídrico (Dias 2014, Costa et al. 2015).

Ao analisar o teor de prolina nas folhas (TABELA 2) considerando somente as doses de Br foi encontrado diferença estatística em todas as doses nas plantas irrigadas na presença da bactéria e nas plantas com deficiência hídrica tanto na presença como na ausência, onde verificou-se que nas plantas irrigadas na presença de azospirillum o maior teor de prolina foi encontrado na dose 0,3. Já nas plantas com deficiência de água na presença e na ausência de azospirillum o maior teor de prolina foi verificado na dose 0  $\mu$ M.

Ao analisar apenas a ação da azospirillum nas folhas, observa-se que para a prolina ocorreu diferença estatística tanto nas plantas irrigadas nas doses 0,3  $\mu$ M e 0,6  $\mu$ M, como nas com deficiência hídrica na presença e na ausência da bactéria nas doses 0  $\mu$ M; 0,3  $\mu$ M e 0,6  $\mu$ M (Tabela 2).

Ao observar na Tabela 2 o teor de aminoácidos nas folhas levando em consideração apenas os regimes hídricos, verifica-se que houve diferença significativa tanto nas plantas irrigadas como nas com deficiências hídricas na presença e na ausência da bactéria em todas as doses de brassinosteroides. Assim, verifica-se que as plantas com deficiência de água tanto na presença quanto na ausência da bactéria apresentaram sempre os maiores teores de aminoácidos em relação as irrigadas. Pois, as plantas quando em condições de deficiência hídrica promovem um incremento nos teores de aminoácidos, em especial a prolina, esse aumento pode se dá em função do aumento da atividade das enzimas proteolíticas, o que promove uma maior concentração de aminoácidos livres, que ocorre no sentido de proteger os tecidos vegetais contra a falta de água.

Na Tabela 2 analisando somente as doses de Br, observa-se que nas plantas irrigadas na presença da azospirillum os maiores teores de aminoácidos foram encontrados na dose 0,3  $\mu\text{M}$  e a menor na dose 0  $\mu\text{M}$ . Enquanto, nas plantas com deficiência hídrica na presença da azospirillum o maior teor de aminoácidos foi encontrado na dose 0  $\mu\text{M}$ , não diferindo da dose 0,6  $\mu\text{M}$  e nas plantas que sofreram com falta de água sem a inoculação com a bactéria foram encontrados os maiores teores de aminoácidos na dose 0  $\mu\text{M}$  e a menor nas doses 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ .

Observa-se ainda na Tabela 2 ao analisar-se somente a ação da azospirillum mantendo os demais fatores na mesma condição observou-se diferença significativa apenas nas plantas com deficiência hídrica nas doses 0  $\mu\text{M}$  e 0,3  $\mu\text{M}$ , isto é, a bactéria contribuiu para reduzir o teor de aminoácidos nessas doses de brassinosteroides.

Ao analisar nas raízes (Tabela 3) somente os regimes hídricos, na condição dos outros fatores iguais, observa-se que ocorreu efeito significativo do teor de amônio para as plantas irrigadas e com deficiência hídrica na presença da azospirillum nas doses 0  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ . Ocorreu também efeito significativo nas plantas irrigadas e com deficiência hídrica na ausência da azospirillum nas doses 0  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ . Observa-se assim que houve um aumento no teor de amônio nas plantas estressadas. Este incremento pode estar ligado a rota do glutamato desidrogenase (GDH), uma vez que este atua na dependência de NADH, desaminando o glutamato e gerando o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e o 2-Oxiglutarato para formação do mesmo, promovendo um acúmulo de amônio através de um descompasso entre sua produção e a redução da atividade da enzima glutamina sintetase (Cruz et al. 2008). Castro et al. (2007) encontraram resultados semelhantes ao trabalharem com plantas de *Tectona grandis* L. f. quando submetida a deficiência hídrica.

Na Tabela 3 analisando apenas as doses de Br para os teores de amônio nas raízes, observa-se que nas plantas irrigadas na presença da azospirillum os maiores teores foram encontrados na dose 0  $\mu\text{M}$  e 0,3  $\mu\text{M}$ . Enquanto, nas plantas com deficiência hídrica na presença da azospirillum o maior teor de amônio foi encontrado na dose 0,3  $\mu\text{M}$  e a menor na dose 0,6  $\mu\text{M}$  e nas plantas irrigadas e sem inoculação com bactéria o maior teor foi encontrado na dose 0,3  $\mu\text{M}$  não diferindo da dose 0  $\mu\text{M}$ . Já nas plantas que sofreram com falta de água sem a inoculação com a bactéria foram

encontrados os maiores teores de amônio na dose 0  $\mu\text{M}$  e a menor nas doses 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ .

Ao analisar-se somente a ação da azospirillum mantendo os demais fatores na mesma condição (Tabela 3) observou-se diferença significativa do amônio nas raízes das plantas irrigadas 0  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$  e também nas plantas com deficiência hídrica nas doses 0  $\mu\text{M}$  e 0,3  $\mu\text{M}$ .

Para os teores de proteínas, analisando somente os regimes hídricos nota-se efeito significativo apenas na dose 0  $\mu\text{M}$ . Houve uma redução significativa da concentração de proteínas nas plantas submetidas ao estresse hídrico (TABELA 3), provavelmente, devido ao aumento da atividade da enzima protease (Costa 1999). Para Maraghni et al. (2011) o metabolismo das proteínas é sensivelmente afetado pela falta de água nas plantas, após a percepção do estresse o processo de biossíntese de proteína é um dos primeiros eventos metabólicos paralisados, dando assim início a proteólise, do qual promove um incremento no conteúdo de aminoácidos solúveis, com consequente redução da concentração de proteínas (Brito et al. 2008). Oliveira et al. (2013), apresentaram resultados semelhantes com o presente trabalho para as concentrações de aminoácidos e proteínas tanto nas folhas como nas raízes quando trabalharam com mudas de graviola submetidos a deficiência hídrica por um período de 40 dias.

Ao analisar apenas as doses de brassinosteroides as plantas irrigadas na ausência da bactéria apresentaram maiores teores de proteínas nas raízes das plantas na dose 0,6  $\mu\text{M}$ . Enquanto, os maiores teores de proteínas nas plantas com deficiência hídrica na presença da bactéria foram observados nas doses 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ . O mesmo comportamento foi observado nas plantas que não foram inoculadas (0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ ).

Ao analisar-se apenas a ação da azospirillum nas raízes mantendo os demais fatores na mesma condição (TABELA 3) verificou-se diferença significativa da proteína nas raízes das plantas irrigadas na dose 0,6  $\mu\text{M}$  e também nas plantas com deficiência hídrica na dose 0  $\mu\text{M}$ .

Tabela 3. Amônio, Proteína e Redutase do nitrato em raízes de plantas de milho em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides.

Irrigação	Inoculação	Brassinosteroides ( $\mu\text{M}$ )		
		0	0,3	0,6
Amônio ( $\text{mmol NH}_4^+ \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{MS}$ )				

Irrigado	Presença	7,52Baa*	6,53Baba	5,88Aba
Irrigado	Ausência	3,81Babβ	4,15Aaβ	2,49Bbβ
Déficit hídrico	Presença	16,28Abβ	18,03Aaa	4,59Bca
Déficit hídrico	Ausência	19,88Aaa	4,14Abβ	4,81Aba
CV (%)	10,69			
Proteína (mg de proteína/ g MS)				
Irrigado	Presença	8,34Aaa	10,54Aaa	9,15Aaβ
Irrigado	Ausência	8,84Aba	9,47Aaba	11,47Aaa
Déficit hídrico	Presença	5,93Bba	9,34Aaa	9,63Aaa
Déficit hídrico	Ausência	3,18Bbβ	8,10Aaa	9,67Aaa
CV (%)	15,9			
Redutase do nitrato ( $\mu\text{moles de NO}_2\text{.g}^{-1}\text{MS}$ )				
Irrigado	Presença	2,02Aba	2,20Abβ	2,87Aaa
Irrigado	Ausência	2,10Aba	2,69Aaa	2,52Aaba
Déficit hídrico	Presença	0,39Bba	1,23Baβ	0,99Baa
Déficit hídrico	Ausência	0,11Bca	1,88Baa	1,21Bba
CV (%)	16,05			

\*Médias seguidas de mesma letra (letras maiúsculas para regimes hídricos, letras minúsculas para doses de brassinosteróides e letras gregas para inoculação com *Azospirillum brasilense*) não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Ao analisar a atividade da redutase do nitrato na raiz apenas na condição de regime hídrico, observa-se efeito significativo para as plantas irrigadas e com deficiência hídrica na presença da azospirillum nas doses 0  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ . Ocorreu também efeito significativo nas plantas irrigadas e com deficiência hídrica na ausência da azospirillum nas doses 0  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$  (Tabela 3). Demonstrando que as plantas quando em condições de estresse promoveram uma redução da atividade da redutase do nitrato. A assimilação do nitrogênio é afetada pelo déficit hídrico, sendo observadas reduções drásticas na atividade da enzima redutase do nitrato, a partir de pequenos decréscimos no potencial hídrico nos macros e microporos do solo (Botrel et al. 2000).

Quando analisar-se apenas as doses de brassinosteróides, verifica-se que nas plantas irrigadas na presença da bactéria a atividade da redutase do nitrato é maior na dose 0,6  $\mu\text{M}$  e na ausência a maior atividade desta enzima é observada na dose 0,3  $\mu\text{M}$ . Já nas plantas com deficiência hídrica na presença da bactéria a maior atividade da redutase do nitrato foi encontrado nas doses 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$  e na ausência a maior atividade da redutase foi encontrado na dose 0,3  $\mu\text{M}$  (Tabela 3).

Ao analisar-se somente o comportamento da azospirillum nas raízes (TABELA 3) observa-se diferença significativa da redutase nas raízes das plantas irrigadas na dose 0,3  $\mu\text{M}$  e também nas plantas com deficiência hídrica na dose 0,3  $\mu\text{M}$ .

Ao analisar somente os regimes hídricos nas raízes (TABELA 4) observa-se que os teores de glicina-betaina foram significativos tanto para as plantas irrigadas e com deficiência hídrica na presença da azospirillum nas doses 0  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ . Onde as plantas com estresse obtiveram maiores teores de glicina. O aumento nos níveis de glicina-betaina está associado à função de ser um excelente ajustador osmótico em espécies vegetais, no qual ocorre uma sinalização particular e consequente aumento na síntese deste aminoácido. Aumento nas concentrações de glicina-betaina em plantas sob deficiência hídrica, provavelmente, está associado a uma melhor absorção e transporte de água do solo para a parte aérea por meio de ajustamento osmótico, além de uma maior proteção da membrana celular, bem como proteção contra o mecanismo do estresse oxidativo das plantas (Ashraf e Haris 2004).

Observa-se ainda que houve efeito significativo da glicina nas plantas irrigadas e com deficiência hídrica na ausência da azospirillum nas doses 0  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$ .

Quando observamos apenas a ação do brassinosteroides nas raízes, verifica-se que os teores de glicina-betaina foram significativos apenas nas plantas expostas a deficiência hídrica na presença e na ausência da bactéria, onde nas plantas que foram submetidas a presença da bactéria os maiores teores de glicina foram na dose 0  $\mu\text{M}$  e a menor na dose 0,3  $\mu\text{M}$ . Enquanto, nas plantas que não foram tratadas com a bactéria o maior teor de glicina foi encontrado na dose 0  $\mu\text{M}$  e menor na dose 0,3  $\mu\text{M}$ .

Ao analisar nas raízes de milho somente os regimes hídricos (TABELA 4), observa-se que houve diferença estatística para a glutamina sintetase comparando as plantas de milho submetidas a irrigação e deficiência hídrica tanto na presença quanto na ausência da inoculação com a azospirillum para todas as doses de brassinosteroides. Assim, observa-se que nas doses 0  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$  e 0,6  $\mu\text{M}$  os maiores valores de glutamina na presença da bactéria foi observado nas plantas irrigadas. Na ausência da bactéria a maior concentração de glutamina também foi encontrada nas plantas irrigadas em todas as doses de brassinosteroides.

Quando analisar-se apenas as concentrações de Br, observa-se que houve diferença significativa apenas nas plantas irrigadas na presença da azospirillum e nas

com deficiência hídrica tanto na presença quanto na ausência da azospirillum nas diferentes doses de brassinosteroides, onde as plantas de milho hidratadas apresentaram os maiores teores de glutamina na dose 0,3  $\mu\text{M}$ . E nas plantas que sofreram deficiência hídrica na presença da bactéria apresentaram os valores mais elevados de glutamina na dose 0,3  $\mu\text{M}$  na dose de 0,6  $\mu\text{M}$ . O mesmo comportamento foi verificado nas plantas de milho que sofreram deficiência hídrica na ausência da bactéria, onde a maior concentração de glutamina foi encontrada na dose 0,3  $\mu\text{M}$  e na dose 0,6  $\mu\text{M}$ .

Quando se analisa a ação da azospirillum isolada, foi observado que houve diferença significativa nas concentrações de glutamina nas plantas irrigadas somente na dose 0,3  $\mu\text{M}$ .

Tabela 4. Glicina betaína, Glutamina sintetase, Nitrato, Prolina e aminoácidos em raízes de plantas de milho em função da interação do manejo hídrico, da inoculação com azospirillum e concentrações de brassinosteróides.

Irrigação	Inoculação	Brassinosteróides ( $\mu\text{M}$ )		
		0	0,3	0,6
Glicina betaína ( $\mu\text{g}$ de glicina betaína/g MS.)				
Irigado	Presença	10,62Ba $\beta$ *	10,58Ba $\alpha$	11,33Ba $\alpha$
Irigado	Ausência	11,78Ba $\alpha$	10,90Ba $\alpha$	11,95Ba $\alpha$
Déficit hídrico	Presença	30,83Aa $\beta$	21,39Ac $\beta$	26,59Ab $\beta$
Déficit hídrico	Ausência	35,37Aa $\alpha$	26,84Ac $\alpha$	28,37Ab $\alpha$
CV (%)	3,41			
Glutamina sintetase (mmoles de $\gamma$ -glutamil-hidroximato / kg MS de tecido/hora)				
Irigado	Presença	13,00Ab $\alpha$	14,30Aa $\alpha$	12,65Ab $\alpha$
Irigado	Ausência	12,91Aa $\alpha$	12,83Aa $\beta$	13,04Aa $\alpha$
Déficit hídrico	Presença	6,11Bb $\alpha$	8,22Ba $\alpha$	8,65Ba $\alpha$
Déficit hídrico	Ausência	5,85Bb $\alpha$	8,10Ba $\alpha$	8,15Ba $\alpha$
CV (%)	4,44			
Nitrato ( $\mu\text{moles}$ de $\text{NO}_3^-/\text{g MS}$ )				
Irigado	Presença	1,47Bb $\beta$	1,04Bc $\beta$	2,05Ba $\beta$
Irigado	Ausência	2,92Ba $\alpha$	2,12Bb $\alpha$	2,46Bb $\alpha$
Déficit hídrico	Presença	6,70Ab $\beta$	6,06Ac $\beta$	7,42Aa $\beta$
Déficit hídrico	Ausência	8,55Aa $\alpha$	7,14Ac $\alpha$	8,06Ab $\alpha$
CV (%)	4,61			
Prolina ( $\mu\text{moles Pro/g MS}$ )				
Irigado	Presença	3,94Bc $\alpha$	5,03Ba $\alpha$	4,42Bb $\alpha$
Irigado	Ausência	4,25Ba $\alpha$	4,12Ba $\beta$	4,18Ba $\alpha$
Déficit hídrico	Presença	11,58Aa $\beta$	6,71Ac $\beta$	10,27Ab $\beta$
Déficit hídrico	Ausência	16,76Aa $\alpha$	8,75Ac $\alpha$	10,98Ab $\alpha$
CV (%)	3,50			
Aminoácidos ( $\mu\text{moles}$ de A.A .g. <sup>-1</sup> MS)				
Irigado	Presença	115,39Bc $\alpha$	126,37Ba $\alpha$	120,11Bb $\alpha$
Irigado	Ausência	117,30Bc $\alpha$	122,83Ba $\beta$	119,53Bab $\alpha$
Déficit hídrico	Presença	169,31Aa $\beta$	155,10Ac $\beta$	161,83Ab $\beta$

Déficit hídrico	Ausência	181,77Aaα	163,90Aba	164,98Aba
CV (%)	1,38			

\*Médias seguidas de mesma letra (letras maiúsculas para regimes hídricos, letras minúsculas para doses de brassinosteróides e letras gregas para inoculação com *Azospirillum brasilense*) não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Ao analisar o teor de nitrato nas raízes de milho somente na condição de regimes hídricos, observa-se que houve diferença estatística comparando as plantas de milho submetidas à irrigação e deficiência hídrica tanto na presença quanto na ausência da inoculação com a *azospirillum* para todas as doses de Br. Assim, os maiores valores de nitrato na presença da bactéria foram observados nas plantas com deficiência hídrica. O mesmo comportamento foi observado na ausência da bactéria.

Observa-se analisando apenas as concentrações de Br (TABELA 4), que houve diferença significativa nas plantas irrigadas e nas com deficiência hídrica tanto na presença quanto na ausência da *azospirillum* nas diferentes doses de brassinosteróides, onde as plantas de milho hidratadas e inoculadas com a bactéria apresentaram os maiores teores de nitrato na dose 0,6 μM e nas que não foram inoculados os maiores teores de nitrato foi encontrado na dose 0 μM. E nas plantas que sofreram deficiência hídrica na presença da bactéria apresentaram os valores mais elevados de nitrato na dose 0,6 μM. E nas plantas de milho que sofreram deficiência hídrica na ausência da bactéria, a maior concentração de nitrato foi encontrado na dose 0 μM.

Em relação a ação da *azospirillum* isolada, foi observado que houve diferença significativa nas concentrações de nitrato nas plantas irrigadas e com deficiência hídrica. Observa-se que as plantas irrigadas e com deficiência hídrica apresentam os maiores teores de nitrato na ausência da bactéria em todas as doses de Br. Esse resultado pode estar relacionado ao fato da bactéria do gênero *Azospirillum* reduzir o nitrato ao amônio, assim a concentração do nitrato diminui na presença da bactéria e aumenta na ausência. Para Kappes et al. (2017) existem interações entre o N e as bactérias diazotróficas na assimilação e na utilização desse nutriente pelas plantas.

Ferreira et al. (1987) observaram que bactérias do gênero *Azospirillum* podem atuar no crescimento vegetal por meio da redução do nitrato nas raízes das plantas. Assim, as plantas não gastariam energia para reduzir o nitrato até amônia e essa energia poderia ser canalizada para outros processos vitais. Pode-se constituir uma estratégia

importante o conhecimento desta interação e contribuir com informações valiosas em relação à redução de aplicação de fertilizantes nitrogenados, redução de custos na semeadura e menor contaminação do lençol freático por compostos nitrogenados (Kappes et al. 2013b). Dessa forma, o uso do N atmosférico fixado por meio de bactérias diazotróficas seria uma prática importante para amenizar tais problemas (Kappes et al. 2017).

Ao analisar o teor de prolina nas raízes de milho somente na condição de regimes hídricos, observa-se que houve diferença estatística comparando as plantas de milho submetidas à irrigação e deficiência hídrica tanto na presença quanto na ausência da inoculação com a azospirillum para todas as doses de brassinosteroides. Assim, os maiores valores de prolina na presença da bactéria foram observados nas plantas com deficiência hídrica. O mesmo comportamento foi observado na ausência da bactéria.

Em relação as concentrações de brassinosteroides, observa-se que houve diferença significativa nas plantas irrigadas na presença da bactéria e nas com deficiência hídrica tanto na presença quanto na ausência da azospirillum nas diferentes doses de Br, onde as plantas de milho hidratadas e inoculadas com a bactéria apresentaram os maiores teores de prolina na dose 0,3  $\mu\text{M}$ . E nas plantas que sofreram deficiência hídrica na presença da bactéria apresentaram os valores mais elevados de prolina na dose 0  $\mu\text{M}$ , o mesmo foi observado nas plantas que sofreram deficiência hídrica na ausência da bactéria.

Em relação à ação da azospirillum de forma isolada, foi observado que houve diferença significativa nas concentrações de prolina nas plantas irrigadas na dose 0,3  $\mu\text{M}$ . Enquanto, nas plantas com deficiência hídrica houve efeito significativo em todas as doses de Br, onde estas plantas na ausência da bactéria foram as que apresentaram os maiores teores de prolina comparada as que foram inoculadas com a bactéria em todas as doses de brassinosteroides.

Quando se analisa o teor de aminoácidos nas raízes de milho somente na condição de regimes hídricos, observa-se que houve diferença estatística comparando as plantas de milho submetidas à irrigação e deficiência hídrica tanto na presença quanto na ausência da inoculação com a azospirillum para todas as doses de brassinosteroides. Observa-se que os maiores valores de aminoácidos na presença e na ausência da bactéria foram observados nas plantas com deficiência hídrica. Esse aumento de

aminoácidos pode ser decorrente de distúrbios promovidos pela falta de água nos tecidos do floema, diminuindo a translocação para outros órgãos. O incremento do aminoácido quando as plantas estão submetidas em condições de deficiência hídrica foi encontrado também por Oliveira et al. (2013) em plantas jovens de graviola e por Silva et al. (2010) em *Coffea canéfora*.

Em relação as concentrações de brassinosteroides, observa-se que houve diferença significativa nas plantas irrigadas e nas com deficiência hídrica tanto na presença quanto na ausência da azospirillum nas diferentes doses de brassinosteroides, onde as plantas de milho hidratadas e inoculadas com a bactéria apresentaram os maiores teores de aminoácidos na dose 0,3  $\mu\text{M}$ . Nas plantas hidratadas na ausência da inoculação com a bactéria os maiores teores de aminoácidos foram encontrados na dose 0  $\mu\text{M}$ . Já nas plantas que sofreram deficiência hídrica na presença da bactéria apresentaram os valores mais elevados de aminoácidos na dose 0  $\mu\text{M}$ , o mesmo foi observado nas plantas que sofreram deficiência hídrica na ausência da bactéria.

Em relação à ação da azospirillum de forma isolada, foi observado que houve diferença significativa nas concentrações de aminoácidos nas plantas irrigadas na dose 0,3  $\mu\text{M}$ . Enquanto, nas plantas com deficiência hídrica houve efeito significativo em todas as doses de brassinosteroides, onde estas plantas na ausência da bactéria foram as que apresentaram os maiores teores de aminoácidos comparada as que foram inoculadas com a bactéria em todas as doses de brassinosteroides.

#### 4.5 CONCLUSÕES

A aplicação de *Azospirillum brasilense* interfere positivamente no metabolismo do nitrogênio tanto na folha quanto na raiz da cultura do milho durante a ocorrência de deficiência hídrica, assim como a aplicação de brassinosteróides.

O uso da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* via semente e a aplicação de brassinosteróides, amenizam os efeitos negativos no metabolismo do nitrogênio nas folhas e raízes causadas pela ocorrência da deficiência hídrica na cultura do milho.

#### 4.6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AHANUNED GJ, CHOUDHARY SP, CHEN S, et al (2013). Role of brassinosteroids in alleviation of phenanthrene-cadmium co-contamination-induced photosynthetic inhibition and oxidative stress in tomato. *J Exp Bot* 64:199-213 .doi: 10.1093/jxb/ers323

ANDRADE NETTO, J. F. Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em cafeeiro arábica. Universidade de São Paulo, Piracicaba. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* [online]. 2009, vol.33, n.2, pp.315-324. ISSN 1806-9657.

ASHRAF, M.; AKRAM, N. A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M. R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. *Advances in Agronomy*, v.111, p.249-296, 2011.

ASHRAF, M.; HARIS, P. J. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, London, v. 166, n.1, p.3-16, 2004.

BASTOS, T.X.; PACHECO, N.A.; NECHET, D.; SÁ, T.D.A. Aspectos climáticos de Belém nos últimos cem anos. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 31p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 128). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/389773>>. Acesso em: 10 mar. 2020.

BATES, L. S., WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for waterstress studies. Short communication. *Plant and Soil*. V. 39, p.205-207. 1973.

BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 3, p. 89-97, 1996.

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, p.248-254.1976.

BRITO, L.K.F.L. et al. Alterações no perfil de frações nitrogenadas em calos de cana de açúcar induzidas por déficit hídrico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.43, n.6, p.683-690, 2008.

CASTRO, D. S.; LOBATO, A. K. S. ; MENDES, F. S. ; OLIVEIRA NETO, C. F. ; CUNHA, R. L. M. ; COSTA, R. C. L. Atividade da Redutase do Nitrato em Folhas de

Teca (*Tectona grandis* L. f.) sob Déficit Hídrico. Revista Brasileira de Biociências, 2, p. 936-938, jul. 2007.

CARLIN, S. D.; SANTOS, D. M. M. Indicadores fisiológicos da interação entre déficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 44, n. 9, p.1106-1113, 2009.

CATALDO, D. A.; HAROON, S. L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun Soil Science Plant Analyse, v.6, p.71-80, 1975.

COSTA, R.C.L.da Assimilação de Nitrogênio e Ajustamento Osmótico em Plantas Noduladas de Feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] Submetidas ao Estresse Hídrico. UFC/DBBM, março. 1999.

Costa, R.R. da; Andrade, W.L. de; Silva, D.C. da; Melo, A.S. de; Suassuna, J.F.; Ácido salicílico como atenuador de estresse hídrico em feijão-caupi. Congresso técnico científico da Engenharia e da Agronomia, Fortaleza, CE, 2015.

CRUZ, J. L.; PELACANI, C. R.; ARAÚJO, W. L. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização do nitrogênio em mandioca. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.3, p.643-649, mai-jun, 2008.

DIAS, V. G. Crescimento, fisiologia e produção do meloeiro “pele de sapo” cultivado sob diferentes lâminas de irrigação. Campina Grande, 2014. 83f. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão.

EMBRAPA – Manual de Análises químicas de solos, plantas e fertilizantes, 2ª edição, 2009.

FERREIRA, D. F. Programa computacional Sisvar – UFLA, versão 5.4, 2010.

FERREIRA, M.C.B.; FERNANDES, M.S. & DÖBEREINER, J. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. Biol. Fert. Soils, 4:47-53, 1987.

FILIPPOU, P.; BOUCHAGIER, P.; SKOTTI, E.; FOTOPOULOS, V. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. Environmental and Experimental Botany, v. 97, p. 1-10, 2014.

FREITAS, J. M. N. de. Comportamento ecofisiológico e bioquímico de plantas jovens de acapú (*Vouacapoua amaricana* Aubl.) submetida á deficiência hídrica. 2014. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias). Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.

GRIEVE C.M.; GRATTAN S. R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*. v.70, p.303-307. 1983.

HAGEMAN, R.H.G.; HUCKLESBY, D.P. Nitrate reductase from higher plants. In: *Methods in enzymology*. 17 A: 491-503, 1971.

JAMES, E. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, v. 65, p. 197-209, 2000.

HERNÁNDEZ, M.; ECHARTE, L.; DELLA MAGGIORA, A.; CAMBARERI, M.; BARBIERI, P.; CERRUDO, D. Maize water use efficiency and evapotranspiration response to N supply under contrasting soil water availability, *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 178, p. 8-15, 2015.

IAC-Análise química para avaliação da fertilidade solos tropicais, Instituto Agronômico de Campinas, 2001.

KAISER W. M.; HUBER S. C. Pos-translation regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany*, v.52, n.363, p.1981-1989, 2001.

KAMACHI, K.; YAMAYA, T.; MAE,T.; OJIMA, K. A. Role for glutamine synthetase in remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiology*. 96, 411-417, 1991.

KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M.V.; FERREIRA, J.P.; DAL BEM, E.A.; PORTUGAL, J.R.; VILELA, R.G. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.34, n.2, p.527- 538, 2013b.

Kappes, C.; Silva, R. G.; Ferreira, V. E. N. APLICAÇÃO FOLIAR DE *Azospirillum* brasileiro E DOSES DE NITROGÊNIO EM COBERTURA NO MILHO SAFRINHA. *Sci. Agrar. Parana.*, Marechal Cândido Rondon, v. 16, n. 3, jul./set., p. 366-373, 2017.

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, v. 88, n. 3, p. 424- 438, 2005.

MARAGHNI M.; GORAI M.; NEFFATI M. The Influence of Water-Deficit Stress on Growth, Water Relations and Solute Accumulation in Wild Jujube (*Ziziphus lotus*). *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, 1(2): 63-72 p., 2011.

OLIVEIRA-NETO, C.F. Crescimento, produção e comportamento fisiológico e bioquímico em plantas de sorgo (*sorghum bicolor* [L.] moench) submetidas à deficiência hídrica /Belém, 2008. 114p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2008.

OLIVEIRA, L. M.; SILVA, J. N.; COELHO, C. C. R; NEVES, M. G.; SILVA R. T. L.; OLIVEIRA NETO, C. F. Pigmentos fotossintetizantes, aminoácidos e proteínas em plantas jovens de graviola submetida ao déficit hídrico. *Agroecossistemas*, v. 5, n. 1, p. 39-44, 2013.

PAULA, M. T.; SANTOS FILHO, B. G. dos; CORDEIRO, Y. E. M.; CONDE, R. A.; NEVES, P. A. P. F. G. Ecofisiologia do mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla* King) em sistemas agroflorestais no município de Santa Bárbara-PA. *Enciclopédia Biosfera*, v.9, n.16, p.813-824, 2013.

PEOPLES, M.B; FAIZAH, A.W; REAKASEM, B.E; HERRIDGE, D.F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Australian. Centre for International Agricultural Research Canberra. 76p.1989.

RABE, E. Altered nitrogen metabolism under environmental stress conditions. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). *Handbook of plant and crop stress*. New York: CRC. p.349-364, 1993.

Reis Junior, F. B. dos; Machado, C. T. de T.; Machado, A. T.; Sodek, L. INOCULAÇÃO DE *Azospirillum amazonense* EM DOIS GENÓTIPOS DE MILHO SOB DIFERENTES REGIMES DE NITROGÊNIO. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1139-1146, 2008.

- SILVA, S. L. F.; VOIGT, E. L.; VIÉGAS, R. A.; PAIVA, J. R.; SILVEIRA, J. A. G. Influência de porta-enxertos na resistência de mudas de cajueiro ao estresse salino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 4, p. 361-367, 2009.
- SILVA, R. T. L.; OLIVEIRA NETO, C. F.; BARBOSA, R. R. N.; COSTA, R. C. L. CONCEIÇÃO, H. E. O. Resposta fisiológica de plantas de mamoeiro submetidas ao déficit hídrico. *Nucleus*, v. 9, n. 2, p. 113-120, 2012.
- SILVA, V. A.; ANTUNES, W. C.; GUIMARÃES, B. L. S.; PAIVA, M. C.; SILVA, V. de F.; FERRÃO, M. A. G.; DAMATTA, F. M.; LOUREIRO, M. E. Resposta fisiológica de clone de café Conilon sensível à deficiência hídrica enxertado em porta-enxerto tolerante. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.45, n.5, p.457-464, 2010.
- SHARNER, D.L.; BOYER, J.S. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiology*. v.58, p. 499-504, 1976.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in Botanical Research*, v. 51, p. 283-320, 2009.
- SWARBRECK, S. M.; DEFOIN-PLATEL, M.; HINDLE, M.; SAQI, M.; HABASH, D. Z. New perspectives on glutamine synthetase in grasses. *Journal of Experimental Botany*. 62, n. 4, 1511–1522. 2011.
- Teixeira, D.T. F.; Nogueira, G. A. S.; Maltarolo, B. M.; , Ataíde, W. L. S.; , Oliveira Neto, C. F. ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM PLANTAS DE NONI SOB DUAS CONDIÇÕES HÍDRICAS. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p. 2015.
- TERCÉ-LAFORGUE, T; BEDU, M.; DARGEL-GRAFIN, C.; DUBOIS F.; GIBON Y.; RESTIVO F.M.; HIREL, B. Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase: II. Physiological characterization of plants overexpressing the two enzyme subunits individually or simultaneously. *Plant & Cell Physiology*, Kioto, v. 54, n. 10, p. 1635-1647, Oct. 2013.
- VARDHINI, B. V. Application of brassinolide mitigates saline stress of certain metabolites of sorghum grown in Karaikal. *Journal of Phytology*, v. 4, n. 4, p. 1-3. 2012
- WEATHERBURN, M.W. Phenol hipochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. v. 39, p.971-974. 1967