

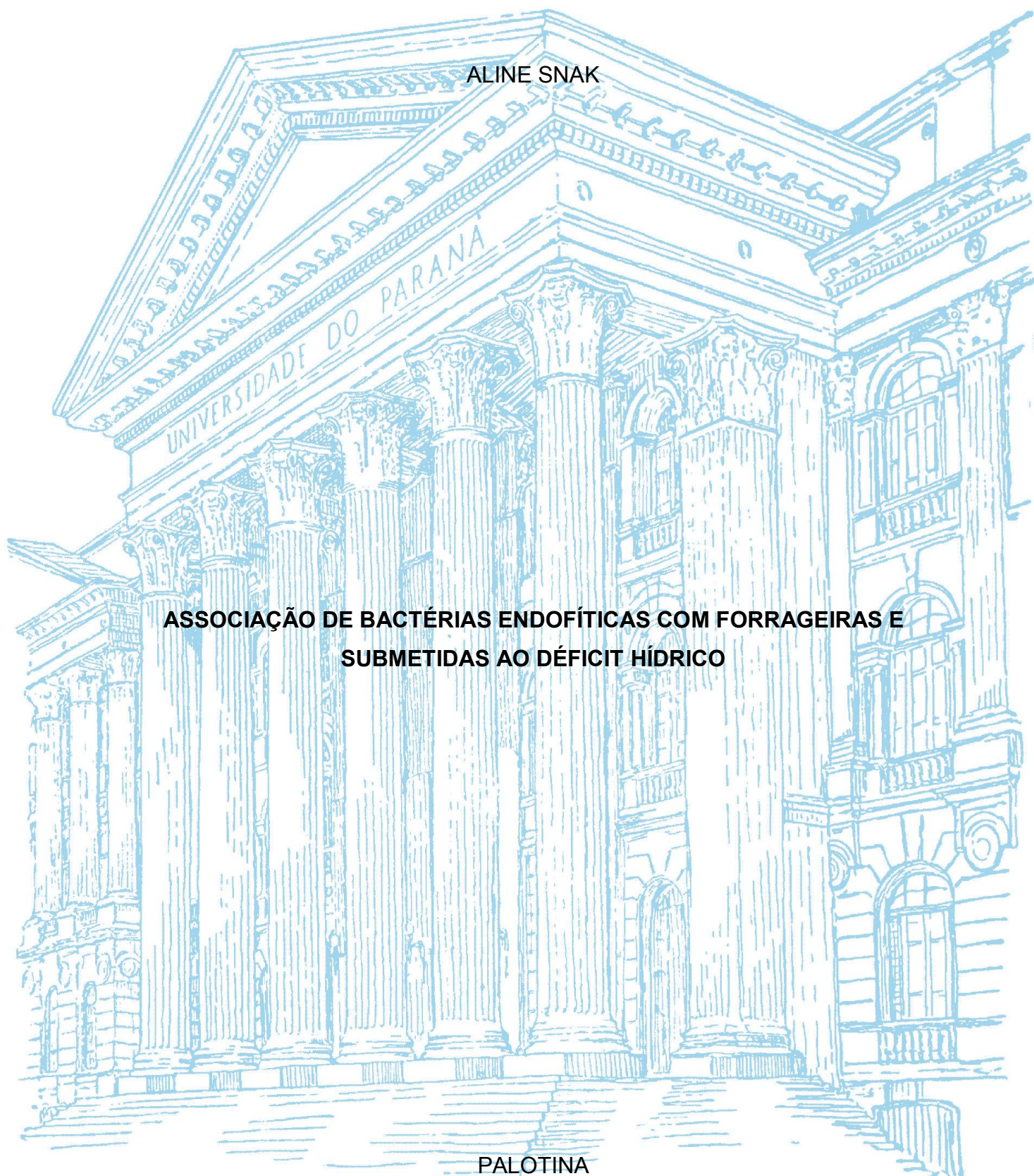
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE SNAK

**ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COM FORRAGEIRAS E  
SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO**

PALOTINA

2018



ALINE SNAK

ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COM FORRAGEIRAS E  
SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Bioprodutos Agroindustriais, no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Bioprodutos Agroindustriais, Setor de Palotina, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo

Coorientador (a): Profa. Dr (a). Marise Fonseca dos Santos

PALOTINA

2018

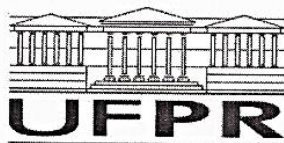
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S669 Snak, Aline  
Associação de bactérias endofíticas com forrageiras e submetidas ao deficit hídrico / Aline Snak. -- Palotina, 2018  
144f.

Orientadora: Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo  
Coorientadora: Marise Fonseca dos Santos  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de  
Bioprodutos Agroindustriais.

1. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. 2. Interação  
planta bactéria. 3. Pastagens. I. Vendruscolo, Eliane Cristina  
Gruszka. II. Santos, Marise Fonseca dos. III. Universidade  
Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 620.91



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO TECNOLOGIAS DE  
BIOPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em TECNOLOGIAS DE BIOPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ALINE SNAK** intitulada: **ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COM FORRAGEIRAS E SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 15 de Fevereiro de 2018.



ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



ELIANE HERMES

Avaliador Interno (UFPR)



ANTONIO CARLOS TORRES DA COSTA

Avaliador Externo (UNIOESTE)

Aos meus pais, Delcio e Terezinha,  
minha gratidão por vocês jamais poderá  
ser demonstrada com palavras.  
Obrigada por fazerem de mim  
a pessoa que sou hoje!

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho. Agradeço também pelas pessoas que colocou em minha trajetória, algumas delas me inspiram, me ajudam, me desafiam e me encorajam a ser cada dia melhor. Te agradeço, por todas as coisas boas e más que me aconteceram, cada uma delas, ao seu modo, me fizeram chegar onde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou. Foi a minha jornada de tropeços, vitórias e derrotas, que me fez enxergar o verdadeiro significado e beleza da vida. Obrigada por não fazer as minhas vontades e sim atender as minhas necessidades.

Agradeço aos meus pais Delcio e Terezinha, se hoje cheguei até aqui com certeza foi por vocês. Não foi nada fácil, mas vocês não me abandonaram em nenhum momento, agradeço todos os dias por ter pais maravilhosos, que sempre fizeram o possível e o impossível para ver meus sonhos realizados. O orgulho que tenho de vocês não cabe em mim, e a cada dia esse orgulho aumenta por ver como enfrentam cada momento de dificuldade e de alegria. Muito obrigada por serem como são. Amo muito vocês!

As minhas irmãs, Cristiane e Alessandra, vocês sempre foram meu grande exemplo, me incentivando e iluminando meus passos, obrigada por estarem comigo e me ajudarem em todos os momentos. Agradeço a Alessandra, pelo incentivo em iniciar este mestrado, que me trouxe enorme evolução profissional e pessoal, vocês sabem o quanto foi importante para mim.

Aos meus avôs, José e Theresa, pela importante contribuição na minha criação e formação do meu caráter, o amor que sinto por vocês é imenso.

Ao meu namorado Matheus Schmidt, por sempre compreender minha ausência, meus momentos de irritação e desespero, por estar sempre ao meu lado, sendo sempre um grande amigo, companheiro e fazendo o possível e o impossível para me ajudar, te agradeço por todas as vezes que me acalmou quando tudo dava errado e que me ajudou a decidir qual caminho a seguir, sem esquecer de todas as correções e traduções, que não foram poucas, muito obrigada amor. Aproveito também, para agradecer aos seus pais Maria e Luiz, que durante o mestrado, me ampararam, seja mandando um pratinho de comida nas madrugadas de trabalho, ou me oferecendo todo suporte em Palotina nos últimos meses.

À minha prima/irmã Fernanda Frizon, por todo apoio e incentivo para a realização deste sonho, cuidando de mim desde bebezinha até emprestar o notebook para finalizar a dissertação.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eliane Vendruscolo pela sua disponibilidade e incentivo para realizar este estudo, por depositar em mim toda a sua confiança, sem nem mesmo me conhecer, por me dar a oportunidade de aprender, errando e acertando durante todas as etapas do trabalho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. À minha coorientadora, Profa. Dra. Marise Fonseca dos Santos, por toda ajuda prestada nesta pesquisa. Vocês me mostraram o tipo de profissional que quero ser, e me fizeram evoluir muito durante esta jornada.

À Profa. Dra. Adriana Fiorini, sempre atenciosa, obrigada pela amizade, conselhos e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Nelson Luis Mello Fernandes pelo auxílio e disponibilização de equipamentos para o experimento, oportunizando a realização deste estudo.

As minhas amigas do LaBioGen, Adriá, Sharlini e Adeline. Obrigada pela amizade, descontração, companheirismo e por fazerem com que o local de trabalho se tornasse um ambiente agradável e feliz. Meus agradecimentos especiais a Adriá, pelas inúmeras manhas, tardes, noites e madrugadas no laboratório e que dividiu comigo não apenas a bancada de laboratório, mas também alegrias, aflições e incertezas, sua ajuda e amizade foram muito importantes para mim.

As técnicas do bloco multidisciplinar, Fernanda, Mara, Cleuza, Zena e Jéssica que foram prestativas em todos os momentos que precisei, em especial a Fernanda, que além de todo auxílio me proporcionou a amizade e conselhos em muitos momentos.

Agradeço a todos que me ajudaram de alguma forma na realização do projeto, em especial ao prof. Fábio.

À UFPR Setor Palotina e a todos os seus funcionários por terem contribuído direta ou indiretamente com a realização deste trabalho, a cada um o meu muito obrigada.

Por fim, agradeço à Fundação Araucária pela concessão de bolsa de estudo durante o segundo período do mestrado.

“Tudo o que você quer está a um sonho de distância.”

Coldplay

## RESUMO

O trabalho teve como objetivos principais, (1) avaliar o perfil associativo de bactérias promotoras de crescimento vegetal com diferentes espécies forrageiras; (2) realizar o estabelecimento de protocolo para simulação de estresse osmótico em plantas forrageiras; (3) avaliar o efeito da associação de bactérias endofíticas em *Urochloa ruziziensis* submetidas ao estresse osmótico. Para isso, foram realizados três experimentos no laboratório de bioquímica e genética da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, com um delineamento inteiramente casualizado. Todos os dados foram submetidos a ANOVA e comparados pelo teste Tukey ( $p > 5\%$ ). No primeiro experimento foram avaliadas três espécies forrageiras: aveia branca (*Avena sativa*), *Brachiaria ruziziensis* (*Urochloa ruziziensis*) e milheto (*Pennisetum glaucum*), inoculadas com *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, e *Leclercia adecarboxylata* na proporção de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> para a *Ensifer adherens* a concentração de inóculo foi de  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Após 21 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados o comprimento, peso fresco e seco da biomassa de parte aérea e raiz, quantificação de proteína bruta e nitrogênio total, morfologia das raízes por coloração com azul de metileno 1%, morfologia de estômatos e contagem microbiana. As diferentes espécies forrageiras apresentaram comportamento distinto em relação à associação com as estirpes bacterianas. Apesar da aveia ter apresentado resultados significativos para PB e NT, a *Brachiaria* apresentou uma maior população microbiana, apontando ser preferencial para a associação bacteriana. No segundo experimento foram avaliadas as mesmas espécies forrageiras. O meio de cultura (MS) para cultivo foi acrescido com Polietilenoglicol (PEG – 6000) em diferentes potenciais, sendo eles 0; -0,1; -0,2; -0,3 e -0,4 MPa (0; 78,49; 119,57; 151,41 e 178,34 g.L<sup>-1</sup> respectivamente). Após 13 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados o comprimento, peso fresco e seco da biomassa de parte aérea e raiz, a morfologia das raízes por coloração com azul de metileno 1% e abertura e fechamento dos estômatos. O potencial -0,3 MPa é o que melhor representou o déficit hídrico, onde os resultados foram significativos e menores para as variáveis analisadas, os estômatos apresentaram-se fechados, enquanto os do grupo controle, irrigado no mesmo período, permaneceram abertos. Para as espécies avaliadas, a concentração de potencial -0,3 MPa é a que melhor simula o déficit hídrico para plantas *in vitro*. No terceiro experimento foi utilizada apenas a *Brachiaria ruziziensis* (*Urochloa ruziziensis*) a qual foi inoculada com *A. brasilense*, *H. seropedicae*, e *L. adecarboxylata* na proporção de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O meio MS foi acrescido com Polietilenoglicol. Após 13 dias de cultivo, foram avaliados o comprimento, peso fresco e seco da biomassa de parte aérea e raiz, contagem microbiana, teor relativo de água (TRA) e índice de estabilidade de membrana (IEM), morfologia das raízes por coloração com azul de metileno 1%, morfologia de estômatos e análise enzimática. Para confirmar a presença das bactérias foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR). *A. brasilense* foi a bactéria que promoveu os maiores aumentos na parte aérea e radicular, manutenção da área estomática em ambas condições (controle e estressado), podendo ser considerada como a melhor estirpe para fins comerciais. Também, a estirpe *L. adecarboxylata* é promissora, apontando ter uma interação benéfica para *Brachiaria* com futuro potencial para o desenvolvimento de biofertilizantes.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Interação planta bactéria. Pastagens.

## ABSTRACT

The main objectives of this study were: (1) to evaluate the associative profile of plant growth promoting bacteria with different forage species; (2) to establish the protocol for osmotic stress simulation in forage plants; (3) to evaluate the effect of the association of endophytic bacteria on *Urochloa ruziziensis* submitted to osmotic stress. To that matter, three experiments were carried out in the biochemistry and genetics laboratory of the Federal University of Paraná - Sector Palotina, with a completely randomized design. All data were submitted to ANOVA and compared by the Tukey test ( $p > 5\%$ ). In the first experiment, three forage species were evaluated: White oats (*Avena sativa*), Brachiaria ruziziensis (*Urochloa ruziziensis*) and Millet (*Pennisetum glaucum*), inoculated in the proportion of  $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup> with *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, and *Leclercia adecarboxylata*, and inoculated in the proportion of  $10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup> with *Ensifer adherens*. After 21 days of in vitro culture, the following factors were evaluated: length, fresh and dry weight of shoot and root biomass, gross protein and total nitrogen quantification, root morphology by staining with 1% methylene blue, stoma morphology and counting microbial. The different forage species presented different behavior in relation to the association with the bacterial strains. Although Oats presented significant results for PB and NT, Brachiaria had a higher microbial population, indicating that it was preferential for bacterial association. In the second experiment, the same forage species were evaluated. The MS medium for cultivation was added with polyethylene glycol (PEG - 6000) in different potentials: 0; -0.1; -0.2; -0.3 and -0.4 MPa (0, 78.49, 119.57, 151.41 and 178.34 g.L<sup>-1</sup> respectively). After 13 days of in vitro cultivation, the following factors were evaluated: length, fresh and dry weight of shoot and root biomass, morphology of roots by staining with 1% methylene blue and opening and closing of the stomata. The potential -0.3 MPa best represented the water deficit, where the results were significant and smaller for the analyzed variables and the stomata were closed, whereas in the control group, irrigated in the same period, they remained open. For evaluated grasses, the potential concentration -0.3 MPa is the one that best simulates the water deficit for plants *in vitro*. In the third experiment, only Brachiaria ruziziensis (*Urochloa ruziziensis*) was used, which was inoculated with *A. brasilense*, *H. seropedicae* and *L. adecarboxylata* in the proportion of  $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup>. After 13 days of cultivation, the following factors were evaluated: length, fresh and dry weight of shoot and root biomass, microbial counts, relative water content (PEG - 6000) (TRA) and membrane stability index (IEM), root morphology by staining with 1% methylene blue, morphology of stomata and enzymatic analysis. A polymerase chain reaction (PCR) was performed to confirm the presence of the bacteria. *A. brasilense* was the bacterium that promoted the greatest increases in aerial and radicular part, maintenance of the stomatal area in both conditions (control and stress), being considered as the best strain for commercial purposes. In addition, the *L. adecarboxylata* strain is promising, aiming to have a beneficial interaction to Brachiaria with potential for the development of biofertilizers.

Key-words: Plant growth promoting bacteria. Plant-bacterium Interaction. Forage.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - LINHA DO TEMPO DA TRAJETÓRIA DA PRODUÇÃO DE INOCULANTES NO BRASIL.....	27
FIGURA 2 - MODO DE COLONIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFITICAS EM GRAMÍNEAS. AS BACTÉRIAS (PONTOS VERMELHOS) INICIAM A COLONIZAÇÃO PELA SUPERFÍCIE DA RAIZ, PRINCIPALMENTE, NOS PONTOS DE EMERGÊNCIA DE RAÍZES LATERAIS (1). APÓS A PENETRAÇÃO SUPERFICIAL NOS TECIDOS DA PLANTA.....	29

### CAPITULO I

FIGURA 1 – ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE PLÂNTULAS DE AVEIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.....	62
FIGURA 2 – ASPECTO VISUAL DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.....	63
FIGURA 3 – ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE PLÂNTULAS DE BRACHIARIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.....	64
FIGURA 4 – ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE PLÂNTULAS DE MILHETO INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.....	64
FIGURA 5 – BIOMASSA FRESCA E SECA (G) DE PLÂNTULAS DE AVEIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.....	66
FIGURA 6 – BIOMASSA FRESCA E SECA (G) DE PLÂNTULAS DE BRACHIARIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.....	66
FIGURA 7 – BIOMASSA FRESCA E SECA (G) DE PLÂNTULAS DE MILHETO INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.....	68
FIGURA 8 – ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE AVEIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS USANDO O PROGRAMA IMAGE-PRO PLUS.....	69
FIGURA 9 – ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE BRACHIARIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS USANDO O PROGRAMA IMAGE-PRO PLUS.....	70
FIGURA 10 – ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE MILHETO INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS USANDO O PROGRAMA IMAGE-PRO PLUS.....	71

FIGURA 11 – ASPECTO VISUAL DE RAÍZES DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.....	71
FIGURA 12 - PADRÃO DE BANDA ENCONTRADO PARA O GENE FILOGENÉTICO 16S.....	74

## **CAPITULO II**

FIGURA 1 - PLANTAS FORRAGEIRAS SUBMETIDAS <i>IN VITRO</i> A DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.....	88
FIGURA 2 – ÁREA ESTOMÁTICA DE PLANTAS FORRAGEIRAS SUBMETIDAS <i>IN VITRO</i> À DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.....	93
FIGURA 3 - ASPECTO VISUAL DAS FOLHAS E ESTÔMATOS DE PLANTAS FORRAGEIRAS SUBMETIDAS <i>IN VITRO</i> A DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.....	93
FIGURA 4 – ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE AVEIA SUBMETIDAS <i>IN VITRO</i> A DIFERENTES CONDIÇÕES OSMÓTICAS.....	94
FIGURA 5 – ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE BRACHIARIA SUBMETIDAS <i>IN VITRO</i> A DIFERENTES CONDIÇÕES OSMÓTICAS.....	95
FIGURA 6 – ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE MILHETO SUBMETIDAS <i>IN VITRO</i> A DIFERENTES CONDIÇÕES OSMÓTICAS.....	96
FIGURA 7 - MORFOLOGIA RADICULAR DE PLANTAS DE AVEIA <i>IN VITRO</i> SUBMETIDAS A DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.....	96

## **CAPITULO III**

FIGURA 1 – ASPECTOS BIOFÍSICOS. <u>A</u> -TEOR RELATIVO DE ÁGUA (TRA) E <u>B</u> -ÍNDICE DE ESTABILIDADE DE MEMBRANA (IEM) (%) EM PLANTAS DE BRACHIARIA SUBMETIDAS OU NÃO A ESTRESSE HÍDRICO <i>IN VITRO</i> INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.....	116
FIGURA 2 – ÁREA DE ESTÔMATOS DE PLANTAS DE BRACHIARIA ESTRESSADAS E NÃO ESTRESSADAS INOCULADA COM DIFERENTES BACTÉRIAS.....	118
FIGURA 3 – ESTÔMATOS DE PLANTAS DE BRACHIARIA.....	119
FIGURA 4 – PLÂNTULAS DE BRACHIARIA.....	121

FIGURA 5 – ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS, E SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS AO POTENCIAL HIDRICO -0,3 MPa.....	122
FIGURA 6 – AVALIAÇÃO DA BIOMASSA FRESCA E SECA (G) DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS E SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS AO POTENCIAL HIDRICO -0,3 MPa.....	124
FIGURA 7 - PADRÃO DE BANDA ENCONTRADO PARA O GENE FILOGENÉTICO 16S.....	125
FIGURA 8 – ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS E SUBMETIDAS AO POTENCIAL HIDRICO -0,3 MPa.....	127
FIGURA 9 – RAÍZES DE PLANTAS DE BRACHIARIA.....	128
FIGURA 10 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE OSMÓTICO.....	130
FIGURA 11 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS AO POTENCIAL HIDRICO -0,3 MPa.....	131
FIGURA 12 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ASCORBATO PEROXIDASE DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS E SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS AO POTENCIAL HIDRICO -0,3 MPa.....	132
FIGURA 13 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS E SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS AO POTENCIAL HIDRICO -0,3 MPa.....	133

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS E PARÂMETROS DA PCR.....	60
TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA (PB) E NITROGÊNIO TOTAL (NT) EM PLANTAS DE DIFERENTES ESPÉCIES FORRAGEIRAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.....	68
TABELA 3 - CONTAGEM MICROBIANA DE BACTÉRIA ADERIDAS EPI E ENDOFITICAMENTE A RAÍZES DE AVEIA <i>IN VITRO</i> INOCULADAS COM DIFERENTES BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	73

### CAPITULO II

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DE POLIETILENOGLICOL (PEG 6000) USADAS NA AVALIAÇÃO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA EM PLÂNTULAS DE FORRAGEIRAS.....	85
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE PLANTAS FORRAGEIRAS SUBMETIDAS <i>IN VITRO</i> A DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.....	88
TABELA 3 - BIOMASSA DE PLANTAS FORRAGEIRAS SUBMETIDAS <i>IN VITRO</i> A DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.....	91
TABELA 4 - CONTAGEM ESTOMÁTICA DE PLANTAS FORRAGEIRAS SUBMETIDAS <i>IN VITRO</i> À DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.....	92

### CAPITULO III

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS E PARÂMETROS DA PCR.....	114
TABELA 2 - NÚMERO DE ESTÔMATOS PRESENTES EM PLANTAS DE BRACHIARIA SUBMETIDAS <i>IN VITRO</i> À INOCULAÇÃO COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE ESTRESSE OSMÓTICO.....	117
TABELA 3 - CONTAGEM MICROBIANA EPI E ENDOFITICAMENTE ADERIDA ÀS RAÍZES DE BRACHIARIA SUBMETIDAS <i>IN VITRO</i> À ESTRESSE OSMÓTICO E INOCULAÇÃO COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - Percentagem

μl - Microlitro

μm<sup>2</sup> – Micrometros quadrados

μmol – Micromolar

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – Oxigênio Singleto

ADAPAR - Agência de Defesa Agropecuária do Paraná

ANPII - Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes

ANOVA - Análise de variância

APX - *Ascosbato* peroxidase

ATPase - Adenosinatrifosfatases

B.O.D - Demanda Bioquímica de Oxigênio

BPCV - *Bactérias* promotoras de crescimento vegetal

CAT – Catalase

Cl - Cloro

cm – Centímetros

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

Cu - Cobre

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTT - Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ENDO – Endofítica

EPI – Epifítica

EROs - *Espécies* reativas do oxigênio

Fe - Ferro

g - Grama

G - Giros

GSH - Glutathiona

GST - *Glutathiona* transferases

h – Hora

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio

HCl - Ácido clorídrico

HgCl<sub>2</sub> - Cloreto de mercúrio

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IEM – Índice de estabilidade de membrana

IPCC - Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas

JNFB - Johanna Dobereiner (Novo Fabio Pedrosa)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato monopotássico

l - Litro

LABIOGEN – Laboratório de bioquímica e genética

LGD – (Lipman) Campêlo & Dobereiner

M - Molar

MF – Massa fresca

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio

min – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

mm<sup>2</sup> – Milímetro quadrado

MPa - Mega Pascal

MS – Massa seca

N - Número

N<sub>2</sub> – Nitrogênio

NaCl - Cloreto de Sódio

NaOCl - Hipoclorito de sódio

NFb - Novo Fabio Pedrosa

nm – Nanômetros

NO<sub>3</sub> - Nitrato

NT – Nitrogênio total

O<sub>2</sub> - Oxigênio

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Superóxidos

°C - Graus celsius

OH• - Hidroxila

PB – Proteína bruta

pb – Pares de base  
PCR - Reação em cadeia pela Polimerase  
PEG – Polietilenoglicol  
pH - Potencial hidrogeniônico  
PM – Peso molecular  
PMSF - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
PR – Paraná  
PVP - Polivinilpirrolidona  
rDNA - Ribosomal DNA  
RNA - Ácido ribonucleico  
rpm - Revoluções por Minuto  
RS – Rio Grande do Sul  
s - Segundo  
SOD - Superóxido dismutase  
Taq – DNA polimerase termoestável  
TBE - Tris/Borato/EDTA  
TRA - Teor relativo de água  
UFC – Unidade formadora de colônia  
UFPR – Universidade Federal do Paraná  
Zn – Zinco  
 $\psi_w$  - Potencial hídrico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1	ESPÉCIES FORRAGEIRAS .....	21
2.1.1	AVEIA ( <i>Avena sativa</i> ).....	23
2.1.2	BRACHIARIA ( <i>Urochloa ruziziensis</i> ) .....	24
2.1.3	MILHETO ( <i>Pennisetum glaucum</i> ).....	24
2.2	FERTILIZANTE MINERAL, BIOFERTILIZANTE E INOCULANTE .....	25
2.3	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV) 28	
2.3.1	<i>Azospirillum brasilense</i> .....	31
2.3.2	<i>Ensifer adhaerens</i> .....	32
2.3.3	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	32
2.3.4	<i>Leclercia adecarboxylata</i> .....	33
2.4	ESTRESSE HÍDRICO E OSMÓTICO .....	33
2.5	MECANISMOS DE DEFESA AO ESTRESSE HÍDRICO .....	36
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	51
3.1	OBJETIVO GERAL.....	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	51
	<b>CAPÍTULO 1: PERFIL ASSOCIATIVO DE BACTÉRIAS</b>	
	<b>PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL COM DIFERENTES</b>	
	<b>ESPÉCIES FORRAGEIRAS</b> .....	52
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	54
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
2.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO E ESPÉCIES SELECIONADAS .....	56
2.2	OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS.....	56
2.3	ISOLADOS E PREPARO DO INÓCULO.....	57
2.4	INOCULAÇÃO DAS PLÂNTULAS.....	57
2.5	ANÁLISES MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS.....	58
2.5.1	DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO, MASSA FRESCA E MASSA SECA.....	58
2.5.2	DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL (NT) E PROTEINA BRUTA (PB).....	58
2.5.3	CONTAGEM MICROBIANA .....	59

2.5.4	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS INOCULADAS.....	59
2.5.5	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE RAÍZES.....	60
2.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	61
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
3.1	DETERMINAÇÃO DOS ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS .....	62
3.2	MASSA SECA E FRESCA DAS PLÂNTULAS INOCULADAS .....	65
3.3	PROTEÍNA BRUTA (PB) E NITROGÊNIO TOTAL (NT) .....	68
3.4	AVALIAÇÃO DA ÁREA RADICULAR.....	69
3.5	CONTAGEM MICROBIANA .....	72
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>76</b>
	<b>CAPÍTULO 2: ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA SIMULAÇÃO DE ESTRESSE OSMÓTICO EM PLANTAS FORRAGEIRAS..</b>	<b>80</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>82</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>84</b>
2.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO E ESPÉCIES SELECIONADAS .....	84
2.2	OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS.....	84
2.3	ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POLIETILENOGLICOL (PEG 6000) COMO AGENTE ESTRESSANTE .....	85
2.4	ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	85
2.4.1	DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO, MASSA FRESCA E MASSA SECA.....	85
2.4.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ESTÔMATOS .....	86
2.4.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE RAÍZES.....	86
2.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	86
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>87</b>
3.1	DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL SOB ESTRESSE OSMÓTICO.....	87
3.2	BIOMASSA SECA E FRESCA .....	89
3.3	MORFOLOGIA ESTOMÁTICA.....	91
3.4	ÁREA RADICULAR .....	94
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>98</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>99</b>
	<b>CAPITULO 3: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM <i>UROCHLOA RUZIZIENSIS</i> SUBMETIDA AO ESTRESSE OSMÓTICO .....</b>	<b>103</b>

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	105
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	107
2.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO E ESPÉCIE SELECIONADA	107
2.2	OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS	107
2.3	ISOLADOS E PREPARO DO INÓCULO	108
2.4	INOCULAÇÃO DAS PLÂNTULAS	108
2.5	ANÁLISES MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	109
2.5.1	AVALIAÇÃO DO TEOR RELATIVO DE ÁGUA (TRA)	109
2.5.2	ÍNDICE DE ESTABILIDADE DE MEMBRANA (IEM)	109
2.5.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ESTÔMATOS	110
2.5.4	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE RAÍZES	110
2.5.5	ENSAIOS ENZIMÁTICOS	110
2.5.6	DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO, MASSA FRESCA E MASSA SECA	112
2.5.7	CONTAGEM MICROBIANA	112
2.5.8	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS INOCULADAS	113
2.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	114
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	115
3.1	TEOR RELATIVO DE ÁGUA (TRA) E ÍNDICE DE ESTABILIDADE DE MEMBRANA (IEM)	115
3.2	MORFOLOGIA ESTOMÁTICA	117
3.3	DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL	119
3.4	MASSA SECA E MASSA FRESCA	122
3.5	CONTAGEM MICROBIANA	124
3.6	ÁREA RADICULAR	126
3.7	ANÁLISE ENZIMÁTICA	128
3.7.1	SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	129
3.7.2	CATALASE (CAT)	130
3.7.3	ASCORBATO PEROXIDASE (APX)	131
3.7.4	GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)	132
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	134
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	135
	<b>REFERÊNCIAS</b>	136

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A maior parte da alimentação humana provém de gramíneas, que inclui as principais culturas de cereais bem como gramíneas forrageiras. A família Poaceae compreende mais de 600 gêneros com mais de 10.000 espécies que dominam muitos sistemas agrícolas e ecológicos (KELLER; FEUILLET, 2000).

Em toda extensão territorial brasileira, a formação vegetal que mais se destaca é a de plantas forrageiras por apresentarem grande capacidade de adaptação e sobrevivência em situações climáticas extremas (VALLE; JANK; RESENDE; 2009).

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial e é o maior exportador comercial do mundo e uma característica importante da pecuária brasileira é ter a maior parte de seu rebanho criado a pasto (FERRAZ; FELÍCIO, 2010)

Nos últimos anos, pressões ambientais e de mercado, além do aumento na disponibilidade de tecnologia têm incentivado uma mudança de atitude no setor produtivo de carne e leite do País, produzir maior quantidade de carne ou de leite em menores áreas de pastagem, ou seja, ser mais eficiente vem se tornado uma necessidade de sobrevivência para a pecuária nacional (MARTHA et al., 2012).

Períodos de estiagem ou estação seca são fenômenos frequentes no Brasil, com intensidade e efeitos variáveis ao longo do tempo (MENESES et al., 2006). O Paraná se encontra em uma região de transição climática com acentuada variabilidade na precipitação e temperatura. A ocorrência de períodos secos durante o ano é frequente e constitui um importante fator de quebra de safras agrícolas (IAPAR, 2017).

Sistemas extensivos utilizando plantas forrageiras para a produção de bovinos ainda são muito utilizados. Neste sistema geralmente os solos estão sujeitos à degradação pela falta de adubação e manejo adequado, o que justificam os baixos níveis zootécnicos, e a baixa produtividade (MACEDO, 2013).

Como solução à baixa produtividade, vêm sendo utilizados fertilizantes nitrogenados, capazes de melhorar o desenvolvimento e produtividade da planta. Em contrapartida, são responsáveis por elevar o custo de produção e gerar danos ambientais, pois nem todo o fertilizante é absorvido pela planta, sendo sua eficiência da utilização de aproximadamente 50% (VORPAGEL, 2012).

Plantas e microrganismos interagem naturalmente no solo formando uma estreita e complexa rede de comunicação que envolve desde sinais bioquímicos a

moleculares que podem ser alterados conforme o tipo de associação (AMARAL, 2014). As bactérias endofíticas tem papel importante na promoção do crescimento vegetal e na proteção contra os estresses abióticos e bióticos. Estas bactérias têm sido usadas com sucesso na forma de inoculantes em vários países com a capacidade de reduzir a necessidade de adubação química (CHATURVEDI et al., 2016).

Vários carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos bem como outros compostos que fornecem uma fonte de nutrientes para as bactérias associativas, são liberados na rizosfera como exsudato. Estas bactérias são conhecidas por serem quimicamente atraídas e movimentam-se pelo exsudato da planta, que permite a colonização e multiplicação, tanto na rizosfera quanto no rizoplane (COMPANT; CLEMENT; SESSITCH, 2010). Porém, estudos com o intuito de averiguar o efeito de estirpes bacterianas em gramíneas forrageiras são escassos e importantes para a melhoria dos índices zootécnicos principalmente sob condições de restrição de água. Para isto, a determinação de plantas e estirpes modelo, com alta performance associativa, além de estudos à campo são importantes para a recomendação de estirpes como biofertilizantes (GLICK, 2012; NEIVERTH et al., 2014).

As plantas que são continuamente submetidas a estresse têm a capacidade de modular respostas de defesa para superar tais mudanças, e voltar ao seu metabolismo normal (SOARES; MACHADO, 2007). Estes mecanismos de defesa podem ser enzimáticos e não enzimáticos, e agem para neutralizar a citotoxicidade das espécies reativas de oxigênio (EROs), e são conhecidos como antioxidantes. As enzimas antioxidantes podem evitar a formação de radicais livres, sequestrá-los ou promover sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas (SERKEDJIEVA, 2011). Estudar as flutuações nos níveis destas enzimas podem apontar marcadores para a compreensão do efeito da inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) nas espécies vegetais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESPÉCIES FORRAGEIRAS

As espécies de forrageiras são popularmente conhecidas como pastagens, sendo classificadas de acordo com o período de desenvolvimento (inverno e verão), ciclo de vida (anual ou perene), e família botânica (gramíneas e leguminosas) (QUINCOZES et. al., 2007).

Estas plantas são amplamente utilizadas como fonte de alimento de grande importância para o desenvolvimento e reprodução de animais ruminantes, como bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos. Esse alimento pode ser disponibilizado por meio do simples plantio da forrageira como ocorre em um pasto ou a planta pode ser produzida e posteriormente colhida para só então servirem de alimentos aos animais (VALLE; JANK; RESENDE, 2009).

As forragens que se destacam pela facilidade de manejo e por incrementar aumentos na atividade agropecuária são: Alfafa (*Medicago sativa*); Amendoim-forrageiro (*Arachis pintoi*); Aveia (*Avena strigosa* e *Avena sativa*); Azevém (*Lolium multiflorum*); Brachiaria (*Urochloa sp.*); Capim-elefante (*Pennisetum purpureum*); Capim-lanudo (*Holcus lanatus*); Capim-nilo (*Acroceras macrum*); Capim-sudão (*Sorghum sudanense*); Cornichão (*Lotus corniculatus*); Feijão-miúdo (*Vigna sinensis*); Gramas bermuda e estrela (*Cynodon dactylon* e *Cynodon niemfuensis*); Hemátria (*Hemarthria altissima*); Milheto (*Pennisetum glaucum*); Sorgo forrageiro (*Sorghum bicolor*); Trevos (*Trifolium sp.*) (VALLE; JANK; RESENDE, 2009; MACHADO et al; 2010).

As pastagens têm extrema importância para a agricultura e meio ambiente desempenhando papéis essenciais no melhoramento e conservação dos solos, no incremento da infiltração, drenagem e disponibilidade de água, e sobretudo, na proteção do solo contra a erosão (MONTEIRO et al., 2014). As plantas forrageiras apresentam grande capacidade de adaptação e sobrevivência em situações climáticas extremas (VALLE; JANK; RESENDE, 2009).

De acordo com o último Censo Agropecuário Brasileiro (2006), as pastagens, tanto naturais quanto plantadas, ocupam 172,3 milhões de hectares do território nacional e 2,8 milhões de hectares pertencentes ao Estado do Paraná (IBGE, 2006).

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial e é o maior exportador comercial de carne bovina do mundo. Esta posição se deve ao menor custo de produção, onde a maioria dos animais vivem em regime extensivo, utilizando pastagens plantadas ou naturais. Por outro lado, em países como os Estados Unidos e vários países europeus, a carne é produzida quase exclusivamente a partir de sistema de confinamento com altos custos de mão de obra, equipamentos, maquinários e combustível (DIAS FILHO, 2014; GERON et al., 2015).

Nos últimos anos, a maior disponibilidade tecnológica junto a pressões ambientais e mercado consumidores mais exigentes, têm incentivado mudanças no setor produtivo nacional, com um aumento no refinamento ou intensificação da produção, marcada pela maior eficiência produtiva em menor área e menor custo de produção (MARTHA et al., 2012).

A degradação das pastagens é definida como um processo de perda de vigor, produtividade e capacidade de recuperação, ficando assim susceptíveis a pragas, doenças, surgimento de plantas invasoras, compactação e erosão do solo (MACEDO et al., 2000). As condições favoráveis de clima, solo e relevos ao longo do tempo promoveram a despreocupação de pecuaristas quanto ao manejo do solo, no entanto, intempéries climáticas, como a seca prolongada, mudaram este quadro, onde a falta de manejo, ou o manejo inadequado dos sistemas pastoris tem ocasionado degradação do solo, bem como das pastagens (COSTA, 2000; SOUZA et al., 2012).

Segundo Ministério da Agricultura (2014), o Brasil apresenta aproximadamente 30 milhões de hectares de pastagens em algum estágio de degradação ocasionado pelo seu manejo, onde as principais causas de degradação das pastagens são o excesso de lotação e a falta de reposição de nutrientes (MACEDO et al., 2013). Estudos mostram que entre 50% a 70% das pastagens apresentam algum grau de degradação. Esta ocorre principalmente por falhas no estabelecimento das pastagens, como o preparo inadequado da área, semeadura em época imprópria ou o pastejo realizado prematuramente ou tardiamente (DIAS FILHO, 2015).

Entre as alternativas para recuperação das pastagens, destaca-se o uso de adubação nitrogenada, uma das práticas de maior importância e dificuldade de manejo, uma vez que a deficiência de nitrogênio vem sendo uma das principais causas na degradação de pastagens cultivadas (SOARES FILHO et al., 1992).

As espécies forrageiras diferem em relação às exigências nutricionais: existem as que são pouco exigentes, adaptadas a solos de baixa fertilidade, até espécies muito exigentes, que podem ser cultivadas em solos de fertilidade elevada (MACEDO et al., 2000). A fertilidade do solo pode ser alterada através da utilização de calagem e adubação, pode ser utilizada a irrigação para suprir o déficit hídrico, porém, é um processo de custo elevado e nem sempre eficiente, pois depende da forrageira responder positivamente as outras condições ambientais, principalmente a temperatura (MACEDO et al., 2013).

### 2.1.1 AVEIA (*Avena sativa*)

O gênero *Avena* tem como origem a Ásia antiga encontrada como planta invasora nas culturas do trigo e da cevada (ALLARD, 1971). A aveia branca (*Avena sativa* L.) pertence à família Poaceae e gênero *Avena* (TAVARES; ZANETTINI; CARVALHO, 1993). É uma planta de clima temperado, considerada uma cultura de inverno, pela sua capacidade de suportar baixas temperaturas (MORI; FONTANELI; SANTOS, 2012).

A aveia pode ser utilizada para alimentação humana em forma de grãos e animal como forragem verde, feno e silagem, pois apresenta uma grande quantidade de aminoácidos, vitaminas, minerais e carboidratos de alta qualidade (VELLOSO; FEDERIZZI, 2013). Possui importância para a exploração agrícola no período de estação fria do ano, principalmente sendo utilizada como cultura benéfica no sistema de rotação de culturas (TUNES et al., 2008).

O Brasil, no ano de 2014, produziu 0,38 milhões de toneladas de aveia (EMBRAPA, 2014). Para o ano de 2015 a Companhia Nacional de Abastecimento previu um aumento de 23,8% na produção de aveia brasileira, onde esta cultura ocupou a segunda maior área plantada entre as culturas de inverno, ficando atrás apenas do trigo (CONAB, 2015).

A aveia branca vem mostrando uma ótima opção para o sistema produtivo baseado em pastagens, principalmente na região Sul do Brasil. Ela pode ser cultivada de forma isolada ou consorciada. São plantas com alta produção de massa seca de excelente qualidade, e resistente ao pisoteio, o que garante ao produtor eficiência e baixo custo no sistema de produção (MACARI et al., 2006).

### 2.1.2 BRACHIARIA (*Urochloa ruzizensis*)

O gênero *Urochloa* pertencente à família Poaceae, teve sua origem no leste da África, nas savanas africanas e apresenta aproximadamente 100 espécies descritas como de regiões tropicais e subtropicais (KARIA, DUARTE; ARAÚJO, 2006).

Na década de 1950, plantas do gênero *Urochloa* (*Syn. Brachiaria*) foram introduzidas no Brasil como forrageiras, no entanto, sua expansão ocorreu nas décadas de 1970 e 1980, pela implantação de novas áreas e substituição de espécies de outros gêneros, principalmente em regiões com o clima mais quente (ZIMMER et al., 1994).

A *Urochloa ruzizensis* é uma espécie perene, sub-ereta, com folhas macias e bastante palatáveis, apresentando boa qualidade nutricional e capacidade para suportar o pastejo. Possui boa capacidade de adaptação à altitudes (desde o nível do mar a 18.000 m), é tolerante ao sombreamento, apresentando boa cobertura do solo, porém, é pouco tolerante à seca, à solos encharcados e à queimadas, exigindo solos mais férteis do que as demais espécies de *Urochloa* (MACHADO et al; 2010).

O gênero *Urochloa* tem grande importância na economia de vários países, pela sua capacidade de crescer em solo infértil e com acidez elevada e mesmo assim produzir forragem de alta qualidade nutritiva para ruminantes (HOLMANN et al., 2004).

No Brasil, a brachiaria provocou uma revolução na produtividade de pastagens e atividade pecuária, onde nos últimos anos, esta espécie se tornou um dos principais componentes das pastagens semeadas, com a maior área plantada, portanto, é a forrageira mais importante para o agronegócio brasileiro (BARCELLOS et al., 2008).

### 2.1.3 MILHETO (*Pennisetum glaucum*)

O milheto (*Pennisetum glaucum*) é originário do norte da África Ocidental, pertence à família Poaceae, gênero *Pennisetum* (BRUNKEN, 1997). É uma forrageira de clima tropical, anual, com hábito ereto e porte alto. Apresenta ótimo valor nutritivo, boa palatabilidade e digestibilidade em pastejo (KICHEL; MIRANDA, 2000). Possui grande adaptação as condições climáticas, principalmente da região Sul do Brasil, com a capacidade de produzir grande quantidade de forragem de alta qualidade em

um curto espaço de tempo, garantindo ganhos a produção animal, como a engorda de bovinos e ovinos, e a alimentação de vacas leiteiras (JORNADA, 2002).

O milheto é uma forragem com boa adaptação à diversos tipos de solo, inclusive em solos de baixa fertilidade e déficit hídrico, entretanto, seu plantio é recomendado em solos de média a boa fertilidade para uma ótima produtividade (KICHEL; MIRANDA, 2000).

Esta forragem vem se destacando principalmente no Cerrado brasileiro, onde há indicações de sua semeadura consorciada com forrageiras tropicais perenes, como as brachiarias, visando a implementação, renovação e recuperação de pastagens (COSTA, 2016). Na região Sul do Brasil, o milheto tem grande importância, destacando-se como a espécie mais importante de gramínea anual de verão (JORNADA, 2002).

## 2.2 FERTILIZANTE MINERAL, BIOFERTILIZANTE E INOCULANTE

Fertilizante mineral é um produto de natureza fundamentalmente mineral, natural ou sintético, que é obtido por processo físico, químico ou físico-químico, fornecendo um ou mais nutrientes para as plantas (ADAPAR, 2014).

O uso destes fertilizantes minerais para aumentar a produtividade de culturas tem se tornado uma prática onerosa, já que os custos destes produtos estão cada vez mais elevados (SANTOS et al., 2013; FRAZÃO et al., 2014). Além do custo, fertilizantes minerais podem causar diversos prejuízos ao meio ambiente, devido à alta demanda energética pelo gasto de combustíveis fósseis durante a sua fabricação e por não ser reciclável com o esgotamento das jazidas naturais (AIRES, 2013).

Inoculantes e biofertilizantes são descritos como termos sinônimos na literatura definindo-os como qualquer produto formulado contendo um ou mais microrganismos e que aumenta o status nutricional (crescimento e produtividade) das plantas pela reposição dos nutrientes do solo ou pela provisão de uma maior disponibilidade de nutrientes para as plantas (BASHAN, 2014; MALUSÁ e VASSILEV, 2014; CALLAGHAN, 2016;).

Os biofertilizantes são constituídos de todos os tipos de resíduos agrícolas, como a palhada, compostagem, esterco animal, cama de aviário, entre outros. Porém, segundo a legislação brasileira vigente Lei nº 6.984 de 1980, regulamentada pelo Decreto nº 4.954 de 2004, inoculante é classificado como um produto que contenha

microrganismos com atuação favorável ao crescimento de plantas, onde este deve ser livre de contaminantes, e ausente de qualquer microrganismo que não seja o especificado (ADAPAR, 2014).

As BPCV são a base da formulação de inoculantes que, por não serem fitopatogênicas, podem ser utilizadas para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita (MARIANO et al., 2004).

Os primeiros inoculantes comerciais surgiram em 1896 usando culturas de *Rhizobium*, comercializados em meio gelatinoso, em solo esterilizado, células secas de *Rhizobium* em algodão ou eram em forma líquida (SMITH, 1998).

No Brasil, os inoculantes comercializados são turfosos ou líquidos, onde a inoculação nas sementes deve ser feita à sombra e a semeadura deve ser realizada no mesmo dia, mantendo as sementes inoculadas protegidas do sol e calor excessivo. O inoculante deve ser distribuído de forma uniforme na superfície da semente, para obter benefício máximo das BPCV em todas as plantas (XAVIER; RUMJANEK; GUEDES, 2011).

Para a liberação de uma formulação de inoculante são necessários estudos laboratoriais para o levantamento, isolamento e seleção de estirpes efetivas na promoção de crescimento vegetal e competitivas com a microbiota residente no solo. Após, são realizados estudos em condições controladas e em casas de vegetação, seguido de estudos à campo para a determinação da sua eficácia. Estes testes devem ser realizados em pelo menos dois ecossistemas de importância para a cultura a ser aplicada, e em duas safras agrícolas (XAVIER; RUMJANEK; GUEDES, 2011).

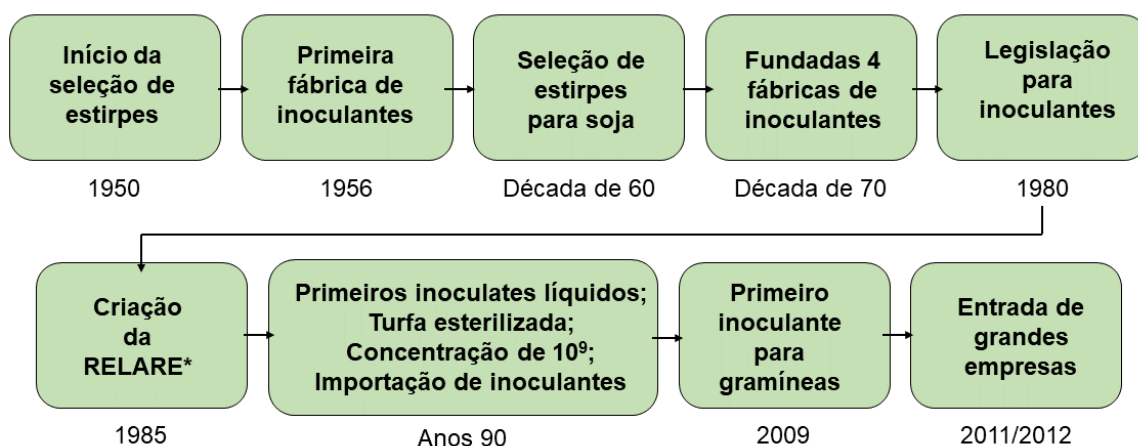
Para a comercialização, os inoculantes devem apresentar algumas características como: serem fáceis de usar; serem compatíveis com os equipamentos agrícolas; apresentarem tolerância a um grande período de estocagem; mostrarem possibilidade de uso em diferentes condições de solo e campo; terem habilidade de promover sobrevivência às BPCV à medida que a planta cresce; conferir reprodutibilidade de resultados a campo e apresentarem segurança ambiental e alimentar (BASHAN et al., 2014). Para garantir sua efetividade, o inoculante deve superar duas grandes barreiras, a perda de viabilidade durante a estocagem na propriedade rural e a manutenção da viabilidade celular em condições variáveis de

temperatura entre -5 a 30°C, desde a fabricação, até seu uso na lavoura (BASHAN; HOLGUIN et al., 1997).

Levando em consideração os mecanismos que as BPCV apresentam, elas podem ser utilizadas com alto potencial na formulação de inoculantes, pois a capacidade destes microrganismos em fixar nitrogênio atmosférico, e de solubilizar nutrientes no solo, são características promissoras, possibilitando uma redução de aproximadamente 50% na aplicação de fertilizantes químicos, sem gerar perdas na produtividade (MIRANSARE, 2011). A era da agricultura sustentável incentiva a indústria a desenvolver produtos que associem fertilizantes minerais ou orgânicos com microrganismos (SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013).

No Brasil, os primeiros estudos com inoculantes foram realizados no Instituto Agrônomo de Campinas, no entanto seu maior enfoque foi Rio Grande do Sul, com uma primeira seleção de estirpes de *Rhizobium* para uso em leguminosas de clima temperado. A primeira fábrica de inoculantes do Brasil foi fundada em 1956, na cidade de Pelotas – RS. Como este insumo se mostrou altamente eficaz para a cultura da soja, na década de 70 surgiram novas fábricas no país. Hoje 90% do mercado de inoculantes é voltado para a cultura da soja (FIGURA 1) (ARAÚJO, 2016).

FIGURA 1 - LINHA DO TEMPO DA TRAJETÓRIA DA PRODUÇÃO DE INOCULANTES NO BRASIL.



FONTE: Adaptado de Araújo (2016).

\*Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola.

Os produtores de soja foram os que mais adquiriram inoculantes em 2016, sendo 35 milhões de doses de inoculante líquido e 11 milhões de inoculante turfoso destinadas à cultura. As vendas para gramíneas também se destacaram em 2016, onde 4,5 milhões de doses foram comercializadas (AMPII, 2017).

Em 2009, foi lançado o primeiro inoculante para gramíneas, que surgiu após cinco anos de pesquisas realizadas pela Embrapa Soja, de Londrina-PR em conjunto com a Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foram selecionadas seis estirpes da bactéria *Azospirillum brasilense*, capazes de melhorar o desenvolvimento radicular da planta e, conseqüentemente, potencializar a fixação biológica do nitrogênio (ZANHOLO; MOITINHO; COSTA, 2010).

O cultivo de diversas gramíneas, incluindo culturas de grãos como o milho e pastagens com as braquiárias, vem expandindo pelo país, e a nutrição adequada das plantas é essencial para atingir bons rendimentos. Existem algumas bactérias denominadas *Azospirillum* que conseguem promover o crescimento de plantas, auxiliando o agricultor a produzir com menor custo e menor impacto ambiental (HUNGRIA; NOGUEIRA 2017).

Existem inoculantes comerciais para gramíneas em todo o mundo, no entanto, a maioria destes produtos tem como base de sua composição bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum spp.* (MOREIRA et al., 2010).

### 2.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)

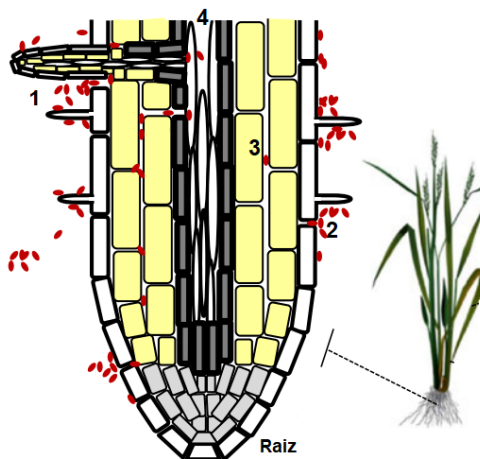
Os microrganismos compõem uma enorme diversidade genética entre os seres vivos, porém esta diversidade ainda é pouco explorada (PROSSER et al., 2007). A árvore filogenética considerada para estes organismos é representada por três domínios, as Archaea, Bactéria e Eucarya (WOESE, 1994). As bactérias podem ser encontradas em praticamente todos os ambientes terrestres, onde representam a maior biomassa viva do planeta e são responsáveis por muitos processos essenciais a vida, fazendo das bactérias uma potencial fonte de bioprodutos (RODRIGUEZ; VALERA, 2004).

O solo apresenta uma microbiota com um grande número de microrganismos, que são responsáveis por desencadear reações bioquímicas que decompõem a matéria orgânica do solo fornecendo à planta, nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento (SANON et al., 2009). Montesinos (2003) estimou baseado em métodos moleculares que existem mais de 4000 espécies de microrganismos por grama de solo. Desta forma, podem estar presentes na rizosfera diferentes grupos de organismos: bactérias, fungos, algas, protozoários e nematoides (HINSINGER et al., 2009).

A absorção dos nutrientes pelas plantas é regulada pelo crescimento radicular e pela interação com fatores bióticos e abióticos, aliados às propriedades químicas, físicas e biológicas da rizosfera (HINSINGER et al., 2009).

As raízes são a principal porta de entrada para estas bactérias, onde estas conseguem penetrar em locais danificados naturalmente pelo próprio crescimento da planta, e também pelas aberturas que existem nas junções entre as raízes primárias, secundárias e laterais. Além disso, as bactérias produzem enzimas como as celulases e pectinases que são capazes de degradar a parede celular da planta hospedeira (SALA et al., 2005), pelo fato da lamela média, que conecta as células vegetais entre si, ser rica em pectina e celulose (FIGURA 2) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

FIGURA 2 - MODO DE COLONIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFITICAS EM GRAMÍNEAS.



FONTE: Adaptado de Monteiro et al. (2012).

As bactérias (pontos vermelhos) iniciam a colonização pela superfície da raiz, principalmente, (1) colonização nos pontos de emergência de raízes laterais, (2) ocupação nos espaços intercelulares radiculares, (3) colonização de aerênquima, (4) colonização de xilema.

Estas bactérias também podem ser classificadas, de acordo com a forma como se posicionam na planta: as epifíticas são encontradas na superfície da raiz e no solo, e as endofíticas, aquelas bactérias encontradas inter e intra celularmente no córtex radicular (GRAY; SMITH, 2005). Porém, esta classificação é estabelecida para fins didáticos, porque as populações bacterianas oscilam entre a colonização epifítica, endofítica ou ambas, dificultando assim uma definição (HALLMANN et al., 1997).

Estas bactérias podem auxiliar o desenvolvimento de culturas vegetais através da promoção de crescimento ou com outros mecanismos (AHMAD F.; AHMAD I.; KHAN, 2008). Podem ainda estimular o desenvolvimento de raízes principais e raízes laterais e em alguns casos aumento da biomassa de raiz e folha (CRUZ et al.,

2001; PEDRAZA et al., 2009). A promoção de crescimento direta se dá pela disponibilização de nutrientes, que ocorre pela fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e outros nutrientes, e o fornecimento de reguladores do crescimento vegetal, como ácido indol acético, giberelinas, citocininas, etileno e aminoácidos. Estes reguladores promovem principalmente o crescimento de raiz central e lateral, aumentando a superfície de absorção, e como consequência, aumentam a absorção de água e nutrientes pelas raízes (BODDEY; DÖBEREINER, 1995; GONZALEZ LOPEZ et al., 2005; GOVINDARAJAN et al., 2006). Já a promoção de crescimento indireta, ocorre através do biocontrole de patógenos pela resistência sistêmica, além de mecanismos envolvidos em respostas a estresses abióticos como, a seca, salinidade, temperaturas extremas, entre outros (BASHAN, 2005; DIMKPA et al., 2009).

Algumas espécies de BPCV apresentam a capacidade de fixação biológica de nitrogênio sendo o nitrogênio atmosférico não assimilável pelas plantas. O papel destes microrganismos é converter o nitrogênio ( $N_2$ ) em amônia, forma em que as plantas conseguem absorver (BISWAS; GRESSHOFF, 2014). A maior fixação biológica de nitrogênio garante a diminuição do uso de fertilizantes químicos nitrogenados, assim, reduzindo danos ambientais e aumentando a renda de agricultores (BARBOSA; PERIN; REIS, 2006).

Diversas espécies de BPCV vem sendo estudadas para a produção e formulação de inoculantes, que possam auxiliar no crescimento da planta e no biocontrole (QUECINE; BATISTA; LACAVALA, 2014). Entre as estirpes que se destacam estão as pertencentes aos gêneros: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derrxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* e *Zoogloea* (BABALOLA, 2010).

Os benefícios destas bactérias para as plantas, podem ser observadas tanto em cultivos *in vitro* quanto em solo (MARIANO et al., 2004). A maioria das bactérias consideradas promotoras de crescimento vegetal são diazotróficas, e são capazes de estabelecer associações com diferentes plantas, inclusive em gramíneas (HUREK, 2002). Estima-se que aproximadamente de 7 a 15% da superfície das raízes são ocupados por células microbianas (GRAY; SIMTH, 2005).

Em culturas forrageiras, as bactérias contribuem significativamente para o desenvolvimento de plantas e características como massa seca, número de panículas e teores de nitrogênio, contribuindo para a maior produção da forrageira (VOGEL; MARTINKOSKI; RUZICKI, 2014). O efeito benéfico da inoculação destas bactérias em pastagens, pode afetar diretamente a qualidade da forragem, onde apresentam uma emissão contínua de folhas e perfilhos, característica importante na restauração de área folhar sob condição de pastejo ou corte (BIRCHAM; HODGSON, 1983).

### 2.3.1 *Azospirillum brasilense*

As bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* estão situados na subdivisão proteobactéria, na qual se encontram a maioria das bactérias gram-negativas, 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).

Estas bactérias podem promover crescimento vegetal através da associação benéfica com plantas (ARZANESH et al., 2011). Outras espécies deste gênero já foram citadas como promotoras de crescimento de plantas como *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. halopraeferens* e *A. irakense* (BHARDWAJ et al., 2014). Estima-se que cerca de 30 a 90% das amostras de solo coletadas no planeta contenham *Azospirillum brasilense* (KEFALOGIANNI; AGGELIS, 2002).

Entre as bactérias diazotróficas já encontradas, a *Azospirillum brasilense* ganha destaque, pois quando inoculada em sementes de gramíneas, como o milho apresenta efeito positivo no estabelecimento da planta assim, tem a capacidade de aumentar a produtividade de grãos (BRACCINI et al., 2012).

*A. brasilense* vem sendo conhecida como o *Rhizobium* das gramíneas, devido ao fato de sua habilidade na fixação biológica de nitrogênio atmosférico e promoção do desenvolvimento radicular e da parte aérea, conseqüentemente auxiliando no desenvolvimento de gramíneas (SANTOS; RIGOBELLO, 2016).

No Brasil, já existem inoculantes comercializados contendo a bactéria *A. brasilense*, pois esta pode gerar diversos estímulos para o crescimento de plantas, destacando-se a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfato, a produção

de hormônios vegetais, como as auxinas, giberilinas, citocininas, maior desenvolvimento radicular, aumento nos teores de clorofila e condutância estomática (CAVALLET et al., 2000; HUNGRIA, 2011, FUKAMI et al., 2016; KAZI et al., 2016).

### 2.3.2 *Ensifer adhaerens*

Bactérias do gênero *Ensifer*, são proteobactérias encontradas na forma de bastonetes, gram-negativas e são bactérias de solo, simbióticas, geradoras de nitrogênio que formam nódulos de raízes em várias leguminosas (WANG et al, 2002). Também são conhecidas como *Ensifer/Sinorhizobium adhaerens* e podem ser encontradas ligadas a outras bactérias, causando a lise destas (ROGEL et al, 2001).

Várias espécies da família Leguminosae são capazes de estabelecer associações simbióticas com uma variedade de diazotróficos, exemplos são as bactérias pertencentes aos gêneros *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (agora *Ensifer*) (BARCELLOS et al., 2007).

Inoculantes à base de bactérias do gênero *Ensifer*, são comercializados para plantas leguminosas, e utilizados principalmente na cultura da soja (BRANDÃO JUNIOR e HUNGRIA, 2000).

### 2.3.3 *Herbaspirillum seropedicae*

Apesar dos microrganismos pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* serem conhecidas como bactérias associadas às plantas, a maioria das espécies pertencentes a este gênero não são encontradas em associação com plantas e sim em ambientes aquáticos, em solos, solos poluídos ou até em pulmões de pacientes com fibrose cística (MONTEIRO et al., 2012).

A bactéria *H. seropedicae*, é uma proteobactéria gram-negativa encontrada endofiticamente em plantas, em uma associação simbiótica com diversas culturas de importância da família Poaceae, como milho, arroz, sorgo, trigo e cana de açúcar (BALSANELLI et al., 2010). Esta bactéria pode estimular o crescimento de plantas através da produção e secreção de fitormônios, proteção da planta hospedeira contra microrganismos patogênicos, ou pela capacidade de fixação biológica de nitrogênio (PEDROSA et al., 2011).

Inoculantes a base de *H. seropedicae*, são comercializados e indicados para culturas de gramíneas (REIS et al., 2009).

#### 2.3.4 *Leclercia adecarboxylata*

A bactéria *Leclercia adecarboxylata* é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, anteriormente denominada ou conhecida como *Escherichia adecarboxylata* (TAMURA et al., 1986).

Comumente encontradas em ambiente aquático, são gram-negativas, encontrada na forma de bastonete (TAM; NAYAKA, 2012). Raramente são patogênicas, especialmente em pacientes imunocompetentes. Nos casos notificados de pacientes imunocompetentes infectados com este organismo, é visto geralmente no contexto de infecções polimicrobianas (KEREN et al., 2014).

Em plantas, já foram encontradas como rizobactérias, isoladas de raízes de milho (FAGOTTI et al., 2012) e morango (LAILI; RADZIAH; ZAHARAH, 2017).

Raros são os estudos da interação desta bactéria com plantas, assim, não há registros de inoculantes comercializados à base destas.

## 2.4 ESTRESSE HÍDRICO E OSMÓTICO

Períodos de estiagem ou estação seca são fenômenos frequentes no Brasil, com intensidade e efeitos variáveis ao longo do tempo. A localização geográfica do território brasileiro é favorável à ocorrência de episódios de seca devendo antes ser encarado como um elemento climático de determinada frequência (MENESES et al., 2006). Além disso, o planeta vem passando por mudanças climáticas, em consequência do aumento do efeito estufa e do aquecimento global, o que tem desencadeado mudanças nas estações do ano e alterações no regime de chuvas e estiagem (IPCC, 2017).

As plantas são consideradas organismos sésseis, e estão expostas a um ambiente de constante mudanças, incluindo vários fatores bióticos e abióticos (KEUNEN et al., 2013). As produções de várias culturas são afetadas negativamente devido a vários estresses bióticos e abióticos e os danos causados por essas tensões são responsáveis pelas enormes perdas econômicas em todo o mundo (RAI et al., 2011).

A água corresponde a 50% da massa fresca em plantas lenhosas e cerca de 80 a 95% em plantas herbáceas, age como reagente no metabolismo vegetal, transporte e translocação de solutos, na turgescência celular, abertura e fechamento dos estômatos e penetração do sistema radicular (TAIZ; ZEIGER, 2004). Pode também atuar como solvente e agente de refrigeração (MUNDREE et al., 2002).

Déficit hídrico, desidratação celular ou ainda estresse osmótico são termos usados na literatura para definir a falta de água que causa mudanças no turgor celular (HMIDA-SAYARI et al., 2005).

O déficit hídrico provoca alterações fisiológicas e morfológicas nas plantas, como o fechamento dos estômatos, murcha e redução da área foliar, diminuição do diâmetro do caule, aborto de flores e frutos prejudicando o desenvolvimento da planta (FARIAS, 2011; MENDES, 2011). A falta de água, faz com que ocorra restrições no metabolismo da planta, causadas pela alta demanda evaporativa, que restringe a atividade fotossintética, afetando o crescimento da planta (YU et al., 2009). Resumindo: os efeitos vão desde a redução no potencial hídrico foliar e teor relativo de água, redução da condutância estomática e na taxa de transpiração causada pelos estômatos, até a diminuição na taxa fotossintética (FAROOQ et al., 2009).

A primeira parte da planta a detectar e sinalizar a falta de água para as demais células tecidos e órgãos é o sistema radicular, onde a desidratação das raízes pode causar o fechamento parcial dos estômatos (DAVIES et al., 2002). Dois fatores determinam o potencial da água para as raízes: a concentração de solutos que cria o potencial osmótico e a pressão física da célula ou tecidos e formam o potencial de turgor. O potencial osmótico é geralmente menor (mais negativo) que o potencial da água, sendo o potencial de turgor a diferença entre eles (SLATER et al., 2003). Quando o turgor foliar é perdido significa que o potencial da água das folhas baixa a valores iguais ao potencial osmótico. À medida que o turgor da folha diminui, os estômatos se fecham para reduzir a transpiração. Também as células da folha colapsam e a folha murcha. Estes efeitos têm a finalidade de diminuir a perda de água pela folha por fechamento de estômatos e o enrolamento visa reduzir a exposição à luz solar.

Estudos mostram que uma característica adquirida por plantas submetidas ao déficit hídrico é o aumento no número de estômatos. Este fato pode ocorrer como medida compensatória, com o intuito de aumentar as trocas gasosas, e atenuar a diminuição da assimilação de CO<sub>2</sub> e da respiração (BALDO, 2007).

Outra possível explicação é que, tendo em vista que o número de estômatos é determinado geneticamente, então o que ocorreria não seria o aumento no número de estômatos em plantas estressadas, mas sim a redução do tamanho da lâmina foliar e conseqüentemente um maior número de estômatos por  $\text{mm}^2$  na área foliar (CERQUEIRA, 1992).

Uma das maiores conseqüências do estresse hídrico é a perda de água protoplasmática, o que induz à concentração de íons tais como Cl e  $\text{NO}_3$  que leva a um estado viscoso-vítreo (HOEKSTRA et al., 2001; MUNDREE et al., 2002). Este estado viscoso aumentaria as chances de interações moleculares que podem causar a desnaturação de proteínas e a fusão de membranas (HARTUNG et al., 1998; HOEKSTRA et al., 2001).

A escassez de água nas células, causada pelo déficit hídrico, também inibe a atividade fotossintética nos tecidos devido a um desequilíbrio entre a luz capturada e a sua utilização pelo sistema fotossintético vegetal gerando um acúmulo de elétrons (FOYER; NOCTOR, 2000). Estas alterações na atividade fotoquímica dos cloroplastos nas folhas de plantas estressadas ocasionam a dissipação do excesso de energia luminosa no centro reativo do sistema fotossintético II, gerando as espécies reativas de oxigênio (EROs) ou radicais livres pelo estresse oxidativo. As EROs podem ser geradas no citoplasma, cloroplastos, mitocôndria, peroxissomas e no apoplasto (SELOTE; BHARTI; KHANNA, 2004).

As espécies reativas de oxigênio são subprodutos do metabolismo aeróbico e participam de vias de sinalização em plantas. Diversas formas de EROs já foram descritas: os radicais superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), os radicais hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Estas moléculas geram lesões nos tecidos e desencadeiam patologias. A mais comum é que durante este processo, os radicais atacam os lipídios da membrana celular, as proteínas e os ácidos nucleicos alteram a fisiologia, levando à degradação oxidativa das células podendo causar a morte celular (BARBOSA et al., 2014).

O estresse oxidativo é um processo regulado e o equilíbrio entre a capacidade oxidativa e antioxidativa determina o metabolismo normal na planta. Os radicais livres inativam enzimas e danificam componentes celulares importantes como as enzimas do ciclo de Calvin. Outros danos causados pelo estresse oxidativo em plantas são: injúrias aos sítios de ligação da ATPase; degradação de fosfolipídeos; peroxidação e reesterificação dos ácidos graxos da membrana; degradação de polissacarídeos,

desnaturação de enzimas e a quebra do DNA e o branqueamento de pigmentos da clorofila (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002; BAEK; SKINNER, 2003; EDREVA, 2005).

Os estudos envolvendo a aplicação de déficit hídrico em plantas à campo é complexo, dependente de vários fatores. Por outro lado, o estresse osmótico aplicado em cultivo *in vitro* tem a vantagem de simular o estresse hídrico, além de minimizar as variações ambientais pelo uso de condições controladas e homogêneas de aplicação do estresse (FURLAN et al., 2014).

Nestes estudos, são utilizadas osmólitos no meio de cultura que diminuem o potencial osmótico da água no meio, simulando um ambiente com umidade reduzida, possibilitando na avaliação do comportamento de genótipos ou espécies vegetais submetidos a potenciais osmóticos negativos (GARCIA et al., 2014).

As forrageiras estão sujeitas a constantes variações climáticas gerando estresses e alterando sua morfologia e fisiologia, sendo a falta de água um dos principais fatores que afetam a produção e a qualidade de matéria seca das forragens (OLIVEIRA et al., 2017).

A substituição da vegetação por pastagens, sugere mudança gradual na energia hídrica do sistema provocada pela compactação dos solos através de pastejo contínuo. A diminuição lenta da capacidade de infiltração, simultânea ao aumento do escoamento superficial de água de chuva são condições que contribuem para diminuição da quantidade de água armazenada nos solos e, portanto, aumento da influência de estresse hídrico nas pastagens a qualquer mudança no regime pluviométrico (EMBRAPA, 2016).

## 2.5 MECANISMOS DE DEFESA AO ESTRESSE HÍDRICO

As plantas que são continuamente submetidas a estresse têm a capacidade de modular respostas de defesa para superar tais mudanças, e voltar ao seu metabolismo normal (SOARES; MACHADO, 2007). Estes mecanismos de defesa podem ser enzimáticos e não enzimáticos, e agem para neutralizar a citotoxicidade das EROs, e são conhecidos como antioxidantes. Os antioxidantes podem evitar a formação de radicais livres, sequestrá-los ou promover sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas (SERKEDJIEVA, 2011).

Entre as EROs, está o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) celular que surge da dismutação do  $O_2^-$  catalisada pela superóxido dismutase (SOD). É um oxidante relativamente estável e ausente de carga, o que pode facilitar a passagem através da camada bilipídica da membrana celular. Essa capacidade de difundir-se rapidamente através da membrana celular favorece a rápida elicitación da resposta vegetal (APOSTOL; HEINSTEIN; LOW, 1989).

O acúmulo de  $H_2O_2$  pode depender de duas etapas consecutivas, a redução do  $O_2$  molecular a  $O_2^-$  seguida pela dismutação espontânea ou catalisada de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ . A enzima SOD catalisa uma conversão altamente eficiente de  $O_2^-/HO_2$  a  $H_2O_2$ , numa velocidade  $10^{10}$  vezes maior que na reação espontânea (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Dentre as enzimas antioxidantes que ajudam a combater as EROs estão: SOD, catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), e glutathione-S-transferase (GST) (ASADA, 2006).

Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) é considerada a primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo (APEL; HIRT, 2004). A enzima consiste em um grupo de metaloenzimas, sendo considerada o antioxidante enzimático intracelular mais eficiente. A SOD promove a dismutação do radical superóxido em  $H_2O_2$ , que é decomposto em uma variedade de peroxidases em água, utilizando substratos redutores, livrando as células de riscos de oxidação por estes radicais (ALSCHER et al., 2002; ABOGADALLAH et al., 2010). Estas enzimas são classificadas em três grupos de acordo com o componente metálico de seu sítio ativo, podendo ser cobre/zinco (Cu/Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe), onde dependendo do metal em que estão ligadas e o compartimento celular em que estão presentes, receberão sua classificação, Cu/Zn-SOD no citosol, Cu/Zn e Fe-SOD no cloroplasto, e Mn-SOD na mitocôndria. Porém em excesso, podem induzir disfunções levando a morte celular (BAKER; ORLANDI, 1995).

O segundo sistema de prevenção é formado pela catalase (CAT, EC.1.11.1.6) que são enzimas encontradas em todos os organismos vivos, sendo amplamente distribuída e com a capacidade de degradar o peróxido de hidrogênio de maneira muito rápida (MALLICK; MAHON, 2000). Estas enzimas estão presentes nos peroxissomos, que são organelas especializadas em produzir e consumir o  $H_2O_2$ , sendo encontradas principalmente no citoplasma de células localizadas nas folhas (VERDUYN et al., 1988, IWAMOTO et al., 1998).

A ascorbato peroxidase (APX, EC.1.11.1.11) apresenta uma alta afinidade pelo ascorbato, e catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, onde ocorre a oxidação do ascorbato, reação que resulta em monodeidroascorbato e água (SHARMA et al., 2012). A APX é a principal enzima relacionada a eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no cloroplasto e citosol das células vegetais (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). Esta enzima é encontrada em plantas superiores, clorófitas e em algas vermelhas, estão localizadas no citosol, em membranas de peroxissomos e em cloroplastos nas membranas dos tilacóides e no estroma (GILL; TUTEJA, 2010).

A glutationa-S-transferases (GST, EC 2.5.1.18) desempenham um papel importante na resposta do estresse causado por herbicidas nas plantas. É a enzima que catalisa a conjugação de substratos xenobiótica eletrofílica por meio da conjugação destes com glutationa reduzida, formando substâncias de baixa toxicidade. As GSTs também promovem a conjugação de GSH com produtos endógenos causadores de danos oxidativos, como radicais hidroxila citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando sua desintoxicação, regula a homeostase hormonal, sequestro vacuolar de antocianina, tirosina metabolismo, desintoxicação de hidroxiperóxido, regulação de apoptose e nas respostas das plantas aos estresses bióticos e abióticos, têm o potencial de remover compostos citotóxicos ou genotóxicos, que podem reagir ou danificar a DNA e proteínas (DIXON; SKIPSEY; EDWARDS, 2010). Geralmente as GSTs são enzimas citoplasmáticas, encontradas em folhas e raízes de plantas (MOONS, 2003).

## REFERÊNCIAS

- ABOGADALLAH, G. M. Antioxidative defense under salt stress. **Plant Signaling & Behavior**, [S.l.], v. 5, n. 4, p.369-374, abr. 2010.
- ADAPAR - Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. Secretaria de Agricultura e do Abastecimento. **Legislação sobre Fertilizantes, Corretivos, Inoculantes e Biofertilizantes**. 2014. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br>>. Acesso em: 15 nov. 2017.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, [S.l.], v. 163, n. 2, p.173-181, mar. 2008.
- AIRES, L. **O uso de fertilizantes é um problema sem solução na agricultura?** 2013. Disponível em: <<https://www.ecycle.com.br>>. Acesso em: 29 set. 2017.
- ALLARD, R. W. Princípios do melhoramento genético das plantas. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381 p.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 53, n. 372, p.1331-1341, maio 2002.
- AMARAL, F. P. do. Interação de Bactérias Benéficas Associativas (*Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*) com Diferentes Espécies de Gramíneas (*Zea mays*, *Brachypodium distachyon* e *Setaria viridis*). 2014. 121 f. **Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias**: Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- ANPII (Org.). **Venda de inoculantes deve crescer 10% em 2017, diz Anpii**. Elaborada por Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br>>. Acesso em: 01 nov. 2017.
- APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, [S.l.], v. 55, n. 1, p.373-399, 2 jun. 2004.
- APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P. F.; LOW, P.S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiology** v. 90, p.109-116. 1989.
- ARAÚJO, G. **A evolução da produção de inoculantes no Brasil**. 2016. Elaborada por Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br>>. Acesso em: 02 nov. 2017.
- ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, New Delhi, v. 82, n. 10, p.1227-1238, maio 2002.

ARZANESH, M. H. et al. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 27, n. 2, p.197-205, 16 maio 2010.

ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 141, n. 2, p.391-396, 1 jun. 2006.

B. JUNIOR, O.; HUNGRIA, M. Efeito de doses de inoculante turfoso na fixação biológica do Nitrogênio pela cultura da Soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [S.l.], v. 24, n. 1, p.527-535, 2000.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, [S.l.], v. 32, n. 11, p.1559-1570, 16 jul. 2010.

BAEK, K. H.; SKINNER, D. Z. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. **Plant Science**, [S.l.], v. 165, n. 6, p.1221-1227, dez. 2003.

BAKER, C. J.; ORLANDI, E. W. ACTIVE OXYGEN I PLANT PATHOGENESIS. **Annual Review of Phytopathology**, Maryland, v. 33, n. 1, p.299-321, 1995.

BALDO, M. N. **Comportamento anatômico, fisiológico e agrônomo do milho (*Zea mays* L.) submetido a estresses de ambiente em diferentes estádios fenológicos**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia/ Fitotecnia, Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo - USP, Piracicaba, 2007.

BALSANELLI, E. et al. *Herbaspirillum seropedicae rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 12, n. 8, p.2233-2244, abr. 2010.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BARBOSA, E. A.; PERIN, L.; REIS, V. M. Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p.827-833, maio 2006.

BARCELLOS, A. O. et al. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 1, p.51-67, 2008.

BARCELLOS, F. G. et al. Evidence of Horizontal Transfer of Symbiotic Genes from a *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Strain to Indigenous Diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 73, n. 8, p.2635-2643, 16 fev. 2007.

BARROS, T. D. **Biofertilizantes**: Agroenergia. 2012. Agência EMBRAPA de Informação Tecnológica. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore>>. Acesso em: 07 out. 2017.

BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant And Soil**, [S.l.], v. 378, n. 1-2, p.1-33, 19 nov. 2013.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990- 1996). **Canadian Journal Of Microbiology**, [S.l.], v. 43, n. 1, p.103-121, 1997.

BHARDWAJ, D. et al. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, [S.l.], v. 13, n. 1, p.66-76, 2014.

BIRCHAM, J. S.; HODGSON, J. The influence of sward condition on rates of herbage growth and senescence in mixed swards under continuous stocking management. **Grass and Forage Science**, Edinburgh, v. 38, n. 1, p.323-331, jan. 1983.

BISWAS, B.; GRESSHOFF, P. The Role of Symbiotic Nitrogen Fixation in Sustainable Production of Biofuels. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 15, n. 5, p.7380-7397, 29 abr. 2014.

BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, Netherlands, v. 42, n. 1, p.241-250, jan. 1995.

BRACCINI, A. L. et al. Seed inoculation with *Azospirillum brasiliense*, associated with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p.58-64, jun. 2012.

BRUNKEN, J. N. A Systematic Study of Pennisetum sect. Pennisetum (Gramineae). **American Journal Of Botany**, [s.l.], v. 64, n. 2, p.161-176, fev. 1977.

CARVALHO, M. S. O uso do solo na década de 1960 no norte do Paraná e a política cafeeira. **Revista do departamento de geociências**, Londrina, v. 8, n. 2, p. 135-142, 1999.

CAVALLET, L. E. et al. PRODUTIVIDADE DO MILHO EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO E INOCULAÇÃO DAS SEMENTES COM *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p.129-132, 2000.

CERQUEIRA, Y. M. Efeito da deficiência de água na anatomia foliar de cultivares de mandioca *Manihot esculenta* Crantz. I - Densidade Estomática. **Sitientibus**, Feira de Santana, v. 1, n. 10, p.103-115, dez. 1992.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos**. 2015. V.2, N.9. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 04 set. 2017.

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. **Trends In Plant Science**, [S.l.], v. 5, n. 5, p.187-188, maio 2000.

COMPANT, S.; CLEMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.l.], v. 42, n. 5, p. 669-678, May 2010.

COSTA, O. V. et al. Cobertura do solo e degradação de pastagens em áreas de domínio de chernossolos no sul da Bahia. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 6, p.843-856, ago. 2000.

CRUZ, L. M. et al. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Applied And Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 67, n. 5, p.2375-2379, 1 maio 2001.

DAVIES, W. J.; WILKINSON, S.; LOVEYS, B. Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. **New Phytologist**, Bailrigg, v. 153, n. 1, p.449-460, 2002.

MORI, C. de; FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P. dos. Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da aveia. Embrapa Trigo, Passo Fundo, p.1-26, 2012. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/91354/1/2013-documentosonline-136.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell & Environment**, [S.l.], v. 32, n. 12, p.1682-1694, 11 ago. 2009.

DIXON, D. P.; SKIPSEY, M.; EDWARDS, R. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 71, n. 4, p.338-350, mar. 2010.

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [S.l.], v. 106, n. 2-3, p.119-133, abr. 2005.

EMBRAPA, 2014. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/960416/1/COT155.pdf>. Acesso em 15 out 2017.

EMBRAPA. **VARIAÇÕES HÍDRICAS EM ÁREAS DE PASTAGENS**. Elaborada por Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 06 nov. 2017.

- FAGOTTI, D. S. L. et al. Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas de Milho em Cultivos Convencional e Agroecológico. In: FERTBIO 2012, 1., 2012, Maceió. **Anais...** Maceió: Sociedade Brasileira de Ciência de Solo, 2012. p. 1 - 4.
- FARIAS, J. R. B. Limitações climáticas à obtenção de rendimentos máximos de soja. In: Congresso De La Soja Del Mercosur - MERCOSOJA, 5., 2011, Rosario. **Anais...** Rosario: ACSOJA, 2011. p. 1 - 4.
- FAROOQ, M. et al. Improving the Drought Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) by Exogenous Application of Salicylic Acid. **Journal of Agronomy and Crop Science**, [S.l.], v. 195, n. 4, p.237-246, ago. 2009.
- FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. de. Production systems – An example from Brazil. **Meat Science**, [S.l.], v. 84, n. 2, p.238-243, fev. 2010.
- FILHO, M. B. D. **Degradação de Pastagens**: Processos, causas e estratégias de recuperação. 2015. 4 ed. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/261026141\\_Degradacao\\_de\\_pastagens\\_processos\\_causas\\_e\\_estrategias\\_de\\_recuperacao](https://www.researchgate.net/publication/261026141_Degradacao_de_pastagens_processos_causas_e_estrategias_de_recuperacao)>. Acesso em: 12 out. 2017.
- FILHO, M. B. D. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**. 2014. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 12 out. 2017.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell And Environment**, [S.l.], v. 28, n. 1, p.1056-1071, 2005.
- FRAZÃO, J. J. et al. Fertilizantes nitrogenados de eficiência aumentada e ureia na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [S.l.], v. 18, n. 12, p.1262-1267, dez. 2014.
- FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, [S.l.], v. 6, n. 3, p.1-13, 13 jan. 2016.
- GARCIA, S. H. et al. Simulação de estresse hídrico em feijão pela diminuição do potencial osmótico. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 11, n. 1, p. 35-41, 2014.
- GERON, L. J. V. et al. Digestibilidade da matéria seca e parâmetros da fermentação in vitro de plantas forrageiras. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 20, n. 1, p.38-49, 2015.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 48, n. 12, p.909-930, dez. 2010.
- GONÇALVES, E. F.; MOLLERI, G. S. F.; RUDORFF, F. M. Distribuição dos desastres Naturais do Estado de Santa Catarina. Estiagem: (1980-2003). In:

Simpósio Brasileiro de Desastres naturais, 1., 2004. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, GDN/UFSC, 2004 p. 773-786.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. et al. Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. **Amino Acids**, [S.l.], v. 28, n. 4, p.363-367, 15 abr. 2005.

GOVINDARAJAN, M. et al. Improved Yield of Micropropagated Sugarcane Following Inoculation by Endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil**, [S.l.], v. 280, n. 1-2, p.239-252, fev. 2006.

GRAY, E. J.; SMITH, D. I. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, [S.l.], v. 37, n. 3, p.395-412, mar. 2005.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 43, n. 1, p.895-914, 1997.

HARTUNG, W.; SCHILLER, P.; DIETZ, K. J. Progress in Botany. **Progress In Botany**, [S.l.], p.299-300, 1998.

HILLEL, D. (Ed.). **Encyclopedia of Soils in the Environment: BACTERIA**. pp. 103-115, Plant Growth-Promoting, Y. Bashan; L. E. de-Bashan. Oxford: Elsevier, 2005. 2200 p.

HINSINGER, P. et al. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. **Plant And Soil**, [S.l.], v. 321, n. 1-2, p.117-152, 21 jan. 2009.

HMIDA-SAYARI, A. et al. Overexpression of  $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v. 196, n. 4, p. 746-752, 2005.

HOEKSTRA P. A. et al. Mechanisms of plant dessication tolerance. **Trends in Plant Science**. v. 6, p. 431-438. 2001.

HOLMANN F. et al. 2004: **Impact of the adoption of *Brachiaria* grasses: Central America and Mexico**. Livestock Research for Rural Development. Vol. 16, Art. 98. Disponível em: <<http://www.lrrd.org/lrrd16/12/holm16098.htm>>. Acesso em: 06 out. 2017.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. 2011. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 12 out. 2017.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Inoculação com *Azospirillum*: bons rendimentos com menor custo para o agricultor e menor impacto ambiental**. 2017. EMBRAPA SOJA. Disponível em: <<http://blogs.canalrural.com.br>>. Acesso em: 05 nov. 2017.

HUREK, T. et al. *Azoarcus* Grass Endophytes Contribute Fixed Nitrogen to the Plant in an Unculturable State. **Molecular Plant-microbe Interactions Journal**, [S.l.], v. 15, n. 3, p.233-242, 2002.

IAPAR - Instituto Agronômico do Paraná. **Agricultura fecha balanço e confirma safra recorde**. 2017. Disponível em: <<http://www.iapar.br>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

IBGE. **Censo Agropecuário 2006**: Resultados preliminares. 2006. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 07 out. 2017.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC. **IPCC Resource Mobilization**. 2017. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

IWAMOTO, M. et al. Evolutionary relationship of plant catalase genes inferred from exon-intron structures: isozyme divergence after the separation of monocots and dicots. **Theoretical and Applied Genetics**, [S.l.], v. 97, n. 1, p.9-19, 1998.

JORNADA, J. B. J. **Rendimento e qualidade de sementes de milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) Leeke) em resposta a práticas de manejo**. 2002. 145 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2002.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. de. **Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. 57p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 163).

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, [S.l.], v. 5, n. 6, p.709-725, jan. 2011.

KAZI, N. et al. The response of wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasilense* in the field. **Field Crops Research**, [S.l.], v. 196, p.368-378, set. 2016.

KEFALOGIANNI, I.; AGGELIS, G. Modeling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 58, n. 3, p.352-357, 1 mar. 2002.

KELLER, B.; FEUILLET, C. Colinearity and gene density in grass genomes. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 6, p. 246-251, Jun 2000.

KEREN, Y. et al. Is *Leclercia adecarboxylata* a New and Unfamiliar Marine Pathogen? **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 52, n. 5, p.1775-1776, 12 fev. 2014.

KEUNEN, E. et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, Cell & Environment**, [S.l.], v. 36, n. 7, p.1242-1255, 17 fev. 2013.

KICHEL, A. N.; MIRANDA, C. H. B. **Uso do milho como planta forrageira.** 2000. Publicado por Ministério da Agricultura e do Abastecimento, EMBRAPA. Campo Grande, MS, dez. 2000, nº 46. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 05 out. 2017.

LAILI, N. S.; RADZIAH, O; ZAHARAH, S. S. Isolation and characterization of plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on growth of strawberry (*Fragaria ananassa duch.*). **Journal of Botany**, Bangladesh, v. 46, n. 1, p.277-282, mar. 2017.

LAWLOR, D. W. et al. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 64, n. 1, p.83-108, 16 nov. 2012.

MACARI, S. et al. Avaliação da mistura de cultivares de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) com azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) sob pastejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p.910-915, jun. 2006.

MACEDO, M. C. M. et al. Degradação de pastagens, alternativas de recuperação e renovação, e formas de mitigação. In: ENCONTRO DE ADUBAÇÃO DE PASTAGENS DA SCOT CONSULTORIA - TEC - FÉRTIL, 1., 2013, Ribeirão Preto, SP. **Anais**, 2013. p. 158-181.

MACEDO, M. C. M.; KICHEL, A. N.; ZIMMER, A. H. **Comunicado Técnico:** Degradação e alternativas de recuperação e renovação de pastagens. 2000. Elaborada por EMBRAPA, nº 62. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 11 out. 2017.

MACHADO, L. A. Z. et al. Principais espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte. In: PIRES, A. V. **Bovinocultura de corte.** Piracicaba: FEALQ, Cap. 19. p. 375-410. 2010.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Julich, v. 157, n. 1, p.183-193, jan. 2000.

MARIANO, R. L. R. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, n. 1, p.89-111, 2004.

MARTHA, G. B.; ALVES, E.; CONTINI, E. Land-saving approaches and beef production growth in Brazil. **Agricultural Systems**, [S.l.], v. 110, p.173-177, jul. 2012.

MENDES, L. F. **Desempenho de genótipos de soja nos estados de Tocantins, Bahia e Maranhão e Piauí.** 2011. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Agronomia, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

- MENESES, C. H. S. G. et al. Potencial hídrico induzido por Polietilenoglicol 6000 no vigor de sementes de algodoeiro. **Embrapa Agroecologia**, v.1, p.5-17, 2007. Disponível em: < <https://www.embrapa.br> >. Acesso em: 14 out. 2017.
- MENESES, C. H. S. G. et al. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 10, p.1039-1072. 2006.
- MIRANSARI, M. Soil microbes and plant fertilization. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.l.], v. 92, n. 5, p.875-885, 12 out. 2011.
- MONTESINOS, E. Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. *International Microbiology*, [s.l.], v. 6, n. 4, p.221-223, 1 dez. 2003. **Springer Nature**. <http://dx.doi.org/10.1007/s10123-003-0141-0>.
- MONTEIRO, A. et al. **Plantas forrageiras de pastagens de altitude**. Lisboa: Isa Press, 2014. 242 p. (Série Didática Botânica).
- MONTEIRO, R. A. et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, [S.l.], v. 356, n. 1-2, p.175-196, 4 fev. 2012.
- MOONS, A. *Osgtu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. **FEBS Letters**, [S.l.], v. 553, n. 3, p.427-432, 2 out. 2003.
- MOREIRA, F. M. de S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, [S.l.], v. 1, n. 2, p.74-99, 2010.
- MUNDREE, S. G. et al. Physiological and molecular insights into drought tolerance. **African Journal Of Biotechnology**, Rondebosch, v. 1, n. 2, p.28-38, dez. 2002.
- OLIVEIRA, H. P. et al. Respostas fisiológicas de forrageiras ao déficit hídrico e baixas temperaturas. **Nutritime**, Viçosa, v. 14, n. 5, p.7008-7014, out. 2017.
- PEDRAZA, R. O. et al. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European Journal Of Soil Biology**, [S.l.], v. 45, n. 1, p.36-43, jan. 2009.
- PEDROSA, F. O. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **PLOS Genetics**, [S.l.], v. 7, n. 5, p.1-10, maio 2011.
- PROSSER, J. I. et al. The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature**, [S.l.], v. 5, n. 1, p.384-392, maio 2007.

QUECINE, M. C. et al. Diversity and Biotechnological Potential of Plant-Associated Endophytic Bacteria. **Journal of Biotechnology**, Weinheim, v. 2, n. 1, p.377-423, 2014.

QUINCOZES, E. R. F. et al. **Sistema de Informação de Espécies Forrageiras para a Região Sul do Brasil Manual do Usuário**. 2007. Embrapa Clima Temperado. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 13 out. 2017.

RAI, M. K. et al. Developing stress tolerant plants through in vitro selection—An overview of the recent progress. **Environmental And Experimental Botany**, [S.l.], v. 71, n. 1, p.89-98, abr. 2011.

REIS, V. M. **Recomendação de inoculante para cultura de milho utilizando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR 11417**. 2009. Comunicado Técnico 119, Seropédica, RJ, novembro, 2009. Publicado por EMBRAPA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 05 nov. 2017.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 28, n. 2, p.123-130, abr. 2003.

RODRÍGUEZ-VALERA, F. Environmental genomics, the big picture? **Fems Microbiology Letters**, [S.l.], v. 231, n. 2, p.153-158, fev. 2004.

ROGEL, M. A. et al. Nitrogen-Fixing Nodules with *Ensifer adhaerens* Harboring *Rhizobium tropici* Symbiotic Plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 67, n. 7, p.3264-3268, 1 jul. 2001.

S. FILHO, C. V.; MONTEIRO, F. A.; CORSI, M. Recuperação de pastagens degradadas de *Brachiaria decumbens*. 1. Efeito de diferentes tratamentos de fertilização e manejo. **Pasturas Tropicais**, [S.l.], v. 14, n. 2, p.2-6, dez. 1992.

SALA, V. M. R. et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p.345-352, maio 2005.

SANON, A. et al. Rhizosphere microbiota interferes with plant-plant interactions. **Plant and Soil**, [S.l.], v. 325, n. 1-2, p.351-352, 8 ago. 2009.

SANTOS, C. S. A. **Capim Marandu submetido à inoculação com bactérias diazotróficas associativas em latossolo vermelho de cerrado**. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Instituto de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Universidade Federal de Mato Grosso, Rondonópolis, 2013.

SANTOS, R. M.; RIGOBELLO, E. C. Teor de amônio e nitrato no solo sob o plantio de milho inoculado com *Azospirillum brasilensis*. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB. I CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, AGRÍCOLA E AMBIENTAL (CBMAAA)**, Jaboticabal, v. 8, p.1-2, maio 2016.

SCHOEBITZ, M.; LÓPEZ, M. D.; ROLDÁN, A. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. **Agronomy For Sustainable Development**, [S.I.], v. 33, n. 4, p.751-765, 27 mar. 2013.

SELOTE D.; BHARTI S.; KHANNA-CHOPRA R. Drought acclimation reduces O<sub>2</sub>-accumulation and lipid peroxidation in wheat seedlings. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 214, p.724-729. 2004.

SENGUPTA, D.; KANNAN, M.; REDDY, A. R. A root proteomics-based insight reveals dynamic regulation of root proteins under progressive drought stress and recovery in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Planta**, [S.I.], v. 233, n. 6, p.1111-1127, 5 fev. 2011.

SERKEDJIEVA, J. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. Chap.13, p.275-293.

SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, [S.I.], v. 2012, p.1-26, 2012.

SMITH, R. S. **New Inoculant Technology to Meet Changing Legume Management**. In: ELMERICH C.; KONDOROSI A.; NEWTON W. E. (eds) *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> Century*. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 1998. Springer, Dordrecht.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p.9-19, 2007.

SOUZA, C. M. P. et al. Zoneamento agroecológico da bacia hidrográfica do Almada (Bahia) com uso de sistema de informação geográfica. **Revista Espaço & Geografia**, Viçosa, v. 15, n. 1, p.207-227, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Pant Physiology**, 5.ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc. Publishers, 2009. 782p.

TAM, V.; NAYAK, S. Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from a wound infection after exposure to hurricane-related floodwater. **BMJ Case Reports**, [S.I.], n. 1, p.1-3, 29 out. 2012.

TAMURA, K. et al. *Leclercia adecarboxylata* Gen. Nov., Comb. Nov., formerly known as *Escherichia adecarboxylata*. **Current Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 179-184, 1986.

TAVARES, M. J. C. M. S.; ZANETTINI, M. H. B.; CARVALHO, F. I. F. de. Origem e evolução do gênero *Avena*: Suas implicações no melhoramento genético. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p.499-507, abr. 1993.

TUNES, L. M. et al. Testes de vigor em sementes de Aveia Branca. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 15, n. 2, p.94-106, 2008.

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 4, p.460-472, ago. 2009.

VELLOSO, C.B.O. & FEDERIZZI, L.C. Delimitação preliminar da cadeia da aveia branca para consumo humano no Brasil. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 20, Pelotas, 21/23 mar. 2000. **Resultados Experimentais**. Pelotas: EMBRAPA/UFPel, 2000. p.181-183.

VERDUYN, C. et al. Hydrogen Peroxide Metabolism in Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 54, n. 8, p.2086-2090, ago. 1988.

VOGEL, G.; MARTINKOSKI, L.; RUZICKI, M. Efeitos da utilização de *Azospirillum brasilense* em poaceas forrageiras: Importâncias e resultados. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, v. 10, n. 1, p.1-6, 2014.

VORPAGEL, A. G. **Inoculação de *Azospirillum*, isolado e associado à bioestimulante, em milho**, no Noroeste do RS, 2012.

WANG, E. T. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S.l.], v. 52, n. 5, p.1687-1693, 1 set. 2002.

WOESE, C. R. There Must Be a Prokaryote Somewhere: Microbiology's Search for Itself. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Urbana, v. 58, n. 1, p.1-9, mar. 1994.

XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; GUEDES, R. E. **Inoculante: Feijão-Caupi**. 2011. Agência EMBRAPA de Informação Tecnológica. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao-caupi/arvore>>. Acesso em: 07 out. 2017.

YU, D. J.; KIM, S. J.; LEE, H. J. Stomatal and non-stomatal limitations to photosynthesis in field-grown grapevine cultivars. **Biologia Plantarum**, [S.l.], v. 53, n. 1, p.133-137, 2009.

ZANHOLO, B.; MOITINHO, F.; COSTA, F. **Inoculante - Raiz Mais Forte!** 2010. Disponível em: <<http://www.revistarural.com.br>>. Acesso em: 05 nov. 2017.

ZIMMER, A. H. et al. Estabelecimento e recuperação de pastagem de *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 11., Piracicaba, 1994. **Anais...** Piracicaba, Escola Superior Agricultura Luiz de Queiros, 1994. p.153-208.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação de bactérias endofíticas com forrageiras e submetidas ao déficit hídrico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a associação entre diferentes espécies forrageiras e estirpes bacterianas.

Desenvolver uma metodologia de simulação de déficit hídrico *in vitro* em plantas forrageiras.

Avaliar o efeito da inoculação de estirpes bacterianas em *Urochloa ruziziensis* submetidas ao estresse osmótico.

## CAPÍTULO 1: PERFIL ASSOCIATIVO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL COM DIFERENTES ESPÉCIES FORRAGEIRAS

### RESUMO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial e é o maior exportador comercial do mundo, uma característica importante da pecuária brasileira é ter a maior parte de seu rebanho criado a pasto. Devido ao alto custo dos fertilizantes químicos, o interesse para os inoculantes bacterianos tem crescido. O objetivo deste trabalho foi identificar espécies forrageiras com melhor associação com diferentes cepas bacterianas, a fim de promover o crescimento da planta. Foram realizados experimentos no laboratório de bioquímica e genética da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, com um delineamento inteiramente casualizado, onde foram avaliadas três espécies forrageiras: aveia branca (*Avena sativa* L.), brachiaria ruziziensis (*Urochloa ruziziensis*) e milheto (*Pennisetum glaucum*), inoculadas com 4 cepas bacterianas: *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Ensifer adherens* e *Leclercia adedecarboxylata*. As sementes pré-germinadas foram colocadas em tubos de ensaio contendo 25 mL de meio MS e inoculadas com  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de cada uma das estirpes, com exceção para a *E. adherens* que foi inoculada com  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Após 21 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados o comprimento, massa fresca e massa seca da biomassa de parte aérea e raiz, quantificação de proteína bruta e nitrogênio total, morfologia das raízes por coloração com azul de metileno 1%, morfologia de estômatos e contagem microbiana (epifítica e endofítica). Os dados foram submetidos a ANOVA e comparados pelo teste Tukey (p > 5%). As diferentes espécies forrageiras apresentaram comportamento distinto em relação à associação com as estirpes bacterianas. A aveia e a brachiaria foram consideradas como mais responsivas à associação bacteriana que o milheto por terem apresentado um incremento maior no tamanho de raízes central/ lateral e área radicular. Apesar da aveia ter apresentado resultados significativos para PB e NT, a brachiaria apresentou uma maior população epi e endofítica, apontando ser preferencial para as bactérias.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Forrageiras. Interação planta bactéria.

## ABSTRACT

Brazil has the largest commercial cattle herd and it is the largest commercial exporter in the world, an important characteristic of Brazilian cattle raising is having most of its herd raised to pasture. Due to the high cost of chemical fertilizers, the interest for bacterial inoculants has grown. The objective of this work was to identify forage specimens with better association with different bacterial strains in order to promote plant growth. Experiments were carried out in the biochemistry and genetics laboratory of the Federal University of Paraná – Sector Palotina, with a completely randomized design, where three forage species were evaluated: white oat (*Avena sativa* L.), brachiaria ruziziensis (*Urochloa ruziziensis*) and Millet (*Pennisetum glaucum*), inoculated with four bacterial strains: *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Ensifer adherens* and *Leclercia adecarboxylata*. Seed asepsis was performed with acidified hypochlorite and afterward the seeds were transferred to agar / water medium and incubated for 48 h at 32 ° C in the dark. The pre-germinated seeds were placed in test tubes containing 25 mL of MS medium and inoculated with  $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup> of each of the strains, except for *E. adherens* which was inoculated with  $10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup>. After 21 days of in vitro culture, the following factors were evaluated: length, fresh and dry weight of shoot and root biomass, gross protein and total nitrogen quantification, root morphology by staining with 1% methylene blue, stoma morphology and microbial counting (epiphytic and endophytic). Data were submitted to ANOVA and compared by the Tukey test ( $p > 5\%$ ). The different forage species presented different behavior in relation to the association with the bacterial strains. Oats and Brachiaria were considered as more responsive to the bacterial association than Millet because they presented a larger increment in the size of central / lateral roots and root area. Although Oat presented significant results for PB and NT, Brachiaria had a larger epi and endophytic population, indicating that it was preferential for bacteria.

Key-words: Plant growth promoting bacteria. Forage. Plant-bacterium Interaction.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne bovina. Praticamente toda a produção brasileira de carne bovina tem como base as pastagens e forrageiras, a forma mais econômica e prática de produzir e oferecer alimentos para os bovinos. Estas espécies, portanto, desempenham papel fundamental na pecuária brasileira, garantindo baixos custos de produção (MACHADO et al., 2013; EMBRAPA, 2014).

É comum no Brasil, o plantio de pastagens e forrageiras em áreas marginais, de difícil acesso e de baixo potencial agrícola (EMBRAPA, 2014), estando estas sujeitas a degradação, proporcionando baixos níveis zootécnicos, e a baixa produtividade (MACEDO, 2013).

Nos últimos anos, pressões ambientais e de mercado, além do aumento na disponibilidade de tecnologias como técnicas de recuperação e manejo de pastagens, lançamento de cultivares mais produtivas de capins, melhoramento genético do rebanho, produção de fertilizantes, entre outros, têm incentivado uma mudança de atitude no setor produtivo de carne e leite do país (MARTHA et al., 2012).

Assim, um número crescente de produtores vem direcionando a pecuária extensiva à uma fase de refinamento, marcada pela busca de maior produtividade via intensificação, produzindo maiores quantidades de carne ou de leite em menores áreas de pastagem. Desta forma, a eficiência vem se tornando cada vez mais uma necessidade de sobrevivência para a pecuária nacional (DIAS FILHO, 2014).

Como uma das principais soluções à baixa produtividade, fertilizantes químicos vêm sendo utilizados, capazes de melhorar o desenvolvimento e produtividade das plantas. Em contrapartida, a fertilização é responsável por elevar o custo de produção e gerar danos ambientais e, nem todo o fertilizante será absorvido pela planta com uma eficiência média de 50% de aproveitamento (VORPAGEL, 2012).

Devido ao elevado custo de fertilizantes químicos, o interesse por inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) vem crescendo. Muitos grupos bacterianos tem a capacidade de associação com plantas, sendo que estas interações podem ser benéficas (associação positiva) ou maléficas (associação negativa) causando patogenicidade (VARGAS et al., 2012).

Na associação benéfica, as BPCV podem aumentar a imunidade das plantas pelo controle de patógenos (BERG; HALLMANN, 2006); ser coadjuvantes na

diminuição dos efeitos do estresse oxidativo em tempos de restrição hídrica (KASIM et al., 2013); aumentar a disponibilidade de nutrientes pela solubilização de fósforo (RICHARDSON et al., 2009), fixação biológica de nitrogênio (ROGEL et al., 2001). Podem ainda, promover o crescimento radicular pela produção de fitohormônios como Ácido indol-acético (AIA), ACC deaminase, giberelinas etc. (GLICK, 2007; BULGARELLI et al., 2013; KISIEL; KEPCZYNSKA, 2016). A maior área radicular ocorre especialmente pelo maior desenvolvimento das raízes laterais, aumentando a densidade e superfície de absorção de água e nutrientes do solo (CASTANHEIRA et al., 2017). Todos estes fatores juntos contribuem para melhorar a produtividade das plantas na chamada agricultura sustentável (HUNGRIA, 2011).

No entanto, o efeito benéfico da associação de BPCV com as plantas depende de vários fatores: tipo de solo, genótipo vegetal, idade e estágio fenológico e estirpe bacteriana (ROESCH et al., 2006; VARGAS et al., 2012). Dentre estes fatores, o genótipo vegetal é o de maior importância, haja vista que as plantas liberam exsudatos agindo como moléculas atrativas para diversos grupos bacterianos (AHMAD; KIBRET, 2014), podendo até ser específico a um determinado grupo ou espécie bacteriana em diferentes poaceas (ROESCH et al., 2005, VINAGRE et al., 2006).

O primeiro passo para o desenvolvimento de biofertilizantes na forma de inoculantes é o *screening* de bactérias promotoras de crescimento de plantas e a caracterização das associações à diferentes espécies forrageiras. Apesar da importância das forrageiras para a agropecuária nacional, trabalhos descrevendo esta caracterização são escassos na literatura. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre diferentes espécies forrageiras e estirpes bacterianas em termos de crescimento radicular.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO E ESPÉCIES SELECIONADAS

Os experimentos foram realizados no laboratório de bioquímica e genética (LABIOGEN) da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, no período de março de 2016 a setembro de 2017.

Três espécies de plantas forrageiras: aveia branca (*Avena sativa* L.), *Brachiaria* (*Urochloa ruziziensis*) e milheto (*Pennisetum glaucum*), comumente encontradas na região oeste do Paraná, foram usadas para os estudos de avaliação da melhor resposta de interação com microrganismos associativos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com a partir de cinco tratamentos.

### 2.2 OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS

A assepsia das sementes foi realizada seguindo o protocolo sugerido por Camilios-Neto et al. (2014) modificado, onde as sementes foram lavadas com etanol 70% durante 2 min, seguida da lavagem com solução de hipoclorito acidificado (0,950 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 50 ml de NaOCl; 1,80 mL de HCl; 0,10 mL de Tween) sob constante agitação (120 rpm) por 5 min. As sementes foram lavadas 3 vezes com água destilada autoclavada e, estas foram deixadas em meio aquoso (200 mL de água destilada autoclavada) durante 3 h em estufa tipo B.O.D a 30 ± 2 °C. Após este período foi realizada novamente uma lavagem com hipoclorito acidificado por 5 min, seguida de solução de peróxido de hidrogênio (35%) por mais 5 min, seguidas por 3 lavagens em água destilada estéril. Finalizado este processo de assepsia, as sementes foram dispostas em placas Petri com meio ágar/água (6 g.L<sup>-1</sup> de ágar) e mantidas no escuro em estufa tipo B.O.D a 30 ± 2 °C para a completa germinação.

Os explantes foram retirados do meio ágar/água e passadas para tubos de ensaio contendo 25 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5,8, onde permaneceram por 21 dias em sala de crescimento sob condição de fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, com temperatura de 25°C ± 2°C.

## 2.3 ISOLADOS E PREPARO DO INÓCULO

Os isolados bacterianos utilizados para a inoculação pertencem à coleção do LABIOGEN, sendo caracterizados como: *Azospirillum brasiliense*, *Ensifer adhaerens*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Leclercia adecarboxylata*.

As bactérias *A. brasiliense*, *E. adhaerens*, *H. seropedicae* e *L. adecarboxylata* foram mantidas em placas com meio de cultura sólido específico para o crescimento bacteriano, sendo eles: NFb – lactado, LGD e JNFB e NFb – malato respectivamente, onde estas placas foram mantidas em estufa de crescimento bacteriano a 28°C para cultura estoque. O pré-inóculo foi preparado em tubo falcon de 50 mL, contendo 5 mL de meio de cultura (NFb- lactato para *A. brasiliense*; NFb – malato *H. seropedicae* e LB para *E. adhaerens* e *L. adecarboxylata*) e uma colônia bacteriana retirada das placas de meio sólido, os quais foram mantidos em uma incubadora tipo *Shaker* em uma temperatura de 28°C a 120 rpm por 24 h.

Para o preparo do inóculo foi utilizado 1,0 mL do pré-inóculo, adicionados a 50 mL de meio de cultura específico para cada bactéria em erlenmeyer de 250 mL, que foi mantido em uma incubadora tipo *Shaker* (28°C a 120 rpm por aproximadamente 22h). O crescimento bacteriano foi quantificado em espectrofotômetro (660 nm), onde o inóculo obtido apresentou a concentração de  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> para *E. adhaerens* e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> para as demais bactérias.

## 2.4 INOCULAÇÃO DAS PLÂNTULAS

Decorridas 24h da transferência das plântulas para os tubos de ensaio, as plântulas foram inoculadas com  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> (*E. adhaerens*) e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> para as demais bactérias. O inóculo foi centrifugado a 10000g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células bacterianas lavadas com solução salina e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi novamente retirado e as células foram ressuspensas com água peptonada (1%), sendo que cada plântula recebeu 3 µL desta solução. Para cada estirpe bacteriana e espécie vegetal foram inoculados 30 tubos de ensaio, organizados randomicamente na sala de cultivo. O grupo controle recebeu o mesmo procedimento, porém sem a presença de bactérias.

## 2.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

### 2.5.1 DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO, MASSA FRESCA E MASSA SECA

Foram escolhidos aleatoriamente 3 tubos de plantas de cada tratamento para a determinação dos parâmetros de crescimento vegetal como: comprimento total (cm), comprimento de parte aérea (cm) e comprimento de raiz (cm) usando régua graduada. Das mesmas plantas, foi obtido o peso fresco e seco da parte aérea (g) e raiz (g). O peso seco foi obtido pela secagem do material a 65°C em estufa por 72 h.

### 2.5.2 DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL (NT) E PROTEÍNA BRUTA (PB)

As partes aéreas de 30 plantas de cada tratamento foram coletadas, secas em estufa de secagem a 65°C por 72 h, separadas em três amostras de igual peso (triplicata) e reservadas para a análise de proteína bruta e nitrogênio total de acordo com o método de Kjeldahl descrito por Vogel (1992).

O nitrogênio total (NT) foi determinado pela seguinte equação:

$$NT = \frac{(Va - Vb) \times F \times 0,1 \times 0,014 \times 100}{P1}$$

Onde *NT* corresponde ao teor de nitrogênio total na amostra expresso em porcentagem; *Va* corresponde ao volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra, em mililitros; *Vb* corresponde ao volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco, em mililitros; *F* corresponde ao fator de correção para o ácido clorídrico 0,01 mol.L<sup>-1</sup> e *P1* corresponde a massa da amostra em gramas.

Para determinação da proteína bruta, multiplicou-se o valor do nitrogênio total encontrado por um fator que converte o nitrogênio em proteína, onde em plantas forrageiras, a PB é expressa pelo fator 6,25, considerando que a maioria das proteínas contém nas suas moléculas aproximadamente 16% de nitrogênio, seguindo a seguinte expressão:

$$PB = NT \times 6,25$$

### 2.5.3 CONTAGEM MICROBIANA

Após 21 dias de inoculação, 3 tubos com plantas de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente e submetidos a contagem microbiana epifítica e endofítica.

Todo o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar brevemente descrito: a raiz foi separada da parte aérea de cada planta. Na contagem epifítica, as raízes foram lavadas em água destilada e autoclavada, por 3 vezes, acondicionadas em tubos contendo solução de NaCl (0,9%) e levadas ao sonicador por 20 s. Desta solução salina, foram aliquoteados 100 µl e feitas 4 diluições em série. De cada diluição, foram plaqueadas 3 gotas de 5 µl cada, em meio específico para cada bactéria (NFB-Lactato, NFB-Malado, JNFB e LGD) sólido. As placas foram mantidas em estufa tipo B.O.D. por 48 h a  $30 \pm 2$  °C. As contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) obtidas foram realizadas em lupa estereoscópica (Quimis).

Para a contagem endofítica, as raízes da contagem epifítica foram imersas em solução de HgCl<sub>2</sub> 0,01% durante 30 s, lavadas por 3 vezes com água destilada e autoclavada, maceradas em solução salina (0,9%) e levadas ao sonicador durante 20 s. De modo similar ao descrito acima, foi realizada a diluição seriada e plaqueamento para a contagem epifítica.

### 2.5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS INOCULADAS

A confirmação molecular das espécies bacterianas foi realizada por amplificação, por PCR, de uma região pertencente a região do rDNA 16S, específica para cada bactéria utilizando par de primers específicos (TABELA 1).

Uma única colônia bacteriana, obtida a partir da contagem microbiana epifítica e endofítica geradas após inoculação (21 dias) foi transferida para um microtubo de PCR e ressuspendida em 20 µl de água ultra pura. As células foram lisadas por aquecimento a 96 °C por 6 min. O sobrenadante foi separado do lisado celular por breve centrifugação. A PCR foi realizada em um volume de 20 µl, utilizando 2 µl do DNA, Tampão de PCR 1x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM do mix de dNTP, 1 unidade da Taq DNA Polimerase (4G Pesquisa e Desenvolvimento) e 0,2 µM de cada primer. A

reação foi realizada em termociclador Bioer Life Express modelo MJ96. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose corados com brometo de etídeo a 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em Tampão TBE 1x (Tris-base 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0) e foto documentados em equipamento Loccus Biotecnologia LPIX. Foi utilizado padrão de tamanho molecular de 100 pb e 50 pb (Norgen<sup>TM</sup>).

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS E PARÂMETROS DA PCR

Bactéria	Sequência	Ciclo	pb
<i>A. brasiliense</i>	AZO-F (5'-GCGGTAATACGAAGGGGGCKF-3') AZO-R (5'-TTGTACCCGGCAGTTCCACCAG-3')	94°C → 3min	648
		94°C → 30s - 25 c	
		58°C → 1min	
		72°C → 1min	
<i>E.adhaerens</i>	ENS-F (5'-TCGGAATTACTGGGCCTAAA-3') ENS-R (5'-CGAACTGAAGGAATACATCTCTGTAAT-3')	72°C → 5min	480
		55°C → 3min	
		55°C → 30s - 25 c	
		58°C → 1min	
<i>H. seropedicae</i>	HERBAS1-F (5'-TTTCGCGGTAGGCGATCA-3') HERBAS1-R (5'-GAGCAATTGACCCGCAAGAC-3')	72°C → 1min	76
		72°C → 5min	
		94°C → 3min	
		94°C → 30s - 25 c	
<i>L. adecarboxylata</i>	LEC-F (5'-ATCAGATGTGCCAGATGG-3') LEC-R (5'-CAAGGGAACAACCTCCAAG-3')	54°C → 1min	601
		72°C → 1min	
		72°C → 5min	
		95°C → 4min	
<i>L. adecarboxylata</i>	LEC-F (5'-ATCAGATGTGCCAGATGG-3') LEC-R (5'-CAAGGGAACAACCTCCAAG-3')	95°C → 60s - 35 c	601
		58°C → 1min	
		72°C → 1min	
		72°C → 5min	

FONTE: O autor (2017).

### 2.5.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE RAÍZES

Para a determinação visual da superfície radicular, 3 raízes de plântulas de cada tratamento foram lavadas com água destilada e submergidas em solução de azul de metileno 1% por 3 min. O excesso de corante foi retirado com água destilada, parte das raízes foram dispostas em lâmina e coberta com lamínulas. As imagens foram capturadas em microscópio óptico com aumento de 10 vezes e analisadas através do programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 (MEDIA CYBERNETICS, 1999).

## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2006).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

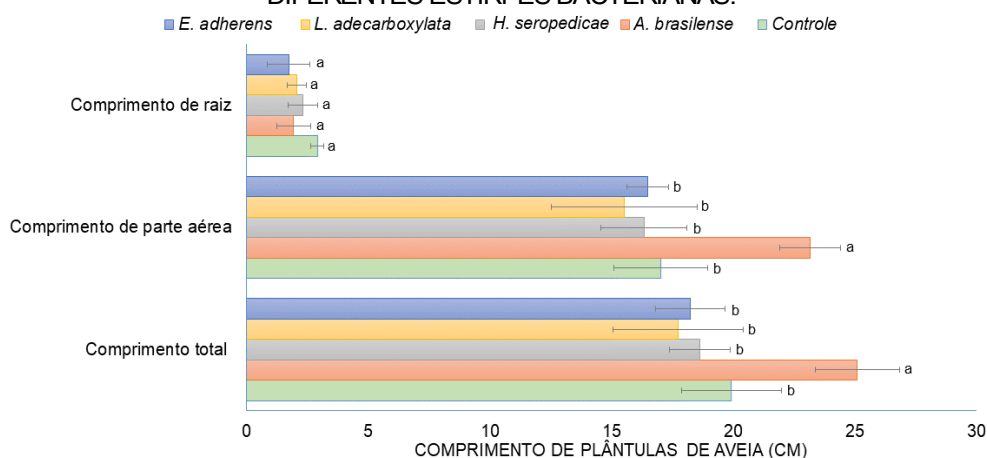
#### 3.1 DETERMINAÇÃO DOS ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS

Para a avaliação do crescimento de plantas de espécies forrageiras sob efeito de diferentes bactérias promotoras de crescimento, foram determinados o comprimento total, comprimento de parte aérea e comprimento de raiz de cada uma das espécies forrageiras.

Os dados obtidos para a aveia (*Avena sativum*) estão demonstrados na Figura 1. Não houve diferença significativa, em relação ao comprimento radicular das plântulas inoculadas com as diferentes estirpes. Porém, ao se tratar de comprimento total e comprimento de parte aérea *A. brasilense* promoveu um crescimento distinto em relação às outras cepas bacterianas usadas neste estudo onde as plântulas tiveram um aumento de 25% e 34% de comprimento total e de parte aérea, respectivamente. Pode-se observar que a aveia não apresentou crescimento reduzido pela presença das diferentes estirpes usadas como inoculantes, portanto, as mesmas não foram percebidas como potenciais patógenos pelas plantas nesta espécie forrageira (FIGURA 1).

Para esta espécie vegetal, as demais bactérias não promoveram resultados visuais distintos para o desenvolvimento da planta (FIGURA 2).

FIGURA 1 - ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE PLÂNTULAS DE AVEIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.



FONTE: O autor (2017)

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de tukey, à 5% de probabilidade (n=3).

FIGURA 2 - ASPECTO VISUAL DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.

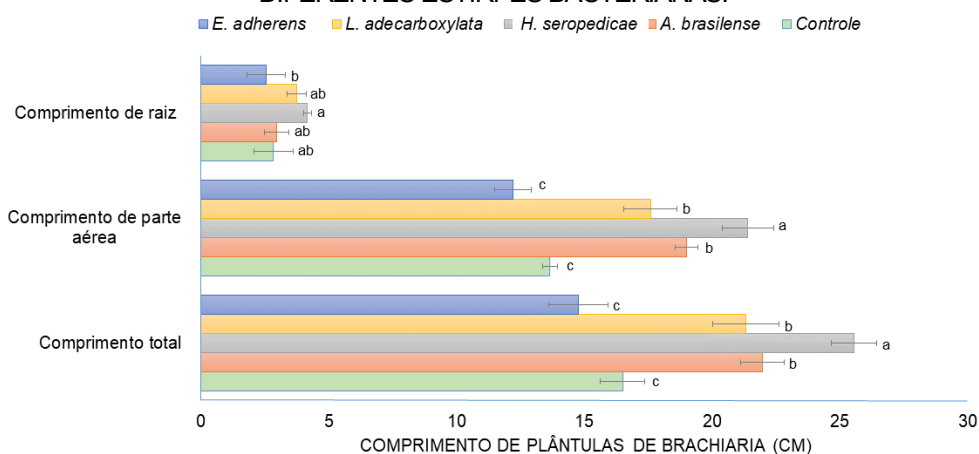


FONTE: O autor (2017).

(1) Aveia; (2) Brachiaria; (3) Milheto; plântulas inoculadas com (a) controle; (b) *A. brasilense*; (c) *H. seropedicae*; (d) *L. adecarboxylata*; (e) *E. adherens*.

Com relação a brachiaria foi observado um crescimento maior em presença da bactéria *H. seropedicae* com médias superiores ou iguais ao controle para todas as variáveis analisadas. Esta espécie também apresentou comprimento de planta e comprimento de parte aérea maiores quando inoculadas com as bactérias *A. brasilense* e *L. adecarboxylata* (FIGURA 3). Todavia, plântulas inoculadas com a estirpe *E. adherens* tiveram o comprimento radicular igual ao controle, porém visualmente inferior àquelas inoculadas com *H. seropedicae* (FIGURA 2).

FIGURA 3 - ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE PLÂNTULAS DE BRACHIARIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.

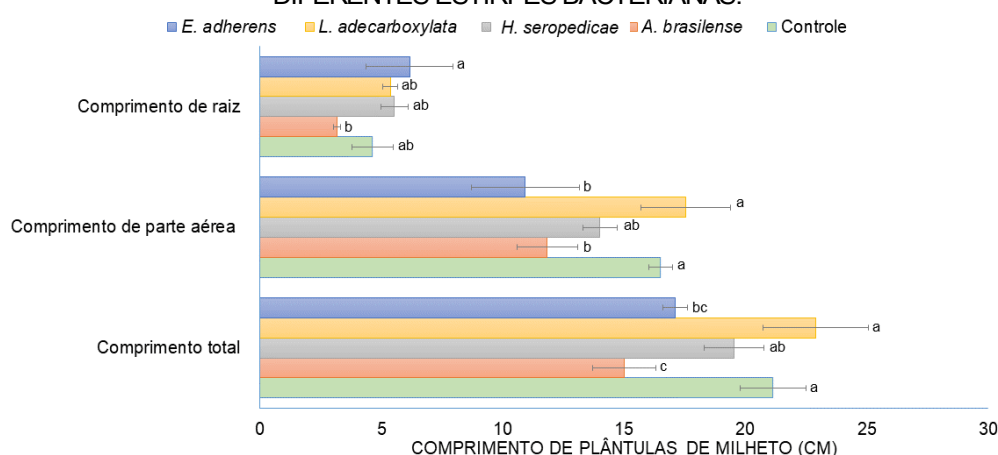


FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de tukey, à 5% de probabilidade (n=3).

A inoculação do milho com as diferentes estirpes bacterianas não rendeu acréscimos às características morfológicas de crescimento. *L. adecarboxylata*, *H. seropedica* e *E. adherens* mostraram resultados similares ao controle em relação ao comprimento total, radicular e da parte aérea das plântulas. Por outro lado, *A. brasilense* promoveu uma diminuição nas variáveis avaliadas demonstrando um efeito negativo no crescimento vegetal (FIGURAS 2 E 4).

FIGURA 4 - ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE PLÂNTULAS DE MILHETO INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.



Fonte: o autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de tukey, à 5% de probabilidade (n=3).

São poucos os trabalhos que relatam o efeito da inoculação de BPCV em forrageiras. Exceção são os trabalhos com capim da Tanzânia (*Panicum maximum*) e pensacola (*Panicum sauræ*) (MACHADO et al., 2013); e azéve (CASTANHEIRA et al., 2017). A determinação de plantas forrageiras modelo para uma associação

benéfica facilitará a determinação das melhores combinações, do mesmo modo como foi feito para cana-de-açúcar, arroz e trigo (VARGAS et al., 2012; GOMES et al., 2005; NEIVERTH et al, 2014).

O efeito benéfico da inoculação com *Azospirillum* ocorre em grande parte pela estimulação da produção de fitormônios, principalmente auxinas, tendo ação na expansão de células vegetais, resultando em maior crescimento (DINONET, 1993).

Corroborando com estes dados, Bilal et al. (2017) observaram que a aveia cultivada em solo e inoculada com *Azospirillum sp.* apresentou maior crescimento de planta, demonstrando uma eficiência positiva da inoculação para a cultura.

Shabaev, Smolin e Strekozova (1991) relataram que a inoculação de aveia com *Azospirillum sp.* aumentou o teor de nitrogênio no solo, equilibrando positivamente o sistema solo-planta, onde a atividade de fixação de nitrogênio foi maior em comparação com o tratamento sem inóculo, explicando assim, o melhor desenvolvimento de plantas inoculadas com esta bactéria. Outros autores descreveram os efeitos benéficos no crescimento vegetal de gramíneas com *Azospirillum sp.*: *Urochloa brizantha* (GUIMARÃES et al., 2011); milho (POONGUZHALI et al., 2005); trigo e cevada (DINONET, 2000; SILVA et al., 2004).

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento em brachiaria apontou que a estirpe *H. seropedicae* aumentou o porte e a produção destas plantas (REIS et al., 2004). Marques Júnior et al. (2008) constataram que em cana-de-açúcar, a inoculação com esta bactéria estimulou o desenvolvimento da parte aérea nesta espécie. Para Araújo (2013) a inoculação com a *H. seropedicae* em milho (*Zea mays*) teve influência no comprimento de raiz em relação ao controle não inoculado.

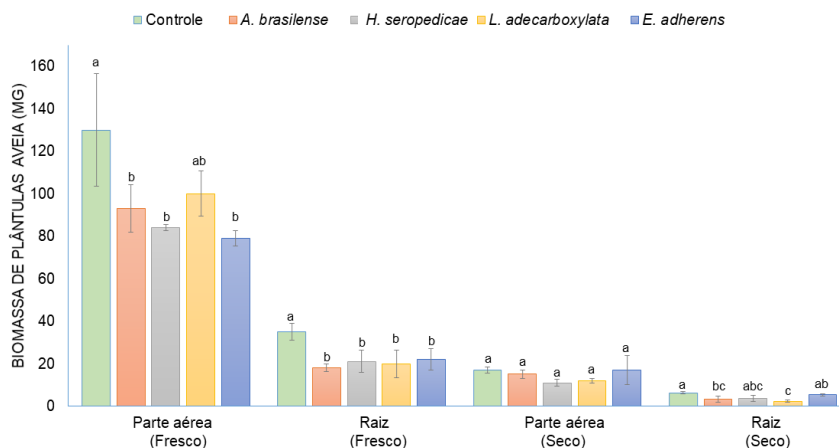
Apesar de *L. adecarboxylata* ser uma bactéria endofítica de milho, o seu efeito no crescimento vegetal ainda não foi relatado na literatura. Os dados obtidos apontam para uma promoção positiva principalmente na brachiaria e no milho em relação ao controle (FIGURAS 3 E 4). Por outro lado, Laili et al (2017) não observaram potencial de promoção de crescimento desta estirpe em plantas de morango.

### 3.2 MASSA SECA E FRESCA DAS PLÂNTULAS INOCULADAS

Nenhuma das diferentes estirpes estudadas, foi capaz de promover acréscimos na massa fresca e seca em plântulas de aveia. Plântulas controle apresentaram os maiores valores de biomassa com 35 e 6,3 mg (massa fresca e seca

de raiz, respectivamente) e 130 e 17 mg, de massa fresca e seca de parte aérea (FIGURA 5).

FIGURA 5 - BIOMASSA FRESCA E SECA (G) DE PLÂNTULAS DE AVEIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.

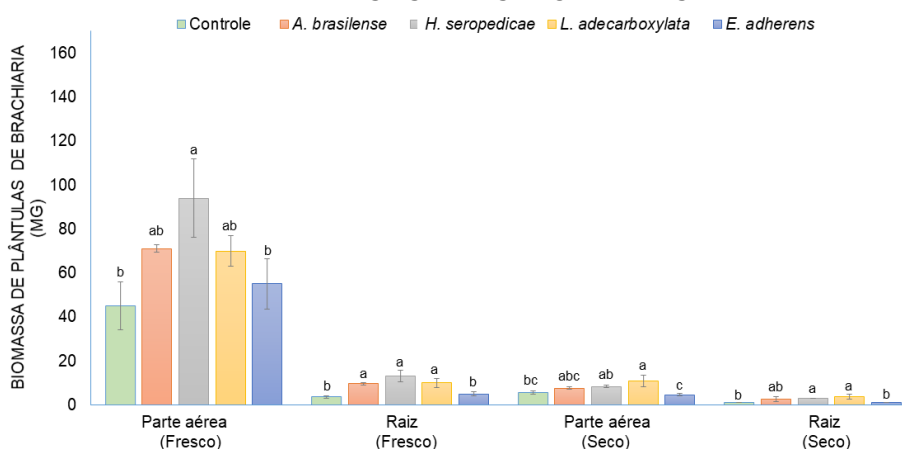


FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de tukey, à 5% de probabilidade. (n=3).

Os resultados foram distintos para a brachiaria, onde a inoculação com *H. seropedicae* promoveu aumentos significativos na biomassa fresca de raiz e parte aérea, bem como na biomassa seca de raiz comparado ao controle. Plantas de brachiaria inoculadas com *A. brasilense*, *H. seropedicae* e *L. adedecarboxylata* promoveram um aumento significativo em relação a biomassa fresca de raiz. (FIGURA 6).

FIGURA 6 - BIOMASSA FRESCA E SECA (G) DE PLÂNTULAS DE BRACHIARIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.



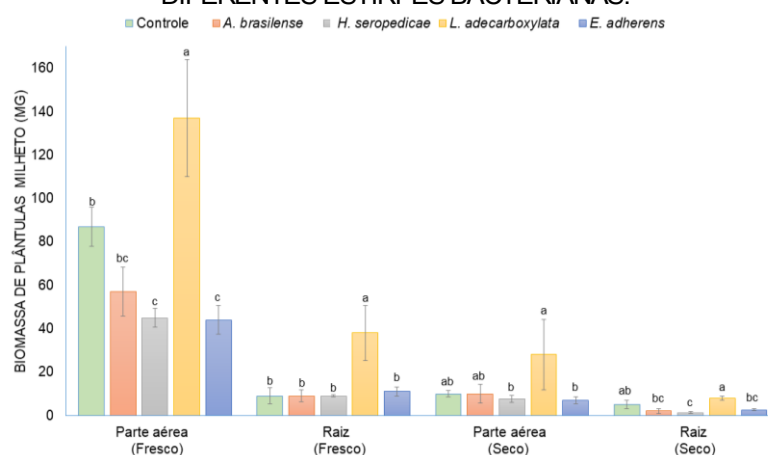
FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de tukey, à 5% de probabilidade.

De modo similar ao descrito para brachiaria, plântulas de milho inoculadas com as diferentes estirpes bacteriana, apresentaram performance distinta comparada ao controle e às diferentes espécies bacterianas. No milho, *L. adecarboxylata* promoveu acréscimos significativos nas massas fresca e seca de raízes (320 e 60%, respectivamente) e massa fresca e seca de parte aérea (50 e 180%, respectivamente), sendo considerada a melhor condição de fertilização/inoculação para esta espécie vegetal.

Por outro lado, *H. seropedicae* e *E. adherens* diminuíram a massa fresca da parte aérea e massa seca radicular (na ordem de 2 e 1,4 vezes, respectivamente para ambas as bactérias), provando serem prejudiciais à esta espécie (FIGURA 7).

FIGURA 7 - BIOMASSA FRESCA E SECA (G) DE PLÂNTULAS DE MILHETO INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.



FONTES: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de tukey, à 5% de probabilidade.

Em plantas de arroz, a inoculação com *Azospirillum* pode aumentar a massa seca em até 100%, variando esta porcentagem de acordo com a cultivar (GUIMARÃES et al., 2013).

No milho, Araújo et al. (2013) demonstraram que a inoculação com a *H. seropedicae* influenciou positivamente no volume de massa de raiz e massa seca da parte aérea, onde plantas inoculadas com esta estirpe apresentaram incremento na ordem de 33,02% no volume de raiz. A produção de massa seca da parte aérea foi 24,74% maior em relação ao controle sem inoculação.

Resultados obtidos por Baldani et al. (2000) mostraram que a inoculação de estirpes pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* aumentaram em até 100% a massa fresca de plantas de arroz quando comparados com o controle.

Dados obtidos em gramíneas para o efeito de *L. adecarboxylata* na biomassa ainda não foram relatados na literatura. Bergottini et al. (2015) demonstram que a inoculação com a bactéria *E. adherens* aumentou significativamente a biomassa de plantas de erva mate (*Ilex paraguariensis*).

### 3.3 PROTEÍNA BRUTA (PB) E NITROGÊNIO TOTAL (NT)

As concentrações de PB e NT, nas plântulas avaliadas sob inoculação com as diferentes estirpes avaliadas, foram distintas nos diferentes tratamentos e espécies forrageiras avaliadas (TABELA 2). Na aveia, a presença das bactérias *A. brasilense*, *H. seropedicae* e *L. adecarboxylata* elevaram os níveis de PB e NT disponíveis para a planta. A inoculação com *E. adherens* não promoveu incrementos significativos nestas variáveis.

Na brachiaria, a inoculação com bactérias promoveu uma diminuição nos níveis de PB e NT (TABELA 2). Apesar destas plântulas terem apresentado maior área de parte aérea, os níveis de PB e NT foram menores nas plântulas nos diferentes tratamentos.

No milho, os valores de PB e NT não foram alterados significativamente pela presença de bactérias (TABELA 2).

TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA (PB) E NITROGÊNIO TOTAL (NT) EM PLANTAS DE DIFERENTES ESPÉCIES FORRAGEIRAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.

Tratamento	Aveia		Brachiaria		Milheto	
	PB (%)	NT (%)	PB (%)	NT (%)	PB (%)	NT (%)
Controle	26 ± 1,6 (c)	4 ± 0,25 (c)	34 ± 0,1 (a)	5 ± 0,01 (a)	30 ± 2,45 (a)	5 ± 0,39 (a)
<i>A. brasilense</i>	39 ± 1,3 (a)	6 ± 0,22 (a)	24 ± 0,1 (e)	4 ± 0,01 (e)	31 ± 0,45 (a)	5 ± 0,07 (a)
<i>H. seropedicae</i>	31 ± 1,2 (b)	5 ± 0,19 (b)	32 ± 0,12 (c)	5 ± 0,02 (c)	33 ± 0,11 (a)	5 ± 0,01 (a)
<i>L. adecarboxylata</i>	34 ± 0,7 (b)	5 ± 0,11 (b)	27 ± 0,08 (d)	4 ± 0,01 (d)	32 ± 0,96 (a)	5 ± 0,15 (a)
<i>E. adherens</i>	24 ± 0,9 (c)	4 ± 0,14 (c)	32 ± 0,04 (b)	5 ± 0,006 (b)	33 ± 0,05 (a)	5 ± 0,008 (a)

FONTE: O autor (2017).

Brasil et al (2005) não observaram diferenças no conteúdo de NT e PB em plantas de brachiaria inoculadas com *Azospirillum*, antes de 60 dias de inoculação. Em contrapartida, Guimarães et al (2013) e Gazola et al. (2015) relataram que plantas de *Brachiaria decumbens* inoculadas com *Azospirillum* apresentaram valores de NT aumentados em comparação a plantas não inoculadas. Este aumento nos teores de

NT e PB são interessantes, uma vez que para ruminantes, são consideradas deficientes as pastagens com teores abaixo 7% de PB na matéria seca (MINSON e MCDONALD, 1986).

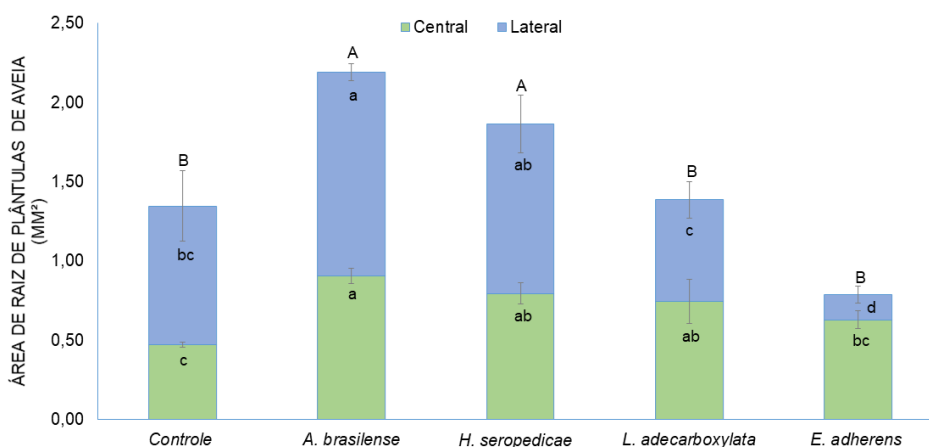
Santos (2013) relata aumentos na PB pela inoculação de *Herbaspirillum sp.* em capim marandu (*Urochloa brizantha*) sendo observado um aumento de 0,7% de PB em relação ao controle.

### 3.4 AVALIAÇÃO DA ÁREA RADICULAR

A área radicular em plântulas de aveia sob inoculação com *A. brasilense* e *H. seropedicae* foi maior, tanto na área da raiz principal, como pelo aumento de raízes laterais. *A. brasilense* promoveu incrementos significativos, aumentando a área radicular lateral (FIGURA 8).

De modo contrastante, a interação das plântulas de aveia com a bactéria *E. adherens* foi negativa, diminuindo a área radicular lateral (FIGURA 11).

FIGURA 8 - ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE AVEIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS USANDO O PROGRAMA IMAGE-PRO PLUS.



FONTE: O autor (2017).

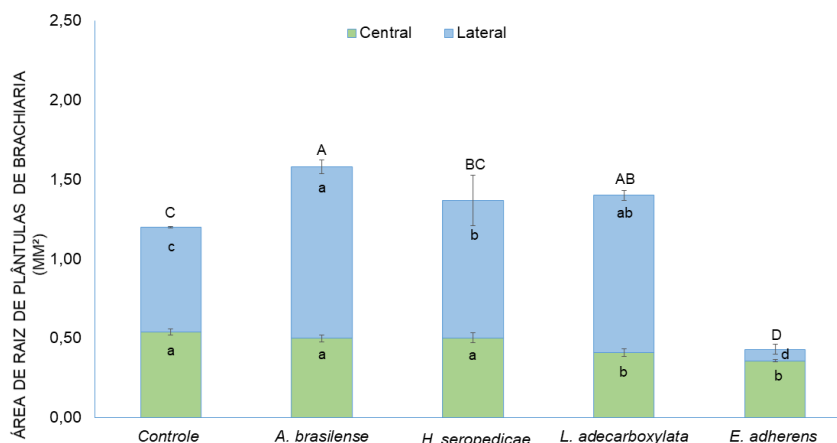
Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade (n=3). Letras minúsculas distinguem as médias para raiz central e lateral. Letras maiúsculas distinguem as médias da raiz total das plantas.

A área radicular de plântulas de brachiaria sob inoculação com diferentes estirpes bacterianas está demonstrada na Figura 9. As estirpes *A. brasilense*, *H. seropedicae* e *L. adecarboxylata* promoveram aumentos significativos na superfície radicular, sendo que os maiores incrementos foram na região de raízes laterais. Estes aumentos na área total radicular foram de 31; 14 e 16%, respectivamente para *A.*

*brasiliense*, *H. seropedicae* e *L. adecarboxylata* e, 63; 31 e 5% vezes para área de raízes laterais em relação ao grupo controle.

*E. adherens* diminuiu a área de raízes de plântulas de aveia, onde a área total e de raízes laterais foi de 65 e 90% menor, respectivamente, em relação ao controle (FIGURA 11).

FIGURA 9 - ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE BRACHIARIA INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS USANDO O PROGRAMA IMAGE-PRO PLUS.

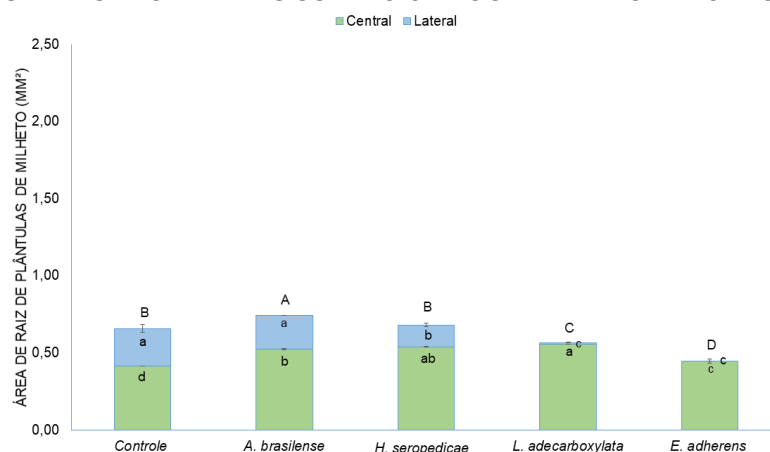


FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade (n=3). Letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas para raiz central e lateral. Letras maiúsculas distinguem as médias da raiz total das plantas.

A área radicular do milho foi proporcionalmente menor em relação às duas espécies forrageiras avaliadas neste trabalho (FIGURA 10). *A. brasiliense* promoveu os maiores acréscimos na área total de raiz e de raízes laterais. Já, *L. adecarboxylata* apesar de aumentar a área da raiz central, promoveu a inibição do desenvolvimento de raízes laterais. Quando *E. adherens* foi usada como inoculante, ocorreu a inibição quase que total das raízes laterais em plântulas de milho (FIGURA 11).

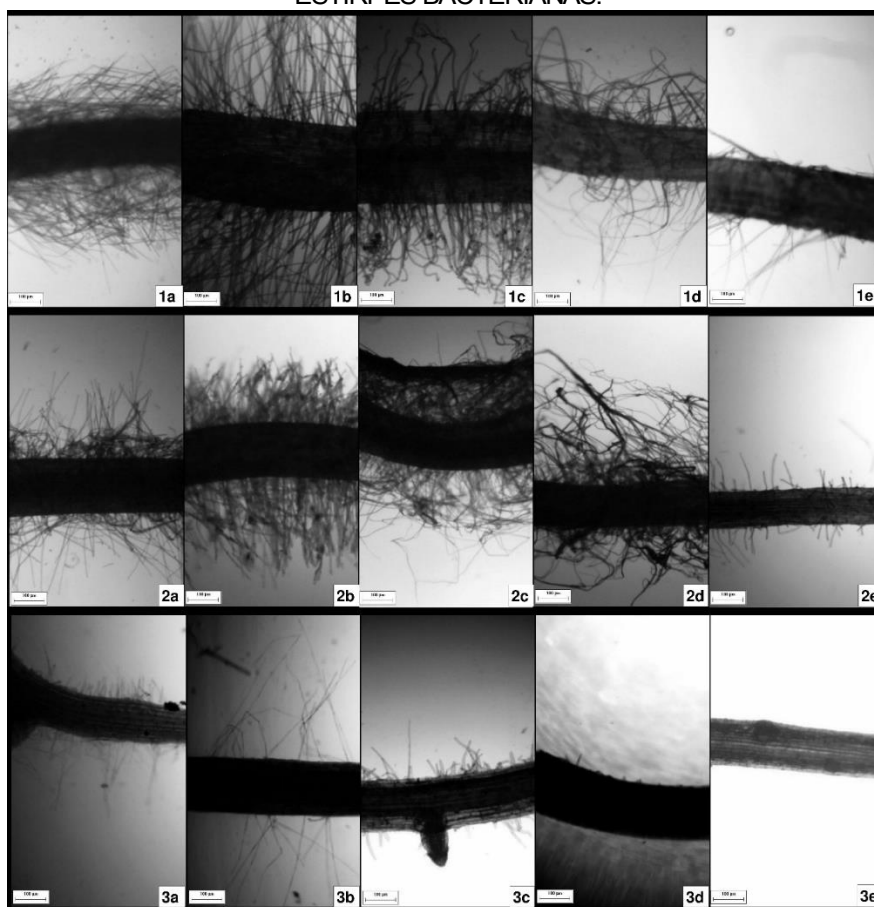
FIGURA 10 - ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE MILHETO INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS USANDO O PROGRAMA IMAGE-PRO PLUS.



FUNTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade (n=3) letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas para raiz central e lateral. letras maiúsculas distinguem as médias da raiz total das plantas.

FIGURA 11 - ASPECTO VISUAL DE RAÍZES DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.



FUNTE: O autor (2017).

(1) Aveia; (2) Brachiaria; (3) Milheto; plântulas inoculadas com (a) controle; (b) *A. brasilense*; (c) *H. seropedicae*; (d) *L. adecarboxylata*; (e) *E. adherens*.

A inoculação com bactérias, pode modificar a morfologia do sistema radicular de plantas, podendo aumentar o número e o diâmetro de raízes laterais e adventícias, pela produção de fitohormônios (auxinas, giberilinas e citocininas) pelas bactérias, além de auxiliarem na fixação biológica de nitrogênio (CAVALLET et al., 2000; SILVA et al., 2004).

O incremento de área no sistema radicular pode também proporcionar à planta, maior longevidade dos tecidos verdes, que conseqüentemente aumentam a atividade fotossintética, melhorando o desenvolvimento e produção das plantas (DIDONET et al., 1996).

Para Bilal et al. (2017) a inoculação com *Azospirillum sp.* aumentou a superfície radicular, através da formação de raízes laterais, aumentando assim a absorção de nutrientes e água.

*L. adecarboxylata* não promoveu incrementos na área radicular. Segundo Laili, Radziah e Zaharah (2017) a estirpe possui a capacidade de aumentar a área de raízes de morango, através do aumento do diâmetro e do número de raízes.

### 3.5 CONTAGEM MICROBIANA

Para a comprovação da real associação planta x bactéria, foi realizada a contagem do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) endofiticamente associadas às forrageiras. Como era esperado, em todas as espécies avaliadas, o controle não apresentou população epi ou endofítica. Para a aveia e milho, todos os tratamentos, apresentaram bactérias epifiticamente aderidas às raízes das plantas, comprovando que a associação pela inoculação ocorreu. No entanto, apenas a estirpe *H. seropedicae* foi encontrada endofiticamente aderida às plântulas destas duas espécies forrageiras, demonstrando uma especificidade desta estirpe com estas gramíneas. As maiores populações epifíticas bacterianas encontradas foram de *A. brasilense* e *H. seropedicae*.

Do mesmo modo, na brachiaria, todos os tratamentos apresentaram população epifítica. Apenas *H. seropedicae* e *L. adecarboxylata* foram observadas endofiticamente aderidas (TABELA 3).

TABELA 3 - CONTAGEM MICROBIANA DE BACTÉRIA ADERIDAS EPI E ENDOFITICAMENTE A RAÍZES DE AVEIA *IN VITRO* INOCULADAS COM DIFERENTES BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

Tratamento	Aveia		Brachiaria		Milheto	
	Epifíticas	Endofíticas	Epifíticas	Endofíticas	Epifíticas	Endofíticas
	UFC.mL <sup>-1</sup>		(UFC.mL <sup>-1</sup> )		(UFC.mL <sup>-1</sup> )	
Controle	0	0	0	0	0	0
<i>A. brasilense</i>	19±0,13(a)	0	33±0,33(b)	0	16 ±0,63(b)	0
<i>H. seropedicae</i>	18±0,43(a)	3±0,40(a)	39±0,6(a)	28±0,17(a)	30±0,28(a)	14,77 ± 0,33 (a)
<i>L. adecarboxylata</i>	2±0,13(b)	0	9±0,36(c)	1±0,11(b)	0,5±0,07(d)	0
<i>E. adherens</i>	1±0,04(c)	0	5±0,3(d)	0	3±0,48(c)	0

FONTE: O autor (2017).

Apesar de Chavarria e Mello (2011) terem relatado que bactérias do gênero *Azospirillum* ocorrem no interior de raízes, entre os espaços intercelulares ou até dentro de algumas células da raiz, estas bactérias só foram observadas epifiticamente aderidas em todas as forrageiras avaliadas, demonstrando que o genótipo pode influenciar na localização bacteriana.

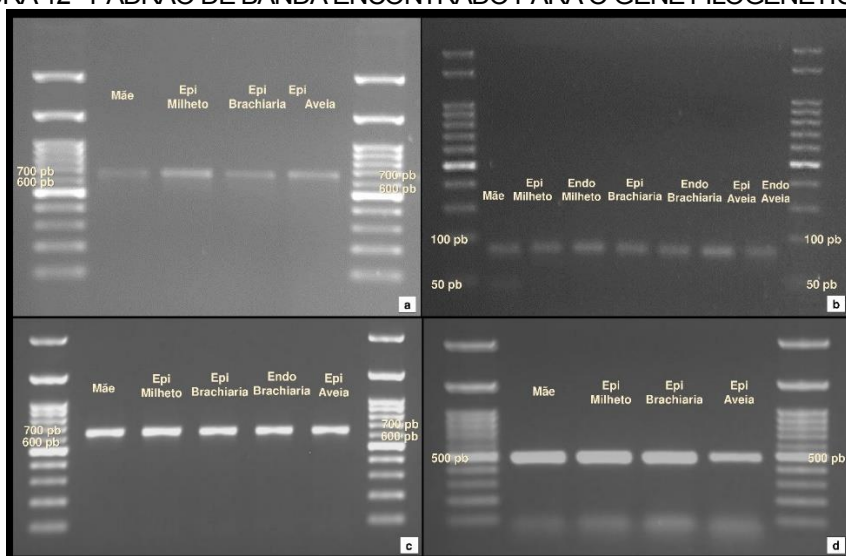
Estudos mostram que espécie *H. seropedicae* possui a capacidade de colonizar o interior e a parte aérea dos tecidos vegetais (BALDANI et al., 1997). Este dado corrobora com os resultados observados em que esta estirpe apresenta grande capacidade de interagir e penetrar ou permear o tecido vegetal em todas as espécies vegetais avaliadas.

O gênero *Ensifer* pertence à família Rhizobiaceae, a qual tem maior afinidade por leguminosas pertence à família Fabaceae (ALVES et al., 2014) fato que pode explicar a ausência destas bactérias endofiticamente aderidas em pastagens, pertencentes à família *Poaceae*.

Estudos mostram que a bactéria *L. adecarboxylata* foi isolada epifiticamente aderida à raízes de morango, bem como, endofiticamente presente em raízes de milho (FAGOTTI et al., 2012; LAILI, et al., 2017). Porém, pode-se observar uma afinidade distinta com a brachiaria sendo encontrada epi e endofiticamente aderida.

Como era esperado, todas as espécies bacterianas apresentaram o padrão de banda esperado para o gene filogenético 16S confirmando a presença das diferentes estirpes no tecido radicular (FIGURA 12).

FIGURA 12 - PADRÃO DE BANDA ENCONTRADO PARA O GENE FILOGENÉTICO 16S



FONTES: O autor (2017).

- (a) *A. Brasilense*, onde o peso molecular para esta espécie é de 648pb; (b) *H. Seropedica*, onde o peso molecular para esta espécie é de 76pb; (c) *L. Adecarboxylata*, onde o peso molecular para esta espécie é de 601pb; (d) *E. Adherens*, onde o peso molecular para esta espécie é de 480pb.

#### 4 CONCLUSÃO

1. As diferentes espécies forrageiras apresentaram comportamento distinto em relação à associação com as estirpes bacterianas. A aveia e a brachiaria foram consideradas como mais responsivas à associação bacteriana que o milho por terem apresentado um incremento maior no tamanho de raízes central/lateral e área radicular.

2. Apesar da aveia ter apresentado resultados significativos para PB e NT, a brachiaria apresentou uma maior população epi e endofítica, apontando ser preferencial para as bactérias.

3. Aliado ao fato de que, poucos estudos de interação com bactérias são encontrados nesta espécie e, por ser economicamente importante e amplamente utilizada como forrageira, a mesma foi escolhida como modelo para os estudos subsequentes neste projeto.

## REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal Of King Saud University - Science**, [S.l.], v. 26, n. 1, p.1-20, jan. 2014.
- ALVES, L. M. C. et al. The Family *Rhizobiaceae*. **The Prokaryotes**, [S.l.], p.419-437, 2014.
- ARAÚJO, G. **A evolução da produção de inoculantes no Brasil**. 2016. Elaborada por Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br>>. Acesso em: 02 nov. 2017.
- BALDANI, J. I. et al. RECENT ADVANCES IN BNF WITH NON-LEGUME PLANTS. **Soil Biology and Biochemistry**, Great Britain, v. 29, n. 6, p.911-922, 1997.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility Of Soils**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p.485-491, 2000.
- BERG, G.; HALLMANN, J. Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. **Soil Biology**, [S.l.], p.53-69, 2006.
- BERGOTTINI, V. M. et al. Bio-inoculation of yerba mate seedlings (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) with native plant growth-promoting rhizobacteria: a sustainable alternative to improve crop yield. **Biology And Fertility of Soils**, [S.l.], v. 51, n. 6, p.749-755, 9 abr. 2015.
- BILAL, M. et al. Dry matter yield and forage quality traits of oat ( *Avena sativa* L.) under integrative use of microbial and synthetic source of nitrogen. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, [S.l.], v. 16, n. 3, p.236-241, jul. 2017.
- BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L. (Ed.) Methods of soil analysis. Madison: **Soil Science Society of America**, p.595 – 624. 1982.
- BRASIL, M. da S. Ocorrência e diversidade de Bactérias diazotróficas associadas a Gramíneas Forrageiras do Pantanal Sul Mato-grossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 2, p. 179-190. 2005.
- BULGARELLI, D. et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review Of Plant Biology**, [S.l.], v. 64, n. 1, p.807-838, 29 abr. 2013.
- CAMILIOS-NETO, D. et al. Dual RNA-Seq Transcriptional Analysis of Wheat Roots Colonized by *Azospirillum Brasilense* Reveals up-Regulation of Nutrient Acquisition and Cell Cycle Genes. **BMC Genomics**, [S.l.], v. 1, n. 15, p.378. 2014.

CASTANHEIRA, N. L. et al. Colonization and beneficial effects on annual ryegrass by mixed inoculation with plant growth promoting bacteria. **Microbiological Research**, [S.I.], v. 198, p.47-55, maio 2017.

CAVALLET, L. E. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p.129-132, 2000.

CHAVARRIA, G.; MELLO, N. de. Bactérias do gênero *Azospirillum* e sua relação com gramíneas. **Revista Plantio Direto**, [S.I.], v. 125, n. 1, p.1-6, out. 2011. Disponível em: <<http://www.plantiodireto.com.br>>. Acesso em: 17 out. 2017.

DIDONET, A. D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M. H. Acúmulo de Nitrogênio e de massa seca em plantas de Trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 9, p.645-651, set. 1996.

EMBRAPA, 2014. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/960416/1/COT155.pdf>. Acesso em 15 out 2017.

FAGOTTI, D. S. L. et al. Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas de Milho em Cultivos Convencional e Agroecológico. In: FERTBIO 2012, 1., 2012, Maceió. **Anais...** Maceió: Sociedade Brasileira de Ciência de Solo, 2012. p. 1 - 4.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 5.6**. Lavras, MG, Brazil: Universidade Federal de Lavras. 2006, Software.

FILHO, M. B. D. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**. 2014. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 12 out. 2017.

GAZOLA, T. et al. Efeitos da inoculação de *Azospirillum brasilense* em área de pastagem. **Unimar Ciências**, Marília, v. 24, n. 2, p.40-48, 2015.

GLICK, B. R. et al. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal Of Plant Pathology**, [S.I.], v. 119, n. 3, p.329-339, 5 jul. 2007.

GOMES, A. A. et al. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p.1105-1113, nov. 2005.

GUIMARÃES, S. L. et al. Crescimento inicial de plantas de arroz inoculadas com *Azospirillum* spp. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, [S.I.], v. 11, n. 567, p.45-50, 2013.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. 2011. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 12 out. 2017.

JÚNIOR M. et al. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 3, p.1121-1128, jun. 2008.

KASIM, W. A. et al. Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth-Promoting Bacteria. **Journal Of Plant Growth Regulation**, [S.l.], v. 32, n. 1, p.122-130, 22 jun. 2012.

KISIEL, A.; KEPCZYNSKA, E. *Medicago truncatula* Gaertn. as a model for understanding the mechanism of growth promotion by bacteria from rhizosphere and nodules of alfalfa. **Planta**, [S.l.], v. 243, n. 5, p.1169-1189, 10 fev. 2016.

LAILI, N. S.; RADZIAH, O; ZAHARAH, S. S. Isolation and characterization of plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on growth of strawberry (*Fragaria ananassa duch.*). **Journal of Botany**, Bangladesh, v. 46, n. 1, p.277-282, mar. 2017.

MACEDO, M. C. M. et al. Degradação de pastagens, alternativas de recuperação e renovação, e formas de mitigação. In: ENCONTRO DE ADUBAÇÃO DE PASTAGENS DA SCOT CONSULTORIA - TEC - FÉRTIL, 1., 2013, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** 2013. p. 158-181.

MACHADO, R. G. et al. Indoleacetic Acid Producing Rhizobia Promote Growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*). **International Journal Of Agriculture & Biology**, [S.l.], v. 15, n. 1, p.827-834, 2013.

MARTHA, G. B.; ALVES, E.; CONTINI, E. Land-saving approaches and beef production growth in Brazil. **Agricultural Systems**, [S.l.], v. 110, p.173-177, jul. 2012.

MEDIA CYBERNETICS, **Image-Pro Plus 4.5.0.29**, Silver Spring, MD, USA: Roper Technologies, 1999. Software.

MINSON, D. J.; MCDONALD, C. K. Estimating forage intake from the growth of beef cattle. **Tropical Grasslands**, [S.l.], v. 21, n. 3, p.116-122, set. 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NEIVERTH, A. et al. Performance of different wheat genotypes inoculated with the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **European Journal Of Soil Biology**, [S.l.], v. 64, p.1-5, set. 2014.

POONGUZHALI et al. Effects of Co-Cultures, Containing N-Fixer and P-Solubilizer, on the Growth and Yield of Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) and Blackgram (*Vigna mungo* L.). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 15, n. 4, p.903-908, 2005.

- REIS, V. M. **Recomendação de inoculante para cultura de milho utilizando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR 11417**. 2009. Comunicado Técnico 119, Seropédica, RJ, novembro, 2009. Publicado por EMBRAPA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 05 nov. 2017.
- RICHARDSON, A. E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant And Soil**, [S.l.], v. 321, n. 1-2, p.305-339, 27 fev. 2009.
- ROESCH, L. F. W. et al. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.l.], v. 22, n. 9, p.967-974, 4 mar. 2006.
- ROESCH, L. F. W. et al. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p.924-927, ago. 2005.
- ROGEL, M. A. et al. Nitrogen-Fixing Nodules with *Ensifer adhaerens* Harboring *Rhizobium tropici* Symbiotic Plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 67, n. 7, p.3264-3268, 1 jul. 2001.
- SANTOS, O. O. et al. Desempenho ecofisiológico de milho, sorgo e braquiária sob déficit hídrico e reidratação. **Bragantia**, [S.l.], v. 73, n. 2, p.203-212, 3 jun. 2013.
- SHABAEV, V. P.; SMOLIN, V. Y.; STREKOZOVA, V. I. The effect of *Azospirillum brasilense* Sp7 and *Azotobacter chroococcum* on nitrogen balance in soil under cropping with oats (*Avena sativa* L.). **Biology And Fertility of Soils**, Pushchino, v. 10, n. 1, p.290-292, jan. 1991.
- VARGAS, W. A. et al. Plant Defense Mechanisms Are Activated during Biotrophic and Necrotrophic Development of *Colletotricum graminicola* in Maize. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 158, n. 3, p.1342-1358, 12 jan. 2012.
- VINAGRE, F. et al. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant–N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacteria association. **Journal Of Experimental Botany**, [S.l.], v. 57, n. 3, p.559-569, 5 jan. 2006.
- VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. Tradução: Horácio Macedo. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1992. 712p.
- VORPAGEL, A. G. **Inoculação de *Azospirillum*, isolado e associado à bioestimulante, em milho, no Noroeste do RS, 2012**.

## CAPÍTULO 2: ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA SIMULAÇÃO DE ESTRESSE OSMÓTICO EM PLANTAS FORRAGEIRAS

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para simulação de estresse osmótico em plantas forrageiras, para isso, foram utilizadas três espécies de forrageiras comumente encontradas na região oeste do Paraná, sendo elas: aveia branca (*Avena sativa* L.); brachiaria ruziziensis (*Urochloa ruziziensis*) e milho (*Pennisetum glaucum*). As sementes pré-germinadas foram colocadas em tubos de ensaio contendo 25 mL de meio MS acrescido com Polietilenoglicol (PEG – 6000) em diferentes potenciais, sendo eles 0; -0,1; -0,2; -0,3 e -0,4 MPa (0; 78,498; 119,57; 151,41 e 178,34 g.L<sup>-1</sup> respectivamente) com um delineamento inteiramente casualizado. Após 13 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados o comprimento, peso fresco e seco da biomassa de parte aérea e raiz, a morfologia das raízes por coloração com azul de metileno 1% e abertura e fechamento dos estômatos. Os dados foram submetidos a ANOVA e comparados pelo teste Tukey ( $p > 5\%$ ). Os resultados obtidos mostraram que a concentração de PEG - 6000 na simulação do déficit hídrico de potencial -0,4 MPa foi limitante para todas as forrageiras, sendo o potencial -0,3 MPa que melhor representou o déficit hídrico. Neste caso, os resultados foram significativos e menores para as variáveis de comprimento, peso fresco da parte aérea e de raiz e peso seco de raiz. Foi observado também um maior crescimento de raízes laterais e os estômatos apresentaram-se fechados, enquanto no grupo controle, irrigados no mesmo período, permaneceram abertos. Como conclusão para todas as gramíneas avaliadas, a concentração de potencial -0,3 MPa é a que melhor simula o déficit hídrico para plantas *in vitro*.

Palavras-chave: Déficit hídrico. Estresse osmótico. PEG-6000

## ABSTRACT

The objective of this work is to establish a protocol for simulating stress in forage, for this, three forage species commonly found in the western region of Paraná were used: White oat (*Avena sativa* L.); Brachiaria ruziziensis (*Urochloa ruziziensis*) and Millet (*Pennisetum glaucum*). The pre-germinated seeds were placed in test tubes containing 25 mL of MS medium supplemented with Polyethylene Glycol (PEG-6000) in different potentials: 0; -0.1; -0.2; -0.3 and -0.4 MPa (0; 78.49; 119.57; 151.41 and 178.34 g / L respectively). After 13 days of *in vitro* cultivation, the following factors were evaluated: length, fresh and dry weight of shoot and root biomass, the morphology of roots by staining with 1% methylene blue and opening and closing of the stomata. Data were submitted to ANOVA and compared by the Tukey test ( $p > 5\%$ ). The results showed that the concentration of PEG - 6000 in the simulation of the potential water deficit - 0,4 MPa was limiting for all forages, while the - 0.3 MPa potential best represented the water deficit. In this case, the results were significant and smaller for the variables of length, fresh weight of shoot and root and dry weight of root. It was also observed a greater growth of lateral roots and the stomata were closed, whereas in the control group, irrigated in the same period, they remained open. As conclusion for all evaluated grasses, the potential concentration -0.3 MPa is the one that best simulates the water deficit for plants *in vitro*.

Key-words: Water déficit. Osmotic stress. PEG-6000.

## 1 INTRODUÇÃO

As gramíneas participam de forma importante na alimentação animal, geralmente as forrageiras estão em áreas com ampla restrição para o cultivo, como em solos com alta declividade, arenosos ou sujeitos a alagamentos, onde estão submetidas a constantes estresses causados por altas temperaturas, déficit hídrico, radiação solar e deficiência de nutrientes que limitam a produção e a qualidade nutricional das mesmas (BEELEN; PEREIRA FILHO; BEELEN, 2008; PEREIRA et al., 2009).

O conhecimento do comportamento da planta forrageira em condições de estresse hídrico pode, portanto, ser de grande importância prática para auxiliar no entendimento dos efeitos do período seco na produção de forragem, possibilitando, assim, o uso de práticas de manejo que tornem possível a melhor utilização do pasto durante esse período (DIAS FILHO et al., 1989).

O cultivo *in vitro* é muito utilizado para o estudo do estresse em plantas, pois minimiza as variações ambientais, onde o meio de cultura utilizado será o adequado para a cultura: a aplicação do estresse pode ser feita de forma controlada e homogênea, além de permitir a otimização de estudos com grandes populações em um espaço pequeno e em pouco tempo (HASSANEIN, 2010).

Está bem estabelecido que o stress da seca prejudica numerosos processos metabólicos e fisiológicos em plantas (LEVITT, 1980). O estresse hídrico pode ser simulado pela aplicação de agente osmótico *in vitro*. Esta metodologia tem sido adotada em programas de melhoramento genético vegetal com o objetivo de obter genótipos tolerantes à seca, (GIROTTTO et al., 2012).

Entre as substâncias mais utilizadas para a simulação do estresse hídrico, está o polietilenoglicol (PEG) que pode mudar o potencial osmótico da solução de cultivo vegetal (VASQUEZ, 1995). O PEG é um agente osmótico que não apresenta efeitos adversos às plantas, por ser quimicamente inerte, não tóxico, possuir elevado peso molecular e uma difícil absorção (BRACCINI et al., 1998; MORAES; MENEZES, 2003). Pelo fato do PEG não entrar no apoplasto, a água é retirada da célula e da parede celular, imitando com mais acurácia o solo seco do que soluções de baixo potencial osmótico (VERSLUES; OBER; SHARP, 1998).

O PEG já foi utilizado para simulação do estresse *in vitro* em girassol (BARROS; ROSSETTO, 2009), trigo (GIROTTTO et al., 2012, FURLAN et al., 2014;

KACEM et al., 2017) e mamona (MORAES et al., 2015) entre outras. Em forrageiras já foi utilizada para a verificação do potencial germinativo de espécies africanas (*Anthephora pubescens*, *Heteropogon contortus* e *Themeda triandra*) (BERG; ZENG, 2006).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia de simulação de déficit hídrico *in vitro* em plantas forrageiras e avaliar por parâmetros morfofisiológicos qual a espécie forrageira de melhor performance.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO E ESPÉCIES SELECIONADAS

Os experimentos foram realizados no laboratório de bioquímica e genética (LABIOGEN) da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, no período de março de 2016 a setembro de 2017.

Três espécies de plantas forrageiras: aveia branca (*Avena sativa* L.), Brachiaria (*Urochloa ruziziensis*) e milheto (*Pennisetum glaucum*), comumente encontradas na região oeste do Paraná, foram usadas para os estudos de avaliação da melhor resposta de interação com microrganismos associativos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com a partir de cinco tratamentos.

### 2.2 OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS

A assepsia das sementes foi realizada seguindo o protocolo sugerido por Camilios-Neto et al. (2014) modificado, onde as sementes foram lavadas com etanol 70% durante 2 min, seguida da lavagem com solução de hipoclorito acidificado (0,95 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 50ml de NaOCl; 1,80mL de HCl; 0,10mL de Tween) sob constante agitação (120 rpm) por 5 min. As sementes foram lavadas 3 vezes com água destilada autoclavada e deixadas em meio aquoso (200mL de água destilada autoclavada) durante 3 h em estufa tipo B.O.D a 30 ± 2 °C. Após este período, foi realizada novamente uma lavagem com hipoclorito acidificado por 5 min, seguida de solução de peróxido de hidrogênio (35%) por mais 5 min, seguidas por 3 lavagens em água destilada estéril. Finalizado este processo de assepsia, as sementes foram dispostas em placas Petri com meio ágar/água (6g. L<sup>-1</sup>de ágar) e mantidas no escuro em estufa tipo B.O.D a 30 ± 2 °C para a completa germinação.

## 2.3 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POLIETILENOGLICOL (PEG 6000) COMO AGENTE ESTRESSANTE

Para a observação de estresse osmótico controlado, foi realizado o ensaio de determinação da concentração do PEG em condições *in vitro*. Foram avaliadas 4 concentrações conforme proposto por Meneses et al., (2007) (TABELA 1).

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DE POLIETILENOGLICOL (PEG 6000) UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA EM PLÂNTULAS DE FORRAGEIRAS.

Tratamentos	Potencial Hídrico (Mpa)	Concentração PEG 6000 (g L <sup>-1</sup> )
1	0	0
2	-0,1	78,498
3	-0,2	119,57
4	-0,3	151,41
5	-0,4	178,34

FONTE: O autor (2017).

As plântulas foram colocadas em tubos de ensaio contendo 25 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, com diferentes concentrações de polietilenoglicol (PEG 6000) e pH ajustado para 5,8. As plântulas foram mantidas em sala de crescimento sob condição de fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, com temperatura de 25°C ± 2°C. As mesmas foram avaliadas a partir do aspecto visual e observação de murcha e morte das plantas.

O experimento foi realizado inteiramente ao acaso, com 5 diferentes concentrações de PEG6000 para cada forrageira totalizando 15 condições ou tratamentos.

## 2.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

### 2.4.1 DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO, MASSA FRESCA E MASSA SECA

Foram escolhidos aleatoriamente 3 tubos de plantas de cada tratamento para determinar a massa fresca e seca das plantas. A parte radicular destacada da planta foi lavada com água destilada. Com régua graduada foi medido o comprimento total (cm), comprimento de parte aérea (cm) e comprimento de raiz (cm). Da parte aérea foi obtida a massa fresca com o peso parte aérea (g) e peso de raiz (g). Em seguida,

ambas as porções (raiz e parte aérea de cada planta) foram secas em estufa a 65°C por 72 h e determinados a biomassa seca.

#### 2.4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ESTÔMATOS

Para a comprovação do estresse osmótico foi realizada a análise estomática a partir da contagem de número de estômatos presentes na superfície das folhas em um espaço de 1 mm<sup>2</sup> e da técnica de impressão da epiderme descrita por Segatto et al (2004). Esta determinação consiste em colocar uma gota de cola instantânea universal (cianoacrilato) sobre uma lâmina de vidro e, sobre a gota coloca-se uma parte da folha que é pressionada sobre a lâmina, por cerca de 10 s, tempo necessário para que a cola se espalhe e seque, permitindo assim a retirada da folha da lâmina. As imagens foram capturadas em microscópio óptico com aumento de 40 vezes e analisadas através do programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 (MEDIA CYBERNETICS, 1999).

#### 2.4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE RAÍZES

Para a determinação da superfície radicular, 3 raízes de plântulas de cada tratamento foram lavadas com água destilada e submergidas em solução de azul de metileno 1% por 3 min. O excesso de corante foi retirado com água destilada, parte das raízes foram dispostas em lâmina e coberta com lamínulas. As imagens foram capturadas em microscópio óptico com aumento de 10 vezes e analisadas através do programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 (MEDIA CYBERNETICS, 1999).

#### 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2006).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL SOB ESTRESSE OSMÓTICO

A seca ou déficit hídrico, é o fator abiótico de maior limitação para o crescimento vegetal e produtividade (HOMAYOUN; DALIRI; MEHRABI, 2011). O polietilenoglicol (PEG) pode ser usado para imitar o déficit osmótico em culturas vegetais com a finalidade de estudar mecanismos de tolerância (ELMAGHRABI et al., 2017), podendo assim, ser feita uma seleção de genótipos que condicionem uma maior ou melhor sobrevivência em condições similares de déficit hídrico.

A análise de crescimento de plantas em diferentes condições abióticas pode dar com precisão as causas das variações nos parâmetros morfológicos (LARCHER, 2000). O PEG tem sido utilizado para estudos para a simulação da restrição hídrica em diferentes culturas (VERMA et al., 2013, FURLAN et al., 2014).

Os resultados obtidos para as avaliações morfofisiológicas das espécies forrageiras estudadas sob condições de estresse osmótico estão demonstrados na Tabela 2. Quando o estresse osmótico foi aplicado na aveia, o crescimento das plântulas diminuiu à medida que o potencial hídrico (MPa) decresceu, sendo que nos grupos controle (0 MPa) e com potencial -0,1 Mpa, o comprimento total, da parte aérea e de raiz foi equivalente (TABELA 2). Concentrações maiores de PEG (-0,2 Mpa) diminuiram o comprimento e o crescimento das plântulas de aveia. A aplicação de -0,4 MPa proporcionou diminuições na ordem de 2,6; 3,32 e 2,23 vezes de comprimento total, de parte aérea e raiz respectivamente, em relação às plântulas controle (FIGURA 2).

Plântulas de *Urochloa rhuziziensis* apresentaram um comportamento distinto em relação às outras espécies estudadas, onde as plantas pareceram suportar maior concentração osmótica no meio de cultura. Plântulas expostas ao potencial hídrico de -0,2 MPa foram as que obtiveram maior desenvolvimento total da planta, porém o grupo controle (0 MPa) demonstrou maior desenvolvimento de parte aérea. Plântulas expostas ao potencial de -0,3 MPa apresentaram maior comprimento radicular tornando a espécie *Brachiaria* como, potencialmente responsiva às condições de restrição hídrica (TABELA 2). O potencial de -0,4 MPa foi o que gerou maiores danos fisiológicos às plântulas que ficaram atrofiadas, cloróticas e murchas (FIGURA 1).

De modo similar à aveia, plântulas de milho tiveram redução significativa no crescimento com o aumento das condições de alta concentração do meio de crescimento radicular (TABELA 2). O comprimento da planta foi comprometido a partir do potencial hídrico -0,2 MPa, com o potencial hídrico de -0,4 MPa, houve uma redução de 75, 83 e 48%, respectivamente ao comprimento total, comprimento da parte aérea e de raiz (FIGURA 1).

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE PLANTAS FORRAGEIRAS SUBMETIDAS *IN VITRO* A DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.

	Tratamento	Potencial hídrico ( $\psi_w$ )	Comprimento total (cm)	Comprimento de parte aérea (cm)	Comprimento de raiz (cm)
<b>Aveia</b>	1	0 MPa	15,6 ± 0,26 (a)	13,3 ± 0,36 (a)	2,3 ± 0,20 (a)
	2	-0,1 MPa	15,43 ± 0,21 (a)	12,96 ± 0,15 (a)	2,46 ± 0,06 (a)
	3	-0,2 MPa	12,8 ± 0,20 (b)	10,13 ± 0,15 (b)	2,66 ± 0,06 (a)
	4	-0,3 MPa	9,03 ± 0,06 (c)	7,33 ± 0,21 (c)	1,7 ± 0,26 (b)
	5	-0,4 MPa	6 ± 0,40 (d)	4,96 ± 0,15 (d)	1,03 ± 0,25 (c)
<b>Brachiaria</b>	1	0 MPa	11 ± 0,10 (b)	9,9 ± 0,10 (a)	1,1 ± 0,17 (e)
	2	-0,1 MPa	11,33 ± 0,06 (ab)	9,53 ± 0,25 (ab)	1,8 ± 0,26 (d)
	3	-0,2 MPa	11,53 ± 0,15 (a)	9,13 ± 0,15 (b)	2,4 ± 0,10 (c)
	4	-0,3 MPa	11,23 ± 0,15 (ab)	8,23 ± 0,25 (c)	3,4 ± 0,15 (a)
	5	-0,4 MPa	8,8 ± 0,20 (c)	5,33 ± 0,15 (d)	3 ± 0,10 (b)
<b>Milheto</b>	1	0 MPa	20,96 ± 0,76 (a)	17,2 ± 0,36 (a)	4,03 ± 0,25 (a)
	2	-0,1 MPa	15,36 ± 0,23 (a)	8,96 ± 0,25 (b)	3,4 ± 0,10 (b)
	3	-0,2 MPa	8,66 ± 0,42 (b)	5,76 ± 0,25 (c)	2,9 ± 0,17 (c)
	4	-0,3 MPa	5,73 ± 0,06 (b)	3,23 ± 0,25 (d)	2,5 ± 0,20 (cd)
	5	-0,4 MPa	5 ± 0,30 (b)	2,9 ± 0,26 (d)	2,1 ± 0,10 (d)

FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade (n=3).

FIGURA 1 - PLANTAS SUBMETIDAS *IN VITRO* A DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.



FONTE: O autor (2017).

(1) Aveia; (2) Brachiaria; (3) Milheto; (a) 0 MPa; (b) -0,1 MPa; (c) -0,2 MPa; (d) -0,3 MPa; (e) -0,4 MPa.

A redução do comprimento de planta e área foliar em plantas estressadas já foi relatada por vários autores (MEHMOOD et al., 2009; ACHAKZAI et al., 2010; AKRAM et al., 2010). Em gramíneas, a redução da área foliar sob condições de déficit hídrico tem sido considerada importante mecanismo de tolerância à seca, visto que menor superfície de tecido foliar exposta à radiação solar resulta em menor perda de água via transpiração (CHAVES, 1991).

Estudos realizados com cana-de-açúcar submetidos a estresse iso-osmótico com -0,7 MPa, registram diminuição no comprimento de brotos e raízes das plantas controle (PATADE et al., 2009). Burton et al. (1977) relatam a diminuição do comprimento dos entrenós das plantas de milho quando submetidas ao déficit hídrico. Plantas de girassol expostas ao PEG 6000 na concentração de 20% tiveram a capacidade de sobreviver, porém com o crescimento de plantas claramente reduzido (SAUCA; GABRIEL, 2017). Colman et al. (2014) observaram uma relação linear e negativa entre os potenciais osmóticos e o comprimento de raiz primária e parte aérea de feijão.

Um dos mecanismos utilizados pelas plantas para evitar o estresse hídrico, é o aprofundamento radicular, aumentando a capacidade de captação de água (LIU et al., 2005). Este mecanismo foi observado na brachiaria com um aumento nas raízes significativo (-0,2 MPa), porém na aveia e milho, o comprimento radicular diminuiu à medida que os valores de potencial hídrico foram menores, demonstrando a grande sensibilidade destas espécies em relação à deficiência hídrica.

### 3.2 BIOMASSA SECA E FRESCA

A falta de água no solo limita o crescimento das espécies vegetais, ocasionando efeitos deletérios que poderão afetar a produtividade (LECHINOSKI et al., 2007). A insuficiência de água representa um estresse abiótico, sendo considerada uma das maiores limitações agrícolas, devido a influências negativas em relação ao crescimento e desenvolvimento (ENDRES et al., 2010).

Um déficit hídrico, tanto moderado como severo, afeta a acumulação de biomassa vegetal, independente da ocorrência de condições ótimas de outros fatores como luz e temperatura. Isso ocorre, pois, a condição hídrica das plantas influencia no crescimento, particularmente no efeito sobre as folhas e na expansão celular (BONO et al., 2001).

Os resultados obtidos para as biomassas fresca e secas das espécies forrageiras sob estresse osmótico estão dispostos na Tabela 3.

Em relação à biomassa, o grupo controle e com potencial hídrico de -0,1 MPa apresentaram valores similares de biomassa, compatível com os dados de crescimento vegetal medida através do comprimento de raízes e da parte aérea (TABELA 2). Como era esperado, à medida que os potenciais diminuíram, houve um decréscimo na biomassa das plântulas avaliadas (TABELA 3).

De modo similar ao crescimento vegetal, houve reduções na biomassa das plântulas de aveia à medida que a concentração osmótica foi aumentada. A mesma tendência também foi observada nas plântulas de milho que apresentaram reduções na massa fresca e seca da parte aérea e radicular à medida que as plântulas foram sendo submetidas à maiores concentrações do agente osmótico. As maiores perdas na biomassa da parte aérea foram observadas à -0,4 MPa e à -0,3 MPa na parte radicular, com reduções de tamanho em torno de 1,5 e 2,1 vezes em relação ao controle para a parte aérea e 3 e 6 vezes para a parte radicular, respectivamente.

Plântulas de *brachiaria* tiveram os pesos de biomassa fresca e seca da parte aérea diminuídas pela imposição do estresse osmótico (TABELA 3). No entanto, a biomassa fresca e seca de raiz aumentaram significativamente com uma concentração maior de PEG no meio de cultura (-0,3 MPa) com acréscimos de 114 e 200% respectivamente em relação ao controle.

Os resultados são similares aos encontrados por Bakht et al. (2011) em milho. Patade et al. (2009) na cana-de-açúcar observaram um aumento do peso fresco de brotos e raízes, quando estas foram submetidas a estresse iso-osmótico com PEG-8000 (20% p/v) atingindo um potencial de -0,7 MPa. Plant e Bose (2016) constataram aumentos significativos na matéria seca de trigo, quando submetido a estresse durante a germinação. Guenni et al. (2002) citam que a seca afetou a biomassa radicular de espécies de *brachiaria* avaliando potenciais de água à campo variando de -0,03 a -2,5 MPa.

TABELA 3 - BIOMASSA DE PLANTAS FORRAGEIRAS SUBMETIDAS *IN VITRO* A DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.

	Tratamentos	Potencial hídrico ( $\psi_w$ )	MF parte aérea (mg)	MF de raiz (mg)	MS de parte aérea (mg)	MS de raiz (mg)
<b>Aveia</b>	1	0 MPa	85 ± 1,5 (a)	42 ± 2,5 (a)	17 ± 1,2 (a)	6 ± 1,2 (a)
	2	-0,1 MPa	85 ± 1 (a)	37 ± 1,2 (ab)	17 ± 1,5 (a)	4 ± 0,6 (ab)
	3	-0,2 MPa	66 ± 2 (b)	34 ± 0,6 (bc)	14 ± 1,2 (a)	2 ± 0,6 (bc)
	4	-0,3 MPa	60 ± 2 (c)	29 ± 1,5 (c)	11 ± 1 (b)	2 ± 1 (c)
	5	-0,4 MPa	35 ± 2,5 (d)	23 ± 3,1 (d)	8 ± 0,6 (b)	1 ± 0,6 (c)
<b>Brachiaria</b>	1	0 MPa	30 ± 1 (a)	7 ± 0,6 (c)	6 ± 0,6 (a)	1 ± 0,6 (b)
	2	-0,1 MPa	28 ± 1,5 (a)	6 ± 0,6 (c)	5 ± 0,6 (ab)	1 ± 0,6 (b)
	3	-0,2 MPa	22 ± 2,5 (b)	11 ± 1,5 (b)	5 ± 1 (ab)	2 ± 1 (ab)
	4	-0,3 MPa	20 ± 1 (b)	15 ± 1,5 (a)	4 ± 0,6 (bc)	3 ± 0,6 (a)
	5	-0,4 MPa	9 ± 0,6 (c)	7 ± 0,6 (c)	2 ± 0,6 (c)	1 ± 0,6 (b)
<b>Milheto</b>	1	0 MPa	10 ± 2,6 (a)	40 ± 3,1 (a)	10 ± 1,2 (a)	3 ± 0,6 (a)
	2	-0,1 MPa	39 ± 4,6 (b)	11 ± 1,5 (b)	7 ± 0,6 (b)	3 ± 1 (ab)
	3	-0,2 MPa	22 ± 2,5 (c)	8 ± 0,6 (b)	5 ± 0,6 (bc)	2 ± 0,6 (ab)
	4	-0,3 MPa	20 ± 1,2 (c)	7 ± 0,6 (b)	5 ± 1 (cd)	1 ± 0,6 (ab)
	5	-0,4 MPa	8 ± 1,2 (d)	9 ± 0,6 (b)	3 ± 0,6 (d)	1 ± 0,6 (b)

FONTE: O autor (2017).

(MF- massa fresca; MS – massa seca). Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade (n=3).

### 3.3 MORFOLOGIA ESTOMÁTICA

Plantas cultivadas em ambientes áridos e semiáridos, estão expostas a longos períodos de déficit de água no solo e desenvolveram algumas adaptações para tolerar a seca. Um dos mais importantes mecanismos é o fechamento estomático pelas mudanças no status de água da folha. Este efeito é comumente observado levando à redução da transpiração e da possibilidade de morte por dessecação, à medida que a disponibilidade de água no solo diminui, a taxa de transpiração também diminui como resultado do fechamento estomático (SILVA et al., 2009).

Sob condições de déficit osmótico, observa-se um aumento da densidade de estômatos e o número de células de mesófilo de tamanho pequeno de todos os componentes histológicos da folha, o que resulta em melhor controle da perda de água (BOSABALIDIS e KOFIDIS, 2002; CHARTZOULAKIS et al., 2002). Como a diferenciação estomática é um processo que ocorre durante o desenvolvimento da folha, a redução de estômatos ocorre logo após o início do estresse aplicado (ALQUINI et al., 2003).

Neste trabalho, todas as condições ou concentrações de PEG 6000 aumentaram o número de estômatos nas folhas à medida que o potencial hídrico diminuiu (TABELA 4).

TABELA 4- CONTAGEM ESTOMÁTICA DE PLANTAS FORRAGEIRAS SUBMETIDAS IN VITRO À DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.

Tratamento	Potencial hídrico	Número de Estômatos		
		Aveia	Brachiaria	Milheto
1	0 MPa	45 ± 2 (c)	150 ± 5 (c)	39 ± 5 (c)
2	-0,1 MPa	75 ± 5 (b)	120 ± 2 (b)	45 ± 3 (c)
3	-0,2 MPa	75 ± 4 (b)	120 ± 3 (b)	45 ± 2 (c)
4	-0,3 MPa	134 ± 3 (a)	268 ± 2 (a)	75 ± 3 (b)
5	-0,4 MPa	134 ± 2 (a)	269 ± 1 (a)	90 ± 4 (a)

FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade (n=3).

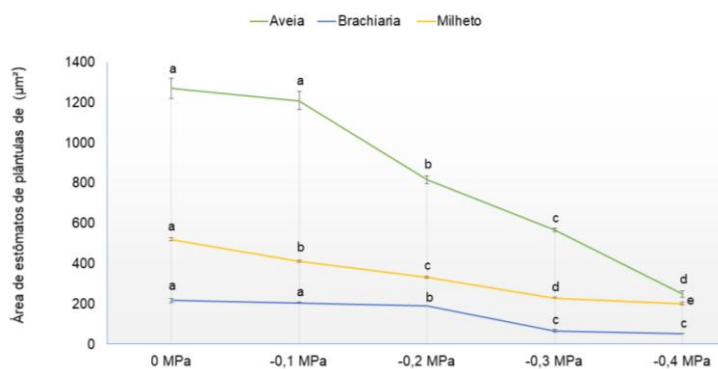
A brachiaria foi a espécie vegetal com maior número de estômatos foliares na condição controle e o milho a que apresentou o menor número de estômatos (TABELA 4). Porém, à medida que o potencial osmótico diminuiu, a presença de estômatos aumentou, com exceção da brachiaria nos potenciais -0,1 e -0,2 MPa. A condição de -0,3 MPa e -0,4 MPa geraram os maiores acréscimos no número médio de estômatos em todas as espécies forrageiras avaliadas sendo 3 vezes para aveia, 1,8 vezes para brachiaria e 2 vezes para milho, em relação ao controle.

Plântulas de aveia apresentaram a maior diminuição na área estomática. No menor potencial hídrico, a área estomática foi 7x menor comparado ao controle (FIGURA 2).

De modo similar, plântulas de brachiaria apresentaram uma diminuição na área estomática, à medida que o potencial foi menor.

No milho, a área estomática a -0,4 MPa foi 2,6 vezes menor comparado às plantas controle (0 MPa) (FIGURA 3).

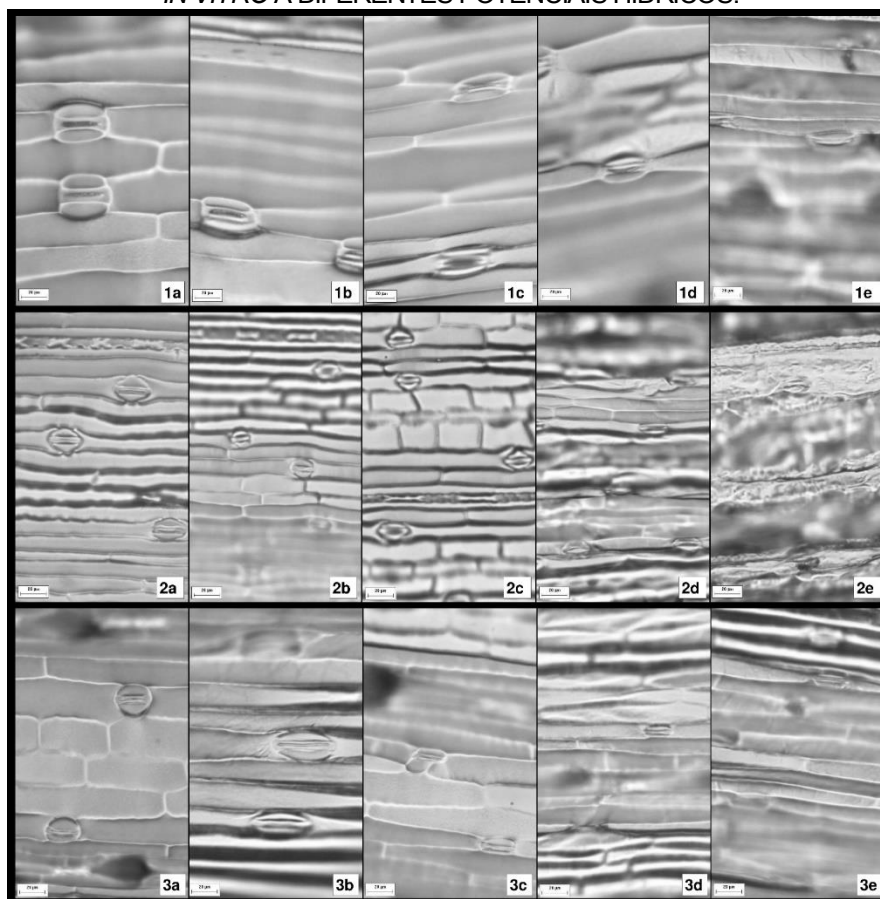
FIGURA 2– ÁREA ESTOMÁTICA DE PLANTAS FORRAGEIRAS SUBMETIDAS *IN VITRO* À DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.



FONTA: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade (n=3).

FIGURA 3- ASPECTO VISUAL DAS FOLHAS E ESTÔMATOS DE PLANTAS FORRAGEIRAS SUBMETIDAS *IN VITRO* A DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.



FONTA: O autor (2017).

(1) Aveia; (2) Brachiaria; (3) Milheto; (a) 0 MPa; (b) -0,1 MPa; (c) -0,2 MPa; (d) -0,3 MPa; (e) -0,4 MPa.

Os estômatos respondem à fatores ambientais como: umidade relativa, transpiração e potencial de água foliar. Uma alta diferença na pressão de vapor entre a folha e o ar resulta no fechamento estomático diminuindo assim a sua área (THOMAS; EAMUS, 1999).

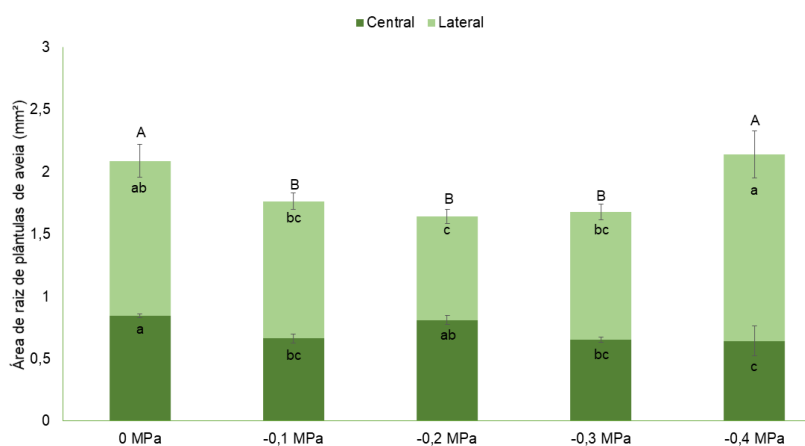
Bono et al. (2001) observaram que plantas de milho submetidas a um potencial hídrico entre -1,2 e -1,5 MPa apresentavam estômatos parcialmente fechados, enquanto que quando submetidas a um potencial entre -1,5 e -0,8 MPa os estômatos apresentavam-se totalmente fechados. Silva et al. (2009) encontraram maior densidade de estômatos em um dos genótipos de umbu submetido ao estresse hídrico.

### 3.4 ÁREA RADICULAR

Vários fatores interferem no crescimento de raízes, como a espécie e as características genéticas das plantas. Plantas tolerantes à seca apresentam raízes profundas, permitindo maior área de alcance de água e nutrientes (AIDAR et al., 2003).

A área radicular das plantas forrageiras foi significativamente influenciada pela diminuição do potencial hídrico. Na aveia, os potenciais de -0,1 MPa a -0,3 MPa causaram uma diminuição na área radicular em relação à área total radicular. A área de raízes laterais também foi menor, principalmente com o potencial osmótico de -0,2 MPa (FIGURA 4). O interessante foi um aumento da área radicular no menor potencial (-0,4 MPa) que apresentou uma área de raiz central diminuída, porém a área de raízes laterais maior. Este fenômeno fez compensar área total que ficou similar às das plantas controle (FIGURA 7).

FIGURA 4 – ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE AVEIA SUBMETIDAS *IN VITRO* A DIFERENTES CONDIÇÕES OSMÓTICAS.



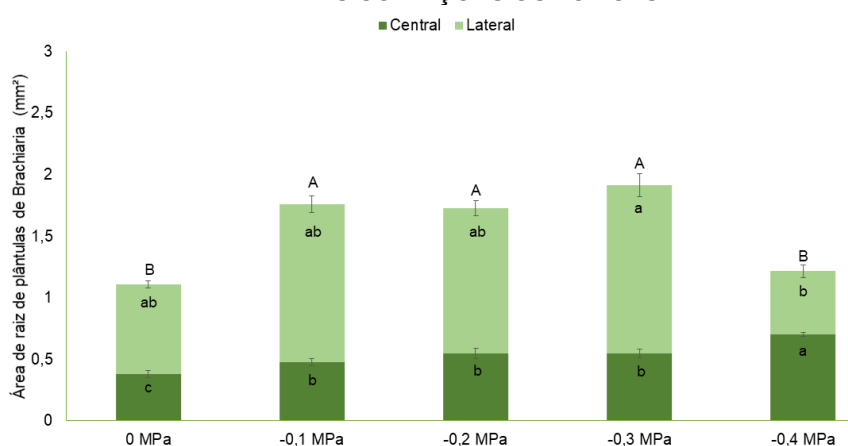
FONTE: O autor (2017).

A soma das duas tonalidades representam a raiz total. Médias seguidas de letras iguais, não diferem

estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade ( $n=3$ ). Letras minúsculas distinguem as médias para raiz central e lateral. Letras maiúsculas distinguem as médias da raiz total das plantas.

Para brachiaria, todos os tratamentos, com exceção do potencial  $-0,4$  MPa aumentaram significativamente a área total das raízes, porém plantas expostas ao menor potencial osmótico ( $-0,4$ MPa) apresentaram aumentos na área da raiz central (FIGURA 5). Plantas cultivadas sob a condição de potencial  $-0,3$ MPa aumentaram significativamente a área de raiz lateral (FIGURA 7).

FIGURA 5 – ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE BRACHIARIA SUBMETIDAS *IN VITRO* A DIFERENTES CONDIÇÕES OSMÓTICAS.

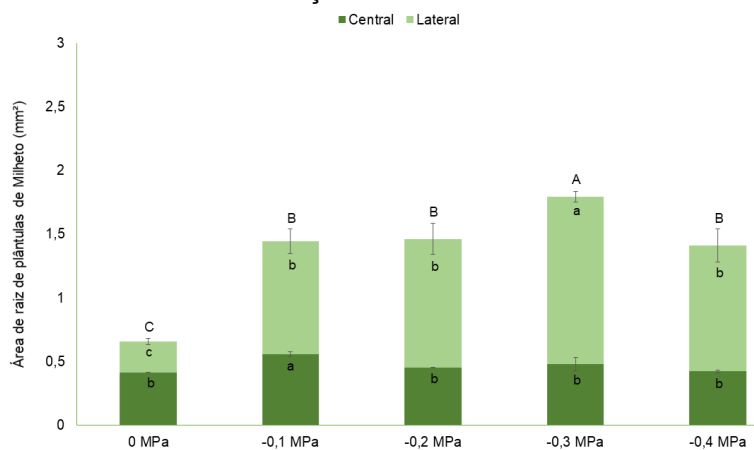


FONTE: O autor (2017).

A soma das duas tonalidades representam a raiz total. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade ( $n=3$ ). Letras minúsculas distinguem as médias para raiz central e lateral. Letras maiúsculas distinguem as médias da raiz total das plantas.

Plântulas de milho, submetidas a diferentes potenciais, aumentaram significativamente a área radicular, quando comparadas ao controle. No potencial de  $-0,1$  MPa foram observados os maiores aumentos na área da raiz central, e, à  $-0,3$  MPa houve o maior aumento na área de raízes laterais (FIGURA 6), tendo as plantas a maior área de raiz total (FIGURA 7).

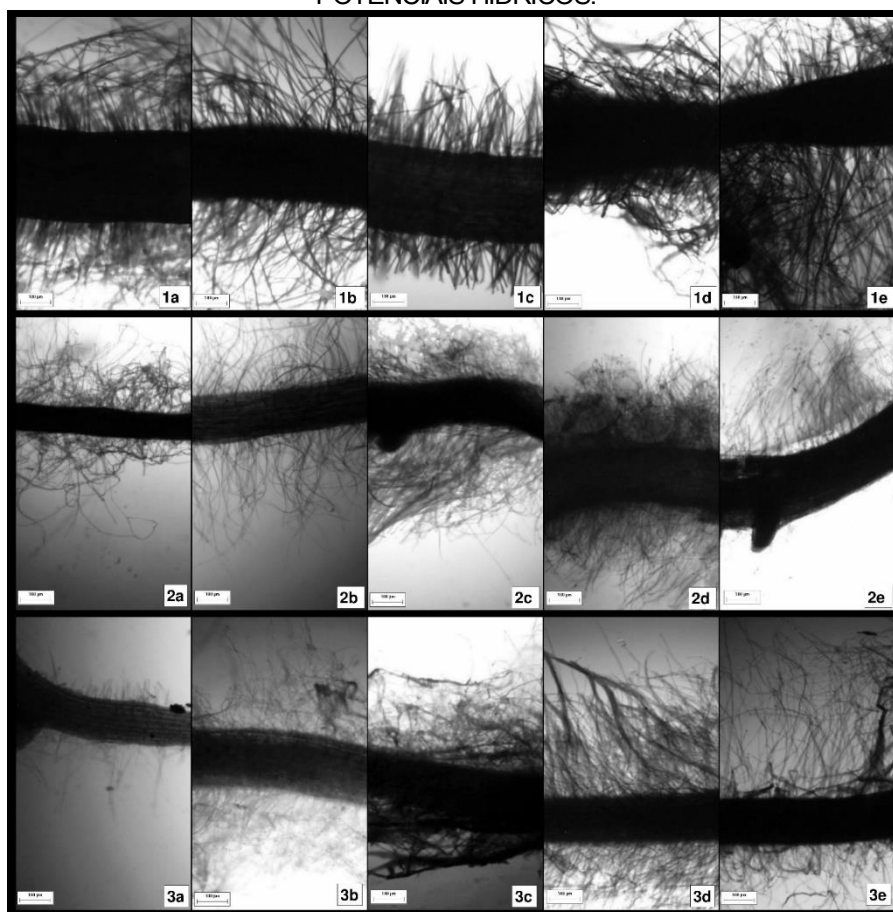
FIGURA 6 – ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS DE MILHETO SUBMETIDAS *IN VITRO* A DIFERENTES CONDIÇÕES OSMÓTICAS.



FUNTE: O autor (2017).

A soma das duas tonalidades representam a raiz total. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade ( $n=3$ ). Letras minúsculas distinguem as médias para raiz central e lateral. Letras maiúsculas distinguem as médias da raiz total das plantas.

FIGURA 7- MORFOLOGIA RADICULAR DE PLANTAS *IN VITRO* SUBMETIDAS A DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS.



FUNTE: O autor (2017).

(1) Aveia; (2) Brachiaria; (3) Milheto; (a) 0 MPa; (b) -0,1 MPa; (c) -0,2 MPa; (d) -0,3 MPa; (e) -0,4 MPa.

As adaptações morfológicas que as plantas apresentam de modo a tolerar situações de déficit hídrico refletem numa menor razão entre parte aérea/raiz; alta densidade e comprimento radicular, penetração mais profunda das raízes e alta densidade de raízes (HOCHMAN; HELYAR, 1989).

Guenni et al (2002) relatam que a seca ou déficit hídrico reduzem a biomassa de pastagens tropicais afetando a razão parte aérea/área radicular bem como a qualidade da forragem causando danos econômicos aos criadores. Furlan et al. (2014) constataram o aumento de pelos radiculares em trigo submetidos a diferentes potenciais hídricos (-0,1; -0,2; -0,3; e -0,4 MPa), com evidência dos potenciais de -0,3 e -0,4 MPa. Aazami et al. (2010) observaram que o crescimento de raízes de feijão foi maior até atingir o potencial hídrico -0,4 MPa. Porém, Noctor e Foyer (1998) relataram que o estresse hídrico não proporcionou o crescimento em raízes de trigo e de milho.

Os potenciais osmóticos aplicados foram capazes de proporcionar modificações fisiológicas nas 3 culturas forrageiras. Os maiores efeitos de contenção da perda hídrica por adaptações na biomassa, estômatos e aumento na área radicular foram observados no potencial de -0,3 MPa ou 152 g.L<sup>-1</sup> de PEG 6000.

A maior concentração de PEG (-0,4 MPa) promoveu morte de plântulas na brachiaria e milheto. A exceção foi a aveia, que apresentou maior área radicular e maior número de estômatos neste potencial, provavelmente explicada pelo fato desta cultura apresentar uma maior área de raízes laterais, compensando a concentração do agente osmótico (FIGURA 7).

#### 4 CONCLUSÕES

1. O uso de PEG 6000 na concentração de  $-0,3$  MPa aplicado por 13 dias foi suficiente para simular uma condição controlada de restrição hídrica.

2. A brachiaria foi escolhida como a espécie forrageira de melhor tolerância à seca de acordo com os padrões de distribuição radicular sob indução de estresse osmótico.

## REFERÊNCIAS

- AAZAMI, M. A.; TORABI, M.; JALILI, E. *In vitro* response of promising tomato genotypes for tolerance to osmotic stress. **African Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 9, n. 26, p.4014-4017, jun. 2010.
- ACHAKZAI, A. K. K.; KAYANI, S. A.; A HANIF. Effect of salinity on uptake of micronutrients in sunflower at early vegetative stage. **Pakistan Journal of Botany**, [S.l.], v. 42, n. 1, p.129-139, 2010.
- AIDAR, H. et al. **Recomendações técnicas para o cultivo do feijoeiro comum em várzeas tropicais irrigadas por subirrigação**. 2003. Circular Técnica, Santo Antônio de Goiás, GO, Dezembro, 2003. EMBRAPA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 21 out. 2017.
- AKRAM, M. et al. Screening for salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) Hybrids at an early seedling stage. **Pakistan Journal Of Botany**, [S.l.], v. 42, n. 1, p.141-154, 2010.
- ALQUINI, Y. et al. Epiderme. In: APPETAZO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Coord.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p.87-107.
- BAKHT, J. et al. Response of maize (*Zea mays* L.) to seed priming with NaCl and salinity stress. **Spanish Journal of Agricultural Research**, [S.l.], v. 9, n. 1, p.252-261, 2011.
- BARROS, C. S.; ROSSETTO, C. A. V. Teste de germinação sob condições de restrição hídrica para avaliar o vigor de sementes de girassol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p.2621-2624, dez. 2009.
- BERG, G.; HALLMANN, J. Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. **Soil Biology**, [S.l.], p.53-69, 2006.
- BERG, L. V. D.; ZENG, Y. J. Short communicate. Response of South African indigenous grass species to drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000. **South African Journal of Botany**, v. 72, p.284-286. 2006.
- BONO, L. et al. Alterações no padrão de resposta à luz da condutância estomática do milho causadas pelo déficit hídrico. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p.27-34, 2001.
- BOSABALIDIS, A. M.; KOFIDIS, G. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. **Plant Science**, [S.l.], v. 163, n. 2, p.375-379, ago. 2002.
- BRACCINI, A. L. et al. Seed inoculation with *Azospirillum brasiliense*, associated with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p.58-64, jun. 2012.

BURTON, G. W. Photoperiodism in pearl millet, *Pennisetum typhoides*. **Crop Science**, [S.I.], v. 5, n. 1, p.333-335, 1965.

CAMILIOS-NETO, D. et al. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, [S.I.], v. 15, n. 1, p.378-390, 2014.

CHARTZOULAKIS, K. et al. Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. **Scientia Horticulturae**, [S.I.], v. 95, n. 1-2, p.39-50, ago. 2002.

CHAVES, M. M. Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation. **Journal of Experimental Botany**, [S.I.], v. 42, n. 234, p.1-16, jan 1991.

COLMAN, B. A. et al. Indução de tolerância ao estresse hídrico na germinação de sementes de feijão-caupi. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 5, n. 4, p.449-455, dez. 2014.

ELMAGHRABI, A. M. et al. PEG Induces High Expression of the Cell Cycle Checkpoint Gene *WEE1* in Embryogenic Callus of *Medicago truncatula*: Potential Link between Cell Cycle Checkpoint Regulation and Osmotic Stress. **Frontiers in Plant Science**, [S.I.], v. 8, p.1-25, 5 set. 2017.

ENDRES, L. et al. Gas exchange alteration caused by water deficit during the bean reproductive stage. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 1, p.11-16, 2010.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 5.6**. Lavras, MG, Brazil: Universidade Federal de Lavras. 2006, Software.

FILHO, M. B. D. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**. 2014. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 12 out. 2017.

FURLAN, F. et al. Influência do potencial hídrico induzido por polietilenoglicol in vitro na morfologia do trigo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, [S.I.], v. 9, n. 3, p.370-375, 30 set. 2014.

GIROTTI, L. et al. Tolerância à seca de genótipos de trigo utilizando agentes indutores de estresse no processo de seleção. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 2, p.192-199, mar. 2012.

GUENNI, O.; MARÍN, D.; BARUCH, Z. Responses to drought of five *Brachiaria* species. I. Biomass production, leaf growth, root distribution, water use and forage quality. **Plant and Soil**, [S.I.], v. 243, n. 2, p.229-241, 2002.

HASSANEIN, A. M. A. Establishment of efficient in vitro method for drought tolerance evaluation in *Pelargonium*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, [S.I.], v. 2, n. 1, p.8-15, 2010.

HOCHMAN, K. R.; HELYAR. **Climatic and edaphic constraints to the persistence of legumes in pastures**. In: G.C. Marten et al. (Eds), Persistence of Forage Legumes. American Society of Agronomy, 1989.

HOMAYOUN, H.; DALIRI, M. S.; MEHRABI, P. PEG Stress Effects on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars at Germination stage. **Middle-east Journal Of Scientific Research**, [S.I.], v. 1, n. 1, p.71-74, 2011.

LARCHER, W. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing With All Aspects Of Plant Biology**, [S.I.], v. 134, n. 3, p.279-295, jan. 2000. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/11263500012331350455>.

LECHINOSKI, A. et al. Influência do Estresse Hídrico nos Teores de Proteínas e Aminoácidos Solúveis Totais em Folhas de Teca (*Tectona grandis* L. f.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p.927-929, jul. 2007.

LEVITT, J. **Responses of Plants to Environmental Stresses**. 2. ed. New York: Academic Press, 1980. 497 p.

LIU, F. et al. ABA regulated stomatal control and photosynthetic water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) during progressive soil drying. **Plant Science**, [S.I.], v. 168, n. 3, p.831-836, mar. 2005.

MEDIA CYBERNETICS, **Image-Pro Plus 4.5.0.29**, Silver Spring, MD, USA: Roper Technologies, 1999. Software.

MENESES, C. H. S. G.; LIMA, L. H. G. M.; LIMA, M. M. A.; FERNANDES, P. D.; BRUNO, R. L. A.; VIDAL, M. S. Potencial hídrico induzido por Polietilenoglicol 6000 no vigor de sementes de algodoeiro. **Embrapa Agroecologia**, v.1, p.5-17, 2007. <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/629710/1/bot022.pdf>>

MORAES, G. A. F. de; MENEZES, N. L. de. Desempenho de sementes de soja sob condições diferentes de potencial osmótico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p.219-226, mar. 2003.

MORAES, P. F. et al. Expressão gênica diferencial em genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) submetidos a déficit hídrico induzido por PEG. **Bragantia**, [S.I.], v. 74, n. 1, p.25-32, mar. 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, [S.I.], v. 15, n. 3, p.473-497, jul. 1962. Wiley-Blackwell.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, [S.I.], v. 49, n. 1, p.249-279, 1998.

PANT, B.; BOSE, B. Mitigation of the influence of PEG-6000 imposed water stress on germination of halo primed rice seeds. **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology**, [S.l.], v. 9, n. 2, p.275-282, abril 2016.

PATADE, V. Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Halopriming imparts tolerance to salt and PEG induced drought stress in sugarcane. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [S.l.], v. 134, n. 1-2, p.24-28, nov. 2009.

PEREIRA, R. G. et al. Influência dos sistemas de manejo do solo sobre os componentes de produção do milho e *Brachiaria decumbens*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 1, p.64-71, mar. 2009.

SAUCA, F.; GABRIEL, A. F. Screening of some sunflower genotypes (*Helianthus annuus*) for drought stress using PEG 6000. **Merit Research Journal Of Agricultural Science And Soil Sciences**, Fundulea, v. 5, n. 3, p.54-59, mar. 2017.

SEGATTO, F.B. et al. 2004. Técnica para estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, 34: 1597-1601.

SILVA, E. C. et al. Stomatal changes induced by intermittent drought in four umbu tree genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 21, n. 1, p.33-42, 2009.

THOMAS, D. S.; EAMUS, D. The influence of predawn leaf water potential on stomatal responses to atmospheric water content at constant  $C_i$  and on stem hydraulic conductance and foliar ABA concentrations. **Journal Of Experimental Botany**, Darwin, v. 50, n. 1, p.243-251, fev. 1991.

IVERMA, D. et al. In vitro selection and field responses of somaclonal variant plants of rice cv PR113 for drought tolerance. **Plant Signaling & Behavior**, [S.l.], v. 8, n. 4, p.1-5, abr. 2013.

VASQUEZ, G. H. **Condicionamento fisiológico de sementes de soja: efeitos sobre a germinação, vigor e potencial de armazenamento**. 1995. 138p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1995.

VERSLUES, P. E.; OBER, E. S.; SHARP, R. e. Root Growth and Oxygen Relations at Low Water Potentials. Impact of Oxygen Availability in Polyethylene Glycol Solutions. **Plant Physiology**, Columbia, v. 116, n. 1, p.1403-1412, 1998.

### CAPITULO 3: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM *UROCHLOA RUZIZIENSIS* SUBMETIDA AO ESTRESSE OSMÓTICO

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de bactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas submetidas a estresse hídrico *in vitro*. *Urochloa ruzizensis* e as bactérias *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Leclercia adecarboxylata* foram usadas neste estudo. O experimento foi inteiramente ao acaso, com 8 tratamentos. As sementes pré-germinadas foram colocadas em tubos de ensaio contendo 25 mL de meio MS com Polietilenoglicol (-0,3 Mpa) e inoculadas com  $10^6$  UFC.semente<sup>-1</sup> de cada uma das estirpes. Após 13 dias de cultivo, foram avaliados o comprimento, peso fresco e seco da biomassa de parte aérea e raiz, contagem microbiana (epifítica e endofítica), teor relativo de água (TRA) e índice de estabilidade de membrana (IEM), morfologia das raízes por coloração com azul de metileno 1%, morfologia de estômatos e análise enzimática. Para confirmar a presença das bactérias epi e endofiticamente aderidas foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR). Os dados foram submetidos a ANOVA e comparados pelo teste Tukey ( $p > 5\%$ ). Como resultados, *A. brasilense* apresentou um efeito positivo na manutenção da atividade metabólica celular observada pela manutenção do TRA e IEM, os maiores aumentos na parte aérea e radicular, manutenção da área estomática em ambas condições, podendo ser considerada como a melhor estirpe para fins comerciais em plantas sob restrição hídrica. A estirpe *L. adecarboxylata*, é promissora por ter promovido incrementos nas biomassas da parte aérea e radicular, como pela manutenção do TRA e IEM em altos níveis. A atividade enzimática foi modificada tanto pela presença da bactéria e ainda mais pela imposição do estresse, podendo ser correlacionada como marcadores de resposta tanto a SOD (*A. brasilense* e *H. seropedicae*) como a GST (*L. adecarboxylata*). Os dados obtidos neste trabalho serão a base para outros projetos futuros na procura por estirpes altamente efetivas como inoculantes a serem usadas em espécies forrageiras.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Brachiaria. Déficit hídrico. Enzimas antioxidantes.

## ABSTRACT

The genus *Urochloa* (*Poaceae*) originates from the African continent and is widely used as a forage plant mainly in tropical regions. *Urochloa ruziziensis* shows high quality of forage, is very palatable and of high food value, in contrast it is not tolerant to drought. The objective of this study was to evaluate the effect of plant growth promoting bacteria on plants submitted to in vitro water stress. *Urochloa ruziziensis* and the bacteria *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Leclercia adecarboxylata* were used in this study. The experiment was completely random, with 8 treatments (control, stressed control, stressed inoculated and inoculated with each of the three bacteria). Seed asepsis was performed with acidified hypochlorite; afterward the seeds were transferred to agar / water medium and incubated for 48 h at 32 ° C in the dark. The pre-germinated seeds were placed in test tubes containing 25 mL of MS medium with Polyethylene Glycol (PEG-6000 at -0.3 MPa concentration) and inoculated with 10<sup>6</sup> CFU-1 of each of the strains. After 13 days of cultivation, the following factors were evaluated: length, fresh and dry weight of shoot and root biomass, microbial counts (epiphytic and endophytic), relative water content (TRA), membrane stability index (IEM) root morphology by staining with 1% methylene blue, morphology of stomata and enzymatic analysis. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to confirm the presence of epi and endophytically adhered bacteria. Data were submitted to ANOVA and compared by the Tukey test (p > 5%). As a result, *A. brasilense* had a positive effect on the maintenance of the cellular metabolic activity observed by the maintenance of the TRA and EMI, the largest increases in the aerial and radicular part, and maintenance of the stomatal area in both conditions (control and stress), being able to be considered the best strain for commercial purposes in plants under water restriction. The *L. adecarboxylata* strain is promising because it has promoted increases in shoot and root biomasses, as well as in the maintenance of high levels of ERT and EMI. The enzymatic activity was modified both by the presence of the bacteria and even more by the imposition of stress, being able to be correlated as response markers both to SOD (*A. brasilense* and *H. seropedicae*) and GST (*L. adecarboxylata*). The data obtained in this work will be the basis for other future projects in the search for highly effective strains as inoculants to be used in forage species.

Keywords: Plant growth promoting bacteria. Brachiaria. Water deficit. Antioxidant enzymes.

## 1 INTRODUÇÃO

Bactérias promotoras de crescimento vegetal quando colonizam o sistema radicular, apresentam a capacidade de promover o crescimento vegetal pela alteração da arquitetura radicular, por mecanismos diretos e indiretos. Entre os mecanismos diretos estão a fixação biológica de nitrogênio (HUREK et al., 2002, INIGUEZ et al., 2004; OBERSON et al., 2013), solubilização de fosfatos (RICHARDSON et al., 2009; SINGH; SATYANARAYANA, 2011) e outros nutrientes (VERMA; SINGH; PRAKASH, 2011; SHANWARE; KALKAR; TRIVEDI, 2014), a produção de fitormônios como auxinas, giberelinas e ácido giberélico (GLICK, 2012). Os mecanismos indiretos são relacionados com a indução sistêmica de resistência à patógenos pela produção de agentes antifúngicos e antibacterianos (BABALOLA, 2010) e melhoria na tolerância a estresses abióticos (RAZI; SEN, 1996; FURLAN et al., 2014) entre outras.

As brachiarias são forrageiras mais amplamente cultivada na América Latina, África, Ásia, Pacífico Sul e Austrália (MUTAI; NJUGUNA; GHIMIRE, 2016) e compõem as espécies de base para o pastoreio extensivo, que ocorre nas principais regiões agropecuárias do Brasil.

A mais importante contribuição das forragens é o seu efeito direto na produção animal. Tradicionalmente, a agropecuária é um importante componente da produção rural gerando renda em países pobres e em desenvolvimento (PETERS et al., 2001). No entanto, cerca de 100 milhões de hectares de pastagens brasileiras estão em alto nível de degradação. Do total, 30% das áreas de pastagens encontram-se em estágios leves a moderados de degradação e somente 20% dos campos estão adequados para uso (RIBEIRO, 2017).

Somado à degradação, a maioria dos pastos podem sofrer estresses abióticos em qualquer estação do ano. O mais importante deles, a seca, diminui a produtividade e o valor nutricional das pastagens. Além disso, a falta de pasto prejudica a taxa de natalidade e interfere no ganho de peso e, conseqüentemente, na idade do abate dos animais (BARUSELLI, 2017).

As várias respostas fisiológicas da planta ao déficit de água, geralmente variam com a gravidade assim como com a duração da tensão de água (SHAO et al., 2008). O déficit hídrico gera um estresse oxidativo pelo aparecimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) na forma de: radicais superóxidos ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxilas ( $OH\bullet$ ) e o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ). As EROs

danificam o RNA, DNA e proteínas provocando a destruição da clorofila, da atividade do sistema radicular e a morte celular (JALEEL et al., 2009).

A proteção contra os danos pode ocorrer às expensas de um eficiente sistema enzimático antioxidante, o qual compreende a ação das chamadas enzimas antioxidantes, entre elas a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), prolina, e GST (ASADA, 1999; HABIB, KAUSAR; SAUD, 2016).

Os inoculantes bacterianos são usados com o intuito de reduzir o impacto ambiental causado pelo uso de fertilizantes químicos, bem como aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção (BABALOLA et al., 2010). Alguns grupos de bactérias agem como biofertilizantes uma vez que promovem o crescimento vegetal (BPCV) (BHATTACHARJEE; DEY, 2014). O primeiro passo para o desenvolvimento de estirpes de uso comercial é o estudo do comportamento de espécies bacterianas em relação à interação com os diferentes genótipos vegetais e em relação à promoção de crescimento em condições normais e estressantes.

Na literatura são encontrados estudos sobre bactérias promotoras de crescimento em *Urochloa brizantha* (ARAÚJO et al., 2012; SILVA et al., 2013) porém são escassos os trabalhos em *Urochloa ruziziensis* que tem grande potencial na região oeste do Paraná.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a o efeito da inoculação de estirpes bacterianas em *Urochloa ruziziensis* submetidas ao estresse osmótico pela aplicação do PEG6000 em relação ao crescimento e perfil antioxidante.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO E ESPÉCIE SELECIONADA

Os experimentos foram realizados no laboratório de bioquímica e genética (LABIOGEN) da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, no período de março de 2016 a setembro de 2017.

Para este experimento foi selecionada a *Brachiaria (Urochloa ruziziensis)*, por ser uma espécie altamente responsiva a inoculação bacteriana.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com a partir de oito tratamentos.

### 2.2 OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS

A assepsia das sementes de *Urochloa ruziziensis* foi realizada seguindo o protocolo sugerido por Camilios-Neto et al. (2014) modificado, onde as sementes foram lavadas com etanol 70% durante 2 min, seguida da lavagem com solução de hipoclorito acidificado (0,950g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 50ml de NaOCl; 1,80mL de HCl; 0,10mL de Tween) sob constante agitação (120 rpm) por 5 min. Após, as sementes serem lavadas 3 vezes com água destilada autoclavada, estas foram deixadas em meio aquoso (200mL de água destilada autoclavada) durante 3 h em estufa tipo B.O.D a 30 ± 2 °C. Novamente, foi realizada uma lavagem com hipoclorito acidificado por 5 min, seguida de solução de peróxido de hidrogênio (35%) por mais 5 min, seguidas por 3 lavagens em água destilada estéril. Finalizado este processo de assepsia, as sementes foram dispostas em placas Petri com meio ágar/água (6 g.L<sup>-1</sup> de ágar) e mantidas no escuro em estufa tipo B.O.D a 30 ± 2 °C para a completa germinação.

As plântulas foram retiradas do meio ágar/água e passadas para tubos de ensaio contendo 25mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 151,41 g.L<sup>-1</sup> de PEG 6000 e pH ajustado para 5,8. Foram inoculadas com 10<sup>6</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> de cada estirpe bacteriana. Cada tubo de ensaio contendo plântulas permaneceu 13 dias em sala de crescimento sob condição de fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, com temperatura de 25°C ± 2°C.

Os tubos de ensaio contendo as plântulas foram arranjados randomicamente num delineamento inteiramente ao acaso, com 8 condições, sendo eles: 1-controle,

2- controle com PEG, 3- *A. brasilense*; 4 *A. brasilense* + PEG; 5- *L. adecarboxylatae* 6-; 6- *L. adecarboxylatae* + PEG; 7-*H. seropedicae* e 8- *H. seropedicae* + PEG. Foram realizadas 10 repetições de cada condição ou tratamento.

### 2.3 ISOLADOS E PREPARO DO INÓCULO

Os isolados utilizados para a inoculação foram bactérias pertencentes a coleção do laboratório LABIOGEN, sendo elas: *Azospirillum brasiliense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Leclercia adecarboxylata*.

As bactérias *A. brasiliense*, *H. seropedicae* e *L. adecarboxylata* foram mantidas em placas com meio de cultura sólido específico para o crescimento bacteriano, sendo eles: NFb – lactado, NFb – malato e JNFB respectivamente, onde estas placas foram mantidas em estufa de crescimento bacteriano a 28°C para cultura estoque. O pré-inóculo foi preparado em tubos falcon de 50 mL, contendo 5 mL de meio de cultura (NFb- lactato para *A. brasiliense*; NFb – malato *H. seropedicae* e LB para *L. adecarboxylata*) e uma colônia bacteriana retirada das placas de meio sólido, os quais foram mantidos em uma incubadora tipo *Shaker* em uma temperatura de 28°C a 120 rpm por 24 h.

Para o preparo do inóculo foi utilizado 1,0 mL do pré-inóculo, adicionados a 50 mL de meio de cultura específico para cada bactéria em erlenmeyer de 250 mL, que foram mantidos em uma incubadora tipo *Shaker* em uma temperatura de 28°C a 120 rpm por aproximadamente 22 h. O crescimento bacteriano foi quantificado em espectrofotômetro, e o inóculo foi preparado para  $10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup> por semente ou plântula.

### 2.4 INOCULAÇÃO DAS PLÂNTULAS

O inóculo foi centrifugado a 10000g por 5min, o sobrenadante foi descartado e as células bacterianas lavadas com solução salina e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi ressuscitado com água peptonada a 1% onde cada plântula recebeu 3µL desta solução ( $10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup>). O grupo controle passou pelo mesmo procedimento, porém, livre de bactérias.

## 2.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

### 2.5.1 AVALIAÇÃO DO TEOR RELATIVO DE ÁGUA (TRA)

O teor relativo de água foi realizado, seguindo recomendações de SCHONFELD et al. (1988), em que após a ocorrência do estresse, 3 amostras de cada folha coletada da mesma planta foram cortadas em 1 cm<sup>2</sup> cada. Os discos foliares foram pesados para obtenção da massa fresca (MF) e incubados a uma temperatura de 25°C por 24 h em 40 mL de água destilada e autoclavada.

Após este período, as partes foliares foram dispostos em papel toalha para a retirada do excesso de água, e os discos pesados para a obtenção da massa túrgida (MT), em seguida foram colocados em envelopes de papel e levados a estufa a 72°C por 24 h para a obtenção da massa seca (MS). O teor relativo de água foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$TRA \% = \left( \frac{MF - MS}{MT - MS} \right) \times 100$$

### 2.5.2 ÍNDICE DE ESTABILIDADE DE MEMBRANA (IEM)

O índice de estabilidade de membrana celular (IEM) foi calculado indiretamente pela medida da condutividade elétrica através da medição da dispersão de íons a fim de verificar a morte celular, seguindo o protocolo de Bajji, Kinnet e Lutts (2002). Folhas das plântulas coletadas em triplicata foram cortadas em discos de tamanho uniforme de 1 cm<sup>2</sup> e lavadas com água Milli-Q para remover eletrólitos aderidos a superfície. Os discos foram alocados em recipientes contendo 40 mL de água Milli-Q, os frascos foram fechados e incubados no escuro a 25°C por 24 h. A condutividade foi medida usando condutivímetro, e após a medição inicial (C<sub>1</sub>), os tubos foram autoclavados por 20 min sob pressão de 120 atm. Após os recipientes esfriarem foi medido novamente a condutividade elétrica (C<sub>2</sub>). O índice de estabilidade de membrana foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$IEM \% = \left( \frac{C_1}{C_2} \right) \times 100$$

### 2.5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ESTÔMATOS

Para a comprovação do estresse osmótico foi realizada a análise estomática a partir da contagem de número de estômatos presentes na superfície das folhas em um espaço de 1 mm<sup>2</sup> e da técnica de impressão da epiderme descrita por Segatto et al (2004). Esta determinação consiste em colocar uma gota de cola instantânea universal (Cianoacrilato) sobre uma lâmina de vidro e, sobre a gota coloca-se uma parte da folha que é pressionada sobre a lâmina, por cerca de 10 s, tempo necessário para que a cola se espalhe e seque, permitindo assim a retirada da folha da lâmina. As imagens foram capturadas em microscópio óptico com aumento de 40 vezes e analisadas através do programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 (MEDIA CYBERNETICS, 1999).

### 2.5.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE RAÍZES

Para a determinação visual de superfície radicular, 3 raízes de plântulas de cada tratamento foram lavadas com água destilada e submergidas em solução de azul de metileno 1% por 3 min. O excesso de corante foi retirado com água destilada. Parte das raízes foram dispostas em lâmina e coberta com lamínulas. As imagens foram capturadas em microscópio óptico com aumento de 10 vezes e analisadas através do programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 (MEDIA CYBERNETICS, 1999).

### 2.5.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Para realização dos ensaios da atividade enzimática da Catalase (CAT) seguiu-se os protocolos de Oliveira e Gondim, (2010) e Hameed et al, (2011) adaptado. Para a determinação da Superóxido dismutase (SOD) seguiu-se o protocolo proposto por Oliveira, Gondim et al., (1997) adaptado, ambos adequados para correlação linear da atividade enzimática do extrato vegetal. Para os ensaios bioquímicos utilizou-se a parte aérea de plantas de brachiaria.

O mesmo extrato vegetal, foi utilizado para ambas as enzimas, o qual foi preparado da seguinte forma: 0,250g de amostra foliar foi macerada em nitrogênio líquido e transferida para um tubo Falcon com capacidade para 15mL. Neste, foi

adicionado fosfato de potássio 50mM-pH7,0, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1mM, glicerol 1%(v/v), Ditioneitol (DTT) 1mM, em um volume final de 1,5mL. Em seguida, o material vegetal foi centrifugado a 12.000g por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante, livre de partículas de folhas, o qual foi colocado em gelo e mantido durante todo o procedimento.

Para a CAT, a mistura reacional na cubeta de quartzo (1mL) incluiu tampão fosfato de potássio 200mM pH7,0; peróxido de hidrogênio 250mM; 437,5µL de água ultrapura e 12,5µL do extrato vegetal. A atividade enzimática foi tomada de 10 em 10 s através da leitura da absorbância no espectrofotômetro no decorrer de 5 min. O comprimento de onda utilizado para a CAT foi 240nm. A atividade da enzima foi, então, calculada com base no coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 36 M cm a 240 nm.

A mistura reacional da SOD em cubeta de quartzo de 1mL foi preparada com os seguintes componentes: tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,8; EDTA 0,1mM; 0,025% de triton X-100 e L-metionina 6,5mM; 10 µL de extrato vegetal; azul de nitrotetrazólio 750mM; riboflavina 100mM e 380 µL de água ultrapura. Após o preparo a reação foi mantida no escuro por 5 min, em seguida procedeu-se a leitura. Manteve-se sob forte incidência de luz por 30 s e seguiu nova leitura. Foram realizadas leituras durante 5min. O comprimento de onda utilizado para a SOD foi 630nm. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para apresentar 50% de dismutação do radical superóxido.

Também foram realizados os ensaios para Ascorbato peroxidase (APX) e Glutathione S-transferase (GST) segundo o protocolo proposto por Oliveira e Gondim, (2011) com adaptações: Para ambas as enzimas, foi utilizado o mesmo extrato vegetal, o qual foi preparado da seguinte forma: 0,250g de amostra foliar foi macerada em nitrogênio líquido e transferida para um tubo Falcon com capacidade para 15mL, neste foi adicionado fosfato de sódio 50mM, pH7,5; polietilenoglicol 6000 (PEG) 1mM; fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1mM; 0,8% (p/v) de polivinilpirrolidina 40000 (PVP) e 0,01% de Triton-X 100, em um volume final de 1,5mL. Em seguida, o material vegetal foi centrifugado a 12.000g por 20 min a 4°C. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante, livre de partículas de folhas, o qual foi colocado em gelo e mantido durante todo o procedimento.

A enzima APX foi quantificada segundo a mistura reacional preparada em cubeta de quartzo de 1mL contendo: tampão fosfato de potássio 50mM, pH7,0;

727,75µL de água de ultrapura; ácido ascórbico 80mM; peróxido de hidrogênio 80mM e 5µL do extrato vegetal. O comprimento de onda utilizado para a GST foi 290nm. A determinação da atividade enzimática deu-se por meio da leitura da absorbância no espectrofotômetro no decorrer de 5 min, com leituras feitas de 10 em 10s. O cálculo da atividade de APX foi feito com base no coeficiente de extinção molar de 2,8 M cm para o ácido ascórbico à 290 nm.

Para medição da atividade enzimática da GST a mistura foi preparada em cubeta de quartzo de 1mL utilizando tampão fosfato de potássio 200mM pH 6,5; 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 1mM; glutathiona reduzida 3,6mM e 50µL extrato vegetal. O comprimento de onda utilizado para a GST foi 340nm. Atividade enzimática deu-se por meio da leitura da absorbância no espectrofotômetro no decorrer de 5 min, com leituras feitas de 10 em 10s. O cálculo da atividade da GST foi feito com base no coeficiente de extinção molar de 9,6 mM cm para a glutathiona reduzida a 340 nm.

As proteínas contidas nas amostras foram quantificadas pelo método colorímetro proposto por Lowry et al. (1951).

#### 2.5.6 DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO, MASSA FRESCA E MASSA SECA

Foram escolhidos aleatoriamente 3 tubos de plantas de cada tratamento para a determinação dos parâmetros de crescimento vegetal como, o comprimento total (cm), comprimento de parte aérea (cm) e comprimento de raiz (cm) usando régua graduada. Das mesmas plantas, foi obtido o peso fresco e seco da parte aérea (g) e raiz (g). O peso seco foi obtido pela secagem do material a 65°C por 72 h.

#### 2.5.7 CONTAGEM MICROBIANA

Passados os dias de inoculação (13 dias), 3 tubos com plantas de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente e submetidos a contagem microbiana epifítica e endofítica.

Para a contagem epifítica e endofítica todo o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar onde a raiz é separada de parte aérea de cada planta. Na contagem epifítica, as raízes foram lavadas em água destilada e autoclavada, por 3 vezes, acondicionadas em tubos contendo solução de NaCl (0,9%) e levadas ao

sonicador por 20 s. Da solução salina, foram aliqüotados 100 µl e feitas 4 diluições em série. De cada diluição, foram plaqueadas 3 gotas de 5 µl cada, em meio específico para cada bactéria (NFB-Lactato, NFB-Malado e JNFB) sólido. As placas foram mantidas em estufa tipo B.O.D. por 48 h a  $30 \pm 2$  °C. As contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) obtidas foram realizadas em lupa estereoscópica (Quimis).

Para a contagem endofítica, as raízes da contagem epifítica foram imersas em solução de HgCl<sub>2</sub> 0,01% durante 30s, lavadas por 3 vezes com água destilada e autoclavada, maceradas em solução salina (0,9%) e levadas ao sonicador durante 20s. A partir disso, foi repetido o processo de diluição e plaqueamento e leitura da contagem epifítica.

#### 2.5.8 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS INOCULADAS

A confirmação molecular das espécies bacterianas foi realizada por amplificação, por PCR, de uma região pertencente a região do rDNA 16S, específica para cada bactéria utilizando par de primers específicos (TABELA 1).

Uma única colônia bacteriana, obtida a partir da contagem microbiana epifítica e endofítica geradas após inoculação e crescimento vegetal foi transferida para um microtubo de PCR e ressuspendida em 20 µl de água ultrapura. As células foram lisadas por aquecimento a 96 °C por 6 min. O sobrenadante foi separado do lisado celular por breve centrifugação.

A PCR foi realizada em um volume de 20ul, utilizando 2 µl do DNA, Tampão de PCR 1x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM do mix de dNTP, 1 unidade da Taq DNA Polimerase (4G Pesquisa e Desenvolvimento) e 0,2 µM de cada primer. A reação foi realizada em termociclador Bioer Life Express modelo MJ96, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose corados com brometo de etídeo a 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> em Tampão TBE 1x (Tris-base 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0) e foto documentados em equipamento Locus Biotecnologia L.PIX. Foi utilizado padrão de tamanho molecular de 100 pb e 50 pb (Norgen™).

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS E PARÂMETROS DA PCR.

Bactéria	Sequência	Ciclo	pb
<i>A. brasiliense</i>	AZO-F (5'-GCGGTAATACGAAGGGGGCKF-3') AZO-R (5'-TTGTCACCGGCAGTTCCACCAG-3')	94°C → 3min	648
		94°C → 30s - 25 c	
		58°C → 1min	
		72°C → 1min	
		72°C → 5min	
<i>H. seropedicae</i>	HERBAS1-F (5'-TTTCGCGGTAGGCGATCA-3') HERBAS1-R (5'-GAGCAATTGACCGGCAAGAC-3')	94°C → 3min	76
		94°C → 30s - 25 c	
		54°C → 1min	
		72°C → 1min	
		72°C → 5min	
<i>L. adecarboxylata</i>	LEC-F (5'-ATCAGATGTGCCAGATGG-3') LEC-R (5'-CAAGGGAACAACCTCCAAG-3')	95°C → 4min	601
		95°C → 60s - 35 c	
		58°C → 1min	
		72°C → 1min	
		72°C → 5min	

FONTE: O autor (2017).

## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2006).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 TEOR RELATIVO DE ÁGUA (TRA) E ÍNDICE DE ESTABILIDADE DE MEMBRANA (IEM)

Segundo Schonfeld et al. (1988), as plantas com maiores valores de TRA sob mesmas condições ambientais são mais resistentes à seca, pois é resultado de uma menor mudança do conteúdo relativo de água das folhas.

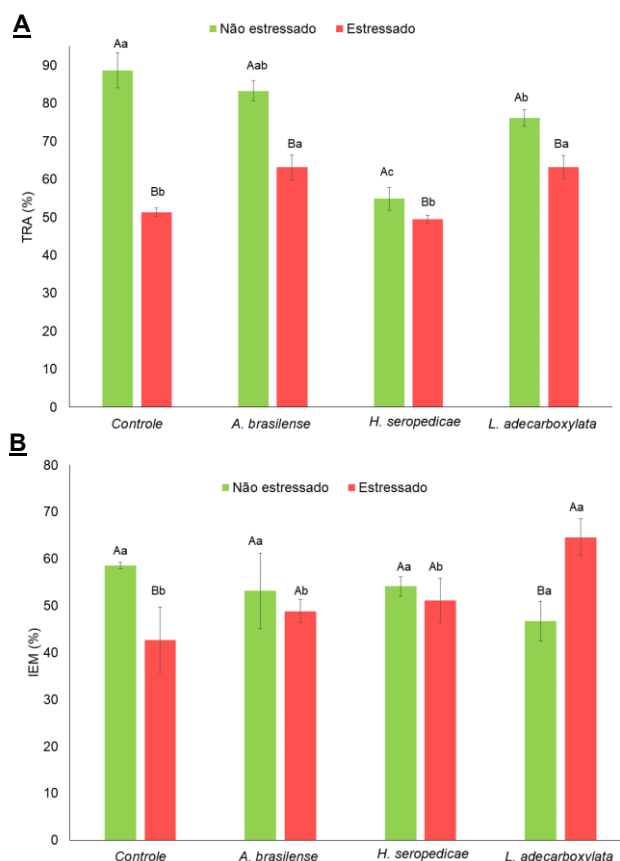
A condição de déficit hídrico, leva o estresse oxidativo por aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio nas plantas, levando assim o desequilíbrio nas taxas de transporte de elétrons e na atividade metabólica das plantas, como consequência destas espécies reativas de oxigênio, ocorre a peroxidação de lipídios, levando a ruptura da membrana celular em plantas submetidas ao déficit hídrico, esta peroxidação de lipídios está diretamente correlacionada ao índice de estabilidade de membrana (IEM) (BECK et al., 2007; VENDRUSCOLO et al., 2007; MILLER et al., 2010).

Os dados obtidos dos diferentes parâmetros avaliados para as plântulas de *Brachiaria* submetidas ao estresse osmótico e inoculadas com as diferentes estirpes estão demonstrados na figura 1. Plantas controle apresentaram um TRA na ordem de 89% e IEM de 59%. A aplicação do estresse osmótico reduziu o TRA das plântulas para 42% e o IEM de 27%. Os níveis de TRA% após 13 dias de imposição do estresse osmótico variaram significativamente de 89% para 51%, nas plantas controle e controle estressado. A mesma tendência pode ser observada para o IEM onde ocorreu uma diminuição de 27% entre os índices das plantas estressadas e não estressadas, comprovando a aplicação do estresse hídrico pela presença de agente osmótico (FIGURA 1).

Plantas inoculadas, porém, não estressadas, apresentaram TRA menores: 83% para *A. brasilense*, 55% para *H. seropedicae* e 76% para *L. adecarboxylata*. Os dados obtidos para o IEM mostram que plantas estressadas e inoculadas com *A. brasilense* e *H. seropedicae* tiveram a capacidade de manter a estabilidade da membrana quando comparada com plantas não estressadas e inoculadas com as respectivas bactérias. Plantas inoculadas e estressadas com *L. adecarboxylata* aumentaram os níveis de IEM em cerca de 38%, demonstrando um efeito protetor da bactéria (FIGURA 1).

Plantas inoculadas e estressadas com *H. seropedicae* apresentaram diminuição do TRA em relação às plantas controle, demonstrando um efeito negativo desta bactéria na manutenção do turgor celular, mesmo em condição não estressante. Os dados obtidos neste trabalho discordam com Furlan (2013) que observou em trigo após restrição hídrica de 16 dias, que plantas controle apresentavam o menor valor de TRA, enquanto plantas inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram valores maiores. Porém, as mesmas plantas apresentaram valores de IEM reduzidos, mostrando que as bactérias conseguiram diminuir os danos causados pelo déficit hídrico na membrana celular.

FIGURA 1 – ASPECTOS BIOFÍSICOS. A- TEOR RELATIVO DE ÁGUA (TRA) E B- ÍNDICE DE ESTABILIDADE DE MEMBRANA (IEM) (%) EM PLANTAS DE BRACHIARIA SUBMETIDAS OU NÃO A ESTRESSE HÍDRICO *IN VITRO* INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.



FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade. Letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas em plantas estressadas e não estressadas isoladamente. Letras maiúsculas distinguem plantas estressadas e não estressadas submetidas ao mesmo tratamento.

### 3.2 MORFOLOGIA ESTOMÁTICA

A primeira resposta das plantas à falta de água no solo é diminuir a abertura dos estômatos para evitar a perda de água por transpiração. O fechamento estomático pode se dar por mecanismo de acionamento hidropassivo ou metabólico. De modo passivo, as células guarda perdem água diretamente por evaporação, o que diminui turgescência celular e reflete em menor abertura dos estômatos. Metabolicamente, esse processo é regulado pelo ácido abscísico (MAHAJAN; TUTEJA 2005). O aumento na densidade estomática, acoplada à diminuição no tamanho dos estômatos, é uma alternativa ao suprimento adequado de CO<sub>2</sub> necessário à fotossíntese, sem que haja excessiva perda de água em detrimento dos estômatos com poros de menor tamanho (MELO et al., 2007).

Os dados obtidos para a contagem do número de estômatos em plântulas de brachiaria inoculadas e/ou submetidas ao potencial -0,3 MPa estão demonstrados na Tabela 2. Plantas controle estressadas apresentaram um número 1,9 vezes maior de estômatos em relação às plantas controle. A presença das estirpes bacterianas não promoveu acréscimos significativos no número de estômatos das plântulas em condição normal. Porém, a presença da bactéria *A. brasilense* sob estresse osmótico reduziu o número de estômatos. Apenas a bactéria *L. adecarboxylata* promoveu aumento significativo em relação ao número dos estômatos, sendo similar às das plântulas controle estressadas.

TABELA 2 – NÚMERO DE ESTÔMATOS PRESENTES EM PLANTAS DE BRACHIARIA SUBMETIDAS *IN VITRO* À INOCULAÇÃO COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE ESTRESSE OSMÓTICO.

Tratamento	Número de estômatos	
	Não estressado	Estressado
Controle	11 ± 1 (Bab)	21 ± 2 (Aa)
<i>A. brasilense</i>	12 ± 1 (Aa)	8 ± 0 (Bb)
<i>H. seropedicae</i>	11 ± 1 (Aab)	10 ± 0 (Ab)
<i>L. adecarboxylata</i>	10 ± 1 (Bb)	19 ± 1 (Aa)

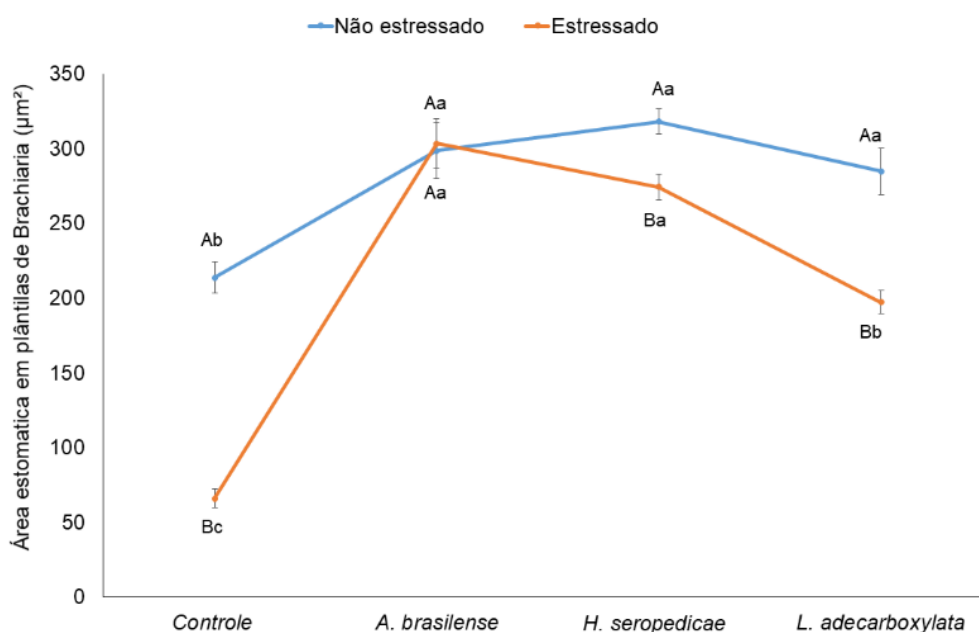
FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade. Letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas em plantas estressadas e não estressadas isoladamente. Letras maiúsculas distinguem plantas estressadas e não estressadas submetidas ao mesmo tratamento.

Em relação à área estomática, plantas controle estressadas apresentaram uma diminuição significativa da área de seus estômatos, comprovando a percepção do estresse osmótico (FIGURA 2). Todos os tratamentos inoculados com as diferentes estirpes bacterianas apresentaram área significativamente maior, com exceção de plantas estressadas e inoculadas com *A. brasilense*, cuja a área estomática foi equivalente ao grupo controle não estressado, possivelmente explicado pelo fato de apresentarem o maior número de estômatos presentes (FIGURA 3).

Melo et al. (2007) observaram que plantas da espécie *Setaria anceps* submetidas ao déficit hídrico apresentaram diminuição no diâmetro dos estômatos, e em plantas da espécie *Paspalum paniculatum* houve o aumento na densidade estomática e a diminuição do diâmetro dos estômatos.

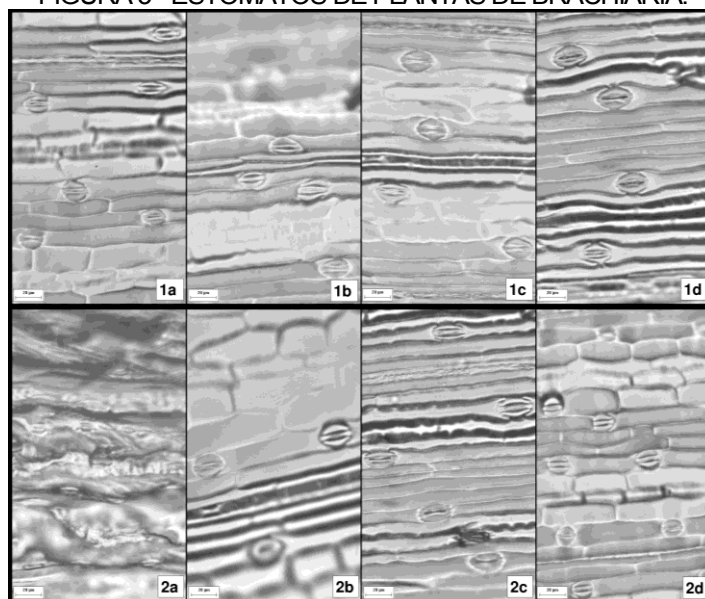
FIGURA 2– ÁREA DE ESTÔMATOS DE PLANTAS DE BRACHIARIA ESTRESSADAS E NÃO ESTRESSADAS INOCULADA COM DIFERENTES BACTÉRIAS.



FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas em plantas estressadas e não estressadas isoladamente. Letras maiúsculas distinguem plantas estressadas e não estressadas submetidas ao mesmo tratamento.

FIGURA 3 - ESTÔMATOS DE PLANTAS DE BRACHIARIA.



FONTE: O autor (2017).

(1) Plantas não estressadas; (2) Plantas estressadas. Plântulas inoculadas com (a) Controle; (b) *A. brasilense*; (c) *H. seropedicae*; (d) *L. adecarboxylata*.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

O alongamento de folhas, é um dos processos fisiológicos mais sensíveis a umidade do solo, pois na condição de déficit hídrico, a planta cessa o crescimento de folhas e raízes antes que os processos de fotossíntese e divisão celular sejam afetados (HSIAO, 1973; LUDLOW; NG, 1977). Dependendo do grau da disponibilidade de água no solo, a taxa de alongamento de folhas pode ser reduzida em até 60%, refletindo negativamente na produção de forragens (MORALES, 1998).

A aplicação de um potencial osmótico negativo (-MPa) *in vitro* e a inoculação de diferentes estirpes bacterianas promoveram resultados distintos no crescimento vegetal de brachiaria medidos pelo comprimento total, comprimento de raiz e da parte aérea das plântulas (FIGURA 4).

Plântulas controle estressadas apresentaram uma redução no tamanho na ordem de 62% demonstrando que a falta de água e nutrientes influenciou de maneira determinante o crescimento vegetal nesta espécie. A inoculação com *H. seropedicae* permitiu um maior crescimento total e da parte aérea das plântulas (19,79 e 18,65%) em relação às plântulas controle. Todavia, a inoculação com as estirpes bacterianas demonstrou potencial para o aumento no comprimento de parte aérea, em plantas expostas ou não ao estresse, pois plântulas estressadas tiveram um desenvolvimento superior ou equivalente ao controle (FIGURAS 4 E 5).

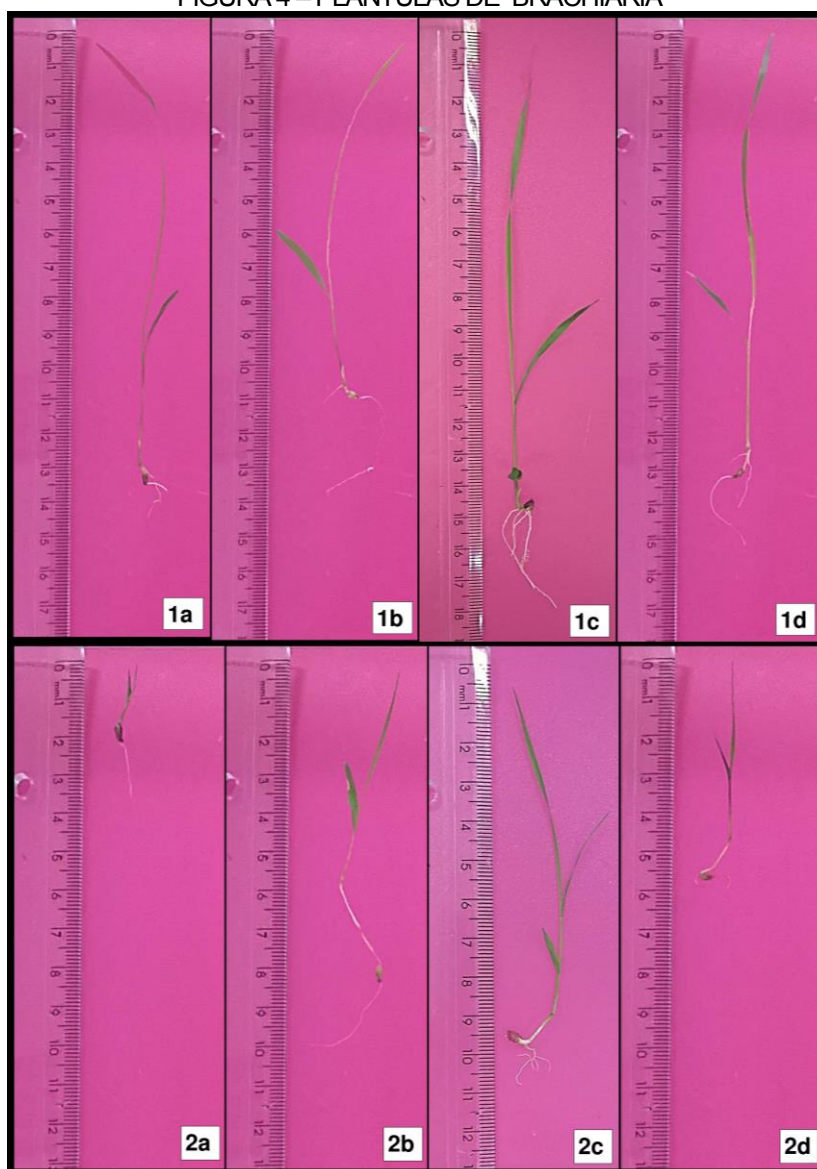
Em relação ao comprimento radicular, plantas não estressadas não diferiram entre controle e inoculadas, já em plantas estressadas, os destaques foram as plantulas inoculadas com *A. brasilense* e *L. adecarboxylata* que apresentaram crescimento radicular superior ao controle (FIGURA 5).

Na literatura são citados diversos trabalhos sobre estresse em forrageiras ou pastagens: Dias Filho et al. (1989), observaram que o déficit hídrico reduziu o tamanho de folhas de plantas de capim-mombaça (*Panicum maximum*). Silva et al. (2005) relatam uma redução de 57,74% no comprimento de folha de capim-setária (*Setaria anceps*) submetido ao déficit hídrico. Barreto et al. (2001) observaram que plantas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) reduziram 28% sua área foliar na falta de água.

Magalhaes et al. (2016) constataram uma redução da lâmina foliar de *Brachiara (Brizantha marandu)* sob baixa disponibilidade de água. Çiçek e Çakırlar (2002) ao estudarem duas variedades de milho constataram diminuição na área foliar de plantas submetidas ao potencial hídrico -0,3 MPa.

Estudos comprovando o efeito benéfico da associação de BPCV em espécies forrageiras são escassos. Porém, Gazola et al. (2015) observaram um aumento significativo no comprimento de parte aérea de brachiaria inoculada com *A. brasilense*.

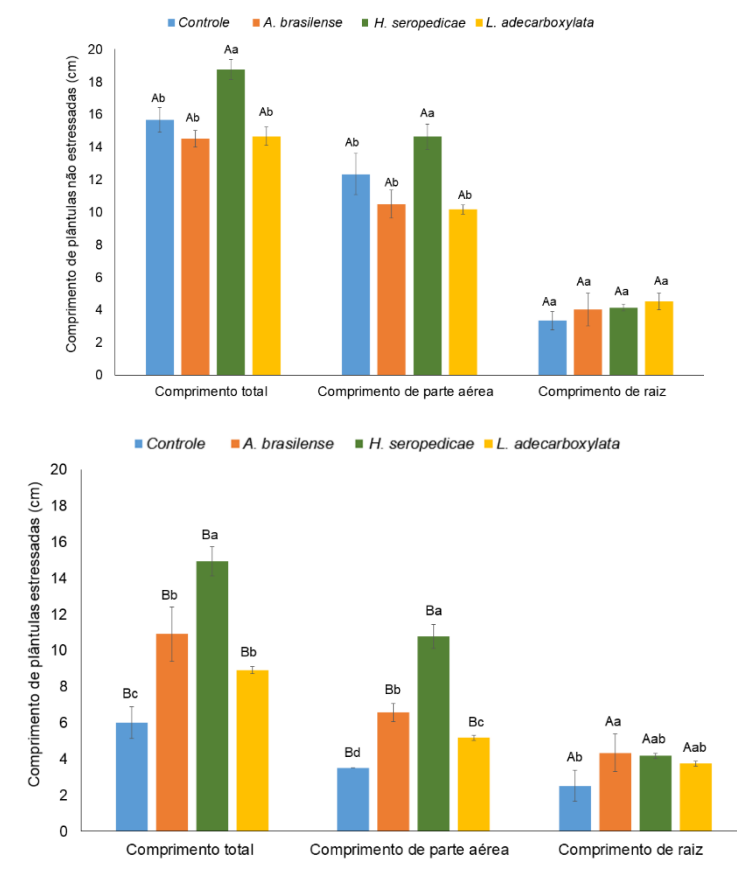
FIGURA 4 – PLÂNTULAS DE BRACHIARIA



FONTE: O autor (2017).

(1) Plantas não estressadas; (2) Plantas estressadas. Plântulas inoculadas com (a) Controle; (b) *A. brasilense*; (c) *H. seropedicae*; (d) *L. adecarboxylata*.

FIGURA 5– ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS, E SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS AO POTENCIAL HIDRICO -0,3 MPa.



FUNTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de tukey, à 5% de probabilidade. Letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas em plantas estressadas e não estressadas isoladamente. Letras maiúsculas distinguem plantas estressadas e não estressadas submetidas ao mesmo tratamento.

### 3.4 MASSA SECA E MASSA FRESCA

O déficit hídrico, tanto moderado como severo, afeta o acúmulo de biomassa vegetal, independente da ocorrência de condições ótimas de outros fatores como luz e temperatura. Isso ocorre pelo fato da condição hídrica influenciar na expansão celular (BONO et al., 2001). A determinação da matéria seca (MS) de forrageiras é muito importante, pois serve para medir a quantidade de biomassa existente em uma pastagem disponível para os animais (OLIVEIRA et al., 2015). A altura do pasto está diretamente ligada a maior produção de massa seca, além disso, nos pastos rasteiros como os de capim brachiaria, as alturas mais elevadas facilitam o pastejo e, conseqüentemente o desempenho animal (GAZOLA et al., 2015).

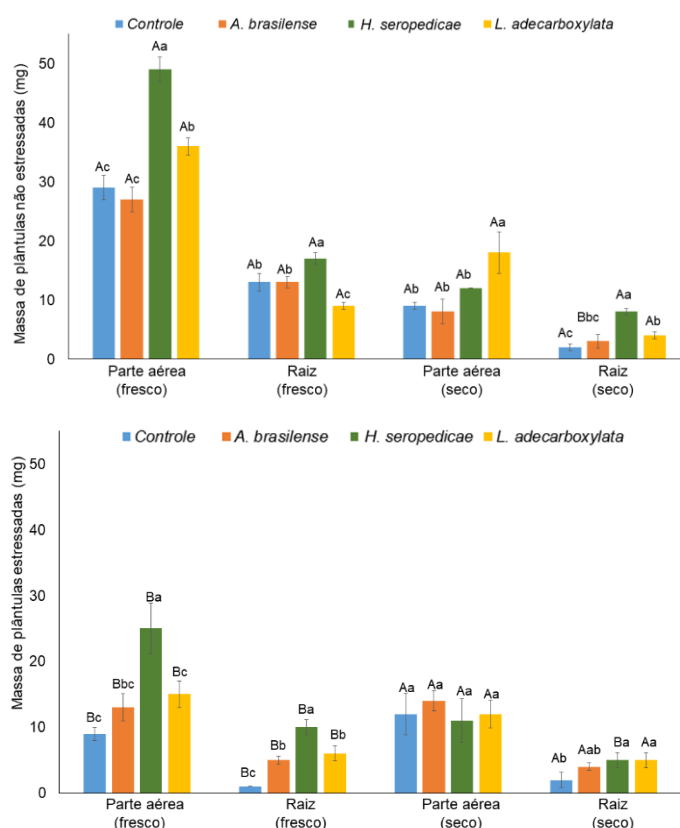
Em plantas não estressadas, as bactérias *H. seropedicae* e *L. adecarboxylata* elevaram significativamente a massa fresca de parte aérea. A bactéria *H. seropedicae* promoveu aumentos na biomassa fresca e seca de parte aérea na ordem de 100 e 24%, respectivamente em relação ao controle (FIGURA 6).

As biomassas radiculares em todos os tratamentos estressados apresentaram -se superiores ao grupo controle estressado. Os dados obtidos discordam com Dias Filho, Corsi e Cusato (1989) que observou uma diminuição da biomassa seca de parte aérea e raiz de plantas de *Panicum maximum* sob a condição de déficit hídrico. Santos et al. (2014) em brachiaria também submetidas à seca encontraram uma redução de 44% na massa seca de parte aérea, no entanto esta mesma espécie obteve um aumento de 25% de sua massa seca de raiz sob as mesmas condições. Pezzopane et al. (2015) observaram uma redução na massa seca e fresca, tanto de raiz quanto de parte aérea de diferentes cultivares de brachiaria submetidas ao déficit hídrico, onde a massa seca de parte aérea foi 49 a 45% menor.

Plantas não estressadas inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram biomassa fresca e seca de raiz superior em relação aos demais tratamentos. Quando estressadas, ainda continuaram a manter as maiores biomassas frescas de parte aérea e de raiz, porém não distintas das demais quando a biomassa da parte aérea foi seca (FIGURA 6). *L. adecarboxilata* apresentou a maior massa da parte aérea seca significativa em relação aos outros tratamentos.

Na cultura do trigo, Didonet et al. (1996) observaram que inoculação com *A. brasilense* na semeadura, não aumento da produção de grãos, restringindo-se somente a aumento da biomassa, onde esse seria um efeito interessante em pastagens, já que o acúmulo de forragem é o objetivo principal da produção.

FIGURA 6 – AVALIAÇÃO DA BIOMASSA FRESCA E SECA (G) DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS E SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS AO POTENCIAL HIDRICO -0,3 MPa.



FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade. (n=3). Letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas em plantas estressadas e não estressadas isoladamente. Letras maiúsculas distinguem plantas estressadas e não estressadas submetidas ao mesmo tratamento.

### 3.5 CONTAGEM MICROBIANA

Os resultados da contagem do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) epi e endofiticamente associadas às plântulas de brachiaria está demonstrada na Tabela 3. Como era esperado, houve a profileração nas plântulas de todas as estirpes avaliadas e o controle não apresentou população bacteriana aderida.

Apenas as bactérias *H. seropedicae* e *L. adecarboxylata* foram encontradas aderidas de forma epi e endofiticamente. *A. brasilense* por não ser endofítica foi encontrada apenas epifiticamente nas plântulas avaliadas. As maiores populações (UFC) foram observadas para *H. seropedicae* demonstrando que esta estirpe possui grande habilidade de associação com esta forrageira. Olivares et al (1996) relataram

o isolamento desta estirpe em várias gramíneas, demonstrando sua alta especificidade para forrageiras. A estirpe *L. adecarboxylata* apresentou uma população menor, praticamente a metade da encontrada para *H. seropedicae*, porém, quase o dobro da observada para *A. brasilense*.

Os resultados apontam para uma especificidade entre estirpe e brachiaria, demonstrando que *H. seropedicae* e *L. adecarboxylata* são estirpes de alta afinidade.

Como era esperado, todas as espécies bacterianas apresentaram o padrão de banda esperado para o gene filogenético 16S (FIGURA 7).

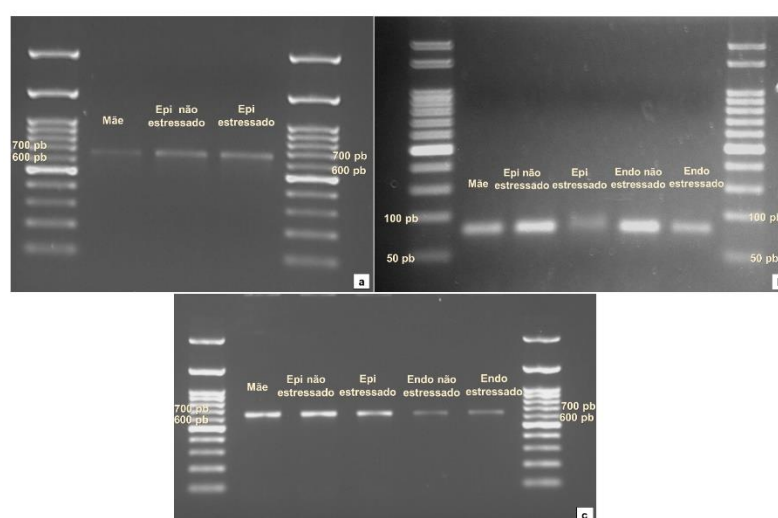
TABELA 3 – CONTAGEM MICROBIANA EPI E ENDOFITICAMENTE ADERIDA ÀS RAÍZES DE BRACHIARIA SUBMETIDAS *IN VITRO* À ESTRESSE OSMÓTICO E INOCULAÇÃO COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS.

Tratamento	Não estressado		Estressado	
	Epifíticas (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Endofíticas (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Epifíticas (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Endofíticas (UFC.mL <sup>-1</sup> )
Controle	-	-	-	-
<i>A. brasilense</i>	3,56 ± 0,21 (Ac)	0 ± 0 (Bc)	3,63 ± 0,12 (Ac)	0 ± 0 (Bc)
<i>H. seropedicae</i>	17,86 ± 0,50 (Aa)	14,90 ± 0,10 (Aa)	17,43 ± 6,17 (Aa)	15,43 ± 7,62 (Aa)
<i>L. adecarboxylata</i>	8,10 ± 0,95(Ab)	2,53 ± 0,15(Ab)	6,46 ± 0,15 (Bb)	2,33 ± 0,25(Ab)

FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade. (n=3). Letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas em plantas estressadas e não estressadas isoladamente. Letras maiúsculas distinguem plantas estressadas e não estressadas submetidas ao mesmo tratamento.

FIGURA 7 - PADRÃO DE BANDA ENCONTRADO PARA O GENE FILOGENÉTICO 16S.



FONTE: O autor (2017).

(a) *A. brasilense* (pm= 648pb); (b) *H. seropedica* (pm= 76pb); (c) *L. adecarboxylata* (pm=601pb).

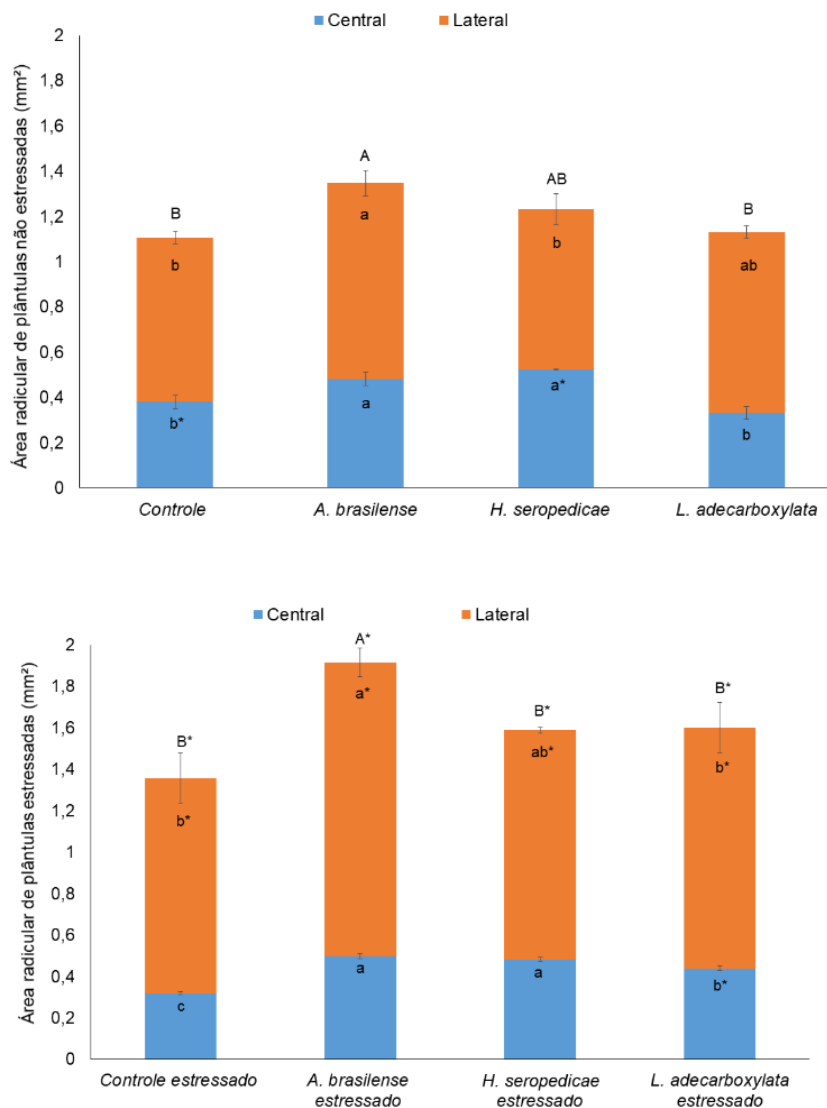
### 3.6 ÁREA RADICULAR

Comumente a brachiaria faz um aprofundamento radicular em condições de estresse hídrico. Plantas controle estressada tiveram um aumento da superfície radicular na proporção de 43% (raízes laterais), porém apresentaram uma redução da área central radicular na ordem de 16% em relação às plantas controle não estressadas. Guenni et al. (2004) observaram em Brachiaria, sob condições de restrição hídrica, uma redistribuição no sistema radicular aumentando a razão da parte área/raiz em maiores profundidades.

Plantas estressadas e inoculadas com *A. brasilense* apresentaram área de raiz superior comparado aos outros tratamentos, onde a área total aumentou 41% devido o aumento tanto da raiz central (58%), como de raízes laterais (37%) em relação às plantas controle estressadas. A inoculação com *L. adecarboxylata* apresentou esta mesma tendência de aumento com valores em porcentagem menores, porém significativos, de 17% na área total da raiz, equivalendo a 38% e 12%, para raiz central e lateral respectivamente, em relação ao controle estressado (FIGURAS 8 E 9).

Plantas inoculadas com *H. seropedicae* obtiveram um aumento significativo em suas raízes laterais (FIGURA 9). Muller (2016) ao inocular a bactéria *A. brasilense* em plantas de milho, constatou um aumento significativo na área das raízes de uma das variedades.

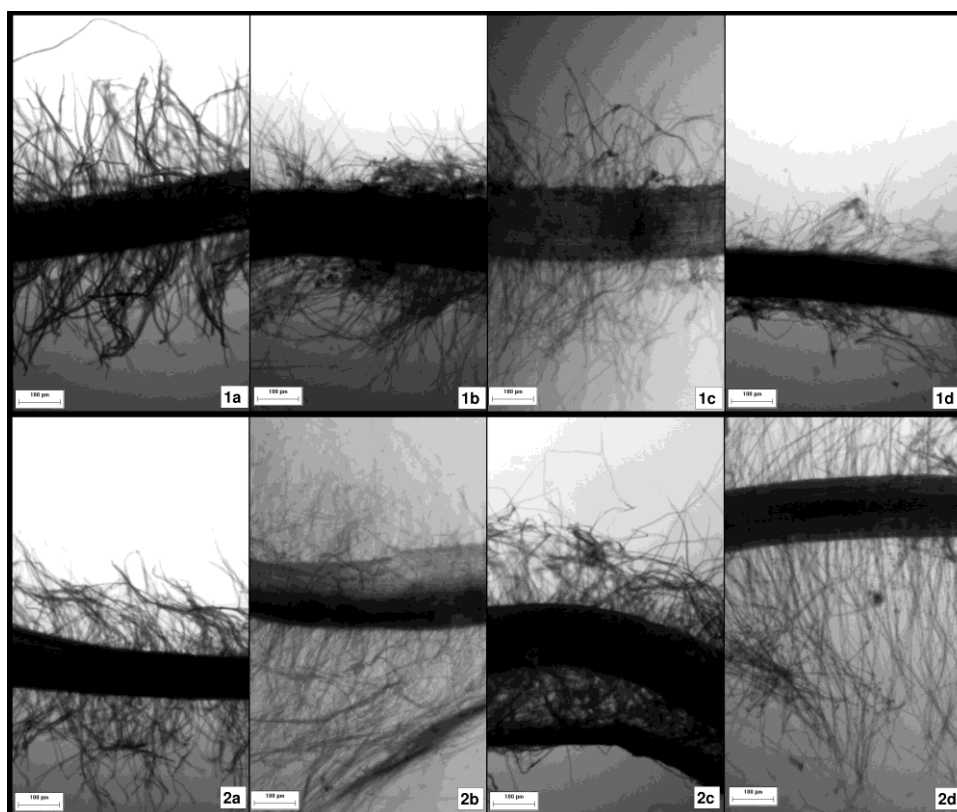
FIGURA 8 – ÁREA RADICULAR DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS E SUBMETIDAS AO POTENCIAL HIDRICO -0,3 MPa.



FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade. (n=3). Letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas em plantas estressadas e não estressadas isoladamente. Letras maiúsculas distinguem as médias da raiz total das plantas. Asteriscos distinguem plantas estressadas e não estressadas submetidas ao mesmo tratamento.

FIGURA 9 – RAÍZES DE PLANTAS DE BRACHIARIA.



FONTE: O autor (2017).

(1) Plantas não estressadas; (2) Plantas estressadas. Plântulas inoculadas com (a) Controle; (b) *A. brasilense*; (c) *H. seropedicae*; (d) *L. adecarboxylata*.

### 3.7 ANÁLISE ENZIMÁTICA

As EROs ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas tornam-se tóxicas à célula. Porém as células dispõem de vários mecanismos para detoxificar eficientemente essas espécies ativas de oxigênio. Esses mecanismos de proteção, foram desenvolvidos pelas plantas durante o processo de evolução. Moléculas antioxidantes, enzimas simples, e um sistema mais complexo de detoxificação, podem estar envolvidos na proteção celular contra EROS acumuladas (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Os níveis das EROs durante o estresse oxidativo podem indicar o perfil antioxidante e a recuperação das plantas submetidas a tal estresse (FOYER; NOCTOR, 2005). O estresse osmótico pode promover o aparecimento de EROs e flutuações nos níveis enzimáticos obtidos em folhas de Brachiaria indicam que houve um metabolismo antioxidante distinto em resposta à seca.

### 3.7.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A enzima SOD é considerada a primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo (APEL; HIRT, 2004). Esta enzima tem um papel fundamental do sistema enzimático na remoção do  $O_2^-$  (BOWLER; MONTAGU; INZÉ, 1992). Plantas não estressadas inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram atividade da SOD muito inferior aos demais tratamentos (FIGURA 10) apontando para uma percepção diferencial da planta à presença de determinada estirpe bacteriana. Camargo (2013) observou um aumento na atividade da SOD em plantas de cana-de-açúcar tolerante à seca e submetidas ao estresse hídrico.

Os resultados da atividade específica da SOD em plantas controle e inoculadas com *H. seropedicae* estressadas tiveram um aumento de 29% e 1520%, respectivamente, demonstrando que a SOD é essencial na tentativa de conter os danos do estresse oxidativo.

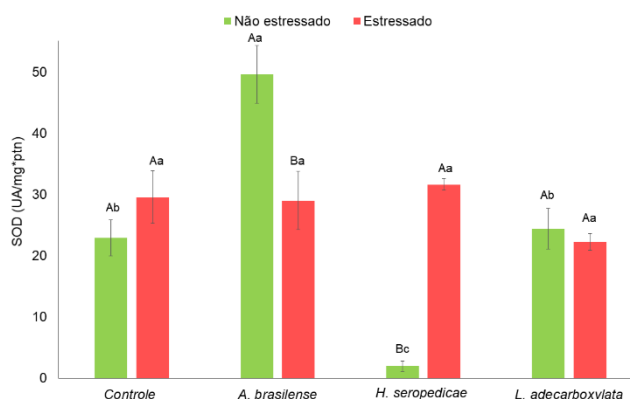
Porém, plantas inoculadas com *A. brasilense* apresentaram níveis elevados de SOD sem o estresse, apontando para uma resposta antioxidante pela presença da bactéria, o que induziria a um sistema de proteção prévio. Estas plântulas, quando submetidas ao estresse com PEG, apresentaram os níveis de SOD reduzidos. Os resultados concordam com os obtidos por Muller (2016) que, ao inocular *A. brasilense* em plantas de milho, observou uma maior atividade da enzima SOD, indicando que esta bactéria aumenta a capacidade de defesa ao estresse oxidativo em milho.

Por outro lado, Bulegon, Guimarães e Laureth (2016) ao avaliar a atividade de SOD em plantas de *Urochloa ruziziensis*, submetidas ao déficit hídrico e à aplicação de *A. brasilense*, observaram que a inoculação induziu a uma maior atividade desta enzima. Em grama azul (*Poa pratensis*), os níveis de SOD foram diferentes comparando-se raízes e folhas. Os níveis foram maiores nas raízes e plantas submetidas a 5 dias de estresse hídrico apresentaram uma diminuição na SOD em relação ao controle (BIAN; JIANG, 2009).

Baixos níveis de SOD aumentam a peroxidação de lipídios da membrana (DACOSTA; HUANG, 2007). De acordo com esta afirmativa, apenas *H. seropedicae* poderia controlar os níveis de peroxidação de lipídeos, mantendo o IEM das células intactas apesar da ocorrência do estresse oxidativo, o que também determinaria um alto valor de TRA, ajudando a planta a manter sua atividade metabólica até a recuperação dos níveis hídricos (FIGURA 1).

Os níveis de atividade específica da SOD não foram alterados quando as plantas foram inoculadas com *L. adecarboxylata*, sendo similares aos encontrados nas plantas controle (FIGURA 10).

FIGURA 10 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE OSMÓTICO.



FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade. Letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas em plantas estressadas e não estressadas isoladamente. Letras maiúsculas distinguem plantas estressadas e não estressadas submetidas ao mesmo tratamento.

### 3.7.2 CATALASE (CAT)

A CAT é uma enzima encontrada nos peroxissomos que atua auxiliando no ciclo ascorbato-glutationa, especificamente na desintoxicação de peróxido de hidrogênio (WILLEKENS et al., 1997; mecanismos (AHMAD, 2010).

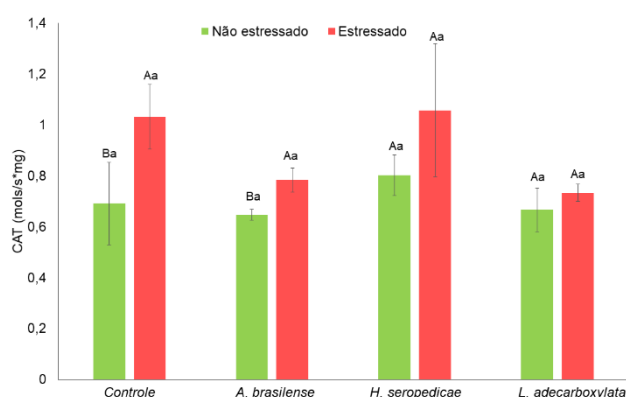
Plantas controle e plântulas inoculadas com *A. brasilense* em condições de estresse apresentaram níveis maiores de CAT. Os dados obtidos são similares aos encontrados por Bulegon et al (2016) que em *Urochloa ruziziensis* inoculadas com *A. brasilense* e submetidas ao déficit hídrico, apresentam uma atividade da enzima CAT aumentada. No entanto, não houve diferença significativa em nenhum dos tratamentos estressados em relação a atividade da enzima CAT (FIGURA 11).

Na literatura, apesar de não serem comparáveis pela espécie, em milho houve um aumento de 6 vezes na atividade específica da enzima CAT após 6 dias de restrição hídrica (HENDGES et al., 2015). Viana et al. (2011) relatam que não houve variações nos níveis de CAT em plantas de milho em fase de desenvolvimento submetidas a diferentes potenciais hídricos (até -0,10 MPa). Camargo (2013)

observou uma baixa na atividade da CAT em plantas de cana-de-açúcar sob estresse hídrico.

Em grama azul (*Poa pratensis*), os níveis de CAT variam em raízes e folhas. Os níveis da CAT foram maiores nas folhas e plantas submetidas a 5 dias de estresse hídrico apresentaram um aumento significativo da SOD nas raízes em relação ao controle (BIAN; JIANG, 2009).

FIGURA 11 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS AO POTENCIAL HÍDRICO -0,3 MPa.



FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade. Letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas em plantas estressadas e não estressadas isoladamente. Letras maiúsculas distinguem plantas estressadas e não estressadas submetidas ao mesmo tratamento.

### 3.7.3 ASCORBATO PEROXIDASE (APX)

A enzima APX é uma das primeiras linhas de defesa da planta, durante o processo de aclimação a seca, é uma enzima essencial para controlar o estresse oxidativo (LU, DENG e KWAK, 2010). Tem um papel importante na detoxificação celular pela presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ASADA, 1999).

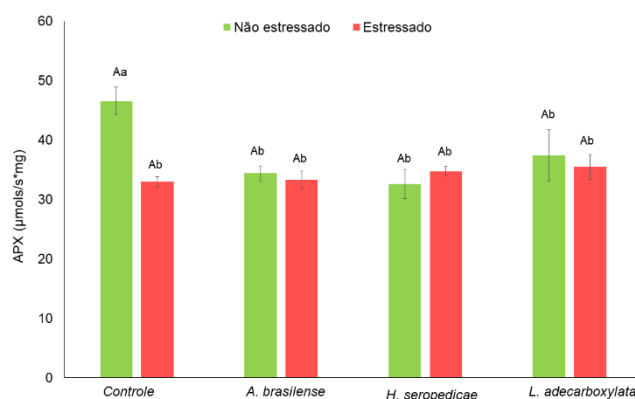
A enzima APX apresentou maior atividade em plantas controle e a menor atividade em plantas do grupo controle estressado. Os demais tratamentos inoculados em condição normal e estresse não diferiram significativamente, o que aponta para o efeito das estirpes na regulação da atividade desta enzima (FIGURA 12).

Plantas de cana-de-açúcar tolerante à seca e submetidas à restrição hídrica tiveram a atividade da APX maior em relação as plantas controle (CAMARGO, 2013).

No entanto, outros autores em milho sob restrição hídrica, não observaram diferenças significativas em relação à APX (HENDGES et al., 2015; VIANA et al, 2011).

Aguiar (2015) ao inocular *H. seropedicae* em plantas cana-de-açúcar secas observou a queda na atividade enzimática das APX. Em grama azul (*Poa pratensis*), de modo similar ao descrito acima, apresentou níveis de APX diferentes em raízes e folhas. Nesta gramínea, os níveis foram maiores nas raízes comprando-se a parte aérea. Plantas submetidas a 5 dias de estresse hídrico apresentaram um aumento na SOD na parte aérea, porém não houve variação em relação à APX radicular (BIAN e JIANG, 2009).

FIGURA 12 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ASCORBATO PEROXIDASE DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS E SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS AO POTENCIAL HÍDRICO -0,3 MPa.



FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade. Letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas em plantas estressadas e não estressadas isoladamente. Letras maiúsculas distinguem plantas estressadas e não estressadas submetidas ao mesmo tratamento.

### 3.7.4 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

A GST é uma enzima que pode atuar como peroxidase auxiliando no ciclo ascorbato-glutationa na desintoxicação de peróxido de hidrogênio, além de atuar na conjugação de glutatona reduzida com moléculas xenobióticas (GILL e TUTEJA, 2010).

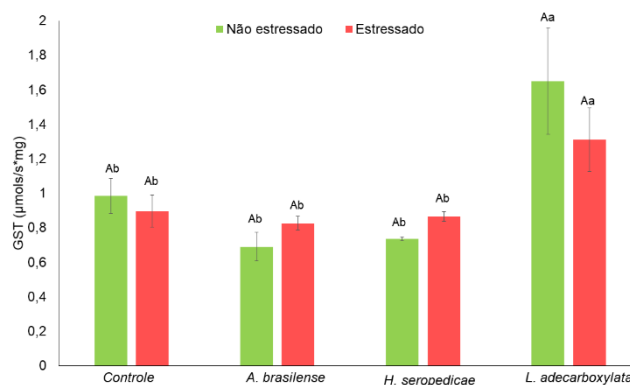
A atividade enzimática da glutatona-S-transferase foi maior em plantas inoculadas com *L. adecarboxylata*, independente do estresse, mas dependente da

presença desta bactéria. Nas demais condições, a atividade enzimática foi equivalente ao grupo controle não estressado (FIGURA 13).

Em outras culturas, sob estresse e com outras bactérias, a GST parece ter níveis diminuídos ou apenas observados na parte radicular da planta (KOJIÉD et al., 2012; CAMARGO, 2013; HENDGES et al., 2015).

Filippou, Antoniou e Fotopoulos (2011) ao estudar plantas de trigo controle e estressadas, observou queda nos valores da atividade de GST em plantas inoculadas, sendo explicado pela resposta mais à inoculação do que ao propriamente ao estresse.

FIGURA 13 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE DE PLÂNTULAS INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES BACTERIANAS E SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS AO POTENCIAL HÍDRICO -0,3 MPa.



FONTE: O autor (2017).

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade. Letras minúsculas distinguem os tratamentos com diferentes estirpes bacterianas em plantas estressadas e não estressadas isoladamente. Letras maiúsculas distinguem plantas estressadas e não estressadas submetidas ao mesmo tratamento.

A imposição de déficit osmótico foi capaz de simular o efeito do déficit hídrico acarretando na variação dos valores de TRA, IEM, biomassa, número de estômatos e atividade enzimática. Estes estudos são fundamentais para a determinação dos mecanismos envolvidos na interação de BPCV com forrageiras visando a obtenção de produtos comerciais.

As respostas diferenciais tanto pelo efeito da imposição do déficit e/ou da inoculação apontam para atividades antioxidantes distintos, uma vez conferindo tolerância à seca como também distinguindo a espécie bacteriana como patógeno ou associativo (FURLAN, 2013).

## 4 CONCLUSÕES

1. Todas as estirpes apresentaram um efeito positivo na manutenção da atividade metabólica celular observada pela manutenção do TRA e IEM em plantas sob restrição hídrica;

2. *A. brasilense* foi a bactéria que promoveu os maiores aumentos na parte radicular, principalmente no aumento de raízes laterais, na manutenção da área estomática em ambas condições (controle e estressado), podendo ser considerada como a melhor estirpe de promoção de crescimento vegetal nesta espécie;

3. *H. seropedicae* foi a estirpe que promoveu os maiores incrementos na biomassa fresca e seca de plantas controle e estressadas e obteve a maior população endofítica demonstrando alto grau de associação;

4. A estirpe *L. adecarboxylata* é promissora para ser usada em forrageiras pelo incremento nas biomassas da parte aérea e radicular, como pela manutenção do TRA e IEM em altos níveis sob restrição hídrica;

5. Os parâmetros de crescimento vegetal: comprimento e biomassa radicular não foram correspondentes ou proporcionais à área radicular;

6. A atividade enzimática foi modificada tanto pela presença da bactéria e ainda mais pela imposição do estresse;

7. A atividade enzimática diferenciada poderia apontar como marcador de resposta pela presença das bactérias *A. brasilense* e *H. seropedicae* como *L. adecarboxylata* (GST).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as espécies forrageiras, a Brachiaria (*Urochloa ruziziensis*) foi a que apresentou melhor resposta à inoculação com BPCV podendo ser apontada como planta modelo para estudos futuros de interação planta x bactéria. O estresse osmótico imposto foi capaz de simular condições de estresse hídrico, útil para a definição da brachiaria como planta modelo nestas condições. Dentre as estirpes avaliadas, *A. brasilense* foi considerada como a melhor estirpe para fins comerciais pelos efeitos benéficos de promoção de crescimento vegetal e proteção durante o estresse osmótico imposto. A estirpe *L. adecarboxylata* primeiramente estudada neste trabalho é promissora para ser usada em forrageiras, porém estudos futuros deverão ser realizados para a reprodutibilidade dos resultados. Estudos futuros deverão ser realizados para confirmar tanto a SOD (*A. brasilense* e *H. seropedicae*) como a GST (*L. adecarboxylata*) como marcadores enzimáticos da interação brachiaria x estirpes bacterianas.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, N. de O. **Perfil metabólico de Cana-de-açúcar tratada com bioinoculante à base de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas**. 2015. 134 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Produção Vegetal, Centro de Ciências Tecnológicas Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2015.
- AHMAD, P. et al. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 161-175, 2010.
- ASADA, K. The water–water cycle in chloroplast: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, Annual Review of Plant Physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 50, p.601–639. 1999.
- APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, [S.l.], v. 55, n. 1, p.373-399, 2 jun. 2004.
- ARAUJO, F. F. de. et al. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Zootecologia**, [S.l.], v. 41, n. 3, p. 521-527, 2012.
- BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, [S.l.], v. 32, n. 11, p.1559-1570, 16 jul. 2010.
- BAJJI, M.; KINET, J. M.; LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**, [S.l.], v. 36, p.61-70. 2002.
- BARRETO, G. P. et al. Avaliação de Clones de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e de um Híbrido com o Milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) Submetidos a Estresse Hídrico. 1. Parâmetros Morfológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 1, p.1-6, jan. 2001.
- BARUSELLI, M. S.; O, Radziah. **SECA: Para superar a falta de chuva...** 2007. Elaborado por ZANHOLO, B.; MOITINHO, F.; COSTA. Disponível em: <<http://www.revistarural.com.br>>. Acesso em: 10 out. 2017.
- BECK, E. H. et al. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. **Journal Of Biosciences**, [S.l.], v. 32, n. 3, p.501-510, abr. 2007.
- BIAN, S.; JIANG, Y. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. **Scientia Horticulturae**, v. 120, n. 2, p. 264-270, 2009.
- BHATTACHARJEE R.; DEY U. Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. **African Journal Of Microbiology Research**, [S.l.], v. 8, n. 24, p.2332-2343, 11 jun. 2014. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajmr2013.6374>.

BONO, L. et al. Alterações no padrão de resposta à luz da condutância estomática do milho causadas pelo déficit hídrico. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p.27-34, 2001.

BOWLER, C.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, Gent, v. 43, n. 1, p.83-116, 1992.

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

CAMARGO, I. A. de. **Sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à seca**. 2013. 87 f. Tese (Doutorado) - Curso de Mestrado em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CAMILIOS-NETO, D. et al. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, [S.l.], v. 15, n. 1, p.378-390, 2014.

ÇIÇEK, N.; ÇAKIRLAR, H. The Effect Of Salinity On Some Physiological Parameters In Two Maize Cultivars. **Bulgarian Journal Of Plant Physiology**, Beytepe, v. 28, n. 1, p.66-74, jan. 2002.

DACOSTA, M.; HUANG, B. Deficit Irrigation Effects on Water Use Characteristics of Bentgrass Species. **Crop Science**, [S.l.], v. 46, n. 4, p.1779-1786, 2006.

DIAS FILHO, M. B.; CORSI, M.; CUSATO, S. Respostas morfológicas de *Panicum maximum* JACQ. cv. Tobiata ao estresse hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 7, p.893-898, jul. 1989.

DIDONET, A. D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M. H. Acúmulo de Nitrogênio e de massa seca em plantas de Trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 9, p.645-651, set. 1996.

FERREIRA, D. F. Sisvar 5.6. Lavras, MG, Brazil: Universidade Federal de Lavras. 2006, Software.

FILIPPOU, P.; ANTONIOU, C.; FOTOPOULOS, V. Effect of drought and rewatering on the cellular status and antioxidant response of *Medicago truncatula* plants. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 2, p. 270-277, 2011.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell And Environment**, [S.l.], v. 28, n. 1, p.1056-1071, 2005.

FURLAN, F. et al. Influência do potencial hídrico induzido por polietilenoglicol in vitro na morfologia do trigo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, [S.l.], v. 9, n. 3, p.370-375, 30 set. 2014.

FURLAN, F. **Efeito do déficit hídrico em duas variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) em associação com bactérias promotoras do crescimento vegetal.** 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2013.

GAZOLA, T. et al. Efeitos da inoculação de *Azospirillum brasilense* em área de pastagem. **Unimar Ciências**, Marília, v. 24, n. 1, p.40-48, jan. 2015.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 48, n. 12, p.909-930, dez. 2010.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, [S.l.], v. 2012, p.1-15, 2012.

GUENNI, O.; BARUCH, Z.; MARÍN, D. Responses to drought of five *Brachiaria* species. II. Water relations and leaf gas exchange. **Plant And Soil**, [S.l.], v. 258, n. 1, p.249-260, jan. 2004.

GUIMARÃES, S. L. et al. Crescimento inicial de plantas de arroz inoculadas com *Azospirillum* spp. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, [S.l.], v. 11, n. 567, p.45-50, 2013.

HABIB, S. H.; KAUSAR, H.; SAUD, H. M. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Salinity Stress Tolerance in Okra through ROS-Scavenging Enzymes. **Biomed Research International**, [S.l.], v. 2016, p.1-10, 2016.

HENDGES, F. B. et al. Avaliação enzimática e fisiológica de plântulas de milho submetidas à seca. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, Palotina, v. 4, n. 1, p.52-63, 2015.

HSIAO, T. C. Plant Responses to Water Stress. **Annual Review Of Plant Physiology**, [S.l.], v. 24, n. 1, p.519-570, jun. 1973.

HUREK, T. et al. *Azoarcus* Grass Endophytes Contribute Fixed Nitrogen to the Plant in an Unculturable State. **Molecular Plant-microbe Interactions**, [S.l.], v. 15, n. 3, p.233-242, 2002.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen Fixation in Wheat Provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-microbe Interactions**, [S.l.], v. 17, n. 10, p.1078-1085, 2004.

JALEEL C. A. et al. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture and Biology**. [S.l.], v. 11, p.100–105. 2009.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, p.193-265, 1951.

LU, Y. Y.; DENG, X. P.; KWAK, S. S. Over expression of CuZn superoxide dismutase (CuZn SOD) and ascorbate peroxidase (APX) in transgenic sweet potato enhances tolerance and recovery from drought stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 49, p. 8378-8391, 2010.

LUDLOW, M. M.; NG, T. T. Leaf Elongation Rate in *Panicum maximum* var. *trichoglume* Following Removal of Water Stress. **Australian Journal Of Plant Physiology**, [S.l.], v. 4, n. 2, p.263-272, 1977.

MAGALHÃES, J. A. et al. Características morfogênicas e estruturais do Capim-Marandu sob irrigação e adubação. **Holos**, [S.l.], v. 8, p.113-124, 9 maio 2017.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.l.], v. 444, n. 2, p.139-158, dez. 2005.

MEDIA CYBERNETICS, Image-Pro Plus 4.5.0.29, Silver Spring, MD, USA: Roper Technologies, 1999. Software.

MELO, H. C. de et al. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, Lavras, v. 34, n. 2, p.145-153, 2007.

MILLER, G. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, [S.l.], v. 33, n. 4, p.453-467, abr. 2010.

MORALES, A. A. Morfogênese e repartição de carbono em *Lotus corniculatus* L cv. São Gabriel sob o efeito de restrições hídricas e luminosas. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998, 74p. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

MULLER, T. M. **Componentes de Produtividade de Grãos e de Atividade Enzimática na Cultura do Milho Inoculado com *Azospirillum brasiliense* em Tratamento de Sementes e Aplicação Foliar**. 2016. 85 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, [S.l.], v. 15, n. 3, p.473-497, jul. 1962.

MUTAI, C.; NJUGUNA, J.; GHIMIRE, S. R. Bacterial community associated with *Brachiaria* spp. in Kenya. *Climate Smart Brachiaria Grasses for Improving Livestock Production in East Africa–Kenya Experience*, p. 163, 2016.

OBERSON, A. et al. Nitrogen fixation and transfer in grass-clover leys under organic and conventional cropping systems. **Plant And Soil**, [S.l.], v. 371, n. 1-2, p.237-255, 21 mar. 2013.

OLIVARES, F. L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, [S.l.], v. 21, p. 197-200, 1996.

OLIVEIRA, J. S. et al. **Como medir a matéria seca (MS%) em forragem utilizando forno de micro-ondas**. 2015. Comunicado Técnico 77, Juiz de Fora, MG. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 25 out. 2017.

OLIVEIRA, J. T. A., GONDIM D. M. F., et al. **Ensaio enzimáticos de proteínas e inibidores de proteases envolvidos com a defesa de plantas a patógenos**. In: Embrapa (Ed.). Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais. Brasília/DF: AMARAL, F., CARNEIRO, P., ROSA, M., ANDRADE, L., v.1, 2010. p. 761.

PETERS, M. et al. The Role of Forages in Reducing Poverty and Degradation of Natural Resources in Tropical Production Systems. **Agricultural Research & Extension Network**, [S.l.], v. 117, n. 1, p.1-12, jun. 2001.

PEZZOPANE, C. de G. et al. Estresse por deficiência hídrica em genótipos de *Brachiaria brizantha*. **Ciência Rural**, [S.l.], v. 45, n. 5, p.871-876, maio 2015.

RAZI, S. S.; SEN, S. P. Amelioration of water stress effects on wetland rice by urea-N, plant growth regulators, and foliar spray of a diazotrophic bacterium *Klebsiella* sp. **Biology And Fertility Of Soils**, [S.l.], v. 23, n. 1, p.454-458, 1996.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 28, n. 2, p.123-130, mar. 2003.

RIBEIRO, C. **Como recuperar pastos degradados**. 2016. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com>>. Acesso em: 26 out. 2017.

RICHARDSON, A. E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant And Soil**, [S.l.], v. 321, n. 1-2, p.305-339, 27 fev. 2009.

SANTOS, O. O. et al. Desempenho ecofisiológico de milho, sorgo e braquiária sob déficit hídrico e reidratação. **Bragantia**, [S.l.], v. 73, n. 2, p.203-212, 3 jun. 2014.

SCHONFELD, M. A. et al. Water Relations in Winter Wheat as Drought Resistance Indicators. **Crop Science**, [S.l.], v. 28, n. 3, p.526-531, 1988.

SEGATTO, F. B. et al. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p.1597-1601, out. 2004.

SHANWARE, A. S.; KALKAR, S. A.; TRIVEDI, M. M. Potassium Solubilizers: Occurrence, Mechanism and Their Role as Competent Biofertilizers. **International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences**, [S.l.], v. 3, n. 9, p.622-629, 2014.

SHAO H. B. et al. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. **Comptes Rendus Biologies**, [S.l.] v. 331, p.433–441. 2008.

SILVA, M. C. P. et al. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 29, n. 1, p. 163-171, 2013.

SILVA, M. M. P. da et al. Respostas Morfogênicas de Gramíneas Forrageiras Tropicais sob Diferentes Condições Hídricas do Solo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Piracicaba, v. 34, n. 5, p.1493-1504, 2005.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. **Physiology And Molecular Biology Of Plants**, [S.l.], v. 17, n. 2, p.93-103, abr. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12298-011-0062-x>.

VENDRUSCOLO, E. C. G. et al. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Journal Of Plant Physiology**, [S.l.], v. 164, n. 10, p.1367-1376, out. 2007.

VIANA, M. C. M. et al. Atividade de enzimas antioxidantes em linhagem de milho (*Zea mays* L.) submetidas a déficit hídrico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilheus. **Anais**: SBFV, 2001. p. 1 - 3.

VERMA, V. C.; SINGH, S. K.; PRAKASH, Satya. Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. **Journal Of Basic Microbiology**, [s.l.], v. 51, n. 5, p.550-556, 9 jun. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201000155>.

WILLEKENS, H. et al. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. **The Embo Journal**, [S.l.], v. 16, n. 16, p.4806-4816, 1997.