

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA CIÊNCIA DO SOLO**

**TESE**

**Metabolismo de Nitrogênio em Plantas de Milho  
Inoculadas com Dois Gêneros de Bactérias  
Diazotróficas**

**Albiane Carvalho Dias**

**2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA –  
CIÊNCIA DO SOLO**

**METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE MILHO  
INOCULADAS COM DOIS GÊNEROS DE BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS**

**ALBIANE CARVALHO DIAS**

*Sob a Orientação do Pesquisadora*  
**Veronica Massena Reis**

*e Coorientação do Professor*  
**Leandro Azevedo Santos**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

Seropédica, RJ  
Novembro de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D541m	<p>Dias, Albiane Carvalho, 1990- Metabolismo de nitrogênio em plantas de milho inoculadas com dois gêneros de bactérias diazotróficas / Albiane Carvalho Dias. – Seropédica, 2021. 134 f. : il.</p> <p>Orientadora: Veronica Mssena Reis. Tese (Doutorado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2021.</p> <p>1. <i>Azospirillum baldaniorum</i>. 2. Bactéria promotora de crescimento de planta. 3. <i>Herbaspirillum seropedicae</i>. 4. Nitrato. 5. <i>Zea mays</i> L. I. Reis, Veronica Massena, 1961-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo III. Título.</p>
-------	--

<p>É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.</p>
--

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

**ALBIANE CARVALHO DIAS**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, área de Concentração em Biologia do Solo.

TESE APROVADA EM 30/11/2021.

---

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia  
(Orientadora)

---

Bruno José Rodrigues Alves. Dr. Embrapa Agrobiologia

---

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ

---

Marcia Soares Vidal. Dra. Embrapa Agrobiologia

---

Gabriela Cavalcanti Alves. Dra. SuperAgro Agronegócios

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a Deus e à minha família, que sempre estiveram presentes nas minhas conquistas.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dá forças e permitir a realização deste trabalho.

Aos meus pais, família e amigos, pelo amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado, por todo amor e companheirismo, e também por estar presente durante todo o tempo.

A minha orientadora Veronica Massena Reis, pela confiança, paciência, motivação, apoio, ensinamentos e disponibilidade em todos os momentos necessários.

Ao meu coorientador Leandro Azevedo Santos pelos ensinamentos e valiosas contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo (PPGA-CS), pela grande oportunidade concedida.

Aos professores, colegas e funcionários do PPGA-CS.

A EMBRAPA Agrobiologia por toda infraestrutura e apoio concedidos para condução dos experimentos, assim como aos funcionários e amigos de todos os setores da unidade. Ao grupo do laboratório de Gramíneas: Lúcio, Geraldo, Nathália, Kaoany, Lorraine, Liliandra, Cecília, Rita, Danilo, Cleiton, Gabriel e aos demais bolsistas por todo apoio e ótimo convívio diário. Em especial aos amigos Gabi, Thamires, Wilson e Erinaldo pelo apoio na condução dos trabalhos.

Ao pesquisador Jean Luiz Simões Araújo pelos ensinamentos e apoio com os primers para as estirpes em estudo.

Ao laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UFRRJ.

A banca examinadora pela disponibilidade.

Ao CNPq, CAPES, FAPERJ, EMBRAPA e Newton Found pelo apoio financeiro concedido durante a pesquisa.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Albiane Carvalho Dias, nascida em Piraí no estado do Rio de Janeiro, iniciou a graduação em Engenharia Ambiental no Centro Universitário de Volta Redonda (UniFOA) em 2009 diplomando-se em 2013. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica pela FOA na área de gestão de resíduos sólidos e líquidos. Iniciou a Pós-Graduação em Engenharia de Segurança do Trabalho no Centro Universitário Geraldo Di Biase (UGB) em fevereiro de 2015. Em março de 2015 ingressou no mestrado no curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola e Ambiental (PGEAAmb/UFRRJ) sob a orientação do professor Dr. Alexandre Lioi Nascentes. No segundo semestre de 2017, ingressou no doutorado no curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo na UFRRJ, sob a orientação da pesquisadora Veronica Massena Reis (Embrapa-Agrobiologia).

## RESUMO

DIAS, Albiane Carvalho. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de milho inoculadas com dois gêneros de bactérias diazotróficas**. 2021. 134f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2021.

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais produzidos no mundo. A sua inoculação com bactérias diazotróficas descritas como promotoras de crescimento de plantas pode reduzir a demanda por fertilizantes nitrogenados e ao mesmo tempo os gastos associados a essa prática. Este estudo investigou como a inoculação das bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum baldaniorum* e *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho influenciaria a modulação da arquitetura da raiz e os parâmetros associados à taxa de absorção de nutrientes, especialmente de nitrogênio (N), sob diferentes condições de disponibilidade de N. Foram desenvolvidos seis experimentos, quatro em sistema hidropônico e dois em substrato estéril (areia+vermiculita) em casa de vegetação, a fim de verificar o metabolismo e a expressão de genes envolvidos na absorção e assimilação de N. Para isso, foram avaliadas nos tecidos vegetais as frações nitrogenadas, açúcares solúveis, a atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase, a expressão gênica de isoformas de bombas de prótons (*ZmHA2* e *ZmHA4*), transportadores de alta afinidade de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (*ZmNRT2.3*, *ZmNRT2.5* e *ZmNRT3.1A*) e das enzimas de redução e assimilação de N (*ZmNR1*, *ZmNR2*, *ZmGS1.1*, *ZmGS1.5*, *ZmGS2* e *ZmNADH-GOGAT*). Parâmetros como acúmulo de biomassa, N total, eficiência do uso de N (EUN), área foliar e índice de clorofila também foram avaliados. A inoculação com as estirpes de *Azospirillum baldaniorum* (Ab)-Sp245 e *Herbaspirillum seropedicae* (Hs)-ZAE94 promoveram as maiores mudanças na arquitetura radicular, com melhora em todos os parâmetros avaliados, o que estava de acordo com o aumento da massa seca e acúmulo de N, mas dependente da data de amostragem e do ensaio. Incrementos no acúmulo de biomassa e N total em até 150 e 180%, respectivamente, foram encontrados no tratamento inoculado com Ab-Sp245 em relação ao controle. A inoculação com ambas as estirpes também promoveu incrementos superiores a 90% para comprimento, volume e área radicular. Os parâmetros avaliados melhoraram em função da maior disponibilidade de N. A Ab-Sp245 foi mais efetiva na maior absorção de macronutrientes, com maior velocidade de absorção de  $\text{NO}_3^-$  e proporcionou uma maior EUN sob baixo N. As mudanças provocadas pela inoculação no perfil de expressão gênica foram menos consistentes, somente após 2 h da indução do sistema de transporte de  $\text{NO}_3^-$  a Hs-ZAE94 aumentou a expressão de dois transportadores de alta afinidade de  $\text{NO}_3^-$  (*ZmNRT2.3* e *ZmNRT2.5*) e duas isoformas de glutamina sintetase (*ZmGS1.1* e *ZmGS2*) quando comparado ao controle, mas as encontradas no conteúdo de metabólitos solúveis e atividade enzimática indicaram melhoria no processo de assimilação de N nas plantas inoculadas. As mudanças na arquitetura radicular e a manutenção da absorção de N por unidade de área da raiz através da inoculação com Ab-Sp245 foi provavelmente o efeito principal.

**Palavras-chave:** *Azospirillum baldaniorum*. Bactéria promotora de crescimento de planta. *Herbaspirillum seropedicae*. Nitrato. *Zea mays* L.



## ABSTRACT

DIAS, Albiane Carvalho. **Nitrogen metabolism in maize plants inoculated with two genera of diazotrophic bacteria.** 134p. Thesis (Doctorate in Agronomy - Soil Science). Institute of Agronomy, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2021.

Maize (*Zea mays* L) is one of the world's leading produced cereals. Its inoculation with diazotrophic bacteria described as plant growth-promoters can reduce the demand for nitrogen fertilizers and at the same time the costs associated with this practice. This study investigated how inoculation of the diazotrophic bacteria *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum baldaniorum* and *Herbaspirillum seropedicae* in maize plants would influence the modulation of root architecture and the parameters associated with the absorption rate of nutrients, especially nitrogen (N), under different conditions of availability of N. Experiments were developed in a hydroponic system and sterile substrate (sand+vermiculite) in a greenhouse, in order to verify the metabolism and expression of genes involved in the absorption and assimilation of N. For this purpose, nitrogen fractions, the activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase, the gene expression of proton pump isoforms (*ZmHA2* and *ZmHA4*), high-affinity nitrate transporters ( $\text{NO}_3^-$ ) (*ZmNRT2.3*, *ZmNRT2.5* and *ZmNRT3.1A*) and N-reduction and assimilation enzymes (*ZmNR1*, *ZmNR2*, *ZmGS1.1*, *ZmGS1.5*, *ZmGS2* and *ZmNADH-GOGAT*) were evaluated. Parameters such as biomass accumulation, total N, N use efficiency (NUE), leaf area and chlorophyll index were also evaluated. The inoculation with *A. baldaniorum* (Ab)-Sp245 and *H. seropedicae* (Hs)-ZAE94 strains promoted the greatest changes in root architecture, with improvement in all parameters evaluated, which was in agreement with the increase in dry mass and accumulation of N, but they were dependent on the date of sampling and experiment. Increases in the accumulation of biomass and total N of up to 150 and 180%, respectively, were found in the treatment inoculated with Ab-Sp245 in relation to the control. Inoculation with both strains also promoted increments greater than 90% for length, volume and root area. The parameters improved due to greater availability of N. The Ab-Sp245 was more effective in the greater absorption of macronutrients, with higher speed of absorption of  $\text{NO}_3^-$  and provided a greater NUE under low N. The changes caused by inoculation in the gene expression profile were less consistent, only after 2 h of induction of the  $\text{NO}_3^-$  transport system did Hs-ZAE94 increase the expression of two high-affinity  $\text{NO}_3^-$  transporters (*ZmNRT2.3* and *ZmNRT2.5*) and two isoforms of glutamine synthetase (*ZmGS1.1* and *ZmGS2*) When compared to the control, but those found in the content of soluble metabolites and enzymatic activity indicated an improvement in the N assimilation process in the inoculated plants. The shift in root architecture and the maintenance of N uptake per unit of root area through inoculation with Ab-Sp245 was probably the main effect.

**Keywords:** *Azospirillum baldaniorum*. Plant growth-promoting bacteria. *Herbaspirillum seropedicae*. Nitrate. *Zea mays* L.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema demonstrativo do substrato e da população bacteriana utilizada em cada experimento. ....	11
<b>Figura 2.</b> Esquema de cultivo, coletas e análises do Experimento I.....	13
<b>Figura 3.</b> Esquema de coletas e análises do Experimento II. ....	15
<b>Figura 4.</b> Esquema de cultivo, coletas e análises do Experimento III.....	16
<b>Figura 5.</b> Esquema de coletas e análises do Experimento IV.....	17
<b>Figura 6.</b> Esquema de cultivo, coletas e análises do Experimento V.....	19
<b>Figura 7.</b> Esquema de cultivo, coletas e análises do Experimento VI.....	21
<b>Figura 8.</b> Contagem de bactérias pela técnica do Número Mais Provável (NMP) presente no inoculante, na solução (dia zero), após 48h em hidroponia e 24 e 32 dias após o transplântio (DAT) (n = 4). NMP com os meios semi-sólido NFb e JNFb sem nitrogênio.....	31
<b>Figura 9.</b> Parâmetros radiculares e biometria de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 avaliadas aos 24 e 32 DAT crescendo em dois níveis de N (0,3 e 3,0 mM). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. ....	32
<b>Figura 10.</b> Atividade da enzima nitrato redutase de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 avaliadas aos 24 e 32 DAT crescendo em dois níveis de N (0,3 e 3,0 mM) e avaliadas antes da troca da solução nutritiva. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições.....	33
<b>Figura 11.</b> Atividade da enzima glutamina sintetase de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 avaliadas aos 24 e 32 DAT crescendo em dois níveis de N (0,3 e 3,0 mM) e avaliadas antes da troca da solução nutritiva. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).....	34
<b>Figura 12.</b> Frações solúveis de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 24 e 32 DAT sob dois níveis de N (0,3 e 3,0 mM). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).....	36
<b>Figura 13.</b> Acúmulo de massa seca de parte aérea (a), raiz (b), massa seca total (c), relação parte aérea / raiz (d), e área foliar (e) de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 crescida a 3,0 e 0,3 mM de N. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).....	38
<b>Figura 14.</b> Nitrogênio total acumulado de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 24 (a) e 32 (b) DAT e eficiência de uso de nitrogênio (EUN) aos 24 (c) e 32 (d) DAT. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ )...	39
<b>Figura 15.</b> Análise da depleção de amônio e nitrato na solução nutritiva durante 72 h (n = 4), o pH da solução foi corrigido todos os dias para 5,8. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).....	41
<b>Figura 16.</b> $\text{Log}^{10}$ do número de células $\text{mL}^{-1}$ no inoculante nos tratamentos controle, FP2, HM053, SP245 e Zae94.....	42

- Figura 17.** Log<sup>10</sup> do número de células g<sup>-1</sup> de raízes de milho em baixa (a) e alta (b) concentração de N dos tratamentos controle, FP2, HM053, Sp245 e Zae94 aos 9, 16, 22 e 34 dias após o plantio (DAP)..... 42
- Figura 18.** Massa fresca e seca (g) de raízes dos tratamentos controle, FP2, HM053, Sp245 e Zae94 aos 8,13 e 22 dias após o plantio sob solução com baixo (a e c) e alto N (b e d)... 43
- Figura 19.** Massa seca (g) da parte aérea das plantas dos tratamentos controle, FP2, HM053, Sp245 e Zae94 aos 8,13, 16 e 22 dias após o plantio sob solução com baixo (a) e alto N (b). ..... 44
- Figura 20.** Comprimento (cm) de todas as raízes (a e b) e comprimento das raízes finas (c e d) dos tratamentos controle, FP2, HM053, Sp245 e Zae94 aos 8, 13 e 22 dias após o plantio sob solução com baixo N (a e c) e alto N (b e d)..... 45
- Figura 21.** Projeção de área radicular (cm<sup>2</sup>) (a; b), diâmetro médio (mm) (c; d), volume de raízes (cm<sup>3</sup>) (e; f), pontas (g; h), bifurcações (i; j) e cruzamentos de raízes (k; l) dos tratamentos controle, FP2, HM053, Sp245 e Zae94 aos 8, 13 e 22 dias após o plantio sob solução com baixo (a, c, e, g, i, k) e alto N (b, d, f, h, j, l). ..... 47
- Figura 22.** Porcentagem de distribuição de comprimento, pontas, volume e área projetada em classes de diâmetro de raiz no experimento em substrato aos 22 DAP..... 48
- Figura 23.** Contagem de bactérias pela técnica do Número Mais Provável presente no inoculante, na solução inoculadora, nas raízes após a inoculação e aos nove dias após o transplântio (DAT) (n = 3). NMP com meio semi-sólido NFb sem nitrogênio. .... 49
- Figura 24.** Análise de regressão da depleção de nitrato na solução nutritiva durante 34 h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 6 repetições e \* difere em p≤0,05. Para 32h - Controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b, para 34h- controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94-b. .... 50
- Figura 25.** Análise de regressão da depleção de amônio na solução nutritiva durante 30 h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 6 repetições e \* difere em p≤0,05. Para 08h - controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b, para 24h- controle- ab; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94-b. .... 51
- Figura 26.** Análise da depleção de cálcio, magnésio, fósforo e potássio na solução nutritiva durante 34 h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 6 repetições e \* difere em p≤0,05. .... 54
- Figura 27.** Massa fresca (a) e seca (b) da parte aérea e das raízes das plantas aos 9 DAT para solução nutritiva. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 6 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas (p≤0,05). ..... 55
- Figura 28.** Nitrogênio total acumulado de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 9 DAT. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativa (p≤0,05). ..... 55
- Figura 29.** Arquitetura das raízes analisadas pelo software WinRHIZO Pro™ de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 9 DAT. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. .... 56
- Figura 30.** Contagem de bactérias pela técnica do Número Mais Provável presente no inoculante, e nas raízes após 7 e 24 dias após o plantio (DAP) (n = 4). NMP com meio semi-sólido NFb sem fonte de nitrogênio..... 58

- Figura 31.** Massa seca acumulada, da parte aérea e das raízes das plantas, diâmetro do colmo, área foliar, número de folhas e razão raiz/PA aos 24, 31, 35 e 38 DAP. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 60
- Figura 32.** Atividade da enzima nitrato redutase de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 31, 35 e 38 DAP. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 61
- Figura 33.** Arquitetura das raízes analisadas pelo software WinRHIZO Pro™ de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 24, 31, 35 e 38 DAP. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 63
- Figura 34.** Teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , N-amino e açúcares solúveis na parte aérea das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 31, 35 e 38 DAP. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 64
- Figura 35.** Conteúdo de nitrogênio total na parte aérea das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 31, 35 e 38 DAP. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 65
- Figura 36.** Contagem de bactérias pela técnica do número mais provável presente no inoculante, na solução inoculadora, nas raízes após a inoculação e aos 17 dias após o transplântio (DAT) ( $n = 3$ ). NMP com meio semi-sólido NFb sem nitrogênio. .... 66
- Figura 37.** Análise da depleção de nitrato na solução nutritiva durante 24h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 8 repetições e \* difere em  $p \leq 0,05$ . Para 22 e 24h - Controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- a, para 23h- controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94-ab. .... 67
- Figura 38.** Análise da depleção de nitrato na solução nutritiva durante 24h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 8 repetições e \* difere em  $p \leq 0,05$ . Para 22 e 24h - Controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- a, para 23h- controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94-ab. .... 68
- Figura 39.** Massa seca acumulada, da parte aérea e das raízes das plantas aos 17DAT, antes da fome (21DAT), após fome (24DAT) e após o ressuprimento (25DAT), razão raiz/parte aérea e área foliar e diâmetro do colmo após o ressuprimento. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 70
- Figura 40.** Atividade da enzima nitrato redutase nas folhas das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 avaliadas antes e após a fome, e após o ressuprimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 6 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 71
- Figura 41.** Teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , N-amino e açúcares solúveis nas folhas das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 antes e após a fome e após o ressuprimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 72

- Figura 42.** Arquitetura das raízes analisadas pelo software WinRHIZO Pro™ de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 17 DAT, antes e após a fome e após ressuprimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 74
- Figura 43.** Conteúdo de nitrogênio total na parte aérea das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 17DAT, antes e após a fome, e após ressuprimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 76
- Figura 44.** Quantificação das bactérias Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 realizadas pelas técnicas do NMP, contagem padrão em placas, câmara de Neubauer e qPCR presentes no inoculante. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 3 repetições. .... 77
- Figura 45.** Quantificação das bactérias pela técnica NMP presente nos tecidos de raiz das plantas de milho após a inoculação, antes da fome e após o ensaio de cinética com  $\text{NO}_3^-$ . As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 3 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 78
- Figura 46.** Quantificação das bactérias Ab-Sp245 (a) e Hs-ZAE94 (b) pela técnica de qPCR presente nos tecidos de raiz das plantas de milho após a inoculação, antes e após a fome, e após o ensaio de cinética com  $\text{NO}_3^-$ . As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 79
- Figura 47.** Massa seca acumulada, da parte aérea e das raízes das plantas antes da fome (15DAT), após fome (18DAT) e após cinética (18DAT) e razão raiz/parte aérea. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 80
- Figura 48.** Nitrogênio total, da parte aérea e das raízes das plantas de milho antes da fome (15 DAT), após fome (18 DAT) e após cinética (18 DAT). A área foliar e ICF aos 18 DAT. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 82
- Figura 49.** Atividade da enzima glutamina sintetase nas raízes das plantas de milho antes da fome (15 DAT), após fome (18 DAT) e após o ressuprimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 84
- Figura 50.** Teores de  $\text{NO}_3^-$  (a),  $\text{NH}_4^+$  (b), N-amino (c) e açúcares solúveis (d) nas folhas e raízes das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 antes e após a fome e após o ressuprimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 87
- Figura 51.** Análise da depleção de nitrato na solução nutritiva durante 6 h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 4 repetições e \* difere em  $p \leq 0,05$ . Para todos os pontos que diferiram: Controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b..... 88
- Figura 52.** Arquitetura das raízes analisadas pelo software WinRHIZO Pro™ de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 após ressuprimento com  $\text{NO}_3^-$ . As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 91

- Figura 53.** Expressão relativa dos genes que codificam para os transportadores de alta afinidade de nitrato em raízes de plantas de milho, antes e após a fome e 1, 2, 4 e 6 h após receberem 0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  (ensaio de cinética). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 92
- Figura 54.** Expressão relativa das isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPase em raízes de plantas de milho inoculadas ou não, antes e após a fome e 1, 2, 4 e 6 h após receberem 0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  (ensaio de cinética). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 93
- Figura 55.** Expressão relativa das isoformas de NR em raízes de plantas de milho inoculadas ou não, antes e após a fome e 1, 2, 4 e 6 h após receberem 0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  (ensaio de cinética). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 94
- Figura 56.** Expressão relativa de isoformas de GS e GOGAT em raízes de plantas de milho inoculadas ou não, antes e após a fome e 1, 2, 4 e 6 h após receberem 0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  (ensaio de cinética). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). ..... 96
- Figura 57.** Incremento ou não observado em hidroponia sob dose contrastante de N. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea; AF, área foliar; EUN, eficiência do uso de N, N total, acúmulo de nitrogênio total; CT, comprimento total da raiz; CT (0-1,5 mm), comprimento total das raízes finas; Vol, volume total da raiz; Área Sup., área superficial da raiz. .... 97
- Figura 58.** Incremento ou não observado em hidroponia sob dose alta de N. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MFR, massa fresca de raiz; MFPA, massa fresca da parte aérea; MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea; N total, acúmulo de nitrogênio total; CT, comprimento total da raiz; CT (0-1,5 mm), comprimento total das raízes finas; CT (>1,5 mm), comprimento das raízes grossas; Vol, volume total da raiz; Área Sup., área superficial da raiz; Área proj., área de projeção da raiz; Diam, diâmetro médio das raízes. .... 98
- Figura 59.** Incremento ou não observado em hidroponia com restrição de N por 72 h e ressuprimento com dose alta de N. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea; AF, área foliar; DC, diâmetro do colmo, N total, acúmulo de nitrogênio total; aNR, atividade da enzima nitrato redutase; CT, comprimento total da raiz; CT (0-1,5 mm), comprimento total das raízes finas; CT (>1,5 mm), comprimento das raízes grossas; Vol, volume total da raiz; Área Sup., área superficial da raiz; Área proj., área de projeção da raiz; Diam, diâmetro médio das raízes. .... 99
- Figura 60.** Incremento ou não observado em hidroponia com restrição de N por 72 h e ressuprimento com dose baixa de N. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea; MST, massa seca total; N total, acúmulo de nitrogênio total; ICF, índice de clorofila Falker; AF, área foliar; aGS, atividade da enzima glutamina sintetase; CT, comprimento total da raiz; CT (0-1,5 mm), comprimento total das raízes finas; CT (>1,5 mm), comprimento das raízes grossas; Vol, volume total da raiz; Área Sup., área superficial da raiz; Área proj., área de projeção da raiz; Diam, diâmetro médio das raízes. .... 100

- Figura 61.** Incremento ou não observado em substrato areia e vermiculita sob doses contrastantes de N. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea. .... 101
- Figura 62.** Incremento ou não observado em substrato areia e vermiculita. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea; MST, massa seca total; N total, acúmulo de nitrogênio total; DC, diâmetro do colmo; AF, área foliar; NF, número de folhas; aNR, atividade da enzima nitrato redutase..... 101
- Figura 63.** Incremento ou não observado nos parâmetros de morfologia radicular em função da densidade populacional aplicada. Incremento (%) = inoculado menos o controle. CT, comprimento total da raiz; CT (0-1,5 mm), comprimento total das raízes finas; Diam, diâmetro médio das raízes; Vol, volume total da raiz; Área Sup., área superficial da raiz. .... 102
- Figura 64.** Morfologia radicular com aplicação crescente de doses de AIA..... 103

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Solução nutritiva utilizada para o crescimento das plantas de milho (HOAGLAND & ARNOLD, 1950) modificada. ....	13
<b>Tabela 2.</b> Solução nutritiva utilizada para o crescimento das plantas de milho (HOAGLAND & ARNOLD, 1950) modificada. ....	20
<b>Tabela 3.</b> Iniciadores utilizados para quantificar as estirpes bacterianas de <i>A. baldaniorum</i> (Sp245) e <i>H. seropedicae</i> (ZAE94) em tecidos das raízes de milho. ....	22
<b>Tabela 4.</b> Tamanho do genoma das estirpes alvo. ....	23
<b>Tabela 5.</b> Sequência dos iniciadores ( <i>Forward</i> e <i>Reverse</i> ) para os genes transportadores de nitrato de alta afinidade, PM H <sup>+</sup> -ATPases e enzimas do ciclo de N em milho utilizados no experimento. O gene da actina ( <i>ZmActin</i> ) e tubulina ( <i>ZmTubulin</i> ) foram utilizados como controle endógeno. ....	25
<b>Tabela 6.</b> Matriz do coeficiente de correlação de Pearson das variáveis biomassa e arquitetura radicular na coleta final (25 DAT) das plantas de milho inoculadas ou não. ....	75
<b>Tabela 7.</b> Cinética de absorção de nitrato em plantas de milho inoculadas com bactérias diazotróficas. ....	89



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 A Cultura do Milho.....	3
2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	4
2.3 Bactérias Diazotróficas na Cultura do Milho .....	8
2.4 Metabolismo de Nitrogênio .....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Modificações no Metabolismo de Nitrogênio em Plantas de Milho Inoculadas com Bactérias Diazotróficas Cultivadas em Doses Contrastantes de Nitrogênio: Experimento I.....	11
3.1.1 Tratamentos e delineamento experimental.....	11
3.1.2 Preparo dos inoculantes.....	12
3.1.3 Condições experimentais .....	12
3.2 Avaliação da Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Plantas de Milho Cultivadas sob Doses Contrastantes de Nitrogênio: Experimento II .....	13
3.2.1 Tratamentos e delineamento experimental.....	13
3.2.2 Preparo dos inoculantes.....	14
3.2.3 Condições experimentais .....	14
3.3 Avaliação da Depleção de Macronutrientes na Solução Nutritiva em Plantas de Milho Inoculadas com Duas Bactérias Diazotróficas: Experimento III.....	15
3.3.1 Tratamentos e delineamento experimental.....	15
3.3.2 Preparo dos inoculantes.....	15
3.3.3 Condições experimentais .....	15
3.4 Avaliação da Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Plantas de Milho Cultivadas em Substrato Estéril: Experimento IV .....	16
3.4.1 Tratamentos e delineamento experimental.....	16
3.4.2 Preparo dos inoculantes.....	16
3.4.3 Condições experimentais .....	17
3.5 Modificações no Metabolismo de Nitrogênio em Plantas de Milho Inoculadas com Duas Espécies de Bactérias Diazotróficas: Experimento V.....	18
3.5.1 Tratamentos e delineamento experimental.....	18
3.5.2 Preparo dos inoculantes.....	18
3.5.3 Condições experimentais .....	18
3.6 Avaliação da Expressão Gênica de Isoformas de PMH <sup>+</sup> - ATPases, Transportadores de Nitrato de Alta Afinidade e Enzimas do Ciclo de N: Experimento VI.....	19
3.6.1 Tratamentos e delineamento experimental.....	19
3.6.2 Preparo dos inoculantes.....	19

3.6.3 Condições experimentais .....	20
3.6.4 Contagem de bactérias diazotróficas nas raízes .....	21
3.6.5 Expressão gênica .....	23
3.6.6 Cinética de absorção de nitrato .....	26
3.7 Avaliações Realizadas Durante os Experimentos .....	26
3.7.1 Contagem de bactérias diazotróficas .....	26
3.7.2 Avaliação de parâmetros radiculares e biometria .....	26
3.7.3 Atividades enzimáticas .....	26
3.7.4 Análise de metabólitos solúveis .....	27
3.7.5 Acúmulo de biomassa, nitrogênio total e clorofila .....	28
3.7.6 Monitoramento dos níveis de macronutrientes da solução nutritiva .....	28
3.8 Bioensaios em Câmaras de Crescimento .....	29
3.8.1 População bacteriana .....	29
3.8.2 Ácido 3- indolacético (AIA) .....	29
3.9 Análise Estatística .....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
4.1 Modificações no Metabolismo de Nitrogênio em Plantas de Milho Inoculadas com Bactérias Diazotróficas Cultivadas em Doses Contrastantes de Nitrogênio: Experimento I .....	30
4.1.1 Contagem de bactérias .....	30
4.1.2 Avaliação de parâmetros radiculares e biometria .....	31
4.1.3 Atividades enzimáticas .....	33
4.1.4 Análise de metabólitos solúveis .....	34
4.1.5 Acúmulo de biomassa e nitrogênio total .....	37
4.1.6 Monitoramento dos níveis de nitrogênio da solução nutritiva .....	39
4.2 Avaliação da Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Plantas de Milho Cultivadas sob Doses Contrastantes de Nitrogênio: Experimento II .....	41
4.2.1 Contagem de bactérias .....	41
4.2.2 Biomassa fresca e seca .....	43
4.2.3 Avaliação dos parâmetros radiculares .....	44
4.3 Avaliação da Depleção de Nitrogênio na Solução Nutritiva em Plantas de Milho Inoculadas com Diferentes Bactérias Diazotróficas: Experimento III .....	49
4.3.1 Contagem de bactérias diazotróficas .....	49
4.3.2 Monitoramento da depleção de nitrogênio na solução nutritiva .....	49
4.3.3 Monitoramento da depleção de Ca, Mg, P e K na solução nutritiva .....	51
4.3.4 Acúmulo de biomassa e nitrogênio total .....	54
4.3.5 Parâmetros radiculares .....	55
4.4 Avaliação da Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Plantas de Milho Cultivadas em Substrato Estéril: Experimento IV .....	57

4.4.1 Contagem de bactérias diazotróficas.....	57
4.4.2 Avaliação de parâmetros biométricos .....	58
4.4.3 Atividade enzimática da nitrato redutase .....	60
4.4.4 Avaliação de parâmetros radiculares .....	61
4.4.5 Análise de metabólitos solúveis .....	63
4.5 Modificações no Metabolismo de Nitrogênio em Plantas de Milho Inoculadas com Duas Espécies de Bactérias Diazotróficas: Experimento V.....	65
4.5.1 Contagem de bactérias diazotróficas.....	65
4.5.2 Monitoramento da depleção de nitrogênio na solução nutritiva .....	66
4.5.3 Acúmulo de biomassa .....	68
4.5.4 Atividade enzimática da nitrato redutase .....	70
4.5.5 Análise de metabólitos solúveis .....	71
4.4.6 Avaliação de parâmetros radiculares .....	72
4.6 Avaliação da Expressão Gênica de Isoformas de PMH <sup>+</sup> - ATPases, Transportadores de Nitrato de Alta Afinidade e Enzimas do Ciclo de N: Experimento VI.....	76
4.6.1 Contagem de bactérias diazotróficas.....	76
4.6.2 Acúmulo de biomassa e nitrogênio total.....	79
4.6.3 Atividade enzimática da GS.....	82
4.6.5 Cinética de absorção de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	87
4.6.6 Avaliação dos parâmetros radiculares.....	89
4.6.7 Expressão das isoformas de PM H <sup>+</sup> - ATPases, transportadores de nitrato de alta afinidade e enzimas do ciclo de N nas raízes.....	91
4.7 Considerações Sobre as Duas Espécies de Bactérias Diazotróficas que Tiveram Enfoque no Trabalho .....	96
5 CONCLUSÕES .....	104
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	105
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	106
8 ANEXOS .....	133

## 1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos alimentos básicos mais importantes nos países em desenvolvimento e um componente chave da alimentação animal e humana em todo o mundo. Essa cultura exige alta fertilidade do solo e geralmente a suplementação de macro e micronutrientes, principalmente nitrogênio (N), são indispensáveis para atingir altos rendimentos. No entanto, a fertilização eficiente de N ainda é desafiadora, devido aos altos custos de aplicação, que limitam seu uso por agricultores de baixa renda, bem como a baixa eficiência da prática, que leva a impactos ambientais negativos (LIPPER et al., 2014).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é definida como um processo sustentável de fornecimento de N às plantas, com a inoculação de estirpes selecionadas de rizóbios utilizadas com sucesso em culturas como a soja e outras espécies de leguminosas (HERRIDGE et al., 2008; JENSEN et al., 2012). Ainda assim, a contribuição direta da FBN para cereais e gramíneas por bactérias diazotróficas associativas permanece limitada e a fertilização com N não pode ser dissociada da inoculação das plantas (HUNGRIA et al., 2010). Alguns desses diazotróficos produzem fitohormônios e outras substâncias que estimulam o crescimento das raízes e aumentam a absorção de água e nutrientes pelas plantas (BASHAN & BASHAN, 2010). Por isso, o efeito inibitório do N mineral sobre a FBN associativa é considerado um paradoxo (CARVALHO et al., 2014). Logo, o uso concomitante de fertilização nitrogenada e inoculação com bactérias diazotróficas em milho e trigo tornou-se uma prática recomendada para melhorar a produção de grãos nessas culturas (HUNGRIA et al., 2010).

Tradicionalmente, a inoculação de gramíneas na América do Sul é realizada com a espécie de *Azospirillum brasilense*, com diferentes estirpes recomendadas em diferentes países (CASSÁN et al., 2009; CASSÁN & DIAZ-ZORITA, 2016). No Brasil, cerca de 9,1 milhões de doses de inoculantes foram comercializadas para gramíneas em 2018 (ANPII, 2021), onde os inoculantes comerciais contêm as estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tanto para milho quanto para trigo (HUNGRIA et al., 2010). No entanto, uma estirpe de *Azospirillum* mais bem estudada é a Sp245, embora tenha sido identificada como estirpe de *A. brasilense* foi recentemente reclassificada a nível de espécie como *A. baldaniorum*, sendo esta uma nova espécie do gênero, considerada referência para investigação de mecanismos de promoção de crescimento vegetal (SOMERS et al., 2005; FERREIRA et al., 2020). É uma estirpe bem descrita, tendo sido isolada de plantas de trigo no sul do Brasil por Baldani et al. (1986a).

Há outros gêneros capazes de promover o crescimento das plantas, dentre eles o *Herbaspirillum*, que foi isolado pela primeira vez de diferentes gramíneas, incluindo milho, por Baldani et al. (1986b). Este por sua vez é descrito como endofítico e atualmente inclui mais de 19 espécies descritas (MONTEIRO et al., 2012; LPSN, 2020). A estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* foi testada em milho em condição de campo, promovendo um aumento de 34% na biomassa vegetal em relação as plantas não inoculadas (ALVES et al., 2015).

A inoculação de plantas de milho com *A. baldaniorum* e *H. seropedicae* tem apresentado resultados positivos, mas nenhuma estirpe apresenta um desempenho consistentemente superior em relação as demais (DARTORA et al., 2016; BREDA et al., 2019b). Embora estudos *in vitro* tenham demonstrado sua capacidade de fixar N<sub>2</sub>, a promoção de crescimento tem sido considerada a explicação mais razoável para o melhor crescimento e desempenho das plantas inoculadas. Nesse sentido, a maior eficiência do uso de N da fertilização após a inoculação das plantas de milho com essas estirpes foi o efeito dominante demonstrado por Martins et al. (2017).

A inoculação com bactérias diazotróficas associativas a fim de melhorar a eficiência do uso de N está ganhando importância crescente no manejo da cultura, com benefícios possíveis mesmo em condições de baixa disponibilidade de N (OLIVEIRA et al., 2003). Curiosamente, não há muitas informações para inferir sobre as possíveis interações das bactérias inoculadas e a disponibilidade de N mineral com relação à resposta da planta, já que  $\text{NO}_3^-$  também é um modelador da arquitetura de raiz e pode desempenhar um papel sinérgico na melhoria da exploração do solo pelas plantas (FORDE, 2014; BREDA et al., 2019a).

Em solos aerados,  $\text{NO}_3^-$  é frequentemente a forma dominante de N. A sua absorção pela planta ocorre nas raízes e é uma molécula que requer simporte com dois prótons ( $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ ), os processos de absorção diferem dependendo da sua concentração externa, ou seja, da disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  no solo (FORDE, 2014; KRAPP, 2015). Geralmente, em concentrações abaixo de 1 mM de  $\text{NO}_3^-$  predominam o sistema de transporte de alta afinidade (HATS) enquanto o sistema de baixa afinidade (LATS) se tornam funcional em concentrações mais altas (MASCLAUX-DAUBRESSE et al. 2010; KANT, 2018). Os transportadores de  $\text{NO}_3^-$  de alta e baixa afinidade pertencem às famílias gênicas NRT2 e NRT1, respectivamente (WANG et al., 2012). Além da regulação de absorção, alocação e translocação de N na planta eles estão envolvidos na sinalização de processos hormonais que regulam a arquitetura da raiz, reprimem o alongamento das raízes e induzem a produção de raízes laterais sob altos níveis de  $\text{NO}_3^-$ , ou então, induzem o alongamento das raízes primárias enquanto reprimem as raízes laterais sob baixos níveis de  $\text{NO}_3^-$  (KANT, 2018). Consequentemente, as doses extras de fitohormônios que as bactérias inoculadas poderiam produzir não se alinham necessariamente com os sinais internos da planta. Isso poderia acarretar alterações metabólicas que aumentam ou reprimem a taxa de absorção de nutrientes, especialmente de N, dessa forma afetando o crescimento das plantas. Por esse motivo, mais estudos são necessários para entender como associações diazotróficas endofíticas e associativas com plantas por meio da inoculação interferiria no processo de absorção de N e no crescimento das plantas (CARVALHO et al. 2014).

A hipótese científica levantada é que a inoculação de bactérias diazotróficas altera a morfologia radicular e o metabolismo de nitrogênio em plantas de milho e diferi entre os gêneros testados.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de dois gêneros de bactérias diazotróficas na promoção de crescimento do milho híbrido SHS5050, como mudanças na arquitetura radicular e no metabolismo de nitrogênio sob condições diferenciais de nitrogênio.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A Cultura do Milho

O milho é uma gramínea de ciclo anual pertencente à família das Poáceas e por apresentar o mecanismo C4 é uma planta altamente eficiente na utilização da radiação solar para conversão do CO<sub>2</sub>, mesmo em elevados níveis de luz e temperatura apresenta altas taxas de fotossíntese líquida (TAIZ & ZEIGER, 2017).

Estudos indicam que o milho é originário do continente Americano, e que evoluiu há pelo menos 9.000 anos atrás do teosinte Balsas, ancestral selvagem nativo da região sudeste do México (KISTLER et al., 2018; PIPERNO et al., 2009). Após o início do seu processo de domesticação, plantas com características desejáveis foram sendo obtidas a partir de seleções de atributos genéticos favoráveis a produção de alimentos (BORÉM, GALVÃO & PIMENTEL, 2015). Por isso, suas características morfofisiológicas juntamente com processos de inovação na agricultura lhe conferem ampla adaptabilidade, sendo hoje cultivado em quase todos os países, ocupando uma área de cerca de 194 milhões de hectares (SILVA et al., 2017; USDA 2021).

O milho é considerado um alimento básico com alto valor energético, seu balanço nutricional rende mais de 5% de todas as calorias ingeridas por pessoa/dia, fornecendo mais de 4 e 1,6% de proteínas e gorduras, respectivamente (BORÉM, GALVÃO & PIMENTEL, 2015; FAO, 2018). Cerca de 70% da sua produção mundial é aplicada na cadeia produtiva de proteína animal, no Brasil participa de até 80% da composição das dietas (PAES, 2006; CRUZ et al., 2011). Embora, seja empregado em maior escala na alimentação animal, apresenta diversas aplicações devido a sua versatilidade, que vão desde utilização direta na alimentação à indústria de alta tecnologia como para a produção de cola, amido, óleos, flocos alimentícios, bebidas, biocombustíveis e entre outros produtos (XUE et al., 2013).

Mundialmente, está entre as culturas alimentares mais importantes juntamente com o arroz e o trigo (SANDHU, SINGH, & MALHI, 2007; AWIKA, 2011). O Brasil tem destaque como o terceiro maior produtor e segundo maior exportador mundial deste cereal, superado apenas pelos EUA e a China. No ano agrícola de 2019/2020 a produção mundial ficou em torno de 1.117 milhões de toneladas, tendo sido produzido 346, 261 e 102 milhões de toneladas pelos Estados Unidos, China e Brasil, respectivamente (USDA, 2021).

No país, o milho é o segundo grão mais importante para a agricultura, no ano agrícola 2019/20, sua produção correspondeu a aproximadamente 41% da produção total brasileira de grãos, perdendo apenas para a soja, porém juntos representam 91% dos grãos produzidos no país (CONAB, 2021). O plantio ocorre praticamente o ano inteiro e dependendo da época de plantio denominou-se como milho safra ou primeira safra, aquele plantado de agosto a dezembro; e milho safrinha ou segunda safra, plantado de janeiro a maio. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento, somando os dois ciclos anuais bem estabelecidos para a cultura, o país deve atingir 19,8 milhões de ha de área plantada, produzindo cerca de 96 milhões de toneladas de milho, com uma produtividade média de 4858 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2021). Apesar de estar entre os principais produtores, o Brasil não se destaca entre os países com maior produtividade, ficando abaixo da média mundial (USDA, 2021). Por outro lado, nos últimos anos, tem-se observado relevantes incrementos nos seus níveis de produtividade de grãos (HÖRBE et al., 2013). Fato este que pode ser atribuído a aspectos como o melhoramento genético, modernas técnicas de manejo do solo, água, nutrição e de controle fitossanitário aliados a biotecnologia.

Além da considerável área cultivada no território brasileiro e a geração de empregos no setor agrícola, a importância do milho também está relacionada ao aspecto social e por ser um

dos cereais de maior importância econômica no cenário da produção agrícola nacional e mundial, é uma das espécies vegetais mais estudadas (ALVES, 2011).

## 2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio é considerado elemento fundamental para as plantas, e destaca-se por ser o nutriente requerido em maiores quantidades e também pelo fato de ser um dos componentes principais na composição de importantes biomoléculas (KUMAR et al., 2015). Embora seja abundante na atmosfera compondo cerca de 78% da sua constituição, sobretudo na forma molecular  $N_2$ , o nitrogênio ainda é uma das principais barreiras para a produtividade agrícola. Isso ocorre porque ele não está prontamente disponível e são poucos os microrganismos capazes de absorvê-lo e o converter a uma forma assimilável, devido a estabilidade da sua ligação tripla.

Nos solos tropicais o seu suprimento é ainda mais limitado, devido a rápida decomposição da matéria orgânica favorecida pelas elevadas temperaturas e grandes quantidades de chuvas (REETZ, 2017; NENDEL, MELZER & THORBURN, 2019). O que resulta numa maior demanda e utilização de fertilizantes nitrogenados. De acordo com Associação Internacional da Indústria de Fertilizantes- IFA (2017) o consumo mundial de fertilizantes nitrogenados sintéticos em 2014/15 foi de 102,5 milhões de toneladas, sendo o trigo a principal cultura a receber esses fertilizantes, com 18,2% do uso global, seguido do milho e do arroz com 17,8 e 15,2%, respectivamente.

A este propósito, o uso excessivo desses fertilizantes sintéticos é causa de grande preocupação, além dos custos econômicos associados à sua fabricação e ao seu uso, há também os impactos ambientais negativos decorrentes da sua utilização. De acordo com Houlton et al. (2019), o aproveitamento do nitrogênio aplicado via fertilizante na agricultura diminuiu de um valor estimado de 60% para 46%, e essa baixa eficiência de recuperação tem sido atribuída as perdas que ocorrem para ambiente. Isso se caracteriza como uma das principais facetas do impacto da agricultura nas mudanças climáticas, já que as emissões mundiais de nitrogênio na agricultura aumentaram substancialmente representando 31% das emissões antropogênicas de nitrogênio (XU et al., 2020; PINDER et al., 2012). Dentre esses impactos que representam uma ameaça tanto para o meio ambiente como para a saúde pública estão a sua lixiviação para corpos d'água e/ou para as camadas mais profundas do solo, podendo atingir o lençol freático e contaminar a água e também acarretar a eutrofização de corpos hídricos; e a volatilização para a atmosfera na forma de gases do efeito estufa (GEE), como óxido nitroso (ADESEMOYE & KLOPPER, 2009; BOUWMAN et al., 2002). Diante dos custos econômicos e ambientais decorrentes da sua utilização e tendo em vista de que o Brasil importa praticamente 70% do N utilizado na agricultura (ANDA, 2020), faz-se necessário a utilização de fontes alternativas que sejam mais eficientes e sustentáveis no uso do nitrogênio. Nesse sentido, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma alternativa ao uso de fertilizantes sintéticos, com elevado potencial para diminuir a sua dependência. É considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese, juntamente com a decomposição orgânica (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2013; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A FBN é realizada por um grupo microrganismos que são capazes converter o nitrogênio atmosférico numa forma assimilável, com a quebra da tripla ligação do  $N_2$  e sua redução à amônia em condições normais de temperatura e pressão, e por esta razão são classificados como diazotróficos. Isso só é possível devido ao sistema enzimático que esses microrganismos possuem, a nitrogenase (SUR, BOTHR & SEM, 2010; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2013; PEDROSA et al., 2020). Amplamente distribuídos entre os domínios Bacteria e Archaea (XIE et al., 2014), estão presentes em diversos ecossistemas. As bactérias diazotróficas ocorrem de forma livre ou em interações, sendo essas simbióticas ou associativas (REIS et al., 2018).

A interação simbiótica entre plantas leguminosas e rizóbios é comumente conhecida pela significativa eficiência da FBN, que ocorre com a formação de uma estrutura especializada, denominada de nódulo, um ambiente propício para fixação de N atmosférico pela bactéria permitindo a troca deste nitrogênio reduzido por fotossintetizados com a planta hospedeira (OLDROYD et al., 2011). Algumas espécies da família Fabaceae conseguem adquirir N suficiente deste processo para suprir suas necessidades metabólicas, como é o caso da soja no Brasil, que em condições adequadas de cultivo dispensa a adubação nitrogenada (HUNGRIA et al., 2007). Inclusive há trabalhos que demonstraram que em alguns casos a aplicação N mineral pode não ter efeito no rendimento de grãos e até prejudicar o processo de nodulação e fixação de N<sub>2</sub> (ALBAREDA et al., 2009; CHIBEBA et al., 2018; SATURNO et al., 2017).

Já nas interações associativas, essas bactérias diazotróficas são capazes de colonizarem desde a rizosfera até o interior do tecido vegetal das plantas, porém diferentemente das simbióticas, não há a formação de estruturas especializadas. A ausência destas torna-se difícil a compreensão dos mecanismos e resultados dessa interação e também é um indicativo de que a FBN ocorra de maneira menos intensa e mais dependente de fatores intrínsecos do ambiente (REIS et al., 2018). Por essa razão, ainda não é possível dispensar adubação nitrogenada. Por outro lado, no Brasil demonstrou-se que variedades de cana-de-açúcar podem se beneficiar agronomicamente com quantidades significativas de N via FBN, valores suportados de até 40 kg N ha<sup>-1</sup> (URQUIAGA et al. 1992; 2012; HERRIDGE, PEOPLES & BODDEY, 2008). Embora haja dificuldade em se estimar a contribuição da FBN devido a amplitude dos valores apresentados, acredita-se que ela seja a principal responsável pela entrada de N nos ecossistemas terrestres (REIS et al., 2018; PENG et al., 2018). De acordo com Ormeño-Orrillo et al. (2013) este processo ainda é responsável pela economia de 30-50% do nitrogênio total utilizado nos campos agrícolas.

Essas bactérias diazotróficas estão inseridas no grupo de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) pois atuam através de vários processos biológicos além da FBN para promoção de crescimento vegetal. As BPCP correspondem a um grupo de microrganismos benéficos às plantas, e como dito anteriormente, por possuírem a capacidade de colonizarem a rizosfera, a superfície radicular e outros tecidos internos do vegetal, estimulam seu crescimento e desenvolvimento, por diversos mecanismos, sejam eles diretos e/ou indiretos (ZAHARAN, 2001; HUERGO et al., 2008; HUNGRIA, 2011; REIS, 2007; SHISHIDO et al., 1999). Essa terminologia de microrganismo promotor de crescimento foi introduzida por Kloepper & Schroth (1978), e desde então diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas para a compreensão dos processos envolvidos nesta interação planta-bactéria.

As BPCP podem ser divididas entre as que formam relação simbiótica ou não com as plantas, aquelas que são restritas a simbiose com leguminosas e estas que são conhecidas por formarem interações associativas com diversas espécies, especialmente as gramíneas. Dentre essas interações associativas têm-se as seguintes categorias: microrganismos rizosféricos, endofíticos obrigatórios e endofíticos facultativos (BALDANI et al., 1997).

BPCP são encontradas em associação com um grande número de espécies de plantas, alguns dos gêneros descritos são: *Azospirillum*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, (GLICK, 2012; OSORIO, 2011). Entre esses gêneros, alguns se destacam como: o *Azospirillum spp.*, que após ser reclassificada e descrita por Tarrand et al. (1978) é atualmente um dos gêneros de BPCP mais estudados (CASSÁN & DIAZ-ZORITA, 2016). As bactérias deste gênero são consideradas endofíticas facultativas (BALDANI et al., 1997), ou seja, são capazes de colonizarem a rizosfera ou o interior dos tecidos vegetais e se associarem com mais de 100 espécies de plantas (CASSÁN & DIAZ-ZORITA, 2016). A estirpe Sp245 de *Azospirillum*, originalmente identificada como *A. brasilense* foi recentemente reclassificada como *A. baldaniorum*, é considerada uma linhagem tipo para esta espécie (CASSÁN & DIAZ-ZORITA, 2016; FERREIRA et al., 2020) e foi isolada a partir de raízes de



trigo esterilizadas superficialmente na região sul do Brasil (BALDANI et al., 1983). É amplamente utilizada na pesquisa de processos de interação entre planta-bactéria visando a sua elucidação.

Dentre as inúmeras linhagens de *Azospirillum brasilense* tem-se a Ab-FP2, uma mutante espontânea da linhagem Sp7, isolada de plantas de capim pangola (*Digitaria decumbens*) pela pesquisadora Johanna Döbereiner (CASSÁN & DIAZ-ZORITA, 2016), se destaca por possuir genes de resistência aos antibióticos estreptomicina e ácido nalidíxico (PEDROSA & YATES, 1984). A estirpe de Ab-FP2 tem se destacado em estudos de avaliação da sua interação com plantas de milho e trigo (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2013; FALEIRO et al., 2015; CAMILIOS-NETO et al., 2014; STETS et al., 2015). Outra mutante espontânea é a HM053 isolada por Machado et al. (1991) utilizando a estirpe Sp7 de *A. brasilense*. Conhecida por excretar amônio e ser fixadora de nitrogênio, esta linhagem (HM053) ainda é resistente a etilenodiamina e apresenta baixa atividade transferásica da enzima glutamina sintetase (GS), ou seja, a mutação pontual no gene *glnA* (P347L) ocasiona uma redução da atividade da GS (MACHADO et al., 1991). Logo, acredita-se que devido à baixa atividade da GS, o amônio produzido pela nitrogenase não é totalmente assimilado, levando a sua excreção (PEDROSA et al., 2020). Assim como as demais estirpes de *A. brasilense*, a aplicação desta mutante tem sido explorada, já que bons resultados de sua aplicação têm sido demonstrados (PANKIEVICZ et al., 2015; PEDROSA et al., 2020).

Outras espécies de BPCP vêm sendo estudadas, como as do gênero *Herbaspirillum spp*, que compreendem 19 espécies (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, LPSN, 2020). Dentre elas a *Herbaspirillum seropedicae* foi a primeira descrita do gênero por Baldani et al. (1986) e recebe a denominação de bactéria endofítica obrigatória, pois não é capaz de sobreviver por longos períodos no solo (OLIVARES et al., 1996). Esta espécie possui a capacidade de se associar a uma grande variedade de plantas, em especial as gramíneas. A estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* foi isolada de raízes de arroz desinfestadas por Baldani et al. (1986) e estudos mostraram que este isolado apresenta grande potencial para aumentar a produtividade de milho (ZILLI et al., 2007; ALVES, 2007; SANTOS et al., 2015).

Essas bactérias possuem características que as tornam promotoras de crescimento, seja capacidade de realizar a FBN, a produção e secreção de fitohormônios, a solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, melhoria na absorção e assimilação de nutrientes e biocontrole. Embora haja muitos mecanismos propostos para promoção de crescimento acredita-se que não há um isolado que explique os benefícios e sim uma combinação de múltiplos fatores (OKON et al., 1983; PUENTE et al., 2004; BASHAN & DE-BASHAN, 2010).

Um dos principais mecanismos propostos para explicar a promoção de crescimento, além da FBN, é capacidade que essas bactérias têm de produzir e metabolizar fitohormônios. E assim, através da interferência no crescimento das plantas podem causar alterações da morfologia das raízes, e possibilitar uma exploração de um volume maior de solo e, conseqüentemente, proporcionar uma maior absorção de nutrientes e água (BASHAN & HOGUIN, 1997; ZAIED et al., 2003; REIS, 2007). Os principais reguladores de crescimento produzidos são auxinas, giberelinas, citocininas e etileno.

A auxina foi o primeiro hormônio do crescimento a ser estudado em plantas. Os fisiologistas identificaram o ácido 3-indolacético (AIA) como a auxina vegetal primária, a forma mais abundante e fisiologicamente mais importante (TAIZ & ZEIGER, 2017). O AIA está relacionado ao alongamento de células, promovendo a formação de raízes adventícias no caule e a expansão radicular (TAIZ & ZEIGER, 2014). Já no metabolismo bacteriano o AIA, dentre as auxinas, também é o mais abundante em termos de concentração (GLICK et al., 2012). O AIA produzido pelas BPCP já vem sendo relatado por pesquisadores, visto que um dos fatores responsáveis pelo estímulo no crescimento de plantas inoculadas é a produção de

fitormônios por estas bactérias, como no caso da inoculação de estirpes de *Azospirillum* (BOTTINI et al., 1989). Uma vez que o principal hormônio produzido por estas estirpes é o ácido 3-indolacético (AIA) (CROZIER et al., 1988), além de outros compostos indólicos. Vários outros gêneros além do *Azospirillum*, foram relatados como produtores de auxina, inclusive AIA, como *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Bacillus* (CASSÁN, VANDERLEYDEN & SPAEPEN, 2014). Vale ressaltar, que a auxina estimula o crescimento de plantas apenas dentro de uma faixa estreita de concentração, fora deste intervalo ideal, como em concentrações celulares elevadas ela é tóxica; sem controles homeostáticos, o hormônio pode facilmente desenvolver níveis tóxicos (TAIZ & ZEIGER, 2017).

As giberelinas formam uma grande família de diterpenóides e são biomoléculas naturais complexas que estão envolvidas em processos fisiológicos e de desenvolvimento das plantas, como por exemplo, regulador da divisão e alongamento das células, dormência de sementes, transição para o florescimento e desenvolvimento do fruto (CROZIER et al., 2000; DAVIES, 1995; SALAZAR-CEREZO et al., 2018; TAKAHASHI et al., 1988; ZHANG, LEE & TANABE, 2008). Diferentes BPCP são produtoras de giberelina, como por exemplo, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* (KUMAR & LONSANE, 1989; COHEN et al., 2009; RAO & SALVAGI, 2017; KANG et al., 2014). Shahzad et al. (2016) propõem a produção de um biofertilizante com estirpes de BPCP produtoras de giberelinas como alternativa para melhorar o desenvolvimento das culturas economicamente importantes.

As citocininas desempenham papéis importantes em muitos processos fisiológicos e de desenvolvimento das plantas. Foram primeiramente descobertas por estimularem a divisão celular e posteriormente por estarem inseridas em processos como senescência foliar, dominância apical, sinalizações nutricionais e entre outros (TAIZ & ZEIGER, 2017; ARKHIPOVA et al., 2007). O mesmo acontece na sua contribuição na relação simbiótica com bactérias diazotróficas (TAIZ & ZEIGER, 2017). Além disso, estudos destacam seu papel na interação com fatores bióticos e abióticos (TAIZ & ZEIGER, 2017; WERNER & SCHMÜLLING, 2009). Alguns microrganismos são conhecidos por sintetizarem citocininas, como *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus* (CASSÁN et al., 2009; ARKHIPOVA et al., 2007; HUSSAIN & HASNAIN, 2011; VESSEY, 2003).

O etileno é considerado um fitohormônio gasoso metabolizado nas plantas que regula a quebra de dormência e germinação de sementes, expansão e diferenciação celular, abscisão foliar e floral, amadurecimento de frutos e a sinalização de defesa a ataques de patógenos (TAIZ & ZEIGER, 2017; BULGARELLI et al., 2013; PIETERSE et al., 2012; BABALOLA, 2010, BABALOLA et al., 2007). Algumas BPCP são capazes de interferir na biossíntese de etileno nas plantas pela expressão da enzima ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) deaminase, reduzindo assim a sua produção e resultando no melhor crescimento das plantas, em especial sob condições de estresse (GLICK, PENROSE & LI, 1998; GLICK et al., 2007; BULGARELLI et al., 2013).

Dessa forma, a utilização de BPCP que aportam nitrogênio via fixação biológica e/ou aumentam a eficiência de utilização dos fertilizantes por conta da produção de fitohormônios caracteriza-se como uma estratégia viável economicamente, além dos benefícios ambientais associados à redução no uso de fertilizantes (HUNGRIA, 2011).

### 2.3 Bactérias Diazotróficas na Cultura do Milho

O milho é atualmente a safra com maior produção entre todas as culturas e também está entre as mais exigentes em demanda por adubo nitrogenado (SIVASANKAR et al., 2012). Conseqüentemente, há uma necessidade por buscas de tecnologias que visam à redução de uso desses fertilizantes nitrogenados, seja para reduzir os custos associados a produção e/ou o risco de contaminação ambiental. Diante disso, a realização de trabalhos explorando alternativas ao uso intensivo desses insumos, como a inoculação com BPCP, tem apontado resultados promissores tornando-as assertiva para o melhor desenvolvimento de diversas culturas, inclusive o milho.

Dentre as várias bactérias diazotróficas apontadas como BPCP, as pertencentes ao gênero *Azospirillum* são as mais estudadas (CASSÁN & DIAZ-ZORITA, 2016; REIS et al., 2018; VANDE BROEK et al., 2000). Sua descrição foi no Brasil em 1978, a partir de raízes de gramíneas como trigo, milho e a forrageira *Digitaria*, considerado como de vida livre e encontrado em quase todos os lugares da terra (DÖBEREINER & PEDROSA 1987; HUERGO et al. 2008; REIS et al., 2018). A espécie de *Azospirillum brasilense* já é utilizada como inoculante comercial de milho em vários países, como Argentina, México, Colômbia, Egito e, desde 2010, no Brasil (FAGES, 1994; HUNGRIA et al., 2010; MEHNAZ et al., 2010). Logo, na cultura do milho a maioria dos experimentos conduzidos com a inoculação de *Azospirillum*, mostraram aumentos em média de 24 a 30% na produção de grãos (KENNEDY et al., 2004; HUNGRIA et al., 2011).

Lana et al. (2012) verificaram que mesmo sem adição de N, houve incrementos de 7 a 15% na produtividade de grãos de milho inoculado com *Azospirillum*. Já Müller et al. (2016) apontam incrementos de até 28% na produtividade do milho inoculado com *Azospirillum brasilense* combinando diferentes doses de N. Enquanto Zemrany et al. (2006), observaram que a inoculação de milho com *Azospirillum* promoveu maior crescimento de raízes e desenvolvimento das plantas no período vegetativo, mas não em rendimento de grãos.

Ademais, a inoculação de milho com *Azospirillum brasilense* pode estimular o desenvolvimento do sistema radicular, colaborando com melhor eficiência do uso do N do solo através da liberação de hormônios de crescimento, como auxinas, por parte desse microrganismo (HUNGRIA et al., 2010; NOVAKOWISKI et al., 2011; OKON & VANDERLEY, 1997). Bashan et al. (2004) relataram que principalmente o AIA, excretados por *Azospirillum*, desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas. A esse respeito Casanovas et al. (2002) observaram que a inoculação de *Azospirillum* em milho resultou no aumento do volume radicular e no conteúdo de água das folhas, mitigando o estresse hídrico das plantas, que tiveram redução de até 75% no suprimento de água. Ainda, de acordo com Lucangeli & Bottini (1997), a inoculação com *Azospirillum brasilense* em plantas de milho resultou num aumento dos níveis de giberelina, neste caso ácido giberélico, e promoveu seu crescimento.

O *Herbaspirillum* é outro gênero de bactéria diazotrófica que se destaca em pesquisas com milho (MONTEIRO et al., 2008). Descrito como endófito obrigatório, apresenta maior especificidade de interação com as plantas. A espécie *Herbaspirillum seropedicae* se destaca por ser eficiente na produção de compostos indólicos (ESTRADA et al., 2013). Alves et al. (2015) observaram que a estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* foi superior a outras 20 estirpes deste mesmo gênero, e a selecionaram para avaliações em campo quanto à produtividade e à contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada. Ainda, de acordo com Breda et al. (2016) há um efeito positivo da inoculação desta mesma estirpe na produtividade de milho, porém na presença de doses de N mineral.

Neste sentido, a cultura do milho tem grande potencial a ser explorada em termos de viabilidade da inoculação, pois pode ser colonizada simultaneamente por uma grande

diversidade de bactérias diazotróficas (ROESCH et al., 2007). Corroborando para que tal possibilidade ainda possa contribuir para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos e, conseqüentemente, a poluição ambiental, tornando os sistemas agrícolas mais sustentáveis e produtivos.

## 2.4 Metabolismo de Nitrogênio

As principais formas de aquisição de nitrogênio inorgânico pelas plantas são através da absorção de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Em solos aerados o  $\text{NO}_3^-$  é a forma predominante, enquanto em solos ácidos e áreas alagadas é o  $\text{NH}_4^+$  (XU; FAN; MILLER, 2012). A absorção desses nutrientes é dependente de energia, e esta é gerada pelas bombas de prótons presentes na membrana plasmática (P-H<sup>+</sup>-ATPases ou PM H<sup>+</sup>-ATPase) (SONDERGAARD, SHULTZ, PALMGREN, 2004). A criação de um potencial de membrana e uma força próton-motriz a partir do funcionamento das P-H<sup>+</sup>-ATPases proporciona o transporte destes e outros nutrientes, permitindo também outras funções fisiológicas como abertura de estômatos, regulação do pH intracelular e crescimento celular (FALHOF et al., 2016; FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018). Além disso, as P-H<sup>+</sup>-ATPases estão envolvidas tanto na adaptação de plantas a estresses ambientais, como salinidade, deficiência de fósforo, toxicidade de alumínio quanto no recrutamento de BPCP (JANICKA-RUSSAK & KABALA, 2015; YU et al., 2015; WU et al., 2018).

As P-H<sup>+</sup>-ATPases são membros da superfamília ATPases do tipo P, no qual é dividida em 5 subfamílias (P1 a P5) que abrangem enzimas com diferentes especificidades de substrato (PALMGREN & NISSEN, 2011). As P-H<sup>+</sup>-ATPases envolvidas na nutrição mineral de plantas pertencem a subfamília P3, que utiliza a hidrólise de ATP para bombear prótons do citosol para o apoplasto (PEDERSEN et al., 2012). Logo, esse potencial de membrana contribui favoravelmente para a entrada passiva de cátion na célula, enquanto ânions são absorvidos acompanhando o fluxo de prótons (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018).

O influxo de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  é mediado por transportadores presentes na membrana plasmáticas, essas proteínas atuam em dois sistemas de transporte, o de alta afinidade (*HATS-High Affinity Transport System*) que ocorre em concentrações externas abaixo de  $1 \text{ mM L}^{-1}$  e o de baixa afinidade (*LATS-Low Affinity Transport System*) que atua em concentrações externas superiores a  $1 \text{ mM L}^{-1}$  (RASHID et al., 2018; VON WIRÉN et al., 2000; SANTOS et al., 2011; FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018).

Em nível molecular, os HATS de amônio em plantas fazem parte das proteínas de transporte de amônio e permeases de metilamônio conhecidos por AMT e MEP, respectivamente. Já entre os LATS podem ser incluídos além do transportador AMT1.2 da família AMT1, proteínas integrais do tonoplasto (TIP), canais retificadores de K (KIRC), canais não seletivos de cátion (NSCC), aquaporinas do tipo AQP e proteínas facilitadores de amônio (AMF) (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018). Ainda de acordo com FERNANDES, SOUZA & SANTOS (2018) este fato demonstra a plasticidade das plantas para aquisição de formas reduzidas de nitrogênio.

Igualmente, os transportadores de  $\text{NO}_3^-$  de alta e baixa afinidade são codificados por duas famílias gênicas, NRT2 e NRT1, respectivamente (PLETT et al., 2010). Este por sua vez teve sua nomenclatura unificada com os transportadores de peptídeos passando a ser designado como NPF (*Nitrate Transporter //Peptide Transporter Family*) a partir de relações filogenéticas proposta por Lérán et al. (2014). Os LATS de nitrato são geralmente constitutivos, enquanto que os HATS são subdivididos em sistemas constitutivos (cHATS) e induzidos (iHATS), sendo estes induzidos pela presença externa de nitrato e/ou nitrito, porém ambos são reprimidos pela presença interna de glutamina (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018).

Após a absorção de  $\text{NO}_3^-$  pela planta, ele pode ser prontamente reduzido, armazenado no vacúolo ou transportado para outras células, mas só será assimilado se for primeiro reduzido a amônio. Este processo ocorre em duas sucessivas etapas enzimáticas na rota de assimilação de N. A primeira é a redução do  $\text{NO}_3^-$  a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pela ação da enzima nitrato redutase (NR) no citoplasma de folhas e/ou raízes. Em seguida, o  $\text{NO}_2^-$  é translocado para os plastídeos e reduzido a  $\text{NH}_4^+$  pela enzima nitrito redutase (PALLARDY, 2008; FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018; TAIZ & ZEIGER, 2017). A NR é considerada uma enzima chave na regulação do processo de assimilação e metabolismo de N e sensível a mudanças nas condições ambientais (KAISER & HUBER, 1994). Alguns dos fatores que regulam a sua atividade são a presença de  $\text{NO}_3^-$ , luz e os carboidratos (TAIZ & ZEIGER, 2017). Há muitos genes que codificam a NR nas plantas superiores, por exemplo, em milho, já foram identificadas 4 sequências e a partir de sua análise filogenética juntamente com as sequências encontradas para *Arapidopsis* e arroz observou-se que elas se encontram no mesmo clado (CANTÚ et al., 2016).

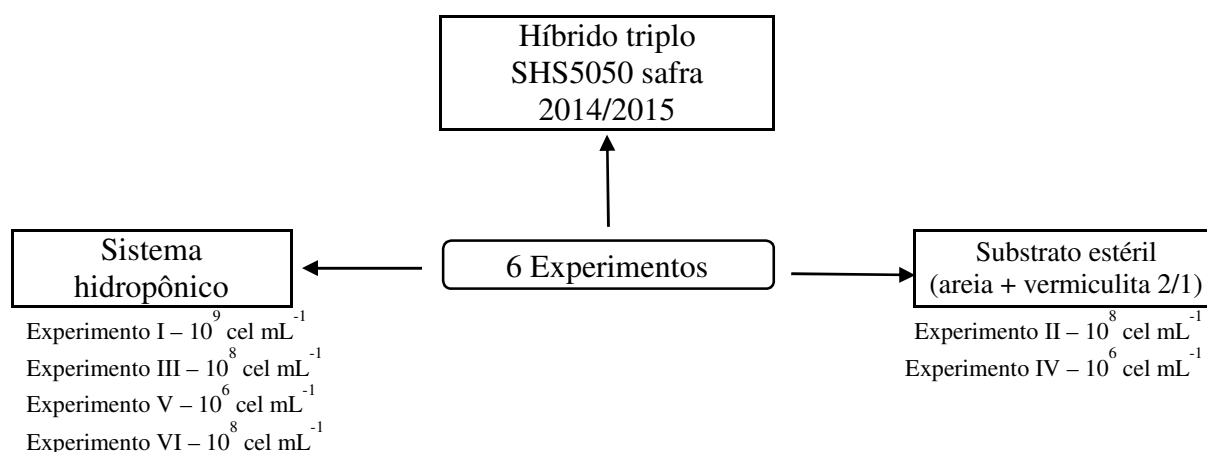
Além destas enzimas supracitadas existem as enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintetase (GOGAT) que são requeridas para a assimilação de N, porque embora  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  possam ser absorvidos pelas plantas, a assimilação só ocorre na forma reduzida, ou seja, como  $\text{NH}_4^+$ . E a via GS-GOGAT é responsável pela incorporação deste  $\text{NH}_4^+$ , seja o proveniente da redução do nitrato, absorvido primariamente ou gerado a partir de outras vias metabólicas da célula, em esqueleto de carbono, formando, glutamina e glutamato, respectivamente (DONATO et al., 2004; SANTOS et al., 2011; FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018). Existem outras rotas alternativas para este processo, como a via glutamato desidrogenase (GDH) e asparagina sintetase (AS), porém podem ocorrer em condições mais específicas como de estresse (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018).

As evidências de que as bactérias diazotróficas afetam o metabolismo de N em plantas já foram apontadas, seja através de mecanismos diretos ou indiretos, elas podem contribuir para melhorar a captação de N (ALVES et al., 2021; BREDA et al., 2019; SANTOS et al. 2019). Estudos já mostraram que a inoculação dessas bactérias diazotróficas podem atuar em mecanismos regulatórios por meio do controle no nível de expressão dos genes que estão envolvidos no processo de nutrição nitrogenada (HARDOIM et al., 2019; PII et al., 2019; PEREIRA-DEFILIPPI et al., 2017), sendo assim podem ser uma alternativa para proporcionar uma maior EUN pelas plantas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Seis ensaios experimentais foram divididos em sistema hidropônico e substrato estéril (Figura 1) e desenvolvidos em casa de vegetação automatizada com controle de temperatura e umidade na Embrapa Agrobiologia, localizada no município de Seropédica-RJ, a fim de verificar o metabolismo e a expressão de genes envolvidos na absorção e assimilação de N nas plantas de milho inoculadas com dois gêneros de bactérias diazotróficas, assim como mudanças nos parâmetros de morfologia radicular.

Nos experimentos, exceto no segundo (II), avaliou-se a inoculação de duas estirpes de bactérias diazotróficas, a Sp245 de *Azospirillum baldaniorum* e a ZAE94 de *Herbaspirillum seropedicae* aplicadas de forma isoladas no genótipo de milho híbrido triplo SHS5050 produzido pela companhia Santa Helena proveniente da safra 2014/2015. Enquanto, no experimento II foi avaliada a inoculação de quatro estirpes, além das duas supracitadas foram avaliadas as estirpes FP2 e HM053 de *Azospirillum brasilense* conforme descrito anteriormente.



**Figura 1.** Esquema demonstrativo do substrato e da população bacteriana utilizada em cada experimento.

Em cada experimento, adotou-se o delineamento experimental e as condições experimentais adequadas aos objetivos sendo estes inerentes a cada ensaio e por isso foram descritos de forma individualizada.

#### 3.1 Modificações no Metabolismo de Nitrogênio em Plantas de Milho Inoculadas com Bactérias Diazotróficas Cultivadas em Doses Contrastantes de Nitrogênio: Experimento I

##### 3.1.1 Tratamentos e delineamento experimental

Neste experimento foi avaliada a inoculação de 2 estirpes de bactérias diazotróficas na cultura do milho quando submetida ao fornecimento de diferentes doses de N. O experimento foi desenvolvido em esquema fatorial 2x3, com 4 repetições, sendo o primeiro fator composto por duas doses de nitrogênio (0,3 mM e 3,0 mM de N da solução de Hoagland modificada) e o segundo fator a inoculação sendo: não inoculado (NI), inoculado com a *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe ZAE94); inoculado com *Azospirillum baldaniorum* (estirpe Sp245). Foram avaliadas de forma isolada, as 2 estirpes supracitadas, dispostos em blocos casualizados, e o mesmo foi conduzido durante o primeiro semestre de 2018.

### 3.1.2 Preparo dos inoculantes

As bactérias utilizadas foram a *H. seropedicae*, Hs-ZAE94 (BR11417) e *A. baldaniorum*, Ab-Sp245 (BR11005), sendo as mesmas adquiridas do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD). As estirpes foram inicialmente crescidas em placas com meio de cultura sólido NFb3x (BALDANI et al., 2014) com o objetivo de isolar e verificar sua pureza. Para obtenção do inoculante, colônias puras dos isolados foram inoculadas em tubos de ensaio com 5 mL do meio de cultura DYGS pH 6,5 (BALDANI et al., 2014) e multiplicadas por 20 horas a 30 °C em mesa agitadora a 175 rpm. Após esta etapa, 200 µL da suspensão foi inoculada em frascos contendo 500 mL do mesmo meio e multiplicada nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o crescimento, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer para obtenção de uma densidade populacional de  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>, para a equalização populacional dos inoculantes foi necessário o ajuste celular com solução salina.

### 3.1.3 Condições experimentais

O experimento foi dividido em 3 etapas, germinação das sementes (4 dias), desenvolvimento inicial das plântulas (6 dias) e aplicação das diferentes doses de N (32 dias). A primeira etapa foi realizada em câmara do tipo BOD (*Biological Oxygen Demand*) e as duas últimas etapas em sistema hidropônico.

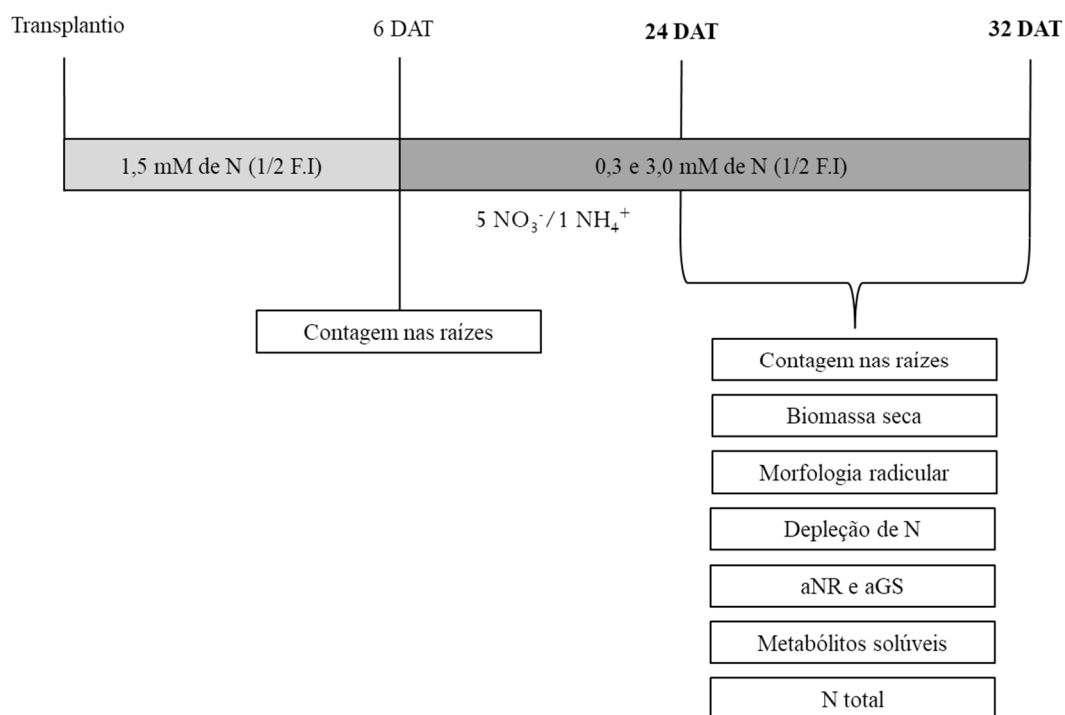
As sementes foram desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v) + 0,01% de Tween 20 (v/v) por 5 min sob agitação de 65 rpm e a 30°C; após foram realizadas 3 lavagens com solução tampão fosfato de 50 mM (pH 7) nas mesmas condições supracitadas. Após o processo de desinfestação superficial, as sementes foram pré-germinadas em células de espuma fenólica com 2 cm<sup>3</sup>, em BOD a 30°C com ciclo de fotoperíodo de 12/12 h por 4 dias. Após este período, as células com as plântulas foram selecionadas, a fim de padronizá-las de acordo com o comprimento da raiz ( $\pm$  5 cm) e inoculadas com os respectivos tratamentos, para isso as raízes ficaram submersas por 1 hora na suspensão inoculadora.

Para o desenvolvimento inicial das plântulas, após o processo de inoculação, foi realizado o transplantio para o sistema hidropônico em casa de vegetação. As mesmas permaneceram por 6 dias em solução nutritiva modificada de Hoagland com concentração de 1,5 mM de N (HOAGLAND & ARNOLD, 1950) aplicada a metade da força iônica (F.I) para os macronutrientes para a adaptação das plantas ao cultivo hidropônico. Assim, após esse período foram aplicadas as diferentes doses de N, sendo esta a terceira etapa (Tabela 1). Para as duas últimas etapas, foram utilizados vasos plásticos de 7,5 dm<sup>3</sup> sendo preenchidos com 5,5 dm<sup>3</sup> de solução nutritiva cada e mantidos sob aeração intermitente. O parâmetro pH da solução nutritiva era monitorado constantemente e em caso de ajuste para valores próximos de 5,8, a correção foi realizada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) e/ou ácido clorídrico (HCl) ambas a 1 M. A cada quatro dias foi realizada a troca da solução nutritiva do sistema. Foram realizadas coletas diárias da solução nutritiva para avaliação de nitrato e amônio, sendo estes parâmetros determinados por método colorimétrico.

O experimento teve duração total de 32 dias sendo as plantas avaliadas em duas coletas: C1 e C2. Sendo C1, a coleta realizada aos 24 dias após o transplantio para sistema hidropônico (DAT) e C2 realizada aos 32 DAT. A cada coleta foram realizadas análises de contagem nas raízes das plântulas, análises da atividade enzimática, metabólitos solúveis e também avaliações dos parâmetros biométricos e morfologia de raízes (Figura 2).

**Tabela 1.** Solução nutritiva utilizada para o crescimento das plantas de milho (HOAGLAND & ARNOLD, 1950) modificada.

Nutriente	3,0 mM	0,3 mM	1,5 mM
	mM L <sup>-1</sup>		
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2,50	0,25	1,25
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,50	0,05	0,25
P	0,50	0,50	0,50
K	3,00	3,0	3,00
S-SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	2,62	3,85	3,40
Ca	2,00	2,00	2,00
Mg	1,00	1,00	1,00
	μM L <sup>-1</sup>		
Fe	53,72	53,72	53,72
B	46,20	46,20	46,20
Cu	0,31	0,31	0,31
Mn	11,38	11,38	11,38
Zn	0,76	0,76	0,76
Mo	0,09	0,76	0,76



**Figura 2.** Esquema de cultivo, coletas e análises do Experimento I.

## 3.2 Avaliação da Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Plantas de Milho Cultivadas sob Doses Contrastantes de Nitrogênio: Experimento II

### 3.2.1 Tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi desenvolvido em um fatorial 2x5, com 4 repetições, sendo o primeiro fator composto por duas doses de nitrogênio (0,6 mM e 6,0 mM de N da solução de HOAGLAND, 1954) modificada e o segundo fator a inoculação sendo: não inoculado (NI),



inoculado com a *H. seropedicae* (estirpe ZAE94), *A. baldaniorum* (estirpe Sp245), e *A. brasilense* (estirpes FP2 e HM053). Foram avaliadas de forma isoladas, as 4 estirpes supracitadas, dispostos em blocos casualizados, durante o segundo semestre de 2018.

### 3.2.2 Preparo dos inoculantes

Para obtenção do inoculante, as estirpes foram adquiridas, isoladas e inoculadas conforme descrito no item 3.1.2, para obtenção do pré-inóculo foram multiplicadas por 24 horas a 30 °C a 175 rpm. Após o crescimento, 250 µL do pré-inóculo foi transferido para 250 mL de meio DYGS, nas mesmas condições descritas anteriormente. Foi realizada a contagem em câmara de Neubauer e posteriormente a leitura as populações foram ajustadas para a obtenção de 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup> com solução salina.

### 3.2.3 Condições experimentais

As sementes foram desinfestadas superficialmente nas mesmas condições descritas no item 3.1.3. As soluções inoculadoras foram aplicadas diretamente sobre a semente no ato do plantio numa dosagem de 2 mL por vaso. Foram utilizados vasos com diferentes capacidades em função das datas de avaliações, sendo estas: 1, 2 e 3 kg contendo o substrato areia + vermiculita (2:1, v/v) autoclavado. Foram semeadas três sementes por vaso e após cinco dias da emergência das plântulas foi realizado desbaste para a homogeneização mantendo-se uma planta por vaso.

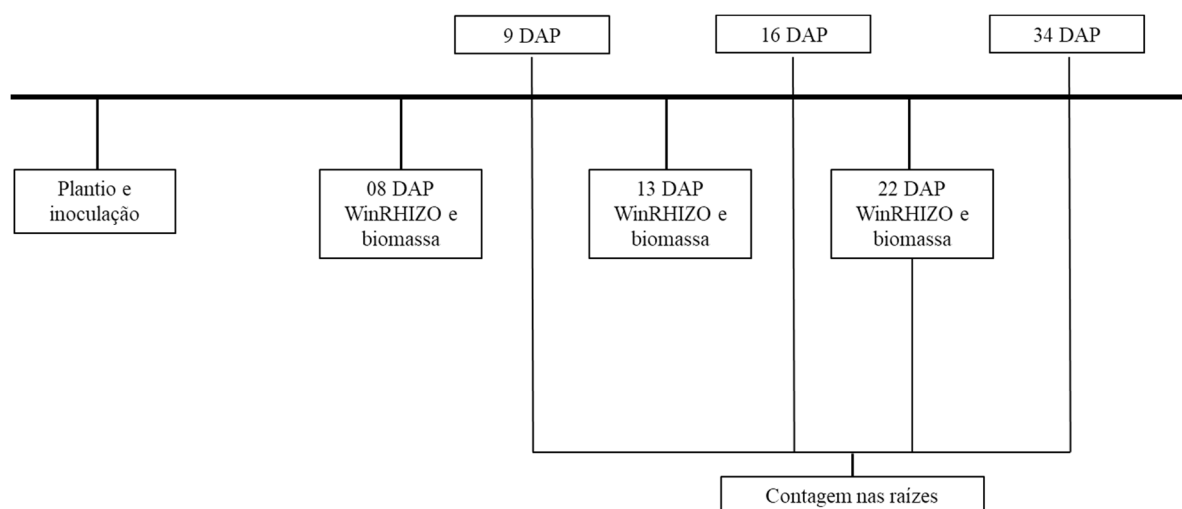
A adubação foi realizada de forma fracionada em duas aplicações de 10 mL cada de solução de Hoagland modificada e concentrada com pH de 5,8 (HOAGLAND e ARNON, 1951). Sendo estas duas soluções nutritivas com diferentes concentrações de N:

**Solução 1**, com baixo suprimento de N (0,5 mM L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e 0,1 mM L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup>):  
- 0,0128 g L<sup>-1</sup> Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,223 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,0066 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,087 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,171 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,0472 g L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>).4 H<sub>2</sub>O; 0,31 g L<sup>-1</sup> CaSO<sub>4</sub>; 0,05 g L<sup>-1</sup> FeEDDHA.

**Solução 2**, alto suprimento de N (5,0 mM L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e 1,0 mM L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>):  
- 0,128 g L<sup>-1</sup> Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,122 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,066 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,087 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,171 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,472 g L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>).4 H<sub>2</sub>O; 0,05 g L<sup>-1</sup> FeEDDHA.

Vale ressaltar que em ambas as soluções, foi adicionado 1 mL de solução estoque de micronutrientes para cada litro de solução nutritiva, contendo: 4,6 µM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,5 µM de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 0,2 µM de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 µM de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,2 µM de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dissolvido em 1 L de água deionizada.

O experimento teve duração total de 34 dias sendo as plantas avaliadas em três coletas, sendo a primeira realizada aos 08 dias após o plantio (DAP); a segunda aos 13 DAP e a terceira aos 22 DAP. Em todas as coletas foram realizadas avaliações dos parâmetros biométricos e de morfologia de raízes, a contagem de bactérias diazotróficas nas raízes das plântulas foram realizadas aos 9, 16, 22 e 34 DAP (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de coletas e análises do Experimento II.

### 3.3 Avaliação da Depleção de Macronutrientes na Solução Nutritiva em Plantas de Milho Inoculadas com Duas Bactérias Diazotróficas: Experimento III

#### 3.3.1 Tratamentos e delineamento experimental

No experimento III foi avaliada a depleção de macronutrientes na solução nutritiva das plantas de milho inoculadas ou não com bactérias diazotróficas. O experimento foi desenvolvido com 06 repetições, sendo o fator avaliado a inoculação: não inoculado (NI), inoculado com a *H. seropedicae* (estirpe ZAE94); inoculado com *A. baldaniorum* (estirpe Sp245) submetidos à mesma dose de nitrogênio (2,0 mM de N - solução de Hoagland (1954) modificada). Foram avaliadas de forma isoladas, as 2 estirpes supracitadas, dispostos em blocos casualizados, durante o primeiro semestre de 2019.

#### 3.3.2 Preparo dos inoculantes

Para obtenção dos inoculantes, as estirpes adquiridas do CRB-JD foram crescidas, isoladas, inoculadas e multiplicadas nas mesmas condições descritas no item 3.1.2. Após o crescimento do pré-inóculo, 50 µL do mesmo foi transferido para 250 mL de meio mínimo (NFb-Sp245 e JNFb-ZAE94), e multiplicadas nas mesmas condições também descritas no item 3.1.2. Após o crescimento, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer para obtenção de uma densidade populacional de  $10^8$  células mL<sup>-1</sup>, para a equalização populacional dos inoculantes foi necessário o ajuste celular com solução tampão fosfato 2 mM (pH 7,0).

#### 3.3.3 Condições experimentais

As sementes foram pré-germinadas em células de espuma fenólica com 2 cm<sup>3</sup>, em BOD a 30°C com ciclo de fotoperíodo de 12/12 h por 4 dias. Após este período as células com as plântulas foram selecionadas, a fim de padronizá-las de acordo com o comprimento da raiz ( $\pm$  5 cm) e inoculadas com os respectivos tratamentos. Para a inoculação, as raízes das plântulas ficaram submersas por 2 horas na solução inoculadora.

Após, foi realizado o transplântio para o sistema hidropônico em casa de vegetação. As plantas permaneceram por 9 dias em solução nutritiva modificada de Hoagland com concentração de 2,0 mM de N (HOAGLAND & ARNOLD, 1950), aplicada a 1/2 força iônica (F.I) para os macronutrientes antes do ensaio de depleção e a 1/4 F.I para o respectivo ensaio.

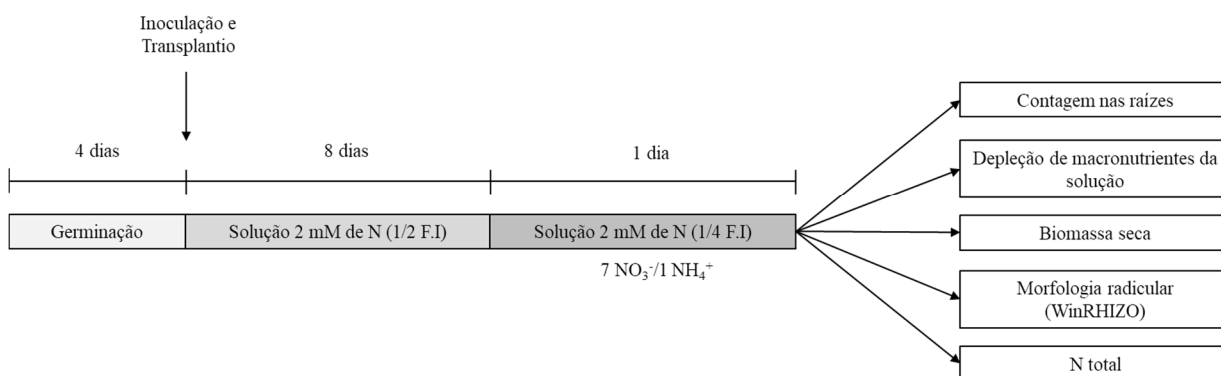
Foram utilizados vasos plásticos de 2,0 dm<sup>3</sup> sendo preenchidos em sua totalidade de solução nutritiva, mantidos sob aeração intermitente.

A composição química da solução nutritiva (1/2 F.I) foi: P-0,5 mM L<sup>-1</sup>; K- 3 mM L<sup>-1</sup>; Ca-2 mM L<sup>-1</sup>, Mg-1 mM L<sup>-1</sup>, 1,75mM L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e 0,25 mM L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, S-3,2 mM L<sup>-1</sup> e para micronutrientes: B- 46,2 μM L<sup>-1</sup>; Cu-0,31 μM L<sup>-1</sup>; Mn- 11,38 μM L<sup>-1</sup>; Mo- 0,09 μM L<sup>-1</sup>; Zn- 0,76 μM L<sup>-1</sup> e Fe- 53,72 μM L<sup>-1</sup>.

A composição química da solução nutritiva (1/4 F.I) foi: P-0,25 mM L<sup>-1</sup>; K- 1,50 mM L<sup>-1</sup>; Ca-1 mM L<sup>-1</sup>, Mg-0,50 mM L<sup>-1</sup>, 1,75 mM L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e 0,25 mM L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, S-1,25 mM L<sup>-1</sup> e para micronutrientes: B- 46,2 μM L<sup>-1</sup>; Cu-0,31 μM L<sup>-1</sup>; Mn- 11,38 μM L<sup>-1</sup>; Mo- 0,09 μM L<sup>-1</sup>; Zn- 0,76 μM L<sup>-1</sup> e Fe- 53,72 μM L<sup>-1</sup>.

O parâmetro pH da solução nutritiva foi monitorado constantemente e em caso de ajuste para valores próximos de 5,8, a correção foi realizada com solução de hidróxido de potássio (KOH) e/ou ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ambos a 1 M. A cada quatro dias foram realizadas as trocas da solução nutritiva do sistema.

Aos 8 dias após o transplântio para sistema hidropônico (DAT), foi realizada a última troca da solução nutritiva e a partir daí foram realizadas coletas da mesma para o acompanhamento da depleção dos macronutrientes, com intervalo de 2 horas entre as coletas, por um período de 34 h, exceto o período noturno, e ao final dessa avaliação as plantas foram coletadas e avaliadas. A coleta final foi realizada aos 9 DAT, foram realizadas análises de contagem nas raízes das plantas, morfologia radicular, biomassa seca e acúmulo de N (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de cultivo, coletas e análises do Experimento III.

### 3.4 Avaliação da Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Plantas de Milho Cultivadas em Substrato Estéril: Experimento IV

#### 3.4.1 Tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi desenvolvido com 5 repetições, sendo o fator avaliado a inoculação: não inoculado (NI), inoculado com a *H. seropedicae* (estirpe ZAE94); inoculado com *A. baldaniorum* (estirpe Sp245) submetidos as mesmas doses de adubação nitrogenada. Foram avaliadas de forma isolada, as 2 estirpes supracitadas, dispostos em blocos casualizados durante o segundo semestre de 2019.

#### 3.4.2 Preparo dos inoculantes

Para obtenção do inoculante, as estirpes foram crescidas, isoladas, inoculadas e multiplicadas nas mesmas condições descritas no item 3.2.2. Após a multiplicação em tubo de

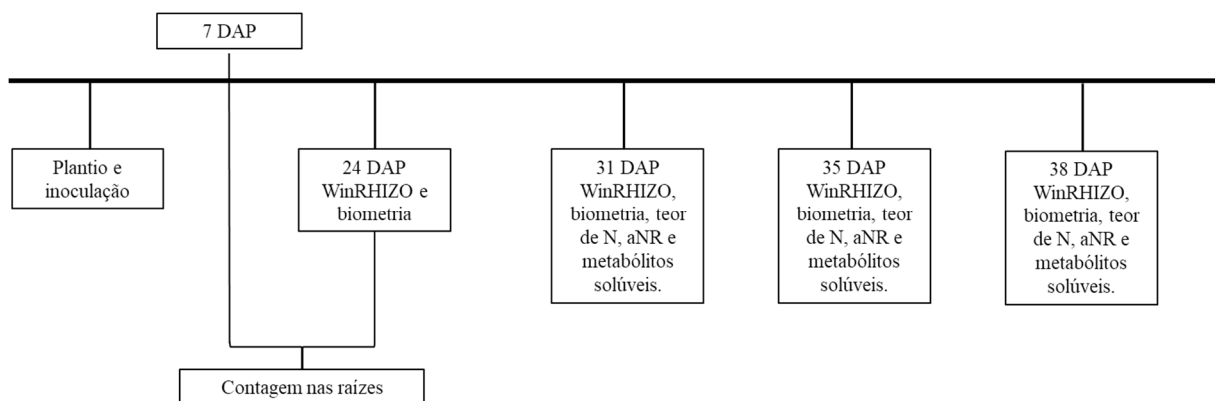
ensaio, 30 µL do pré-inóculo foi transferido para 250 mL de meio mínimo (NFb-Sp245 e JNFb-ZAE94), e multiplicadas nas mesmas condições descritas no item 3.2.2. Foi realizada a contagem em câmara de Neubauer e posteriormente a leitura a população foi ajustada para a obtenção de  $10^6$  células mL<sup>-1</sup> com tampão fosfato a 2 mM (pH 7,0).

### 3.4.3 Condições experimentais

As sementes foram lavadas superficialmente com água corrente até a completa retirada do fungicida e após foram realizadas 3 lavagens com água destilada. As soluções inoculadoras foram aplicadas diretamente sobre as sementes no ato do plantio numa dosagem de 3 mL por vaso, no tratamento controle foi adicionado tampão fosfato a 2 mM (pH 7,0). Foram utilizados vasos com 7 kg de capacidade contendo o substrato areia + vermiculita (2:1 v/v) autoclavado. Foram semeadas três sementes por vaso e após cinco dias da emergência das plântulas foi realizado desbaste para a homogeneização mantendo-se uma planta por vaso. A análise química deste substrato apresentou as seguintes características: pH (H<sub>2</sub>O) 6,70, cálcio 0,39 cmolc dm<sup>3-1</sup>, potássio 48,72 mg L<sup>-1</sup>, magnésio 2,81 cmolc dm<sup>3-1</sup>, nitrogênio 0,01%, fósforo 5,97 mg L<sup>-1</sup> e alumínio 0,0 cmolc dm<sup>3-1</sup>. A adubação foi realizada de forma fracionada em aplicações de no máximo 100 mL cada por vaso de solução de Hoagland modificada e com pH de 5,8 (HOAGLAND e ARNON, 1951) e suplementada com superfosfato simples (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

Aos 24 dias após o plantio, ou seja, na primeira coleta as concentrações adicionadas por vaso de macronutrientes foram: 0,042g de N, 0,25g de P, 0,12g de K, 0,024g de Mg, 0,080g de Ca e 0,1g de S e de micronutrientes: 0,25 mg de B; 0,010 mg de Cu, 0,312 mg de Mn, 0,0041 mg de Mo, 0,025 mg de Zn e 1,5 mg de Fe. E nas demais coletas as concentrações adicionadas por vaso de macronutrientes foram: 0,075g de N, 0,26g de P, 0,14g de K, 0,031g de Mg, 0,322g de Ca e 0,16 de S e de micronutrientes: 0,3mg de B, 0,012 mg de Cu, 0,375 mg de Mn, 0,005 mg de Mo, 0,03 mg de Zn e 1,8 mg de Fe.

O experimento teve duração total de 38 dias sendo as plantas avaliadas em quatro coletas: C1, C2, C3 e C4. Sendo C1, a coleta realizada aos 24 dias após o plantio (DAP); C2 realizada aos 31 DAP, C3 aos 35 DAP e C4 aos 38 DAP. Nas coletas C1, C2, C3 e C4 foram realizadas avaliações dos parâmetros biométricos e morfologia de raízes, nas C2, C3 e C4 foram avaliadas a atividade da enzima nitrato redutase (aNR) nas folhas e coletado material para análise de metabólitos solúveis. Ademais, aos 07 e 24 DAP foram realizadas contagem nas raízes das plantas (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema de coletas e análises do Experimento IV.

## 3.5 Modificações no Metabolismo de Nitrogênio em Plantas de Milho Inoculadas com Duas Espécies de Bactérias Diazotróficas: Experimento V

### 3.5.1 Tratamentos e delineamento experimental

O experimento V foi desenvolvido com 05 repetições, sendo o fator avaliado a inoculação: não inoculado (NI), inoculado com a *H. seropedicae* (estirpe ZAE94); inoculado com *A. baldaniorum* (estirpe Sp245) submetidos à mesma dose de nitrogênio (3,0 mM de N - solução de Hoagland (1954) modificada). Foram avaliadas de forma isolada, as 2 estirpes supracitadas, dispostos em blocos casualizados durante o segundo semestre de 2019.

### 3.5.2 Preparo dos inoculantes

Para obtenção dos inoculantes, as estirpes adquiridas do CRB-JD foram crescidas, isoladas, inoculadas e multiplicadas nas mesmas condições descritas no item 3.4.2. Igualmente, a densidade populacional de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  foi ajustada com solução tampão fosfato a 2 mM (pH 7,0). A escolha da concentração do número de células foi baseada em experiências preliminares, que sugeriu ser suficiente para o processo de interação e promover melhorias no crescimento das plantas.

### 3.5.3 Condições experimentais

As sementes foram pré-germinadas em células de espuma fenólica, selecionadas e inoculadas conforme descrito no item 3.1.3. Para a inoculação, as raízes das plântulas ficaram submersas por 2 horas na solução inoculadora.

Após o processo de inoculação, foi realizado o transplantio para o sistema hidropônico em casa de vegetação. As mesmas permaneceram por 7 dias em solução nutritiva modificada de Hoagland com concentração de 3 mM de N (HOAGLAND & ARNOLD, 1950) aplicada 1/4 da força iônica (F.I) para a adaptação das plantas ao cultivo hidropônico. Assim, após esse período, foi aplicada a mesma solução nutritiva a 1/2 F.I e a cada quatro dias foi realizada a troca da solução nutritiva do sistema. Para esta segunda etapa, foram utilizados vasos plásticos de  $7,5 \text{ dm}^3$  sendo preenchidos com  $6 \text{ dm}^3$  de solução nutritiva cada, mantida sob aeração intermitente e as plantas permaneceram nessas condições por 25 dias.

**Solução nutritiva com 3 mM de N** (2,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  e 0,5 mM de  $\text{NH}_4^+$ ):

P-0,5 mM  $\text{L}^{-1}$ ; K- 3 mM  $\text{L}^{-1}$ ; Ca-2 mM  $\text{L}^{-1}$ , Mg-1 mM  $\text{L}^{-1}$ ; S-3,0 mM  $\text{L}^{-1}$ ; 2,5 mM  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-$  e 0,5 mM  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$  e para micronutrientes: B- 46,2  $\mu\text{M L}^{-1}$ ; Cu-0,31  $\mu\text{M L}^{-1}$ ; Mn- 11,38  $\mu\text{M L}^{-1}$ ; Mo- 0,09  $\mu\text{M L}^{-1}$ ; Zn- 0,76  $\mu\text{M L}^{-1}$  e Fe- 53,72  $\mu\text{M L}^{-1}$ ;

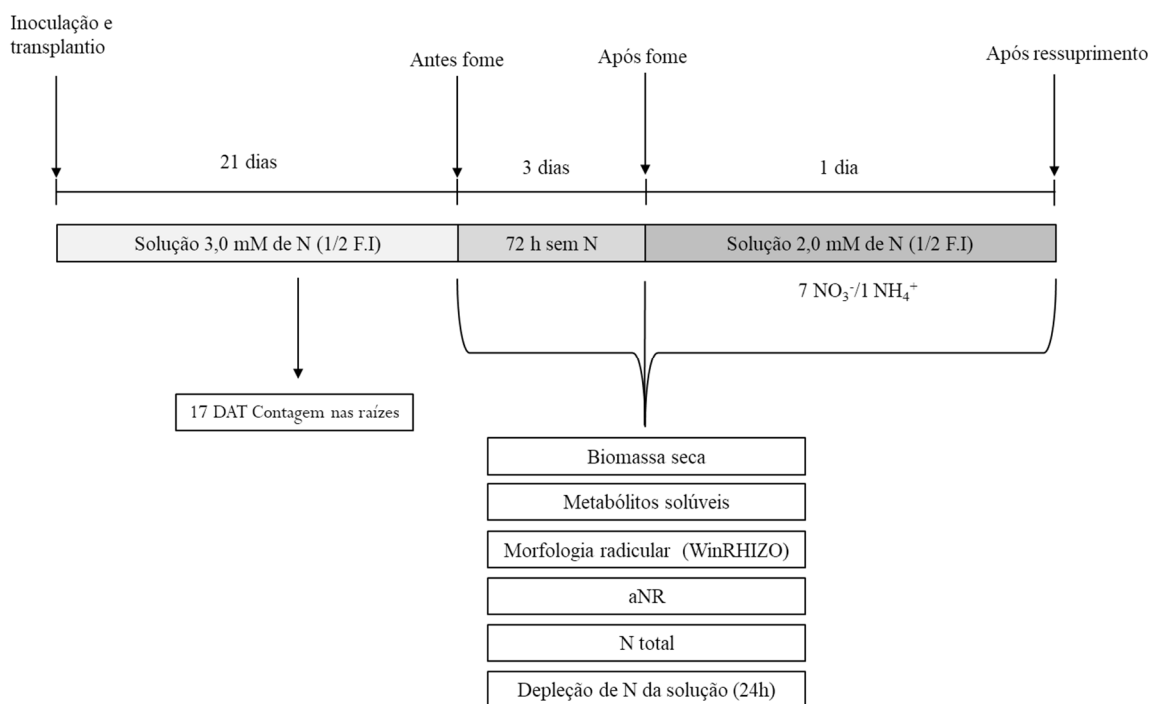
**Solução nutritiva com 2 mM de N** (1,75 mM de  $\text{NO}_3^-$  e 0,25 mM de  $\text{NH}_4^+$ ):

P-0,5 mM  $\text{L}^{-1}$ ; K- 3 mM  $\text{L}^{-1}$ ; Ca-2 mM  $\text{L}^{-1}$ , Mg-1 mM  $\text{L}^{-1}$ ; S-3,2 mM  $\text{L}^{-1}$ ; 1,75 mM  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-$  e 0,25 mM  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$  e para micronutrientes: B- 46,2  $\mu\text{M L}^{-1}$ ; Cu-0,31  $\mu\text{M L}^{-1}$ ; Mn- 11,38  $\mu\text{M L}^{-1}$ ; Mo- 0,09  $\mu\text{M L}^{-1}$ ; Zn- 0,76  $\mu\text{M L}^{-1}$  e Fe- 53,72  $\mu\text{M L}^{-1}$ .

Para indução do processo de transporte de N, as plantas foram crescidas em suficiência de N (3,0 mM) por 21 dias, foram submetidas a solução nutritiva sem N por 72 horas, e posteriormente foram transferidas para solução com 2,0 mM de N. Após, foram realizadas coletas da solução nutritiva para o acompanhamento da depleção do N por 24 horas, com intervalo de 1 hora entre as coletas, exceto no período noturno, e ao final dessa avaliação as plantas foram coletadas.

Foram realizadas 3 coletas, aos 21, 24 e 25 dias após o transplântio (DAT). A primeira coleta foi realizada aos 21 DAT, a segunda aos 24 DAT, em que as plantas se encontravam com 72 h sem fornecimento de N, e a terceira, foi aos 25 DAT, ou seja, após o ressuprimento com N e término das coletas de solução para o acompanhamento da depleção de N (Figura 6).

Em todas as coletas os tecidos foliares foram coletados para avaliação imediata da atividade da enzima nitrato redutase (aNR) e para análises de metabólitos solúveis. Posteriormente as plantas foram separadas em folhas e raízes para obtenção da biomassa seca, acúmulo de N e avaliação da morfologia radicular.



**Figura 6.** Esquema de cultivo, coletas e análises do Experimento V.

### 3.6 Avaliação da Expressão Gênica de Isoformas de PMH<sup>+</sup>- ATPases, Transportadores de Nitrato de Alta Afinidade e Enzimas do Ciclo de N: Experimento VI

#### 3.6.1 Tratamentos e delineamento experimental

O experimento VI foi conduzido para avaliar os padrões de expressão gênica de isoformas de PMH<sup>+</sup>- ATPases, transportadores de nitrato de alta afinidade e enzimas do ciclo de N em resposta a presença de nitrato nas plantas de milho inoculadas ou não com bactérias diazotróficas. O experimento foi desenvolvido com 04 repetições, sendo o fator avaliado a inoculação: não inoculado (NI), inoculado com a *H. seropedicae* (estirpe ZAE94); inoculado com *A. baldaniorum* (estirpe Sp245) submetidos à mesma dose de nitrogênio (2,0 mM de N - solução de Hoagland (1954) modificada). Foram avaliadas de forma isolada, as 2 estirpes supracitadas, dispostos em blocos casualizados durante o primeiro semestre de 2021.

#### 3.6.2 Preparo dos inoculantes

Para obtenção dos inoculantes, as estirpes foram crescidas, isoladas, inoculadas e multiplicadas nas mesmas condições descritas no item 3.2.2. Após o crescimento do pré-inóculo, 200 µL do mesmo foi transferido para 500 mL de meio mínimo sem indicadores de pH

(NFb-Sp245 e JNFb-ZAE94), e multiplicadas nas mesmas condições descritas no item 3.2.2. Após o crescimento, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer para obtenção de uma densidade populacional de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , para a equalização populacional dos inoculantes foi necessário o ajuste celular com solução tampão fosfato a 2 mM (pH 7,0).

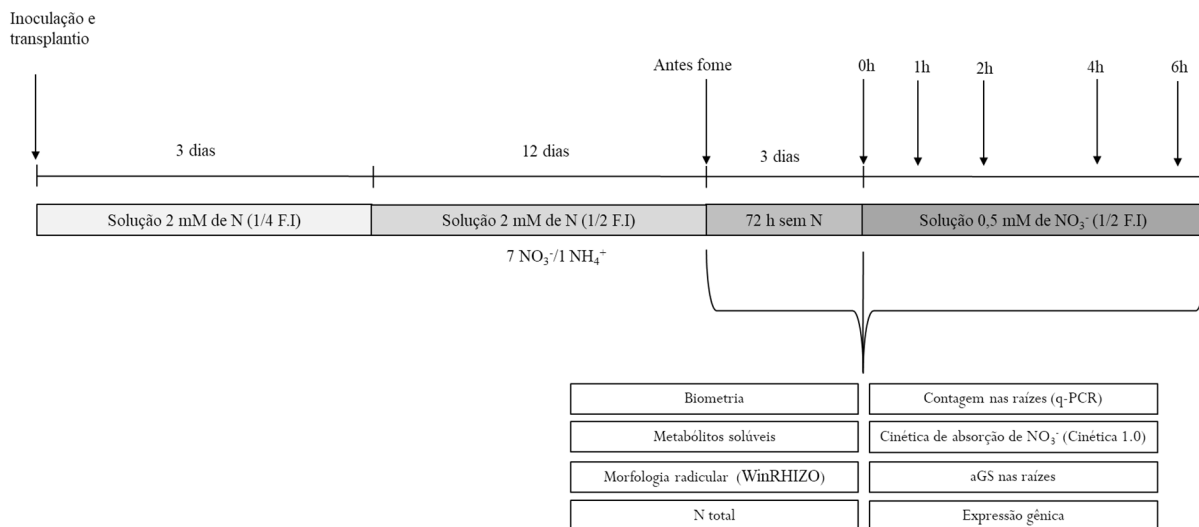
### 3.6.3 Condições experimentais

As sementes foram pré-germinadas conforme o item 3.3.3. Para a inoculação, as raízes das plântulas ficaram submersas por 1 h na solução inoculadora. Após o processo de inoculação, foi realizado o transplante para o sistema hidropônico em casa de vegetação. As mesmas permaneceram por 3 dias em solução nutritiva modificada de Hoagland com concentração de 2 mM de N (HOAGLAND & ARNOLD, 1950) aplicada a 1/4 F.I para a adaptação das plantas ao cultivo hidropônico. Assim, após esse período, foi aplicada a mesma solução nutritiva a 1/2 F.I (Tabela 2), a cada quatro dias foi realizada a troca da solução nutritiva do sistema. Para esta etapa, foram utilizados vasos plásticos de  $3,5 \text{ dm}^3$  sendo preenchidos com  $3 \text{ dm}^3$  de solução nutritiva cada, mantida sob aeração intermitente e as plantas permaneceram nessas condições por 18 dias.

Para indução do processo de transporte de nitrogênio, as plantas foram crescidas em suficiência de N (2,0 mM) por 15 dias, em seguida foram submetidas a solução nutritiva sem N por 72 horas, e posteriormente realizou-se o ressuprimento com 0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 2). Após, foram realizadas coletas da solução nutritiva para o acompanhamento da depleção do N durante 6 horas e das raízes das plantas que foram congeladas imediatamente em  $\text{N}_2$  líquido e armazenadas em ultrafreezer à  $-80^\circ\text{C}$  para posterior extração de RNA, DNA e quantificação de proteína total (Figura 7). Nas coletas antes da fome (15 DAT), após o período de fome e de ressuprimento com  $\text{NO}_3^-$  (18 DAT) nos diferentes tempos de coletas, foram avaliados parâmetros biométricos, morfologia radicular, aGS, metabólitos solúveis, contagem nas raízes, cinética da absorção de  $\text{NO}_3^-$  e expressão gênica.

**Tabela 2.** Solução nutritiva utilizada para o crescimento das plantas de milho (HOAGLAND & ARNOLD, 1950) modificada.

Nutriente	2 mM	0 mM	0,5 mM
	$\text{mM L}^{-1}$		
N- $\text{NO}_3^-$	1,75	0	0,5
N- $\text{NH}_4^+$	0,25	0	0
P	0,50	0,50	0,50
K	3,00	3,0	3,00
S- $\text{SO}_4^-$	3,20	3,70	3,70
Ca	2,00	2,00	2,00
Mg	1,00	1,00	1,00
	$\mu\text{M L}^{-1}$		
Fe	53,72	53,72	53,72
B	46,20	46,20	46,20
Cu	0,31	0,31	0,31
Mn	11,38	11,38	11,38
Zn	0,76	0,76	0,76
Mo	0,09	0,76	0,76



**Figura 7.** Esquema de cultivo, coletas e análises do Experimento VI.

### 3.6.4 Contagem de bactérias diazotróficas nas raízes

Foi realizada a coleta das raízes das plantas de milho para estimar, quantificar e acompanhar a população bacteriana. A mesma foi realizada através do método do número mais provável (NMP) conforme descrito no item 3.7.1 e, por meio da técnica de qPCR (n=4), onde o DNA total dos tecidos das raízes de milho armazenados em ultrafreezer foi extraído, assim como o DNA genômico das estirpes alvos.

#### a) Extração de DNA total

O DNA genômico das estirpes de *A. baldaniorum* (Sp245) e *H. seropedicae* (ZAE94) foi extraído utilizando a metodologia do tampão CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987). Para o processo de extração 1 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada em microtubos de 2 mL a 10.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento formado foi utilizado para a extração do DNA. Para a extração com o referido tampão foram utilizados 600 µL do mesmo [2% (p/v) de brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB; 1,42 M de NaCl; 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM de EDTA (pH 8,0); 2% (p/v) de polivinilpirrolidona - PVP; 5 mM de ácido ascórbico e 4 mM de ácido dietitiditiocarbâmico - DIECA] pré-aquecido a 65° C, o sedimento bacteriano foi dissolvido suavemente por pipetagem. As amostras foram incubadas em banho-maria por 20 min a 65° C e homogeneizadas a cada 5 min. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em bancada e após atingirem temperatura ambiente adicionou-se 3 µL de RNase (20 mg mL<sup>-1</sup>) e 3 µL de Proteinase K (1 mg mL<sup>-1</sup>) com posterior incubação a 37° C por 30 min em equipamento Thermomixer. Posteriormente, adicionou-se 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) com homogeneização e centrifugação a 13.000 rpm por 10 min.

O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo estéril de 2 mL, a este foi adicionado 70% de isopropanol (100%) gelado correspondente ao volume recuperado, para precipitação do DNA. As amostras foram invertidas suavemente de forma manual por 10 vezes e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao pellet formado foi adicionado 500 µL de solução de álcool etílico a 70% (v/v) para sua lavagem com posterior centrifugação a 10.000 rpm por 5 min. Novamente o sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco a temperatura ambiente por 3 h em capela de exaustão com fluxo de ar ligado.

O processo de extração foi finalizado com a reidratação do pellet com 100 µL de água ultrapura livre de nucleases (Promega). A quantificação do rendimento e a pureza das amostras



de DNA foram avaliadas em espectrofotômetro utilizando o equipamento NanoDrop (Thermofisher) com comprimento de onda de 260 nm e a observação das relações entre os valores de absorvância 260/280 e 260/230, respectivamente. A quantificação também foi realizada com o fluorímetro Qubit<sup>®</sup> 2.0 (Invitrogen), para isso foi utilizado o kit Qubit<sup>™</sup> dsDNA BR Assay seguindo as recomendações do fabricante e a integridade do DNA bacteriano extraído foi observada em gel de agarose (1% p/v) corado com brometo de etídio (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) por meio de eletroforese (70V/90min). As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C durante o processamento da qPCR.

Para a extração de DNA dos tecidos de raízes das plantas de milho, o tecido vegetal foi macerado em N<sub>2</sub> líquido com auxílio de pistilo e gral. Após, 250 mg de tecido foram transferidos para microtubos de 2 mL e a extração com tampão CTAB seguiu o mesmo protocolo descrito para a extração do DNA genômico das estirpes.

### b) Ensaio em PCR em tempo real (qPCR)

Para o ensaio de qPCR os pares de iniciadores (*primers*) utilizados para detecção e quantificação das estirpes alvos foram específicos (Tabela 3), desenhados a partir da sequência dos genomas das estirpes em estudo (Sp245-n<sup>o</sup> de acesso no NCBI: CP022253.1 e HE577327.1/ ZAE94-n<sup>o</sup> de acesso no RAST: 6666666.224243) por Soares et al. (2021) e Soares (2020) conforme metodologia descrita nos respectivos trabalhos.

**Tabela 3.** Iniciadores utilizados para quantificar as estirpes bacterianas de *A. baldaniorum* (Sp245) e *H. seropedicae* (ZAE94) em tecidos das raízes de milho.

Estirpe	ID do iniciador	Sequências (5'-3')	Tamanho do Amplicon (pb)
Sp245 (BR11005)	Sp245p10F	CCTCTATCGGAACCGCAACG	203
	Sp245p10R	GCACTTGTTTGATGCCGAGA	
ZAE94 (BR11417)	ZAECont2223F2	GGTCGCTCTTATGACGTGGT	196
	ZAECont2223R2	GAAGGCGTTGGGATACATCG	

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o kit GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (Promega<sup>®</sup>) com volume total de reação de 15 µL, sendo todas realizadas em duplicata. Cada reação foi composta por: 6,5 µL de SYBR Green, 0,22µL de cada iniciador (*primer*) (10 µM), 0,5 µL de solução de Tween 20 a 2% (v/v), 5,0 µL de DNA e 2,56 µL de água ultrapura. As condições da reação foram: 95°C por 10 min seguida por 40 ciclos a: 95°C por 15 s e 60°C por 30 s.

Para a análise do resultado elaborou-se uma curva padrão para cada estirpe alvo a partir da diluição decimal seriada de seu DNA genômico, as concentrações finais de DNA variaram de 20 a 0,0002 ng 15 µL<sup>-1</sup> para a estirpe Hs-ZAE94 e 25 a 0,00025 ng 15 µL<sup>-1</sup> para a estirpe Ab-Sp245, já que 5,0 µL de DNA foram utilizados na reação. O número de cópias do fragmento de DNA alvo correspondente a massa de DNA genômico de cada diluição foi determinado a partir do tamanho do genoma das estirpes alvo, conforme Tabela 4, através da Equação 1.

**Tabela 4.** Tamanho do genoma das estirpes alvo.

Espécie	Estirpe	Tamanho do genoma (pb)	Referência
<i>Azospirillum baldaniorum</i>	Sp245	7.530.241	WISNIEWSKI-DYÉ et al. (2011)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	ZAE94	5.653.622	BALDANI et al. (2011)

$$\text{N}^\circ \text{ de células} = \frac{X(\text{ng}) \times 6,0221 \cdot 10^{23} (\text{moléculas mol}^{-1})}{N(\text{bp}) \times 660 (\text{g mol}^{-1}) \times 1 \cdot 10^9 (\text{ng g}^{-1})} \quad (1)$$

Onde:

Nº de células = número de células ou cópias do fragmento de DNA alvo amplificado;

X = massa de DNA utilizado na reação em nanograma (ng);

6,0221\*10<sup>23</sup> = constante de Avogadro;

N = tamanho do DNA genômico em pares de base (pb);

660 = massa média de 1 pb de DNA dupla fita;

1,0\*10<sup>9</sup> = constante para conversão da massa do fragmento de DNA amplificado de grama para nanograma.

Ao final o log<sub>10</sub> do número de cópias de cada amostra de DNA usada na reação foram correlacionados às médias do valor de Ct (*Cycle threshold*) obtidas na qPCR, para se plotar uma curva padrão para cada estirpe. A equação da reta gerada foi utilizada para calcular o número de cópias do fragmento de DNA de cada estirpe alvo nas amostras de tecido radicular de milho. Sendo assim, a quantidade de células presentes em cada amostra foi estimada a partir do número de cópias do fragmento, uma vez que se entende que o fragmento alvo a ser amplificado tem apenas uma cópia no genoma. Para calcular o número de células das estirpes alvos por grama de tecido fresco foi utilizada a Equação 2.

$$\text{N}^\circ \text{ de células} = \frac{A \times B \times C}{D} \times E \quad (2)$$

Onde:

A = número de cópias do fragmento;

B = concentração de DNA genômico extraído (ng µL<sup>-1</sup>);

C = volume de DNA extraído (µL);

D = massa de DNA total empregada na reação de qPCR (ng);

E = massa inicial de tecido vegetal utilizada para extração de DNA (ng)

As eficiências de amplificação dos primers foram determinadas pela Equação 3.

$$E = 10^{-\left(\frac{1}{\text{slope}}\right) - 1} \quad (3)$$

Onde:

E = eficiência de amplificação (%);

Slope = valor de inclinação da reta gerado pela equação de cada iniciador (*primer*).

### 3.6.5 Expressão gênica

#### a) Extração de RNA total

As amostras de raízes foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido com auxílio de gral e pistilo. Após, 1 mL do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) mantido sob refrigeração foi adicionado em cerca de 200 mg de tecido macerado acondicionados em um microtubo de 2 mL e com auxílio de um

agitador orbital do tipo vórtex foi homogeneizado. As amostras foram mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio refrigerado e agitou-se vigorosamente as amostras à mão e, após, as mesmas foram incubadas novamente à temperatura ambiente. Depois, as amostras foram centrifugadas 12.000 g por 15 minutos à 4°C e o sobrenadante foi transferido para novo microtubo.

Para a precipitação do RNA foram adicionados 0,5 mL de isopropanol (mantido a -20°C). Por inversão dos tubos, as amostras foram agitadas cuidadosamente e mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado ficando o RNA precipitado no fundo do microtubo. Este precipitado foi lavado com 1 mL de solução de álcool etílico a 75% (v/v - preparado com água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato - DEPC) e após centrifugado a 12.000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o excesso de etanol foi retirado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente por 5 minutos. O RNA foi eluído em 50 µL de água tratada com DEPC, após foi quantificado em Nanodrop (Thermofisher) e a qualidade verificada em de gel de agarose a 1% (m/v) corado com gel-red. O RNA extraído ficou armazenado em freezer à -80°C para posterior análise.

#### **b) Tratamento com DNase I, síntese de cDNA e PCR em tempo real (qPCR)**

Para o tratamento das amostras com DNase foi utilizado o Kit “DNase I Amplification Grade” (Sigma-Aldrich). Para cada 1 µg de RNA total tratado, foi utilizado 1 µL de tampão de reação (10x), 1 µL da enzima DNase I (1U µL<sup>-1</sup>) e água para volume total de 10 µL de reação. As amostras foram incubadas em termociclador por 15 minutos à 25°C. Foi adicionado 1 µL da solução de parada para cada 1 µg de RNA tratado e incubado novamente em termociclador à 70°C por 10 minutos para inativação da enzima DNase I.

Na reação de síntese do cDNA foi utilizado o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits” (Applied Biosystems) seguindo as recomendações do fabricante. A reação foi realizada em termociclador com a seguinte programação: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho StepOne Plus Real-Time PCR System” (Applied Biosystems) utilizando o kit “HOT FIREpol® Eva Green® qPCR Mix Plus (ROX)” (Solis BioDyne) de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: 15 minutos à 95°C, quarenta ciclos de amplificação com 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos. E finalmente a curva de dissociação com ciclos de amplificação de 15 segundos a 95°C e um aumento de temperatura de 0,3°C a cada ciclo de 60°C até 95°C para verificar a especificidade da reação.

A especificidade dos iniciadores foi analisada por alinhamento das sequências nos bancos de dados (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> e MaizeGBD, <https://www.maizegdb.org/>) e experimentalmente ao fim da reação de PCR durante a curva de dissociação. Os cálculos de expressão foram realizados com base no método do CT (*Cycle Threshold*, ciclo limite) comparativo ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) de LIVAK & SCHMITTGEN (2001). Como controle endógeno foram utilizados os genes actina (*ZmActin*) e tubulina (*ZmTubulin*) (GARNETT et al., 2015) conforme Tabela 5.

**Tabela 5.** Sequência dos iniciadores (*Forward e Reverse*) para os genes transportadores de nitrato de alta afinidade, PM H<sup>+</sup> -ATPases e enzimas do ciclo de N em milho utilizados no experimento. O gene da actina (*ZmActin*) e tubulina (*ZmTubulin*) foram utilizados como controle endógeno.

Gene	Gene ID	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	q-PCR (pb)	Referência
<i>ZmNRT2.3</i>	GRMZM2G163866	AGGAAGGGCATCGAGAACAT	CTTGCGCTGTGACGGCCTAC	179	GARNETT et al., 2013
<i>ZmNRT2.5</i>	GRMZM2G455124	GCATCGTCCCGTTCGTCTC	CCGTCTCCGTCTTGTACTTGG	129	
<i>ZmNRT3.1A</i>	GRMZM2G179294	GCATCCACGCCTCTCTCAAG	TCAGCAACGACAGCCACTCAT	177	
<i>ZmHA2</i>	GRMZM2G019404	AACACCTTTGCTGCCCGAC	GAAACTCCCTAGAAAAGACGG	128	PII et al., 2016
<i>ZmHA4</i>	GRMZM2G006894	TGCCACCCTTGTGTCTTCTG	TGTCTCCAATCACATCACCG	88	
<i>ZmNADH-GOGAT</i>	GRMZM2G077054	CATAGACCGAGGCATGTTTTA	AAACAATAGACACCAAACTTTC	110	PII et al., 2019
Nitrate reductase ( <i>ZmNR1</i> )	GRMZM2G568636	GCCGACTTGCCAGCGTAAAT	ACATGTTGCACATTCCGAGG	163	Este trabalho
Nitrate reductase ( <i>ZmNR2</i> )	GRMZM5G878558	TACGATCAAAGGATACGCATACTC	CTTGCCGTACTTGGTTGGAC	130	CANTÚ et al., 2016
Glutamine synthetase ( <i>ZmGS1-1</i> )	GRMZM2G050514	CGAGGGAGCCCACTGTTTTT	TGTTCCCGAGCAATACACCG	123	Este trabalho
Glutamine synthetase ( <i>ZmGS1-5</i> )	GRMZM2G046601	CGCTCTCCAGTGTACTGCTC	CGCAGCCAATCGTACACCTA	102	
Glutamine synthetase ( <i>ZmGS2</i> )	GRMZM2G098290	TTATATACGCCGTCCGCGCC	GAGACCTCACCTGTGACGAGC	104	LI et al., 2021
<i>ZmActin</i>	GRMZM2G126010	CCAATTCTGAAGATGAGTCT	TGGTAGCCAACCAAAAACAGT	156	GARNETT et al., 2015
<i>ZmTubulin</i>	GRMZM2G152466	GAGGACGGCGACGAGGGTGAC	CAAAGCGGGGAATAAAGTCT	186	

### **3.6.6 Cinética de absorção de nitrato**

Para a obtenção dos parâmetros cinéticos, os níveis de  $\text{NO}_3^-$  na solução foram monitorados durante 6 horas após o ressuprimento da fonte de nitrogênio. Amostras de 1 mL da solução nutritiva foram coletadas para determinação da concentração de nitrato e ao final do experimento o volume final da solução bem como a massa fresca radicular foram determinadas para o cálculo dos parâmetros cinéticos. Os valores de  $V_{\text{máx}}$  e  $K_M$  foram estimados empregando-se um processo gráfico-matemático proposto por Ruiz (1985) através do software CINETICWIN 1.0 (RUIZ & FERNANDES-FILHO, 1992).

## **3.7 Avaliações Realizadas Durante os Experimentos**

### **3.7.1 Contagem de bactérias diazotróficas**

Para estimar e acompanhar a população bacteriana foi realizada a coleta das raízes das plantas, a mesma foi realizada através do método do número mais prováveis (NMP) e pela tabela de McCrady com três repetições, no meio de cultivo semi-sólido NFB e JNFB, conforme descrito por Baldani et al. (2014). Para isso, o material vegetal obtido nas diferentes coletas foi devidamente lavado com água destilada e secos em papel toalha, posteriormente foi pesado e macerado com solução salina na relação 1/10. Após, 1 mL da solução precedente foi retirada para a realização das diluições seriadas também em solução salina até  $10^{-9}$ , em seguida, 0,1 mL de cada diluição foi inoculada nos frascos contendo 5 mL dos respectivos meios semi-sólidos supracitados. Após 7 dias de incubação a  $30^\circ\text{C}$  procedeu-se a contagem, sendo considerado crescimento positivo o aparecimento da película característica de crescimento de bactérias diazotróficas na subsuperfície do meio.

### **3.7.2 Avaliação de parâmetros radiculares e biometria**

Para as análises das raízes, evitando-se a sobreposição, as mesmas foram espalhadas em uma cuba de acrílico, na dimensão que as comportavam, preenchida por uma lâmina de água destilada. Procedeu-se à captura das imagens utilizando um scanner profissional Epson XL1000. As características da morfologia radicular foram avaliadas por meio do programa analisador de imagens WinRHIZO Pro™. As variáveis avaliadas foram comprimento total, área superficial total, área de projeção, diâmetro médio, volume total, número de pontas, bifurcações, cruzamentos, comprimento total das raízes finas ( $\varnothing$  até 1,5 mm) e comprimento total das raízes grossas ( $\varnothing > 1,5$  mm). Quando necessário, as raízes foram armazenadas em álcool etílico a 50% (v/v) até o processamento das imagens.

As variáveis biométricas avaliadas foram número de folhas, diâmetro do colmo mensurado com auxílio de um paquímetro digital (Digimess) e o parâmetro índice de área foliar (AF) realizado com medidor de bancada modelo LI-3100C (LI-COR™) com todas as folhas existentes.

### **3.7.3 Atividades enzimáticas**

#### **a) Atividade da enzima nitrato redutase (aNR)**

A análise da aNR foi realizada pelo método *in vivo* de acordo com Jaworski (1971) e adaptado para milho de acordo com Breda et al. (2019b). As coletas consistiram em amostras de 0,5 g dos fragmentos de tecido de raízes e/ou da folha +1 (sem a nervura central) cortadas a aproximadamente 1 cm da inserção no colmo. Esses fragmentos foram acondicionados no

escuro em 10 mL de solução extratora obtida a partir de 2,5 mL de tampão fosfato preparado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na concentração de 285 mM com pH 7,3; 2,5 mL de  $\text{KNO}_3$  com concentração de 300 mM; 1,0 mL de solução de Tween 20 a 0,6% (v/v) e 4,0 mL de água deionizada. Logo após, as amostras foram submetidas a vácuo (600 mm Hg) por 3 minutos e posteriormente mantidas em banho-maria a 32°C, por 90 min. Após o período de incubação, foram retiradas alíquotas de 0,5 mL da solução de incubação de cada amostra e recolhidas em tubos de ensaio onde foram adicionados 0,5 mL de sulfanilamida a 1% em HCl 3M (m/v), 0,5 mL de n-naftil-etileno-diamino a 0,02% (m/v). As alíquotas permaneceram em repouso por 20 min e, então, foi acrescentado 4 mL de água deionizada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (modelo 2000 UV-Bel Photonics) a 540 nm e a determinação da concentração de  $\text{NO}_2^-$ , foi obtida a partir de uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ . Desta forma, a atividade da enzima foi estimada pela quantidade de  $\text{NO}_2^-$  liberada pelos tecidos vegetais na solução de incubação e foi expressa em  $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de massa fresca.

#### **b) Atividade da enzima glutamina sintetase (aGS)**

A aGS foi realizada de acordo com o método descrito por Schiavon et al. (2008) com modificações. Amostras do tecido fresco de folha e/ou raízes (0,5 g) foram maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida foi adicionado 1,5 mL do tampão de extração, constituído por 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM de EDTA (pH 8,0); 1,5% (m/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP), 10 mM de ditioneitol (DTT), 30% (v/v) de glicerol puro e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). Este homogeneizado foi centrifugado a 14.000 g durante 30 min em centrífuga refrigerada a - 4 °C (5415 R; Eppendorf). O conteúdo de proteína total foi determinado através do método descrito por Bradford (1976), pela absorbância em espectrofotômetro a 540 nm utilizando albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

Esse extrato protéico foi utilizado para quantificar a atividade de GS, para isso foi preparado o tampão de extração pela adição de 2,5 mL de imidazol-HCl a 1M (pH 7,5); 2,5 mL de solução de hidroxilamina-Tris a 0,1M (pH 7,5); 0,203 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,184 g de L-glutamato; 0,138 g de ATP e 17,5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol e avolumado para 45 mL. Uma alíquota de 450  $\mu\text{L}$  deste tampão, com e sem a presença de ATP, foi adicionado a 50  $\mu\text{L}$  contendo 50  $\mu\text{g}$  de proteína. Esta mistura foi incubada a 30 °C por 30 min e após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 350  $\mu\text{L}$  de uma solução composta por 4% de ácido tricloroacético- TCA (m/v) e 3,2% de cloreto férrico anidro-  $\text{FeCl}_3$  (m/v) preparada em ácido clorídrico (HCl) 0,5 N. As absorbâncias das amostras foram mensuradas em placa de ELISA com o leitor de microplaca modelo Anthos Zenyth 200 ST (Biochrom) a 540 nm, utilizando como padrão o  $\gamma$ -glutamil mono-hidroamato. A atividade da GS foi expressa em  $\mu\text{moles de } \gamma\text{-glutamil monohidroamato produzido por minuto por } \mu\text{g proteína}^{-1}$ .

#### **3.7.4 Análise de metabólitos solúveis**

Amostras de 1 g de material coletado da parte aérea e/ou raízes foram homogeneizadas em 20 mL de etanol 80% (v/v) após processo de trituração por 3 min em triturador Turratrec (modelo TE-102 (Tecnal, hélice de 12 mm) e filtrados com papel filtro  $\phi=150\text{mm}$ . O filtrado foi recolhido e após a partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984) em funil de separação, a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-amino livre pelo método da ninidrina (YEMM & COCKING, 1955),  $\text{N-NO}_3^-$  (MIRANDA et al., 2001),  $\text{N-NH}_4^+$  (MITCHEL, 1972) e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957).

### 3.7.5 Acúmulo de biomassa, nitrogênio total e clorofila

A parte aérea (folhas e caules) e a raiz foram pesadas no momento das coletas e depois foram secas em estufa com ventilação forçada a 65°C até atingir peso constante para a obtenção da biomassa seca e o acúmulo deste nutriente. Após o processo de secagem, as amostras foram moídas em moinho de facas do tipo Willey (<2 mm) e destinadas à análise de nitrogênio total, por digestão sulfúrica e destilação (BREMNER & MULVANEY, 1983).

No experimento I, a eficiência do uso de N (EUN) foi calculada utilizando a Equação 4, conforme proposto por Xu et al. (2012).

$$EUN (gg^{-1}) = \frac{\text{massa seca total da planta}}{\text{Nitrogênio aplicado}} \quad (4)$$

E apenas no experimento VI, durante o ensaio de cinética foi realizada a estimativa no teor de clorofila foliar com o auxílio do clorofilômetro portátil ClorofiLOG® (modelo CFL 1030). Por meio de sensores, ele analisa três faixas de frequência de luz e através de relações de absorção de diferentes frequências fornece as medições dos teores de clorofila a, b e total, expressas em unidades dimensionais conhecidas como ICF (Índice de Clorofila Falker). Os dados das leituras foram obtidos pela média de três medições realizadas em sequência no terço médio da folha +1 de cada planta.

### 3.7.6 Monitoramento dos níveis de macronutrientes da solução nutritiva

#### a) Experimento I

Para a determinação de  $\text{NO}_3^-$ , foi utilizada a metodologia descrita por Miyazawa et al. (1985), mas utilizando os comprimentos de onda 220 e 275 nm. Assim, considera-se que, no comprimento de onda de 220 nm, a absorbância reflete a presença de  $\text{NO}_3^-$  e impurezas, e no comprimento de 275 nm, reflete apenas impurezas. De acordo com Olsen (2008), é necessário subtrair da absorbância no comprimento de onda de 220 nm o dobro da absorbância em 275 nm. Para a determinação de  $\text{NH}_4^+$  utilizou-se o método de silicato-hipoclorito de acordo com Kempers & Zweers (1986).

#### b) Experimento III

Para a determinação de  $\text{NO}_3^-$  foi utilizada a metodologia descrita por Miranda et al. (2001), para  $\text{NH}_4^+$  utilizou-se o método Mitchel (1972), para Ca, Mg e K determinou-se através de espectrometria de absorção atômica com chama (modelo AA-6800- Shimadzu) e o P determinou-se por colorimetria em espectrofotômetro-UV (modelo Genesys 10S VIS-ThermoFisher Scientific) com  $\lambda=660$  nm, conforme metodologia descrita por (NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

#### c) Experimento V e VI

Para a determinação de  $\text{NO}_3^-$  foi utilizada a metodologia descrita por Miranda et al. (2001) e para  $\text{NH}_4^+$  utilizou-se o método Mitchel (1972).

## **3.8 Bioensaios em Câmaras de Crescimento**

### **3.8.1 População bacteriana**

O ensaio avaliou a aplicação de duas densidades populacionais bacterianas,  $10^6$  e  $10^8$  cel mL<sup>-1</sup>, das estirpes que tiveram enfoque no trabalho Ab-Sp245 e Hs-ZAE94. Ambas as estirpes foram crescidas e multiplicadas conforme descrito no item 3.2.2.

As sementes de milho híbrido SHS5050 foram desinfestadas superficialmente conforme descrito no item 3.1.3 e pré-germinadas em papel germitest duplo estéril umedecido com 40 mL de água destilada autoclavada pelo período de 2 dias em BOD à 30°C no escuro envolvidos em filme plástico. Após, as plântulas foram selecionadas de acordo com o comprimento da radícula ( $\pm 1,5$  cm) e ficaram imersas durante 1 h nas respectivas suspensões bacterianas. Em seguida, mais uma vez foram colocadas para germinar nas mesmas condições descritas anteriormente pelo período de 6 dias, com ciclo de fotoperíodo ajustado para 12 h de luz. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 12 repetições. Ao final, as raízes das plantas foram escaneadas para avaliação da morfologia conforme descrito no item 3.7.2.

### **3.8.2 Ácido 3- indolacético (AIA)**

No ensaio para avaliar a aplicação de diferentes concentrações de AIA exógeno no híbrido de milho SHS5050, as sementes foram desinfestadas superficialmente conforme descrito no item 3.1.3. Após, as mesmas ficaram imersas por 1 h nas soluções com  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-8}$  M de AIA sob proteção da luz, o controle consistiu apenas em água destilada autoclavada isenta de regulador vegetal (0 M). As concentrações foram preparadas a partir da diluição seriada da solução estoque de 1 mM de AIA.

As sementes foram colocadas para germinar em dupla camada de papel germitest estéril umedecidos com 40 mL das respectivas soluções envolvidos em filme plástico por 4 dias em BOD à 30°C com ciclo de fotoperíodo ajustado para 12 h de luz. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 12 repetições. Ao final, as plântulas foram escaneadas para avaliação da morfologia radicular conforme descrito no item 3.7.2.

## **3.9 Análise Estatística**

Os dados foram analisados pelo software R (R CORE TEAM, 2019) e/ou SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010) quanto à normalidade (teste Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste Bartlett). Os diferentes parâmetros avaliados foram submetidos à testes de análise de variância (ANOVA), e havendo significância as médias foram comparadas através do teste LSD, com nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

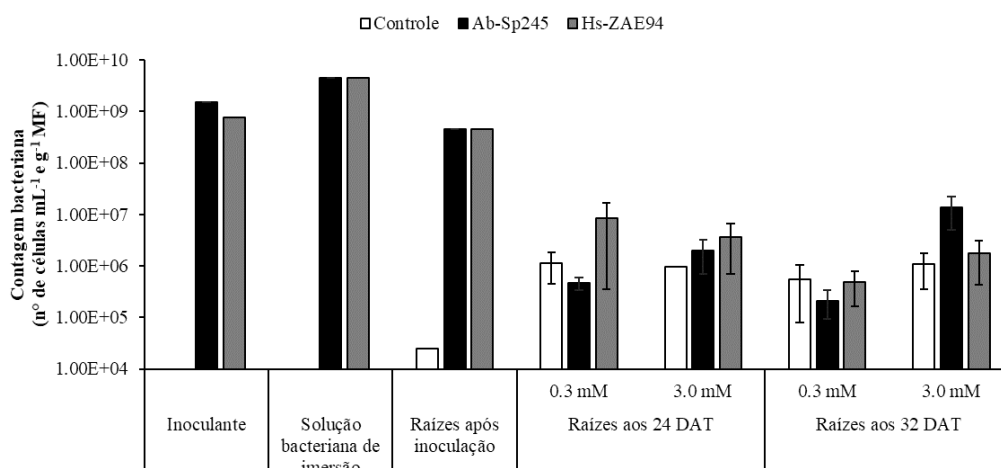
### 4.1 Modificações no Metabolismo de Nitrogênio em Plantas de Milho Inoculadas com Bactérias Diazotróficas Cultivadas em Doses Contrastantes de Nitrogênio: Experimento I

#### 4.1.1 Contagem de bactérias

A população inicial de ambos os inoculantes de Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 foi equalizado para  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  no dia da inoculação. Dois dias após a transferência das plântulas de milho inoculadas para as respectivas soluções de crescimento alto (3,0 mM) e baixo N (0,3 mM), as populações iniciais de ambas as estirpes bacterianas estavam semelhantes, independentemente do nível de N, em aproximadamente  $10^8$  células  $\text{g}^{-1}$  de massa fresca (MF) das raízes (Figura 8). Nesse momento, as plantas não inoculadas apresentaram uma população natural entorno de  $10^4$  células  $\text{g}^{-1}$  de MF de raiz. Haja visto, que a desinfestação superficial das sementes não impediu o estabelecimento desta população no tratamento não inoculado, uma vez que alguns diazotróficos, entre outros grupos bacterianos, são capazes de residir nos tecidos das sementes (KANDEL et al., 2017). Por esse motivo, a possibilidade de competição entre as populações carreadas pelas sementes e as estirpes inoculadas não pode ser desconsiderada.

Nesse sentido, observou-se uma redução na população das estirpes inoculadas em ambas datas de amostragem para as plantas que cresciam sob dose baixa de N. Aos 24 DAT nessa condição, a população de ambas as estirpes bacterianas diferiu sendo 10 vezes maior para Hs-ZAE94. As plantas referentes ao tratamento controle exibiram uma população similar a este, mesmo com desinfestação superficial das sementes com NaClO. A convergência de ambas as estirpes a um nível comum entre  $10^6$  e  $10^7$ , para Hs-ZAE94 e Ab-Sp245, respectivamente, aos 32 DAT na dose alta é indicativo de uma população microbiana limite em que o ambiente radicular pode sustentar, nessas condições. Apenas as plantas inoculadas com Ab-Sp245 no tratamento com dose alta de N mantiveram populações bacterianas ligeiramente superiores entorno de  $10^7$  células  $\text{g}^{-1}$  MF de raízes (Figura 8), isso sugere que a disponibilidade de N é um fator chave para a competência dessa estirpe no sistema radicular (VANBLEU e VANDERLEYDEN, 2007).

Em contraste com *A. baldaniorum*, que é capaz de colonizar tanto a rizosfera como as raízes da planta, a *H. seropedicae* é considerada um endófito obrigatório ou facultativo com taxas de sobrevivência muito baixas fora da planta (JAMES & OLIVARES, 1998). Isso pode indicar que a persistência do último seja dependente do genótipo da planta, conforme demonstrado por Alves et al. (2015) em diferentes genótipos de milho inoculados com Hs-ZAE94 em condição de campo.

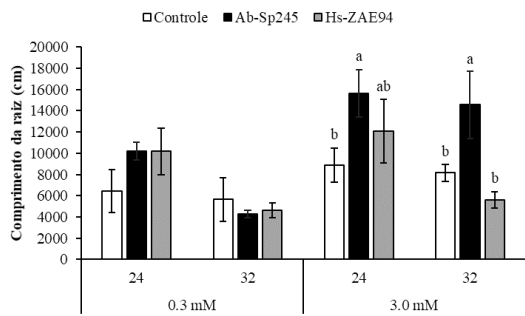


**Figura 8.** Contagem de bactérias pela técnica do Número Mais Provável (NMP) presente no inoculante, na solução (dia zero), após 48h em hidroponia e 24 e 32 dias após o transplante (DAT) (n = 4). NMP com os meios semi-sólido NFb e JNFb sem nitrogênio.

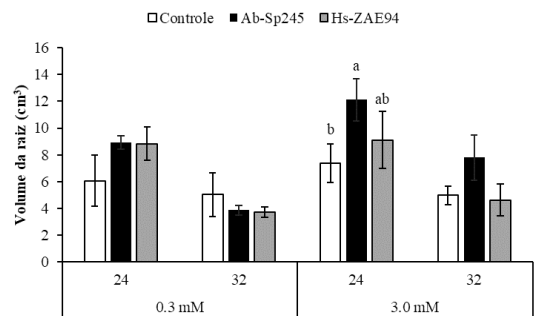
#### 4.1.2 Avaliação de parâmetros radiculares e biometria

A arquitetura das raízes foi avaliada através do software WinRHIZO Pro™ (Figura 9). As plantas inoculadas com Ab-Sp245 com suprimento de 3,0 mM N aumentaram vários parâmetros de crescimento radicular, como comprimento total da raiz, volume da raiz, número de pontas, bifurcações e cruzamentos, especialmente aos 32 DAT (Figuras 9a, b, c, d, e). O comprimento das raízes finas (0-1,5 mm), que são mais eficientes para a absorção de nutrientes, aumentou apenas na dose alta de N com a inoculação de Ab-Sp245 e o tratamento com Hs-ZAE94 aos 24 DAT teve um incremento, mas não diferiu do controle não inoculado (Figura 9g). Esse mesmo comportamento repetiu para os parâmetros comprimento, volume, nº de pontas e área superficial, mas não diferindo do controle. No tratamento com dose baixa de N, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados. Com base na avaliação destes parâmetros, a inoculação com Ab-Sp245 melhorou a arquitetura radicular, mas foi controlada pelo *status* de N da solução sendo verificado que o suprimento com 0,3 mM de N limitou essa promoção de crescimento.

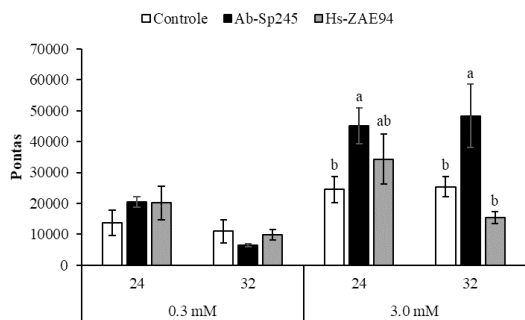
a) Comprimento de raiz



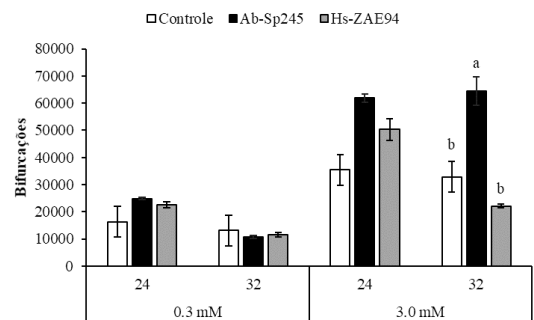
b) Volume de raiz



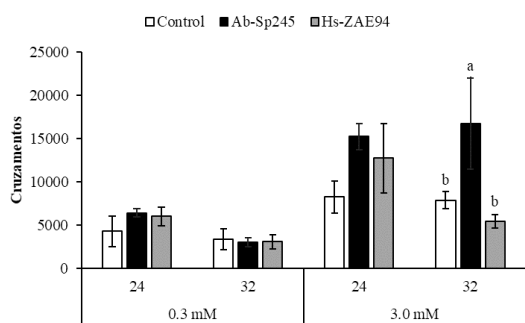
c) Número de pontas



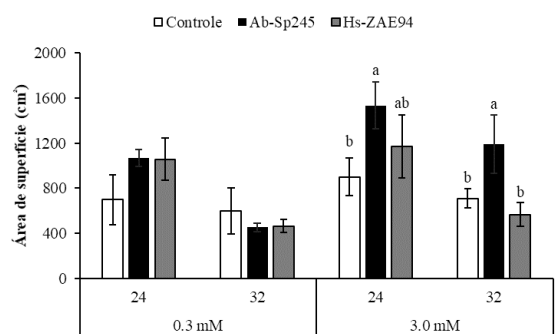
d) Número de bifurcações



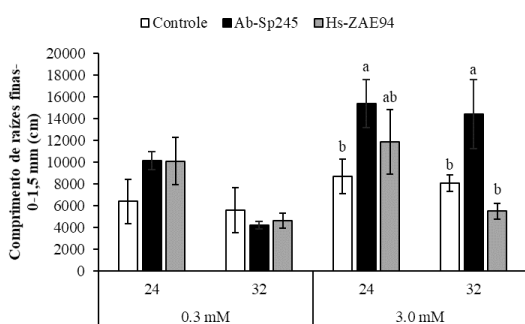
e) Número de cruzamentos



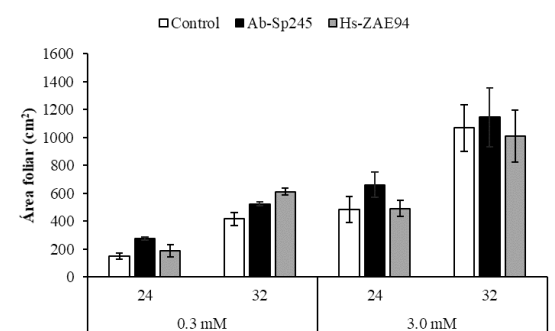
f) Área superficial



g) Comprimento de raízes finas 0-1,5 mm



h) Área foliar



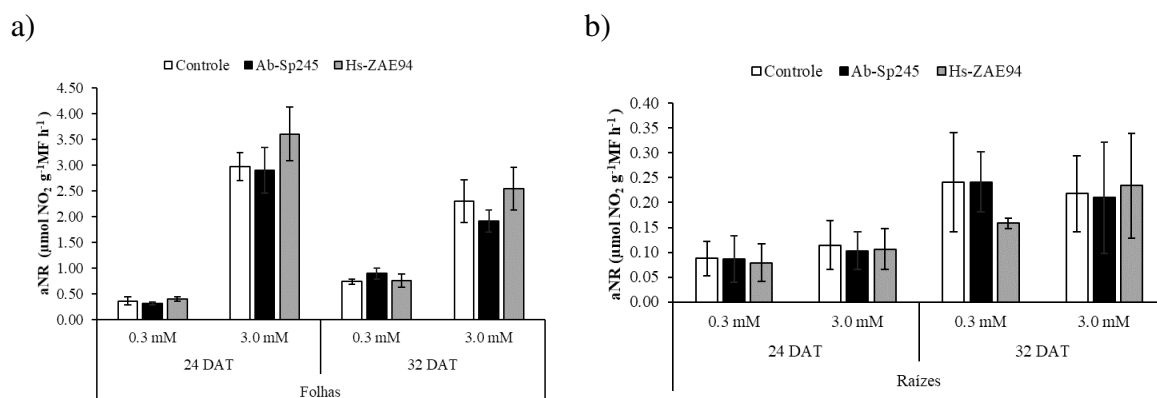
**Figura 9.** Parâmetros radiculares e biometria de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 avaliadas aos 24 e 32 DAT crescendo em dois níveis de N (0,3 e 3,0 mM). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições.

### 4.1.3 Atividades enzimáticas

#### a) aNR

A atividade da enzima nitrato redutase (aNR) foi medida antes da renovação da solução nutritiva, ou seja, no final do período de 3 dias em que ambas as fontes de N foram utilizadas e atingiram a concentração mínima (Figura 10). A aNR foi avaliada aos 24 e 32 DAT e a inoculação não alterou a atividade nos dois níveis de N testados (Figura 10a, b), embora seja possível observar um aumento de uma coleta para a outra, sendo este mais evidente nas raízes, e em ambas as condições de N. A aNR foi 10 vezes superior nas folhas em comparação com as raízes, independente da concentração de N fornecida (Figura 3a, b). Isso demonstra que a maior parte do  $\text{N-NO}_3^-$  após absorvido foi preferencialmente reduzido nas folhas, nessas condições. Estes resultados eram esperados, pois normalmente a atividade desta enzima é alta nas folhas, uma vez que são tecidos fotossintetizantes, e tem-se a formação de NADPH nos cloroplastos, aparentemente sendo este utilizado como poder redutor por algumas isoformas da enzima NR (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018).

Nas raízes também houve atividade desta enzima (Figura 10b), uma vez que há isoformas desta enzima que são ativas neste tecido, utilizando como poder redutor o NADH. Em geral, espécies nativas de regiões de clima temperado dependem mais intensamente da assimilação do nitrato pelas raízes do que espécies de regiões tropicais e subtropicais (TAIZ & ZEIGER, 2017).

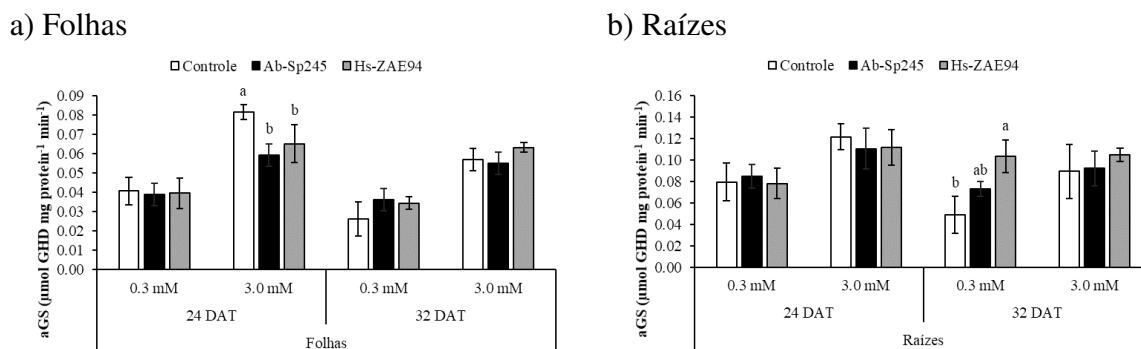


**Figura 10.** Atividade da enzima nitrato redutase de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 avaliadas aos 24 e 32 DAT crescendo em dois níveis de N (0,3 e 3,0 mM) e avaliadas antes da troca da solução nutritiva. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições.

#### b) aGS

A atividade da enzima glutamina sintetase (aGS) também foi medida antes da renovação da solução nutritiva, conforme descrito anteriormente para aNR. A aGS foi modificada pela inoculação, bem como com o nível de N e o tempo de coleta (Figura 11a, b). Aos 24 DAT, a inoculação com ambas as estirpes reduziu a aGS nas folhas das plantas em 3 mM de N (Figura 11a). Na coleta aos 32 DAT, oito dias depois e no tratamento com dose baixa de N, a inoculação com ambas as estirpes aumentaram a aGS nas raízes, embora o tratamento inoculado com Ab-Sp245 tenha sido semelhante ao controle não inoculado. Nessas condições, a inoculação com Hs-ZAE94 aumentou em 107% a aGS na raiz com relação ao controle, e as raízes exibiram maior atividade que a parte aérea, sendo 3 vezes superior nesta mesma coleta. Os níveis de N também aumentaram a aGS em ambos os órgãos da planta. Estes resultados corroboram com

os resultados de  $\text{NH}_4^+$  em ambos os tecidos (Figura 12c e d). Uma vez que a aGS tende a ser maior onde se encontram os maiores teores de  $\text{NH}_4^+$  para serem assimilados por ela. A GS apresenta duas isoformas, a GS1 presente no citosol e a GS2 presente nos plastídeos de raízes, cloroplastos e outros tecidos não fotossintéticos (SANTOS, 2009). Segundo Coruzzi et al. (2015), a GS1 citosólica está em altas concentrações nas raízes, mas em baixa nas folhas, indicando que essa enzima estaria catalisando a assimilação do amônio primário nas raízes. Ainda, segundo Santos (2009), em milho, foram observados cinco diferentes genes para GS1 expressos em raízes, e que houve diferenças na expressão dentro dos tecidos.



**Figura 11.** Atividade da enzima glutamina sintetase de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 avaliadas aos 24 e 32 DAT crescendo em dois níveis de N (0,3 e 3,0 mM) e avaliadas antes da troca da solução nutritiva. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.4 Análise de metabólitos solúveis

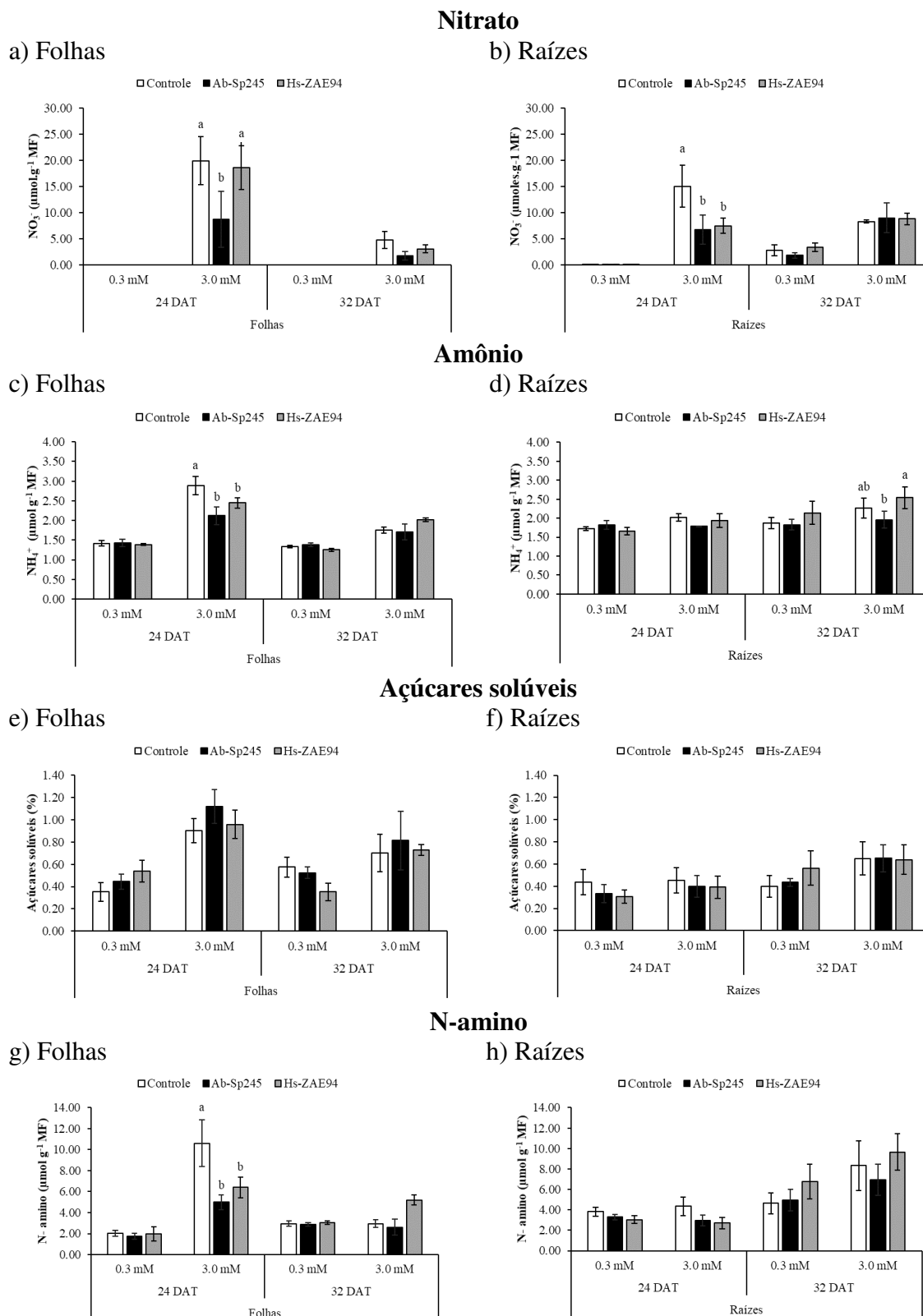
Os teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , N-amino e açúcares solúveis foram estimados nas plantas de milho em ambas as datas de amostragem. Analisando os diferentes compartimentos, folhas e raízes, observou-se que sob baixo nível de N não houve teores detectáveis de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas das plantas, independente do tratamento inoculação e da data de amostragem. Essa não detecção de  $\text{NO}_3^-$  reflete o intenso metabolismo das plantas, de tal forma, que o pouco desse nutriente que foi disponibilizado era rapidamente assimilado com o objetivo de manter todos os processos metabólicos necessários à sua sobrevivência, dados que corroboram com os menores teores de açúcares solúveis para o mesmo órgão (Figura 12a, b). Nas raízes, foi possível detectar concentrações de  $\text{NO}_3^-$  sendo essas superiores na coleta aos 32 DAT.

No tratamento com alto N, observa-se teores de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas próximos a  $20 \mu\text{moles g}^{-1}$  de MF para o controle e Hs-ZAE94, mas as plantas inoculadas com Ab-Sp245 reduziram o teor de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas em 56% aos 24 DAT (Figura 12a). Aos 32 DAT, ainda nas folhas, os teores de  $\text{NO}_3^-$  diminuíram para menos de  $5 \mu\text{moles g}^{-1}$  de MF, mas nenhuma diferença significativa para o tratamento inoculação foi observada. Nas raízes, ambas as estirpes reduziram o teor de nitrato em mais de 50% em comparação com o tratamento controle aos 24 DAT, mas não tiveram efeito 8 dias depois onde todos os tratamentos apresentaram aproximadamente  $8 \mu\text{moles g}^{-1}$  de MF (Figura 12b).

De maneira diferente ao observado para  $\text{NO}_3^-$ , o conteúdo de  $\text{NH}_4^+$  foi menos indicativo com relação ao nível de N na solução nutritiva, com efeito da inoculação observados apenas na dose alta de N (Figura 12c, d). No tratamento com dose alta de N, os teores de  $\text{NH}_4^+$  nas folhas foram menores aos 24 DAT quando as plantas foram inoculadas com qualquer uma das estirpes, embora menor aGS tenha sido observada para ambos os tratamentos e esse efeito tenha desaparecido aos 32 DAT. Além disso, os teores de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes não seguiu o mesmo

comportamento, sendo reduzido apenas na inoculação com Ab-Sp245 aos 32 DAT. As concentrações de  $\text{NH}_4^+$  detectadas nas folhas dos tratamentos que receberam dose baixa de N são resultados da redução do  $\text{NO}_3^-$  absorvido, uma vez que é identificada aNR juntamente com a ausência de  $\text{NO}_3^-$  neste tecido, indicando que o pouco de N fornecido foi prontamente absorvido e reduzido, para posteriormente ser assimilado.

Os açúcares solúveis nas folhas aos 24 DAT foram 2 vezes superiores no tratamento com alto N do que no tratamento com dose baixa de N, independente do tratamento de inoculação, mas essa diferença foi reduzida na coleta aos 32 DAT (Figura 12e). Enquanto, nas raízes os teores de açúcares foram entorno de 60% superiores nas raízes aos 32 DAT em relação a coleta aos 24 DAT para dose alta de N, essa disponibilidade refuta qualquer limitação de energia ou esqueleto de C nessas condições. De uma maneira geral, nas raízes houve pouca influência da suplementação nitrogenada assim como do tratamento inoculação que não proporcionou mudanças. Ademais, no baixo suprimento de N as plantas de milho exibiram um nível basal de 0,4% de açúcar solúvel, independentemente da parte da planta, dos tratamentos inoculados ou período de coleta (Figura 12f). Esses baixos teores de açúcares solúveis observados, de forma geral, sugerem o gasto de energia para as reações envolvidas na redução e incorporação do N absorvido em esqueletos de C, ou seja, o  $\text{NH}_4^+$  advindo da redução do  $\text{NO}_3^-$  ou absorvido de forma direta, através da atividade da GS é incorporado à uma molécula de glutamato, tendo como produto a glutamina (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018). Portanto, da mesma forma é o comportamento dos teores de N-amino (Figura 12g e h), uma vez que onde há intensa atividade da GS seus teores são superiores (Figura 11). De acordo com Santos et al. (2009), a redução nos teores de açúcares solúveis e o aumento dos de N-amino podem ser um indicativo de um maior processo de assimilação de N. Contudo, esta relação inversa entre açúcares solúveis e N-amino tem sido relatada em trabalhos com diferentes espécies de plantas e doses de N (BORGES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011).



**Figura 12.** Frações solúveis de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 24 e 32 DAT sob dois níveis de N (0,3 e 3,0 mM). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.5 Acúmulo de biomassa e nitrogênio total

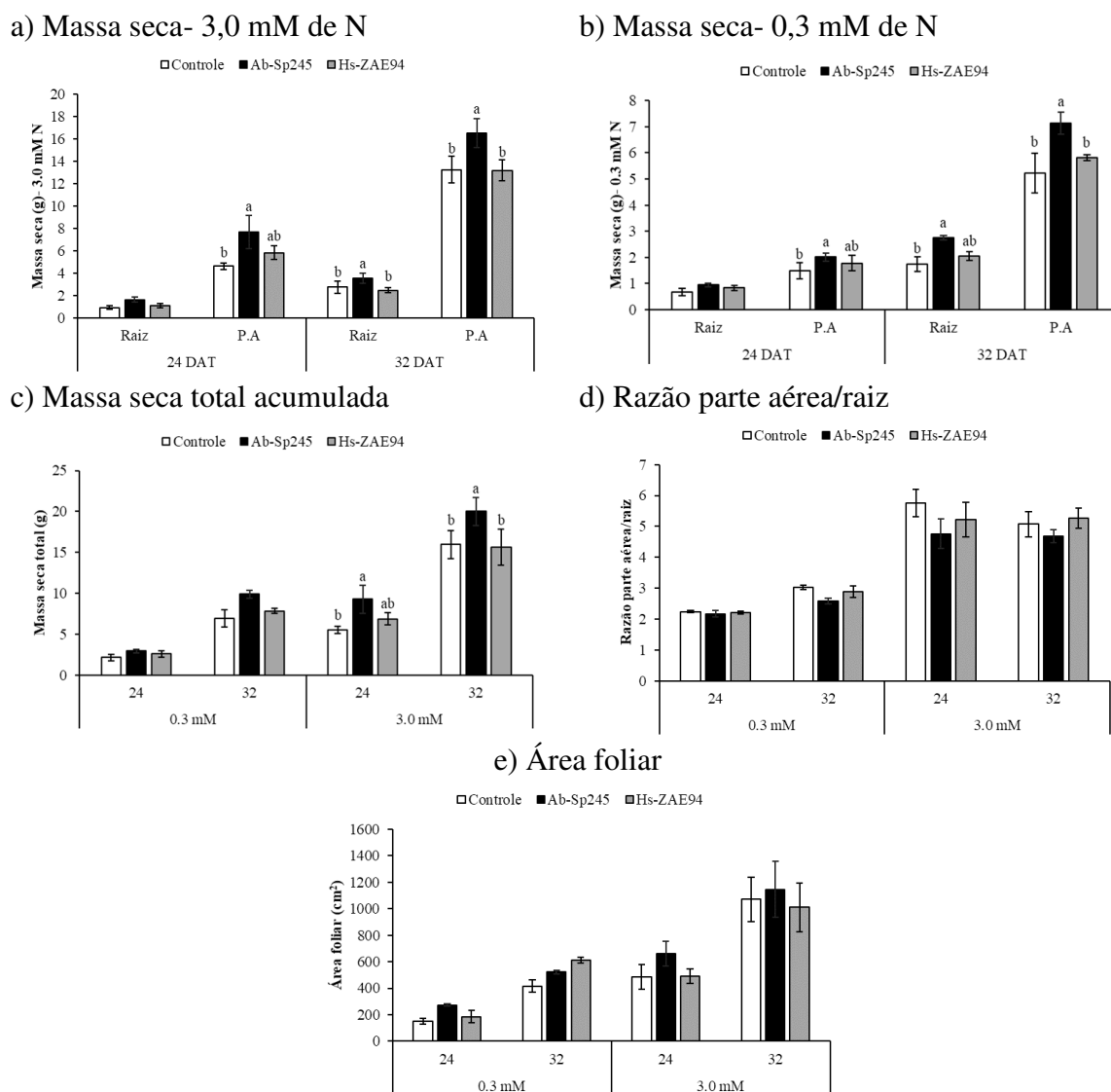
O crescimento das plantas de milho avaliadas aos 24 e 32 DAT e submetidas a alto e baixo suprimento de N, 3,0 e 0,3 mM, respectivamente, modificou o acúmulo de massa seca da parte aérea e raízes (Figura 13a e b). Foi possível observar que o acúmulo de massa seca nas plantas que cresceram sob dose alta de N foi o dobro quando comparado as plantas que cresceram em baixo N, com um efeito significativo da inoculação com Ab-Sp245 que se tornou ainda mais evidente na última coleta aos 32 DAT (Figura 13c). No entanto, quando os diferentes órgãos, parte aérea e raiz, foram analisados separadamente, o efeito da inoculação foi significativo para ambas as datas de amostragem. Aos 24 DAT a massa seca da parte aérea das plantas inoculadas com Ab-Sp245 foi superior a observada para o controle, mas semelhante das plantas inoculadas com Hs-ZAE94, independente da concentração de N disponível na solução de crescimento (Figura 13a e b). Porém, nessa mesma data de amostragem a inoculação não afetou a massa seca de raiz.

Aos 32 DAT, a parte aérea das plantas inoculadas com Ab-Sp245 atingiram uma média de 16,5 g de massa seca na dose alta de N, sendo este acúmulo 25% superior aos demais tratamentos, mantendo a promoção do crescimento observada 8 dias antes.

Por outro lado, sob baixo suprimento de N, as plantas inoculadas com Ab-Sp245 reduziram o acúmulo de massa seca da parte aérea em 57%, mas ainda assim melhorou em 36% em comparação com o controle não inoculado (Figura 13b), e novamente, o tratamento com Hs-ZAE94 não diferiu do controle. A massa seca da raiz também foi estimulada pela inoculação com Ab-Sp245, sendo 29 e 57% maior que o tratamento controle não inoculado sob alta e baixa dose de N, respectivamente, na coleta aos 32 DAT (Figura 13a e b). Isso posto, observa-se que no acúmulo de biomassa total, as plantas inoculadas com Ab-Sp245 foram superiores aos demais tratamento em ambas as coletas na dose alta de N, acúmulos que variaram de 25 a 68% quando comparado ao controle. Vale ressaltar, que na coleta aos 24 DAT mesmo Ab-Sp245 tendo acumulando 35% a mais de biomassa que Hs-ZAE94, eles não diferiram significativamente (Figura 13c).

A razão parte aérea/raiz não mudou nas diferentes datas de amostragem, ou seja, de 24 para 32 DAT, mas aumentou com o nível de N da solução nutritiva (Figura 13d). Essa relação foi maior na dose alta de N, quando as plantas investiram 5 vezes mais em emissão de parte aérea do que raízes, independentemente do tratamento. Já na dose baixa de N, a redução da razão parte aérea/raiz está relacionada ao redirecionamento de fotoassimilados para o alongamento das raízes em busca de N, sendo esta uma resposta típica de plantas de milho submetidas ao baixo suprimento de N (MI et al., 2010; FORDE, 2014). Nessas condições, as raízes representaram 30% da massa seca da planta, um percentual que reduziu pela metade no tratamento com dose alta de N. A área foliar também não foi alterada pela inoculação, somente é possível observar a diferença entre as doses de N, sendo superior na dose alta, e incrementos de uma coleta para outra (Figura 13e).





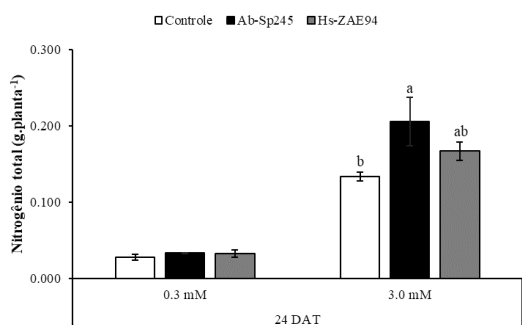
**Figura 13.** Acúmulo de massa seca de parte aérea (a), raiz (b), massa seca total (c), relação parte aérea / raiz (d), e área foliar (e) de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 crescida a 3,0 e 0,3 mM de N. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Com base nas fontes de N aplicadas e no crescimento das plantas, foi calculado o N total acumulado em cada período de coleta e a eficiência do uso de nitrogênio (EUN) (Figura 14). Comparando os dois períodos de medição (24 e 32 DAT), as plantas acumularam N em alto suprimento (3,0 mM de N) conforme o esperado e aumentaram o N total, atingindo 3 vezes mais N num período de 8 dias (Figura 14a e b). Em baixos níveis de N, essa acumulação foi relativamente maior, sendo 3,8 vezes superior em 32 DAT em comparação aos 24 DAT. Aos 24 DAT o acúmulo de N pelas plantas cultivadas na dose baixa de N não foi modificado pela inoculação, em contrapartida na dose alta de N as plantas inoculadas com Ab-Sp245 acumularam 54% a mais de N que o tratamento controle. Aos 32 DAT, esse comportamento continua na dose alta com um incremento de 33% com Ab-Sp245 em comparação ao controle, embora sem diferença significativa (Figura 14b).

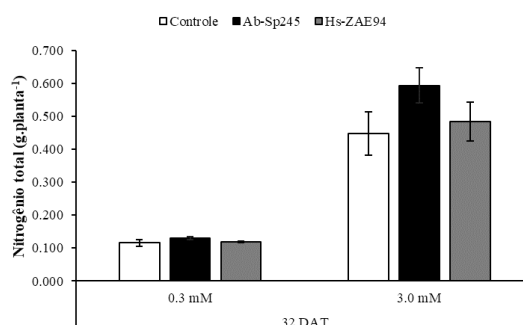
A EUN foi mais alta em níveis baixos de N, uma vez que as plantas tentaram utilizar o N disponível, produzindo o máximo de massa seca com a quantidade utilizada (Figura 14c e d).

Nota-se que não foi encontrada diferenças entre os tratamentos na EUN aos 24 DAT, em nenhuma dose de N, mas é possível observar que as plantas sob dose baixa apresentaram um EUN acima de 30, enquanto aproximadamente metade deste valor foi estimado para as plantas que cresceram sob dose alta de N. Aos 32 DAT a tendência era a mesma, mas a EUN estava próxima de 50 para as plantas do tratamento controle e 30% a mais para as plantas inoculadas com Ab-Sp245, que foi superior aos demais tratamentos, sugerindo uma possível contribuição da FBN. No tratamento com dose alta de N, a EUN foi de aproximadamente 15, sem nenhuma diferença estatística entre os tratamentos.

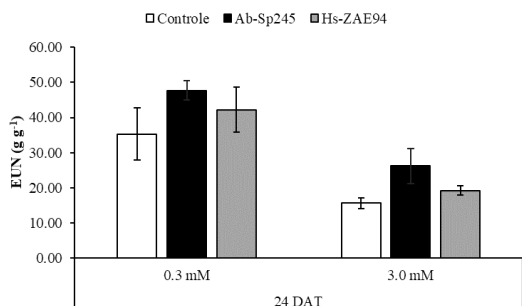
a) N Total aos 24 DAT



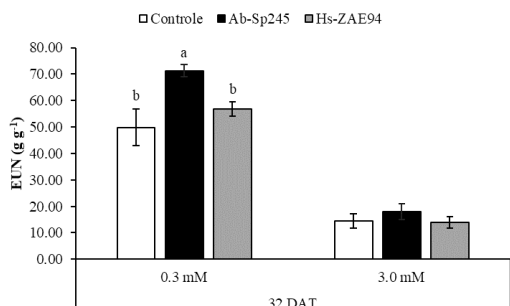
b) N Total aos 32 DAT



c) EUN aos 24 DAT



d) EUN aos 32 DAT



**Figura 14.** Nitrogênio total acumulado de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 24 (a) e 32 (b) DAT e eficiência de uso de nitrogênio (EUN) aos 24 (c) e 32 (d) DAT. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.6 Monitoramento dos níveis de nitrogênio da solução nutritiva

As medições de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  foram realizadas diariamente na solução e a depleção de ambos os íons foram plotadas durante três dias após a troca da solução (Figura 15). A média diária para o período experimental revelou uma rápida absorção de  $\text{NH}_4^+$  pelas plantas, com concentrações na solução nutritiva reduzida para  $<0,2 \text{ mg L}^{-1}$  após 72 h para ambos os níveis de N (Figura 15a e b). Na dose alta de N e após 24 h, as plantas inoculadas com Ab-Sp245 apresentaram as menores concentrações de  $\text{NH}_4^+$  em comparação com Hs-ZAE94, mas semelhante ao controle e não foram observadas diferenças significativas para as horas amostradas adiante (Figura 15a). Já na dose baixa de N, as plantas inoculadas com essa mesma estirpe também reduziram mais  $\text{NH}_4^+$  após 48 h, em comparação com demais tratamentos (Figura 15b).

As concentrações iniciais de  $\text{NO}_3^-$  foram 5 vezes maiores que a de  $\text{NH}_4^+$  para ambas as soluções de crescimento, e observa-se que a absorção é prioritariamente de  $\text{NH}_4^+$  e ao passo que este diminui e se torna menos disponível a absorção de  $\text{NO}_3^-$  aumenta (Figura 15c e d). Na

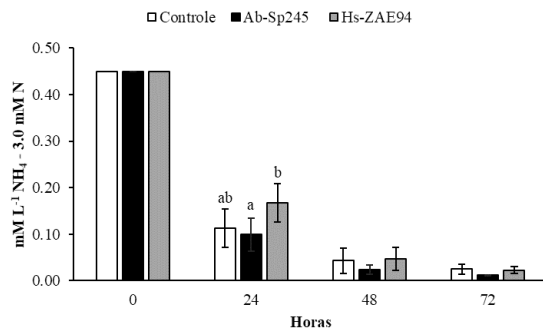
dose alta de N, o  $\text{NO}_3^-$  reduziu de forma linear e após 72 h, as plantas inoculadas com Ab-Sp245 absorveram mais  $\text{NO}_3^-$  do que o Hs-ZAE94 (Figura 15c) e produziram mais massa seca (Figura 13) como consequência das modificações observadas na arquitetura de raiz (Figura 9). Já na dose baixa de N, o efeito da inoculação foi observado após 48 h, onde as plantas inoculadas com ambas as estirpes absorveram mais rapidamente  $\text{NO}_3^-$  da solução nutritiva, sendo 55 e 41% a menos  $\text{NO}_3^-$  para Ab-Sp245 e Hs-ZAE94, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 15d).

A influência da inoculação com Ab-Sp245 no aumento da absorção de N pelas plantas está provavelmente relacionada ao seu efeito promotor de aumentar a área de superfície radicular. Sob tais condições, a contribuição significativa através da FBN para as plantas era pouco provável, uma vez que as concentrações remanescentes de N era relativamente alta, > 1 mM de  $\text{NO}_3^-$  na dose alta após 72 h. É conhecido que a alta disponibilidade de N como  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  pode ser prejudicial para a fixação de  $\text{N}_2$ , especialmente no caso da *A. brasilense* e *H. seropedicae* que regulam negativamente a nitrogenase através de mecanismos específicos, como o aumento nos níveis de glutamina (SMERCINA et al., 2019). Enquanto, que na solução com dose baixa de N, a contribuição da FBN seria mais provável de ocorrer, inclusive, o aumento na aGS quando as plantas foram inoculadas principalmente com Hs-ZAE94 na dose baixa, possa sugerir uma contribuição por essa via, embora tenha ocorrido menor acúmulo de N e a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos, apontando que esse processo teria relativamente menor importância.

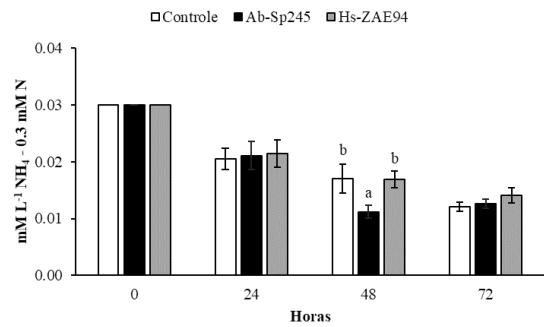
De acordo com Pii et al. (2019), a inoculação com *Azospirillum* regulou negativamente os HATS e como consequência houve uma redução na absorção  $\text{NO}_3^-$ , mas que não houve comprometimento no teor de N nas plantas, que provavelmente deve ter sido compensado pela FBN. Embora a FBN possa de fato suplementar N e contribuir para seu acúmulo nas plantas, foi observado durante a análise de depleção uma maior absorção de  $\text{NO}_3^-$  em função da inoculação, na solução com baixo N, sugerindo então uma regulação positiva dos HATS pela inoculação com ambas as estirpes.

## Amônio na solução nutritiva

a) 3,0 mM de N

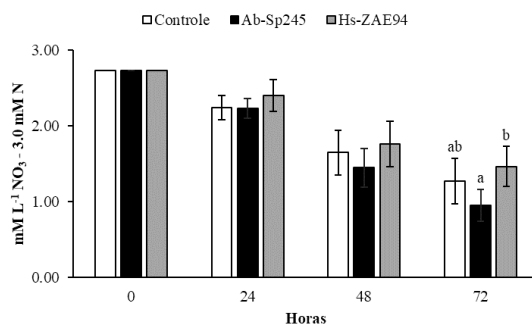


b) 0,3 mM de N

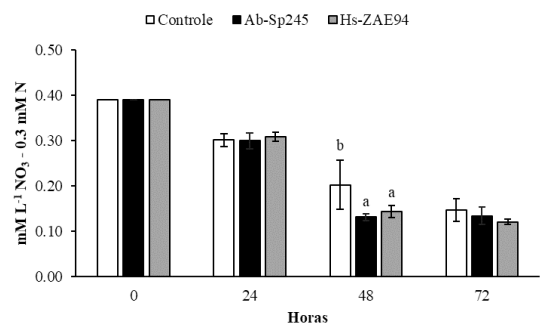


## Nitrato na solução nutritiva

c) 3,0 mM de N



d) 0,3 mM de N

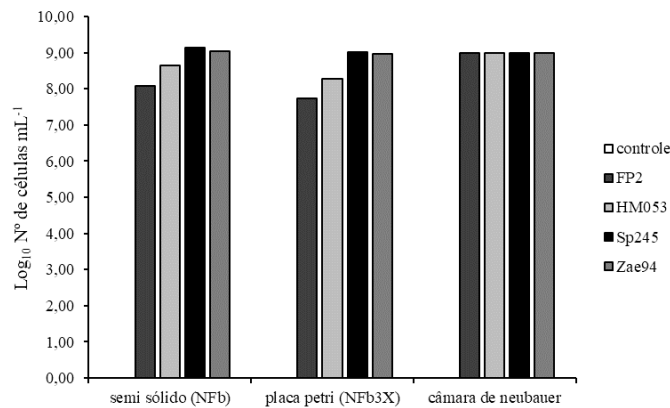


**Figura 15.** Análise da depleção de amônio e nitrato na solução nutritiva durante 72 h (n = 4), o pH da solução foi corrigido todos os dias para 5,8. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas (p < 0,05).

## 4.2 Avaliação da Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Plantas de Milho Cultivadas sob Doses Contrastantes de Nitrogênio: Experimento II

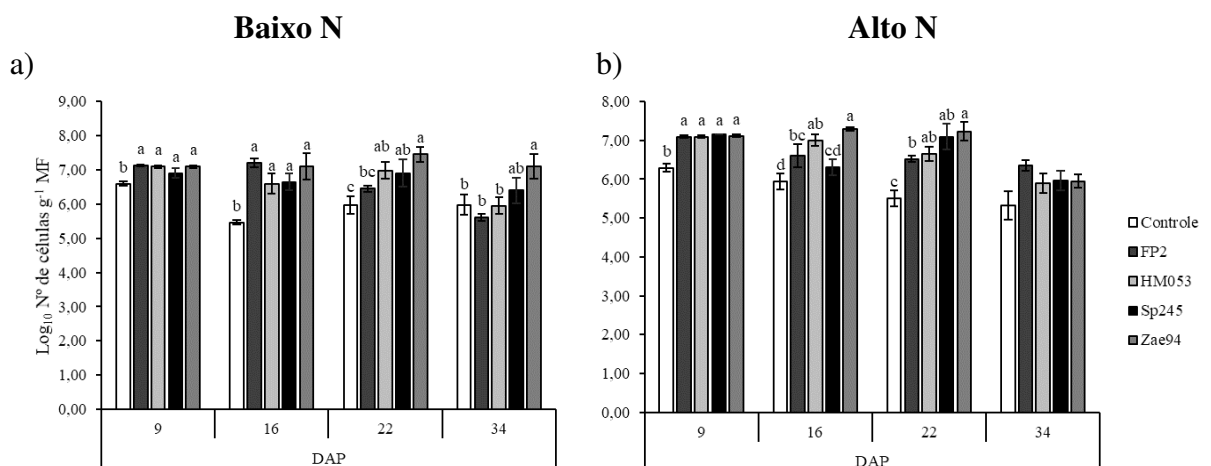
### 4.2.1 Contagem de bactérias

Os inoculantes dos tratamentos de inoculação (FP2, HM053, Sp245 e Zae94) estavam acima de 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup> em todas as metodologias utilizadas para contagem. Não foi observada presença de bactérias diazotróficas na solução utilizada no tratamento controle (Figura 16). A contagem foi realizada por diferentes metodologias, em meio semi-sólido NFb através do NMP, em placas de Petri com meio sólido NFb3x e em câmara de Neubauer.



**Figura 16.** Log<sub>10</sub> do número de células mL<sup>-1</sup> no inoculante nos tratamentos controle, FP2, HM053, SP245 e Zae94.

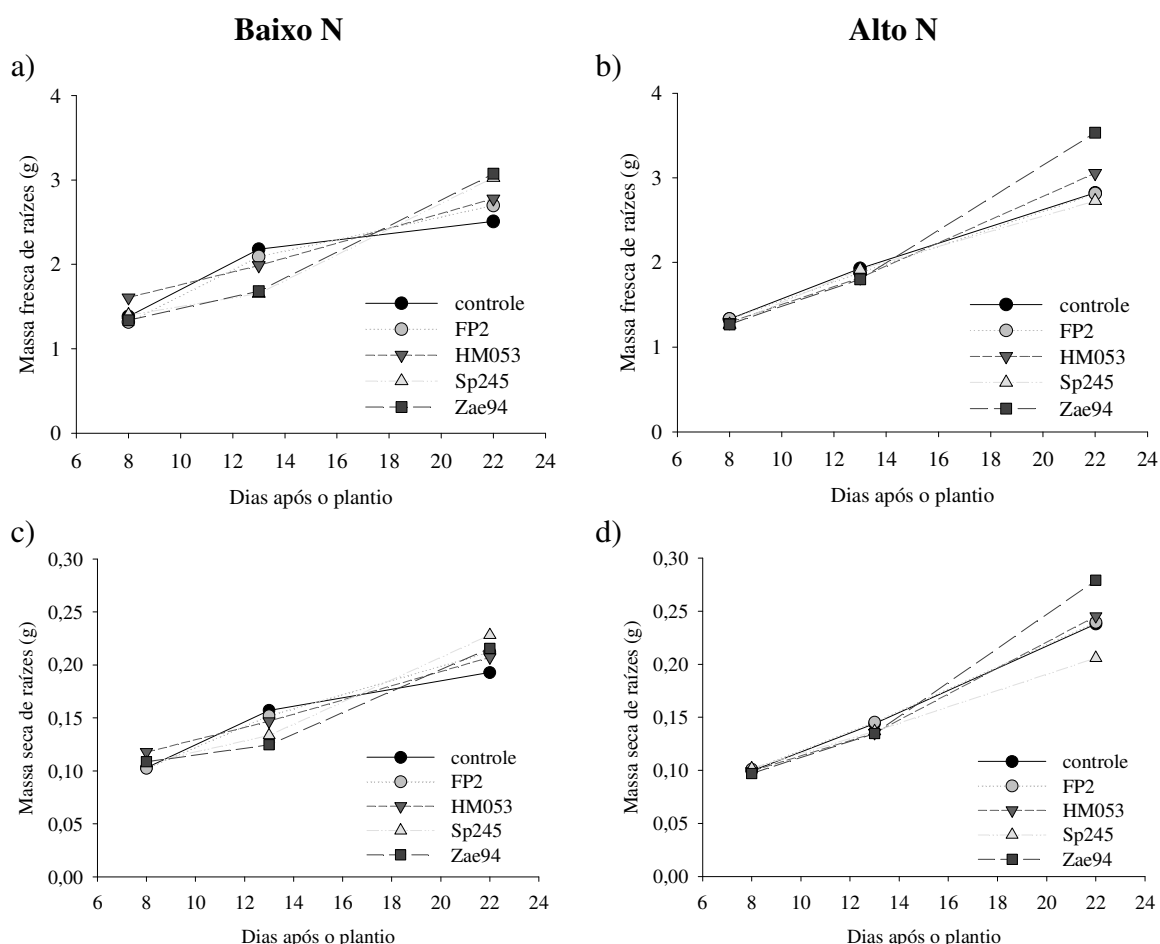
Após a inoculação, observou-se que as estirpes inoculadas permaneceram nas raízes das plantas de milho com populações superiores ao tratamento controle tanto nos tratamentos com baixo quanto alto suprimento de N, conforme observado na Figura 17 (a e b). Somente na dose baixa de N e na última coleta aos 34 DAP as plantas inoculadas com a estirpe Ab-FP2 reduziram a população bacteriana na ordem de 100 vezes quando comparado ao tratamento com Hs-ZAE94 que apresentava neste momento a maior população bacteriana quando comparada aos demais tratamentos. Esse comportamento pode ser explicado pela diferença de competência de estabelecimento das diferentes espécies de bactérias diazotróficas, quando *H. seropedicae* é considerado um endófito obrigatório ou facultativo com taxas de sobrevivência muito baixas fora da planta (JAMES & OLIVARES, 1998), indicando que sua persistência é dependente do genótipo e das condições de cultivo e em contraste a *A. brasilense* é capaz de colonizar tanto os tecidos internos quanto a rizosfera. Faleiro et al. (2013) cultivaram plantas de milho *in vitro* inoculadas com Ab-FP2 e avaliaram a colonização das raízes através da contagem padrão em placas com meio NFb na presença de antibiótico (10 µg mL<sup>-1</sup>), uma população de 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> MF de raiz foi encontrada aos 4, 7 e 10 dias após a inoculação e não sendo detectada nas raízes das plantas controle.



**Figura 17.** Log<sub>10</sub> do número de células g<sup>-1</sup> de raízes de milho em baixa (a) e alta (b) concentração de N dos tratamentos controle, FP2, HM053, Sp245 e Zae94 aos 9, 16, 22 e 34 dias após o plantio (DAP).

#### 4.2.2 Biomassa fresca e seca

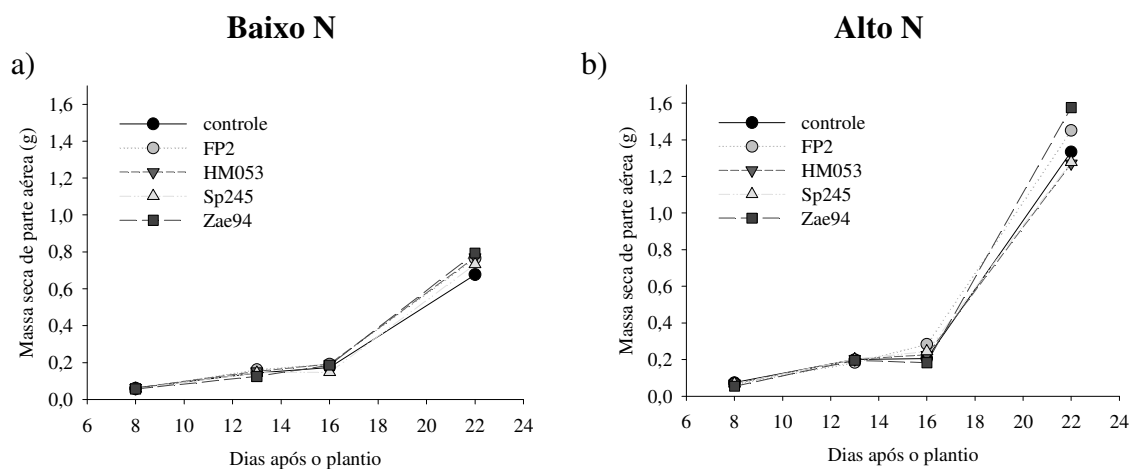
No peso fresco e seco de raízes não houve diferença entre os tratamentos inoculados apenas verificou-se o ajuste da função linear para todos os tratamentos (Figura 18). No entanto, pode-se observar que na dose alta de N e na última coleta os tratamentos começam a se separar assim como observado nos parâmetros radiculares (item 4.2.3), indicando que em coletas posteriores poderiam apresentar diferenças significativas.



**Figura 18.** Massa fresca e seca (g) de raízes dos tratamentos controle, FP2, HM053, Sp245 e Zae94 aos 8,13 e 22 dias após o plantio sob solução com baixo (a e c) e alto N (b e d).

Conforme observado, as plantas inoculadas com *H. seropedicae* ZAE94 apresentaram uma tendência de maior acúmulo de biomassa na coleta aos 22 DAP na dose alta de N, podendo este ser reflexo dos resultados obtidos nos parâmetros radiculares, onde as plantas inoculadas com esta estirpe destacaram-se sendo sempre diferente do controle não inoculado nos parâmetros avaliados (Figura 20 e 21). Diferente dos resultados relatados aqui, em condições de cultivo axênico de plantas de trigo, a estirpe HM053 de *A. brasilense* foi capaz de aumentar em 30 e 49% a massa seca da parte aérea e da raiz, respectivamente, quando comparada com plantas não inoculadas e em 30 e 31% quando comparada com a estirpe parental FP2 (SANTOS et al., 2017). Ademais, Pankiewicz et al. (2015) demonstraram que essa mesma estirpe em condições também axênicas em *Setaria viridis* levou a incorporação de 16 vezes mais N do que a mistura das estirpes tipo selvagem de *A. brasilense* e *H. seropedicae* testadas. Faleiro et al. (2015) avaliaram a inoculação da estirpe FP2 de *A. brasilense* em plantas de milho em

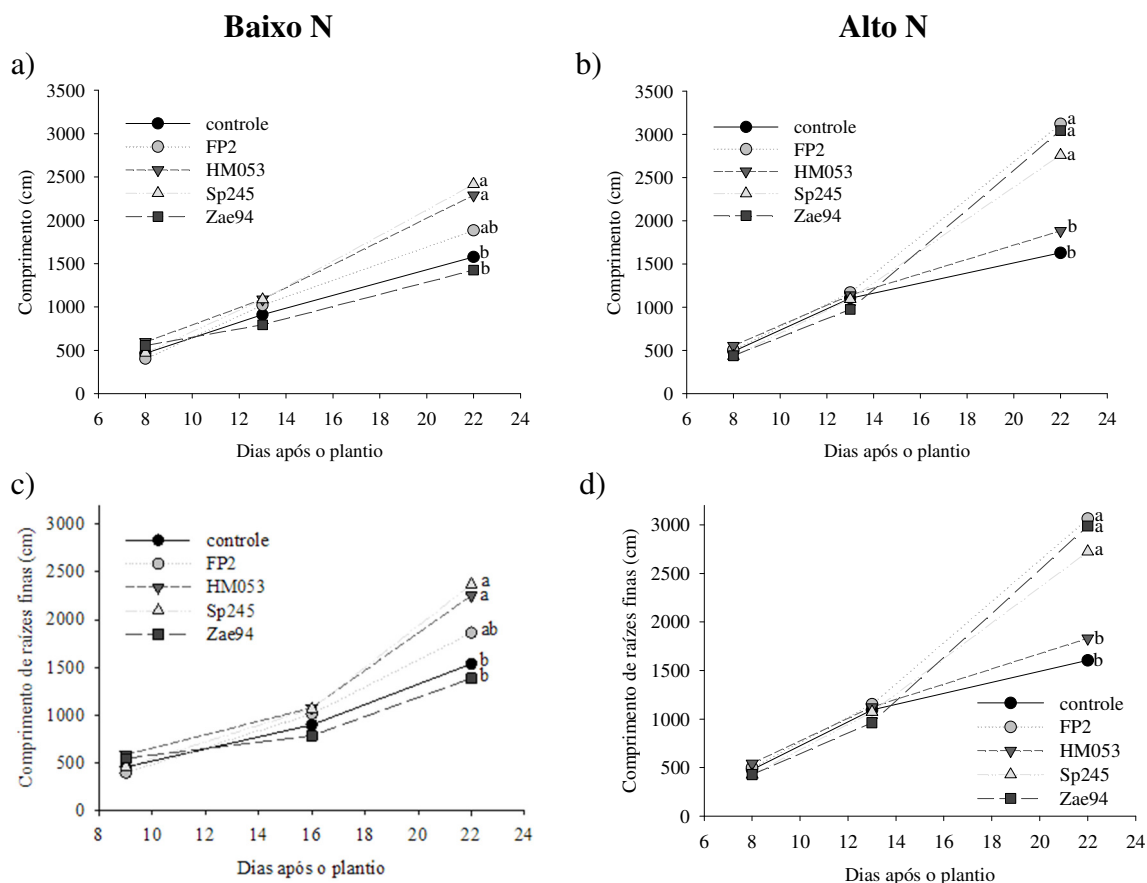
condições axênicas e verificaram que a inoculação proporcionou aumento na massa fresca das folhas e das raízes aos 7 dias após a inoculação.



**Figura 19.** Massa seca (g) da parte aérea das plantas dos tratamentos controle, FP2, HM053, Sp245 e Zae94 aos 8,13, 16 e 22 dias após o plantio sob solução com baixo (a) e alto N (b).

#### 4.2.3 Avaliação dos parâmetros radiculares

Na análise das variáveis associadas à morfologia de raízes o fator coleta ajustou-se a função linear indicando que as plantas ainda estavam crescendo durante as coletas realizadas. Foi observado diferença significativa entre as plantas submetidas às diferentes doses de N. Entre os tratamentos de inoculação foram observadas diferenças significativas em praticamente todas as variáveis, mas estas diferenças estão associadas a última coleta (22 DAP) e em grande parte na alta dose de N (Figuras 20, 21 e 22).



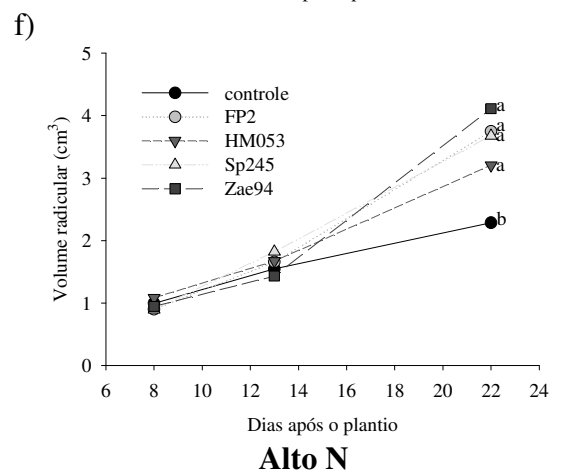
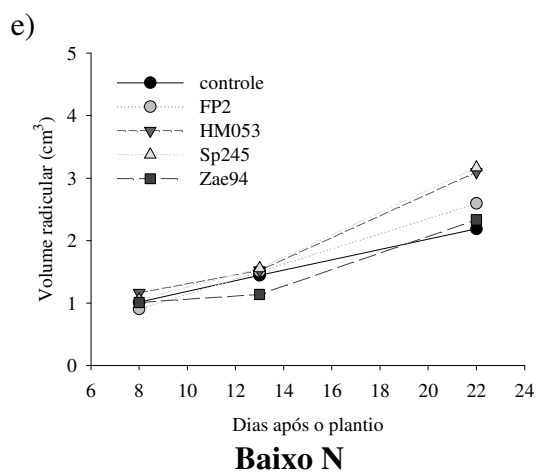
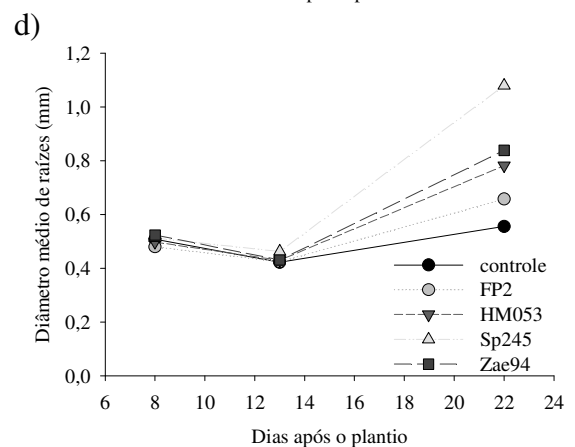
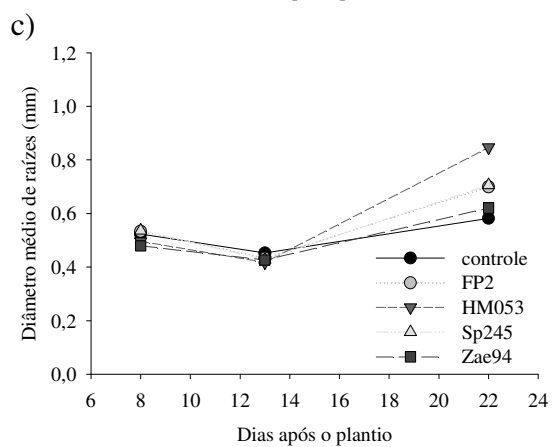
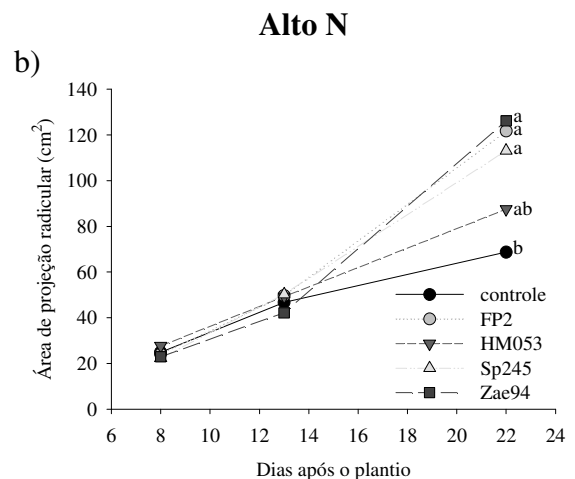
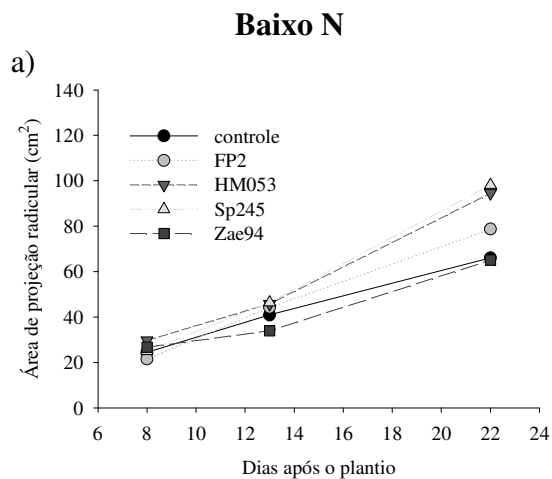
**Figura 20.** Comprimento (cm) de todas as raízes (a e b) e comprimento das raízes finas (c e d) dos tratamentos controle, FP2, HM053, Sp245 e Zae94 aos 8, 13 e 22 dias após o plantio sob solução com baixo N (a e c) e alto N (b e d).

Conforme supracitado, para todos os parâmetros analisados na dose alta de N e na coleta aos 22 DAP o tratamento controle diferiu dos demais apresentando as menores médias. Dentre alguns parâmetros como comprimento de raízes (total e finas) (Figura 20b e d), área de projeção radicular (Figura 21b) e número de pontas (Figura 21h) a estirpe de *A. brasilense* HM053 diferiu dos demais tratamentos inoculados ficando igual ao tratamento controle. Ademais, na dose baixa de N alguns parâmetros não apresentaram diferença na coleta aos 22 DAP como área de projeção, diâmetro e volume (Figura 21a, c, e), porém nos demais parâmetros avaliados o tratamento controle e os inoculados com as estirpes de *H. seropedicae* ZAE94 e *A. brasilense* FP2 não diferiram entre si e apresentaram as menores médias.

Camílios-Neto et al. (2014) observaram a inoculação de Ab-FP2 em plantas de trigo e a inoculação proporcionou incrementos de 30 e 25% na massa seca de raiz e massa seca total, respectivamente, quando comparada com as plantas controle. Stets et al. (2015) também observaram que plantas de trigo inoculadas com Ab-FP2 e cultivadas *in vitro* aumentaram a massa fresca de raiz e da parte aérea durante 13 dias de avaliação. Já em plantas de milho inoculadas com essa mesma estirpe e cultivadas também *in vitro* o número de raízes laterais e o comprimento da raiz principal aumentam 7 e 10 dias após a inoculação (FALEIRO et al., 2015).

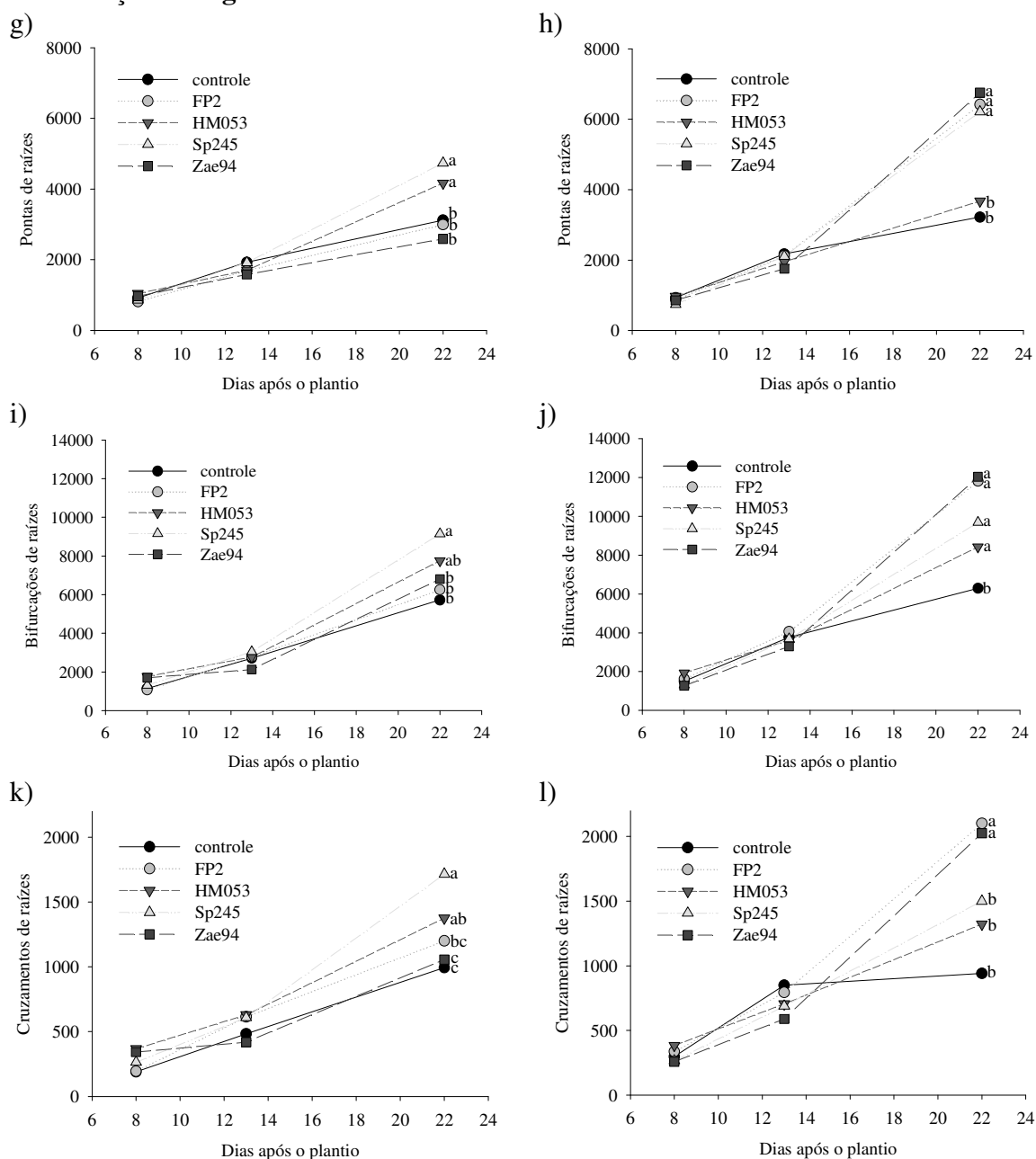
Em contrapartida a estirpe de *A. brasilense* HM053 que apresentou os resultados mais discretos na dose alta de N se destacou juntamente com o tratamento *A. baldaniorum* Sp245 na dose baixa de N apresentando as maiores médias para os parâmetros avaliados.





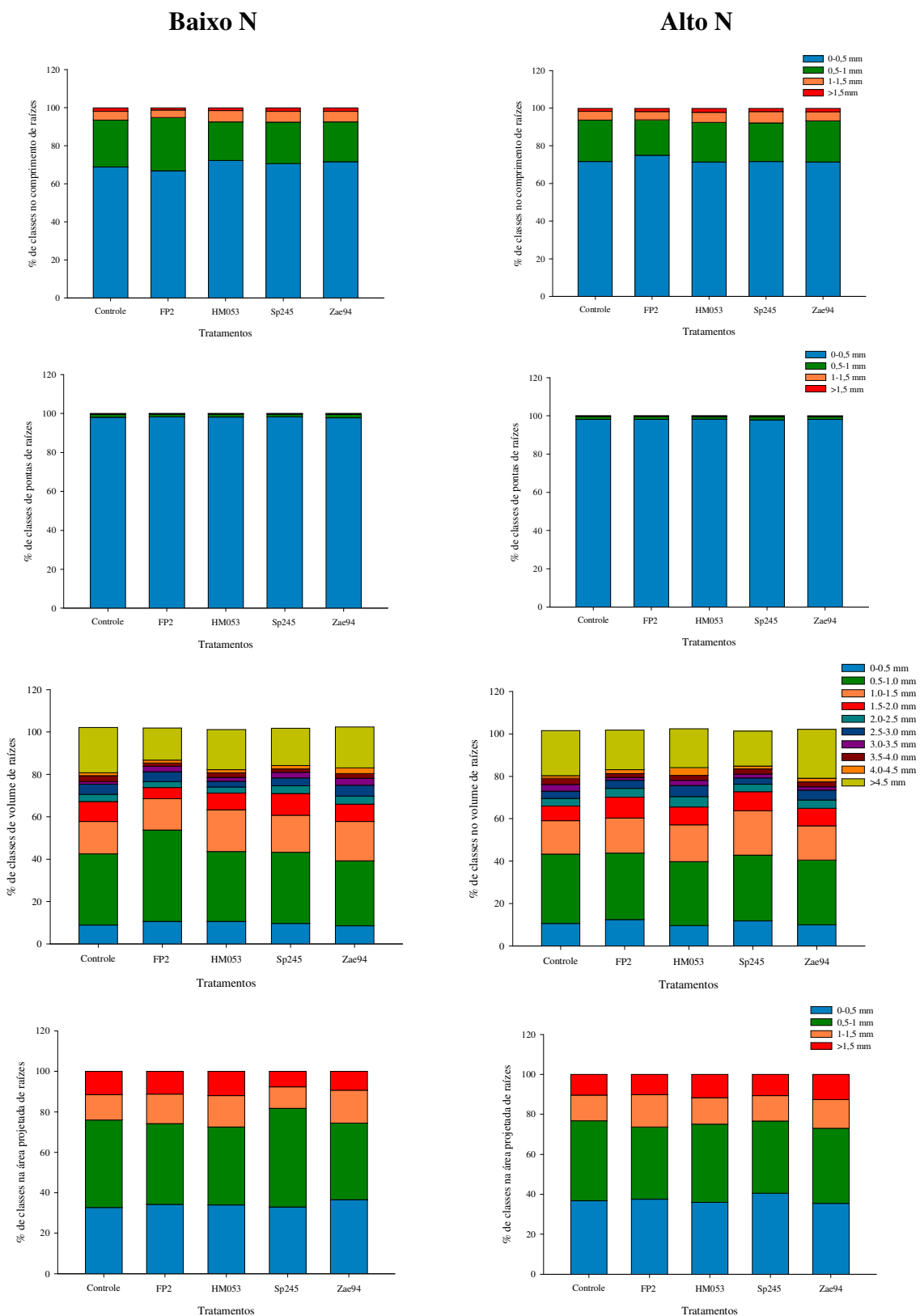
Continua na próxima página a **Figura 21...**

Continuação da **Figura 21.**



**Figura 21.** Projeção de área radicular ( $\text{cm}^2$ ) (a; b), diâmetro médio (mm) (c; d), volume de raízes ( $\text{cm}^3$ ) (e; f), pontas (g; h), bifurcações (i; j) e cruzamentos de raízes (k; l) dos tratamentos controle, FP2, HM053, Sp245 e Zae94 aos 8, 13 e 22 dias após o plantio sob solução com baixo (a, c, e, g, i, k) e alto N (b, d, f, h, j, l).

Foi realizada a avaliação das variáveis de morfologia de raiz por classes, referente somente a última coleta (22 DAP), ou seja, onde diferenças significativas foram encontradas (Figura 22). Pode-se observar que a classe de raízes que mais contribuiu para o comprimento total e número de pontas foram as que estão classificadas entre 0-0,5 mm, enquanto que para o volume radicular são aquelas inseridas entre 0,5-1,0 mm. Na área de projeção as maiores contribuições ficaram divididas entre as classes que incluem raízes de 0-1,0 mm. De maneira geral, houve um equilíbrio entre os diferentes diâmetros de raiz em todos os parâmetros observados nas duas doses de N.

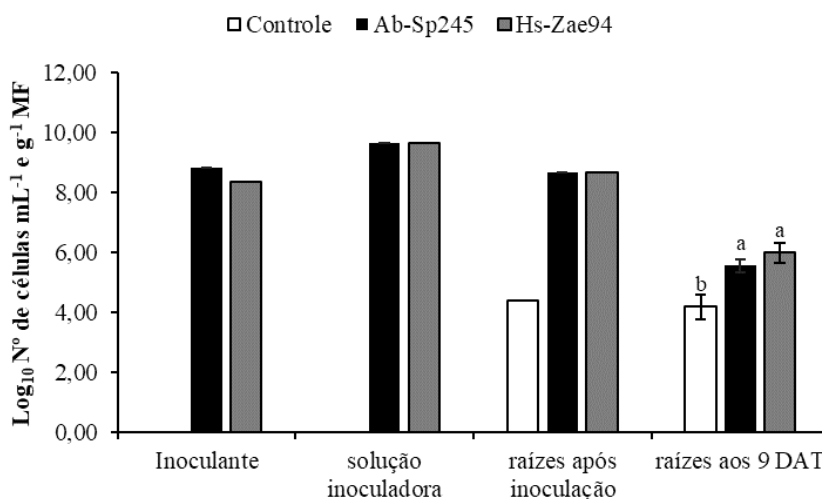


**Figura 22.** Porcentagem de distribuição de comprimento, pontas, volume e área projetada em classes de diâmetro de raiz no experimento em substrato aos 22 DAP.

### 4.3 Avaliação da Depleção de Nitrogênio na Solução Nutritiva em Plantas de Milho Inoculadas com Diferentes Bactérias Diazotróficas: Experimento III

#### 4.3.1 Contagem de bactérias diazotróficas

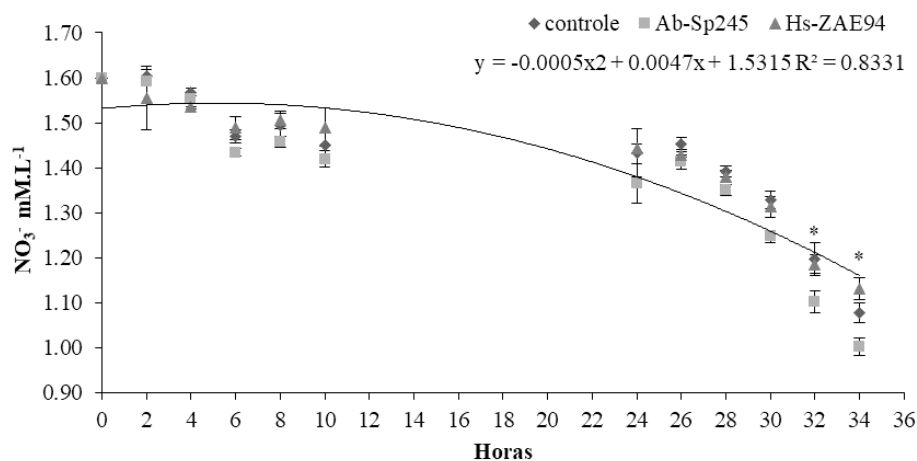
Os inoculantes dos tratamentos com *A. baldaniorum* (Ab-Sp245) e *H. seropedicae* (Hs-ZAE94) estavam em  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  e não foi observado crescimento positivo de bactérias diazotróficas na solução do tratamento controle. Na solução inoculadora e nas raízes imediatamente após a inoculação, a população era 9,65 e 8,65  $\log_{10}$  n° de células  $\text{mL}^{-1}$  e  $\text{g}^{-1}$  massa fresca, respectivamente, isso para ambas as estirpes utilizadas, comprovando a eficácia do estabelecimento do tratamento. Ainda, é possível observar que no tratamento controle as plantas apresentaram uma população natural de 4,40  $\log_{10}$  n° de células  $\text{g}^{-1}$  massa fresca. Aos 09 dias após o transplante (DAT) houve uma equalização das populações das plantas que receberam inoculação, porém continuaram superiores ao tratamento controle na ordem de 10 e 100 vezes para os tratamentos com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94, respectivamente (Figura 23).



**Figura 23.** Contagem de bactérias pela técnica do Número Mais Provável presente no inoculante, na solução inoculadora, nas raízes após a inoculação e aos nove dias após o transplante (DAT) (n = 3). NMP com meio semi-sólido NFb sem nitrogênio.

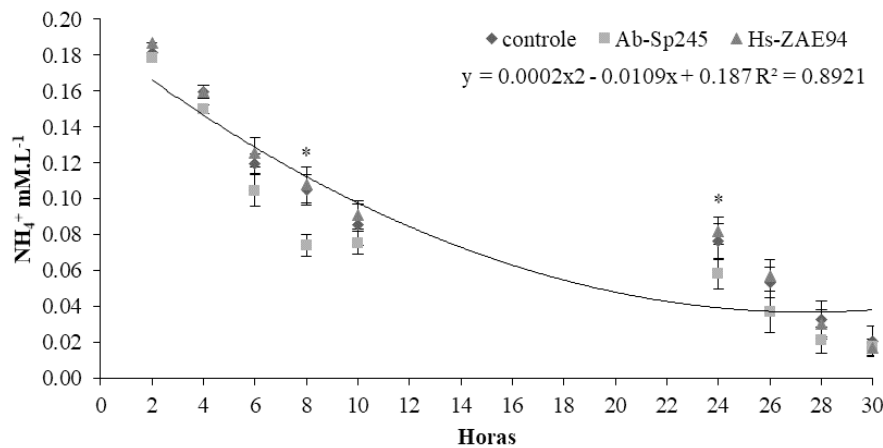
#### 4.3.2 Monitoramento da depleção de nitrogênio na solução nutritiva

As concentrações de  $\text{NO}_3^-$  diminuíram ajustando-se a função quadrática para todos os tratamentos avaliados. O período representado no gráfico sem pontos de avaliação é o noturno, entre 18 e 8 h, onde é possível observar que praticamente não houve redução de  $\text{NO}_3^-$ . As maiores reduções das concentrações são no período diurno, visto que a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  é regulada por diversos fatores entre eles a fotossíntese, pois de acordo com Rubio-Asensio et al. (2015) as plantas gastam cerca de 25% de sua energia total para a assimilação de nitrato. Apesar de observado que as plantas inoculadas com Ab-Sp245 reduziram mais rapidamente o  $\text{NO}_3^-$  na solução ao longo do período avaliado, só houve diferença significativa nos dois últimos pontos de coleta, ou seja, as 32 e 34 h após o início da depleção (Figura 24).



**Figura 24.** Análise de regressão da depleção de nitrato na solução nutritiva durante 34 h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 6 repetições e \* difere em  $p \leq 0,05$ . Para 32h - Controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b, para 34h- controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94-b.

Para a absorção de  $\text{NH}_4^+$  todos os tratamentos também se ajustaram a função quadrática, porém com uma absorção mais intensa quando comparada à de  $\text{NO}_3^-$ . De acordo com Fernandes, Souza e Santos (2018), a absorção de  $\text{NH}_4^+$  é mais rápida que a absorção de  $\text{NO}_3^-$  sob amplas condições de variação ambiental. Ainda, o influxo de  $\text{NH}_4^+$  nas plantas apresenta uma atividade circadiana marcante (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018). O máximo de absorção ocorre ao fim do período luminoso, havendo uma queda acentuada no ritmo de absorção após o início do período noturno (VON WIRÉN et al., 2000). Durante o período de avaliação os pontos de coleta onde os tratamentos diferiam foram 08 e 24 h após o início da depleção, sendo que às 8 h o tratamento com Ab-Sp245 foi o que mais absorveu  $\text{NH}_4^+$ , 29 e 31% com relação ao tratamento controle e Hs-ZAE94, respectivamente (Figura 25). Nos últimos dois pontos de amostragem 32 e 34 h não foi detectada concentração de  $\text{NH}_4^+$  através da metodologia utilizada.



**Figura 25.** Análise de regressão da depleção de amônio na solução nutritiva durante 30 h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 6 repetições e \* difere em  $p \leq 0,05$ . Para 08h - controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b, para 24h- controle- ab; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94-b.

#### 4.3.3 Monitoramento da depleção de Ca, Mg, P e K na solução nutritiva

A depleção dos demais macronutrientes da solução nutritiva também foi monitorada durante as 34 h (Figura 26). A inoculação modificou a dinâmica de absorção em diferentes tempos para cada nutriente avaliado. Para Ca a inoculação proporcionou diferenças após 4, 8 e 34 h da troca da solução, onde as plantas inoculadas com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 absorveram mais intensamente quando comparadas ao controle. Para evitar competição com Mg por sítios de ligação e a precipitação de fosfato é essencial que haja baixas concentrações de Ca no citosol, caso contrário ele pode ser tóxico, pois além da precipitação de fosfato também pode desencadear a agregação de proteínas e ácidos nucleicos (CASE et al., 2007; FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018). Portanto, para evitar esses inconvenientes, as plantas desenvolveram um eficiente sistema de efluxo de Ca para fora da célula, capaz de manter a concentração baixa e constante de Ca (DODD et al., 2010). Talvez, seja por isso que após uma grande absorção de Ca em todos os tratamentos no tempo de 4 h ocorra um efluxo do mesmo para a solução.

Na avaliação da depleção de Mg, as plantas inoculadas com ambas as estirpes absorveram mais intensamente as 6, 8, 24, 28 e 32 h, porém, as 30 e 34 h as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 não diferiram do controle. O Mg é um importante ativador enzimático, pois é cofator de quase todas as enzimas fosforilativas, além disso está envolvido de modo ativo na fotossíntese, uma vez que é o átomo central da molécula de clorofila (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018). Dessa forma, a maior absorção deste nutriente por plantas inoculadas pode estar relacionada ao intenso metabolismo dessas plantas, a fim de garantir o funcionamento de diversas funções metabólicas indispensáveis. Hungria et al. (2010) observaram pequenas reduções na concentração de Ca e Mg nos solos onde plantas de milho inoculadas com estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas, a questão entre os autores era saber se a redução nos teores destes nutrientes estava relacionada a maior absorção pelas plantas ou a liberação de compostos que alteraram sua solubilidade. No entanto, a hipótese de maior absorção foi reforçada pela menor concentração de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  no solo em tratamentos com as mesmas estirpes, e que experimentos em ambientes controlados confirmaram que essas estirpes foram capazes de

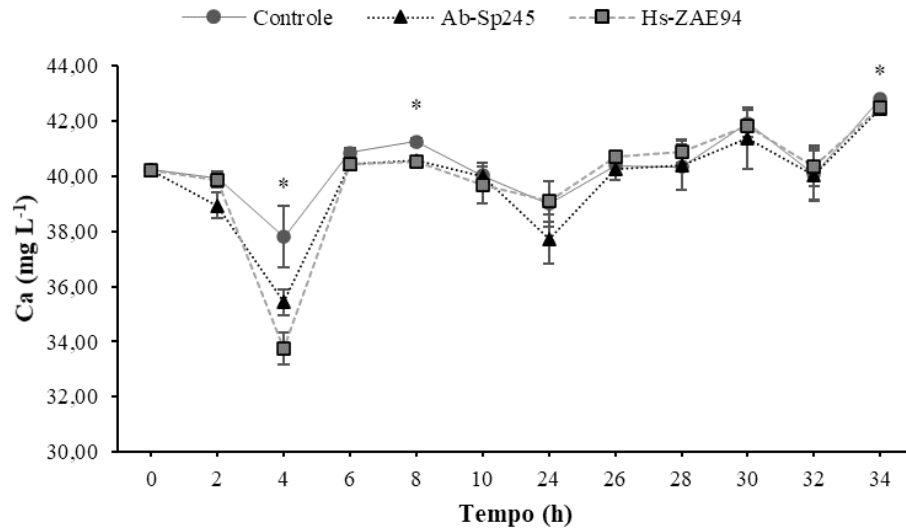
promover o crescimento radicular e, portanto, poderiam melhorar a absorção de nutrientes o que foi confirmado com as análises de tecido.

Para K é possível observar que as plantas inoculadas com Ab-Sp245 mantêm o padrão e absorvem mais rapidamente em quase todos os pontos que apresentaram diferenças significativas, exceto às 8 h em que não diferiu do controle. Por outro lado, as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 apresentaram uma oscilação na qual após 30 h absorveram mais K que o controle, no seguinte ponto monitorado se mantiveram igual ao controle, mas terminaram ao final das 34 h de análise absorvendo menos K que os demais tratamentos. Breda et al. (2019b) observaram maior acúmulo de K na parte aérea das plantas inoculadas com Ab-Sp245 e cultivadas em hidroponia, sendo este aumento de 20,4% com relação ao controle não inoculado. Esses mesmos autores apontam que o nutriente acumulado em maior quantidade nas plantas de milho foi K seguido do N. Ardakani et al. (2011) observaram um aumento de 20% na absorção de K em plantas de trigo inoculadas com *A. brasilense*.

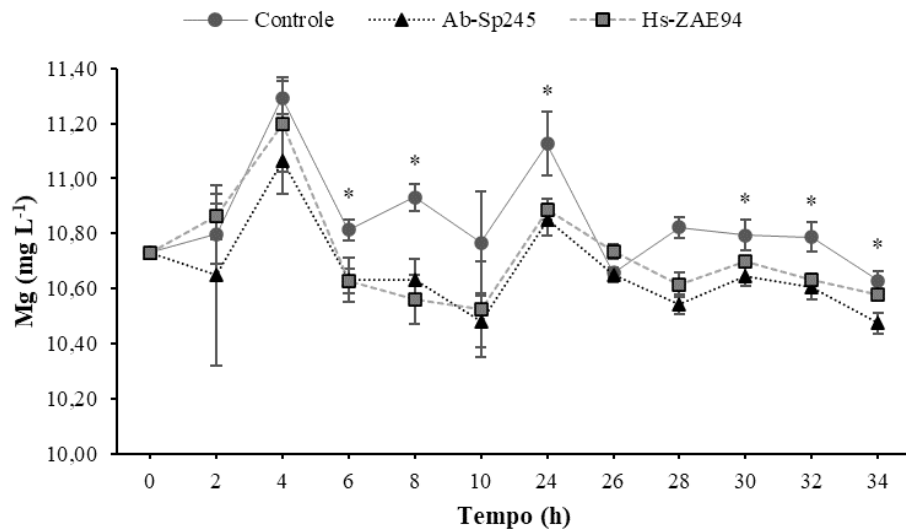
A absorção de P mostrou-se mais rápida para as plantas inoculadas com Ab-Sp245 após 6 h da troca da solução, diferença que é mantida as 8 h em relação as plantas inoculadas com Hs-ZAE94. Após 24 e 26 h diferenças também são encontradas, porém as estirpes não diferem entre si. Se for observado pela perspectiva de que os solos brasileiros são intemperizados, com alta acidez e apresentam baixos teores de P disponível e que isso representa uma grande restrição ao crescimento das plantas (PARENTONI et al. 2011; SHEN et al., 2006), a inoculação com Ab-Sp245 apresenta-se como uma estratégia a ser explorada, tendo em vista, que favorece sua absorção e assim pode facilitar a adaptação das plantas a ambientes com restrições e/ou variações no fornecimento deste nutriente. Outro ponto importante é que várias bactérias já foram caracterizadas como microrganismos solubilizadores de P, inclusive algumas pertencentes ao gênero de *Azospirillum* (MEHNAZ & LAZAROVITS, 2006). De acordo com Pii et al. (2015), os mecanismos subjacentes a melhora na nutrição de P por BPCP ainda são desconhecidos, considerando que dois mecanismos podem ocorrer simultaneamente, tanto do aumento da biodisponibilidade na interface raiz/solo quanto ao aumento na capacidade das plantas em absorvê-lo. Fukami et al. (2017) já haviam relacionado os benefícios da inoculação com *Azospirillum* na melhoria da aquisição de P, N, água e outros nutrientes pelas plantas. Em plantas de trigo a inoculação com *A. brasilense* afetou significativamente a absorção de P, resultando em um aumento de 14% no teor deste nutriente (ARDAKANI et al., 2011). Plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* e *A. lipoferum* aumentaram os teores de P e K nas folhas e nos grãos (HUNGRIA et al., 2010). Marques et al. (2020), apontam que a maior exploração do solo de plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* levaram a um aumento na absorção N, P, K e Ca nos tecidos. Baldotto et al. (2012) também observaram que a inoculação com *H. seropedicae* em plantas de milho em conjunto com a aplicação de fertilizante incrementaram os conteúdos de N, P e K em 11, 30 e 17%, respectivamente, em comparação aos tratamentos que só receberam fertilizante mineral, por outro lado nenhuma diferença foi encontrada para os teores de Ca e Mg. Galindo et al. (2016) observaram incrementos nos teores de P nas folhas das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*, porém nenhuma diferença foi encontrada pra Ca, Mg, K e N nas duas safras avaliadas. Diversos autores atribuíram esse aumento na absorção de nutrientes, como N, P e K a maior superfície de absorção da raiz pelas plantas inoculadas com *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (BALDOTTO et al. 2012; BASHAN & LEVANONY, 1990; JAIN & PATRIQUIN, 1985; LIN et al. 1983).

De uma maneira geral, a velocidade de absorção de N, P e K já é maior do que os outros nutrientes, o que pode levar ao rápido esgotamento deles e ao acúmulo de outros, devido as diferentes taxas de absorção existentes (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018). Ainda, os nutrientes essenciais foram classificados em três categorias com base na rapidez em que são absorvidos da solução nutritiva, em que a taxa de absorção aproximada para N, P e K foi rápida, Mg foi enquadrado na faixa intermediária, enquanto Ca está classificado como absorção lenta

(BUGBEE, 2004). Os resultados encontrados através do comportamento de depleção desses nutrientes neste ensaio vão ao encontro dessa classificação apontada na literatura. Diante disso, optou-se por não calcular parâmetros cinéticos, tendo em vista que a presença de determinados nutrientes inibe a absorção de outros, como é o caso de  $\text{NH}_4^+$  que é absorvido prioritariamente do que  $\text{NO}_3^-$ , ademais Cometti (2003) aponta que além do  $\text{NO}_3^-$ , o  $\text{K}^+$  também têm sua absorção inibida por  $\text{NH}_4^+$ .



\* Para 4, 8 e 34 h - controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- a.

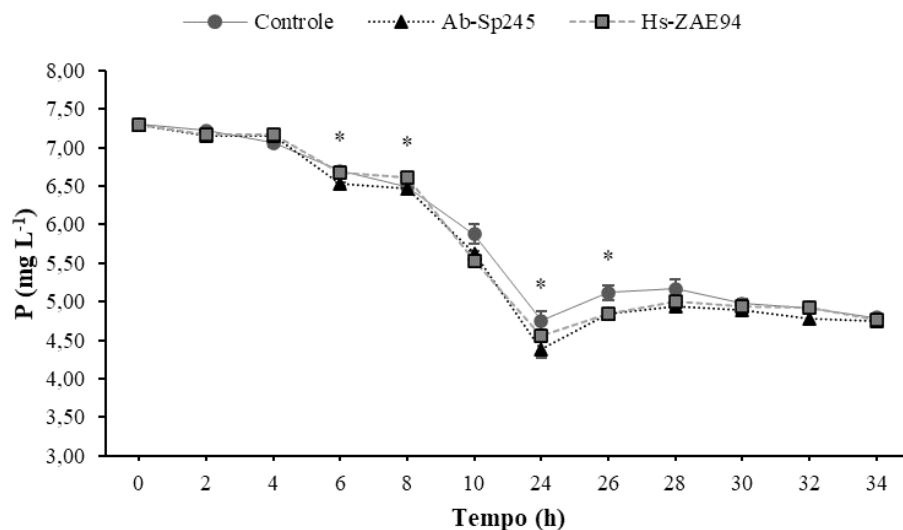


\* Para 6, 8, 24, 28 e 32h - controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- a; para 30h - controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- ab; para 34h - controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b.

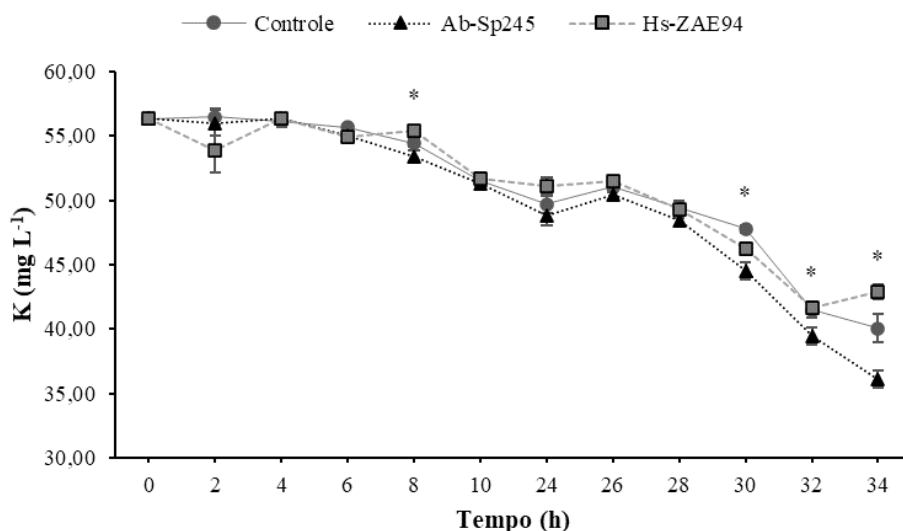
Continua na próxima página a **Figura 26...**



Continuação da **Figura 26**.



\* Para 6h - controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b; \* Para 8h - controle- a; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b; \* Para 24h - controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- ab; \* Para 26h - controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- a.

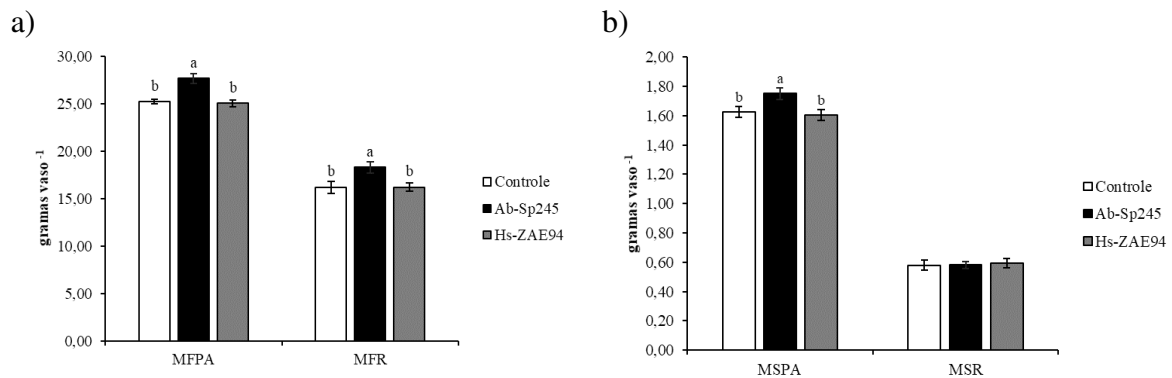


\* Para 8h - controle- ab; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b; \* Para 30h - controle- c; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b; \* Para 32h - controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b; \* Para 34h - controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- c.

**Figura 26.** Análise da depleção de cálcio, magnésio, fósforo e potássio na solução nutritiva durante 34 h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 6 repetições e \* difere em  $p \leq 0,05$ .

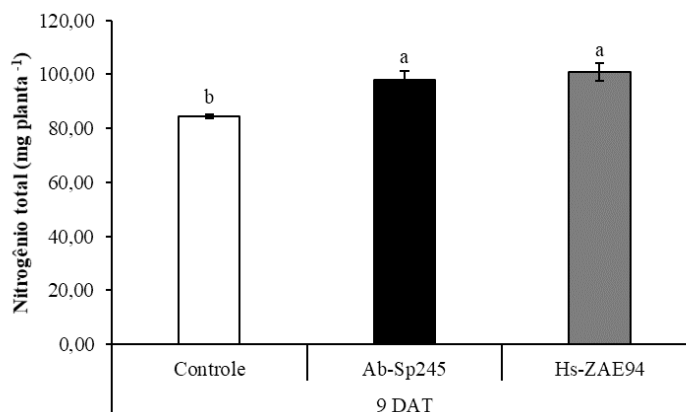
#### 4.3.4 Acúmulo de biomassa e nitrogênio total

A biomassa fresca da parte aérea e raiz foram superiores para as plantas que receberam o tratamento Ab-Sp245. Já para biomassa seca só houve diferença significativa para a parte aérea, sendo novamente o tratamento com Ab-Sp245 apresentando média superior aos demais (Figura 27), o aumento de biomassa em plantas milho inoculadas com *A. brasilense* foi relatado por Calzavara et al. (2018).



**Figura 27.** Massa fresca (a) e seca (b) da parte aérea e das raízes das plantas aos 9 DAT para solução nutritiva. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 6 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

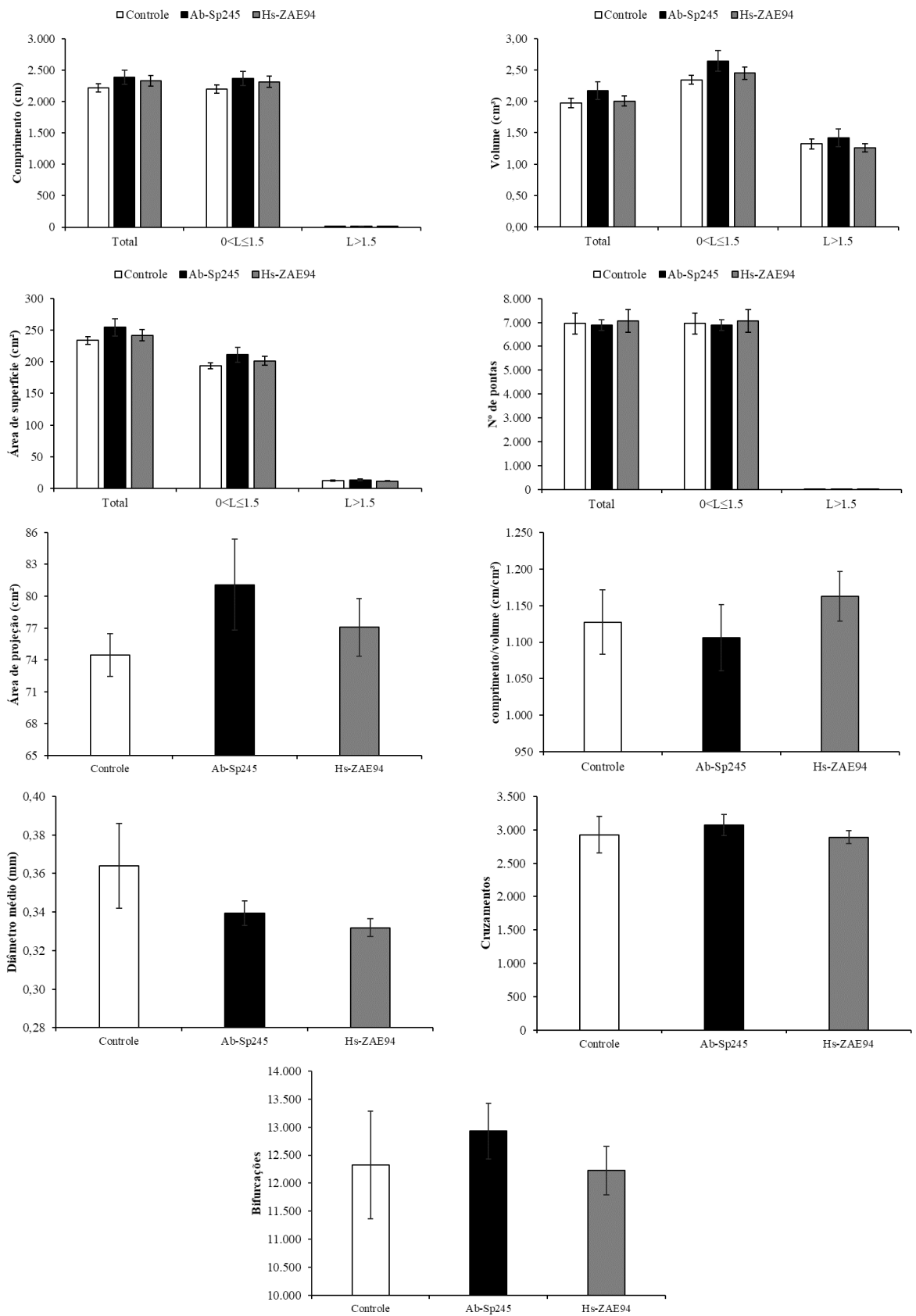
O acúmulo de N nas plantas de milho foi modificado pela inoculação, no qual as plantas inoculadas com ambas as estirpes acumularam aproximadamente 18% mais N do que o controle não inoculado (Figura 28). Alves et al. (2015) e Breda et al. (2019b) também obtiveram maiores incrementos no acúmulo de N em plantas milho inoculadas com bactérias diazotróficas. Esses resultados corroboram com os dados de aquisição de N encontrados, ou seja, o aumento no conteúdo de N pode ser reflexo da maior absorção deste nutriente pelas plantas inoculadas.



**Figura 28.** Nitrogênio total acumulado de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 9 DAT. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativa ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.5 Parâmetros radiculares

Na análise das variáveis associadas à morfologia de raízes apesar de o tratamento com Ab-Sp245 apresentar as maiores médias para quase todos os parâmetros avaliados, exceto número de pontas, não houve diferença estatística significativa (Figura 29). Porém, de acordo com Kraiser et al. (2011) a maior aquisição de nutrientes observada pelas plantas inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas não deve ser explicada apenas pela modificação dos parâmetros radiculares, como ramificação e ampliação da área de superfície radicular, mas também pelo aumento da atividade dos sistemas de absorção de nutrientes.



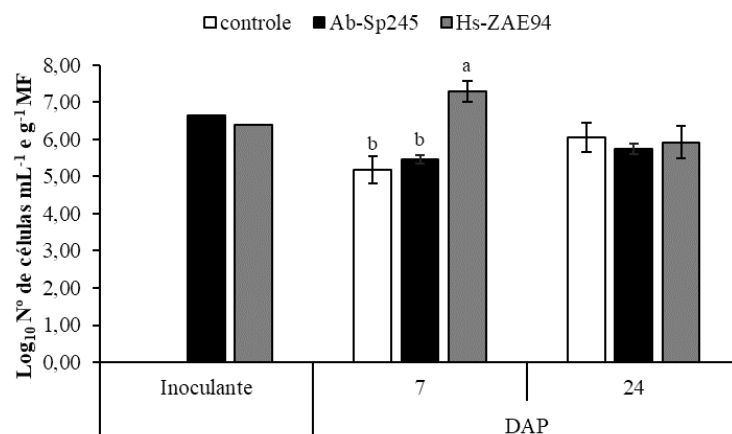
**Figura 29.** Arquitetura das raízes analisadas pelo software WinRHIZO Pro™ de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 9 DAT. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições.

## 4.4 Avaliação da Inoculação de Bactérias Diazotróficas em Plantas de Milho Cultivadas em Substrato Estéril: Experimento IV

### 4.4.1 Contagem de bactérias diazotróficas

A população inicial de ambos os inoculantes foi confirmada através da técnica do NMP apresentando 6,65 e 6,40  $\log_{10}$  n° de cel  $\text{mL}^{-1}$  para Ab-Sp245 e Hs-ZAE94, respectivamente, e não foi detectado crescimento positivo para a solução utilizada no tratamento controle (Figura 30). Optou-se nesse experimento em reduzir a população bacteriana aplicada no momento da inoculação, tendo em vista que trabalhos anteriores apontaram benefícios com a aplicação de  $10^6$  cel semente<sup>-1</sup> para ambas as estirpes utilizadas nesse trabalho em plantas milho (SILVA et al., 2015; BREDA et al., 2016; BREDA et al., 2019; ALVES et al., 2020).

Na contagem realizada nas raízes das plantas aos 7 DAP, a população do tratamento com Hs-ZAE94 foi superior aos demais, um aumento na ordem de 2 log, porém 24 dias após não foi encontrada diferença no número de células entre os tratamentos. Nesse sentido, a contagem da população de bactérias diazotróficas nas raízes de plantas de milho tem demonstrado que o número de bactérias tende a diminuir alcançando um equilíbrio ao passo que o ciclo de desenvolvimento avança. Assim, é possível observar que mesmo em substrato estéril as populações de bactérias diazotróficas nativas carregadas pela semente podem atingir populações semelhantes às observadas nos tratamentos inoculados. Sala et al. (2005) apontam que adubações com fertilizantes nitrogenados também tem influenciado na população dessas bactérias, principalmente nas raízes. A este propósito no experimento II, nenhuma diferença foi encontrada na contagem das raízes aos 34 DAP quando a dose de nitrogênio foi alta, equivalente a 3 mM de N, diferenças só foram observadas na dose baixa de N, onde as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 mantiveram populações 10 vezes mais altas que o tratamento controle. Por outro lado, no experimento I em hidroponia, as plantas inoculadas com Ab-Sp245 na dose alta de N (3,0 mM) mantiveram a população superior que o controle e Hs-ZAE94 também 10 vezes superior aos 32 DAT. Essa mesma proporção foi observada em cana-de-açúcar por Santos et al. (2019), onde inoculação com mix de 5 bactérias diazotróficas aumentaram em 10 vezes o número cel  $\text{g}^{-1}$  MF nas raízes e nas folhas após 45 dias do plantio. Quadros et al. (2014) amostraram raízes das plantas de milho no final do ciclo da cultura para a quantificação de bactérias diazotróficas através do NMP e verificaram que as plantas inoculadas com 4 estirpes de *Azospirillum* mantiveram o número de células significativamente maior ao tratamento controle; o log do n° de células  $\text{g}^{-1}$  MF variou entre 3,8 a 4,1 para o tratamento controle e de 6,0 a 6,4 para o tratamento inoculado.



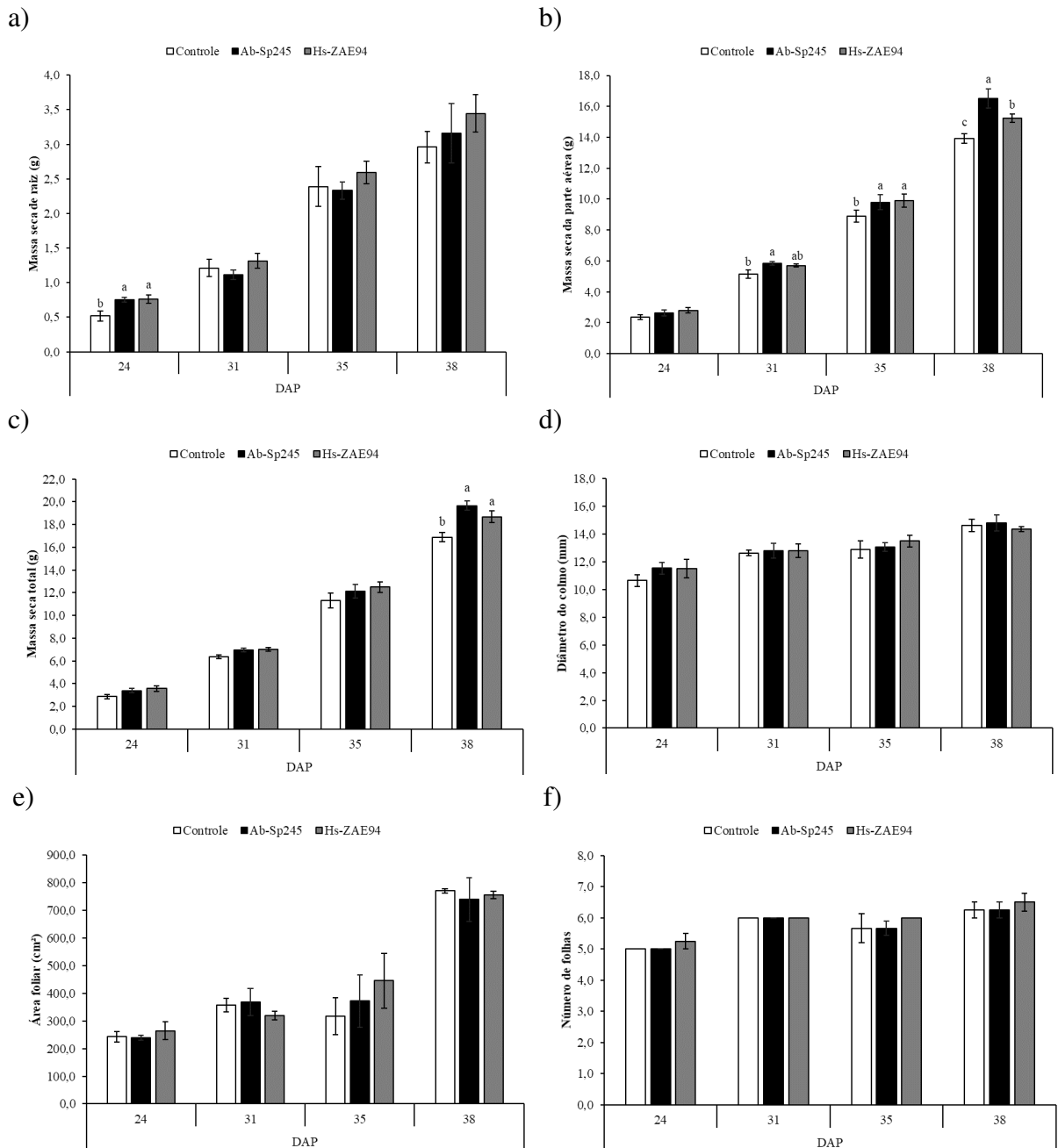
**Figura 30.** Contagem de bactérias pela técnica do Número Mais Provável presente no inoculante, e nas raízes após 7 e 24 dias após o plantio (DAP) (n = 4). NMP com meio semi-sólido NFb sem fonte de nitrogênio.

#### 4.4.2 Avaliação de parâmetros biométricos

A inoculação com ambas as estirpes incrementou a biomassa acumulada somente aos 38 DAP (Figura 31c). Nas demais coletas, a inoculação gerou um acúmulo de biomassa principalmente na parte aérea, exceto na coleta aos 24 DAP, onde a inoculação com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 incrementaram 44 e 46%, respectivamente, na massa seca de raiz (Figura 31a, b). Na coleta aos 31 DAP a inoculação com Ab-Sp245 foi superior ao controle em 13% na massa seca da parte aérea e não diferiu do tratamento com Hs-ZAE94. Aos 35 DAP as estirpes continuaram não diferindo entre si, mas foram significativamente diferentes do controle em 11%. Já na coleta aos 38 DAP todos os tratamentos aumentaram em mais de 50% a biomassa da parte aérea, sendo esse aumento mais pronunciado nas plantas inoculadas com Ab-Sp245 (68%), que por sua vez diferiu dos demais tratamentos sendo superior em 8 e 18% em relação ao Hs-ZAE94 e o controle, respectivamente. O tratamento inoculado com Hs-ZAE94 também foi superior ao controle e aumentou em 9% a massa seca da parte aérea. Ramos et al. (2010) constataram que aos 30 DAP as plantas de milho inoculadas com *A. lipoferum* e fertilizadas com 30 kg de N apresentaram maiores médias na massa seca da parte aérea quando comparadas com as plantas sem inoculação. Santos et al. (2015) observaram incrementos de 14,33% na massa seca da parte aérea das plantas de milho inoculadas com Hs-ZAE94 aos 45 DAP. Dartora et al. (2013) testaram a inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* em milho de forma isolada e combinada, e observaram que a co-inoculação proporcionou um incremento de 12% na massa seca da parte aérea e 7% na produtividade em relação ao controle. Lana et al. (2012) observaram incrementos de 7,2% na produção de biomassa seca da parte aérea de plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* e ainda aumentos de produtividade que variaram dependendo da safra de 7,4 a 15,4% na ausência de adubação nitrogenada.

Nenhuma diferença foi encontrada para diâmetro do colmo, número de folhas, área foliar, e razão raiz/parte aérea em nenhuma das datas de amostragem (Figura 31d, e, f, g). Da mesma forma, Dotto et al. (2010) não verificaram efeito da inoculação com *H. seropedicae* no diâmetro do colmo de plantas de milho. Contudo, Dartora et al. (2013) observaram maior diâmetro do colmo para as plantas co-inoculadas com estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* em milho na fase vegetativa quando comparadas ao controle, este aumento foi de 15%. Quanto a área foliar, esses mesmos autores não encontraram diferenças em relação a inoculação, seja de forma separadas ou conjunta, e independente da fase de avaliação (vegetativa e reprodutiva). Quando a área foliar foi analisada em plantas de milho inoculadas ou não com as mesmas

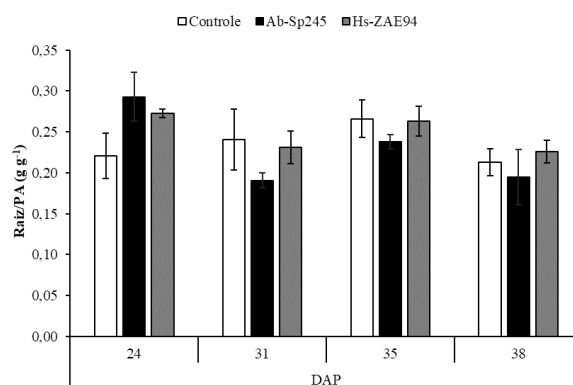
estirpes deste trabalho em duas safras (verão e inverno) com diferentes níveis de adubação nitrogenada, Breda et al. (2019a) verificaram que o efeito da inoculação foi mais pronunciado na safra de verão, e que este parâmetro variou ao longo do tempo, mas que de uma maneira geral ambas as estirpes foram eficientes e aumentaram a área foliar nos últimos estágios de desenvolvimento da planta, seja na ausência ou na presença de 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup> de N. Marques et al. (2020) também observaram maior área foliar nas plantas de milho inoculadas com duas estirpes de *A. brasilense* em condições hídricas contrastantes (irrigado ou em déficit hídrico).



Continua na próxima página a **Figura 31...**

Continuação da **Figura 31**.

g)



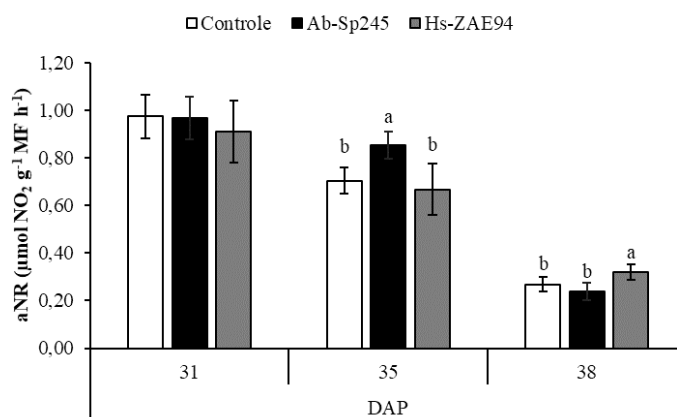
**Figura 31.** Massa seca acumulada, da parte aérea e das raízes das plantas, diâmetro do colmo, área foliar, número de folhas e razão raiz/PA aos 24, 31, 35 e 38 DAP. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.3 Atividade enzimática da nitrato redutase

A atividade da NR nas folhas não diferiu na coleta aos 31 DAP, mesmo as plantas do tratamento inoculado com Hs-ZAE94 apresentando uma redução de 7% quando comparado aos demais tratamentos (Figura 32). Essa atividade ligeiramente mais baixa pode ter ocorrido devido a um sistema de *feedback* negativo, onde a presença de formas reduzidas de N, inibem aNR (STITT et al., 2002). Neste caso, o grande aumento nos teores de N-amino encontrado nos mesmos tecidos pode ter favorecido a ocorrência deste processo, e com isso ter contribuído para o acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  que foi superior em 253% dos demais tratamentos.

Houve uma redução na aNR ao longo das coletas em todos os tratamentos, isso pode indicar que o  $\text{NO}_3^-$  que foi disponibilizado através de adubações parceladas estava sendo rapidamente metabolizado, dados que vão ao encontro das frações nitrogenadas encontradas nos tecidos das plantas. Na coleta aos 35 DAP as plantas inoculadas com Ab-Sp245 apresentaram maior aNR mesmo reduzindo-a em 15% com relação a coleta anterior, e diferiu dos demais tratamentos, esse resultado pode estar relacionado a maior assimilação do N disponível na forma de  $\text{NO}_3^-$ , pois conforme verificado nos experimentos anteriores as plantas inoculadas com Ab-Sp245 apresentam maior influxo de  $\text{NO}_3^-$ .

Aos 38 DAP os valores ainda mais reduzidos da aNR podem indicar além de uma rápida circulação do  $\text{NO}_3^-$  no citosol uma baixa concentração desse nutriente no substrato, pois essa coleta foi realizada distante da última adubação. Nesse momento, a Ab-Sp245 que foi o tratamento com maior redução na aNR (254%) se iguala ao tratamento controle e juntos diferem da Hs-ZAE94 que apresentou a maior aNR. Vale ressaltar que os tecidos das raízes foram coletados aos 31 DAP para realizar a aNR, porém os valores estavam muito baixos e o método utilizado não foi sensível para mensurá-los, por isso optou-se por não realizar a coleta deste tecido nas demais datas de amostragem. Esse comportamento também pode indicar que grande parte do  $\text{NO}_3^-$  absorvido foi remobilizado para as folhas para então serem reduzidos. Pois, já havia sido identificado através do experimento I e de Breda et al. (2019b) que aNR em plantas de milho ocorrem prioritariamente nas folhas, independente da presença de N no meio de cultivo.



**Figura 32.** Atividade da enzima nitrato redutase de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 31, 35 e 38 DAP. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.4 Avaliação de parâmetros radiculares

Os parâmetros radiculares foram modificados positivamente em função da inoculação, apesar de diferenças significativas terem sido encontradas para massa seca deste órgão apenas na coleta aos 24 DAP. De acordo com Hodge (2004), as medições de biomassa radicular não são, necessariamente, um indicativo da área de absorção total do sistema radicular, e alterações na arquitetura do sistema radicular podem sim ocorrer sem que haja mudanças na biomassa total da raiz. Nesse ponto, de maneira geral, a inoculação com ambas as estirpes aumentou o comprimento, as áreas de superfície e projeção e o comprimento de raízes finas (0-1,5mm) em comparação ao controle para as coletas 24, 35 e 38 DAP (Figura 33). Marques et al. (2021) também observaram que a inoculação com *A. brasilense* favoreceram o desenvolvimento das raízes de plantas de milho, aumentaram o comprimento total, a área superficial, volume e diâmetro médio das raízes após 45 dias do plantio. Esses mesmos autores, observaram que não houve diferença no diâmetro médio das raízes quando as plantas foram submetidas ao estresse hídrico.

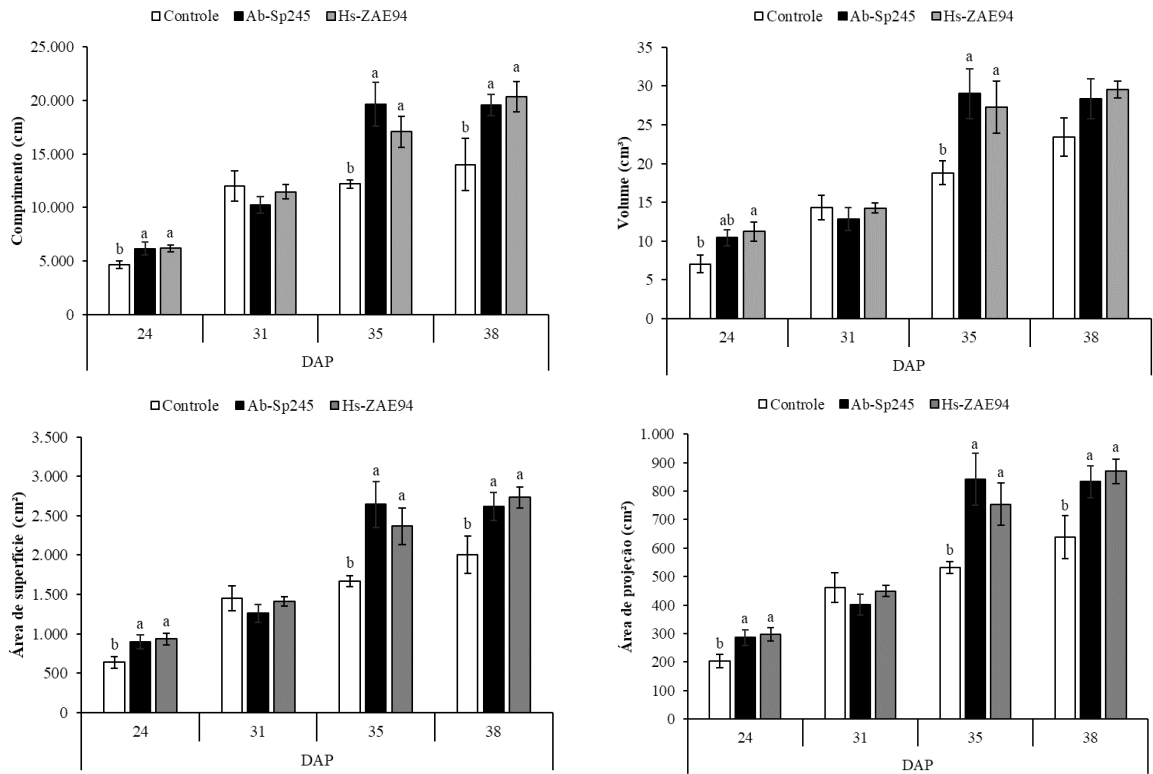
As raízes, nesse experimento, foram separadas em duas classes de acordo com a espessura, as raízes finas compreendem aquelas que apresentaram espessura 0 a 1,5 mm e as demais (médias e grossas) com espessura maior que 1,5 mm. Conforme supracitado somente o comprimento de raízes finas foi alterado pela inoculação, incrementos nessa classe de diâmetro variaram de 32 a 63% para Ab-Sp245 enquanto que para Hs-ZAE94 variaram de 32 a 46% ao longo das avaliações. As raízes mais finas podem conferir maior capacidade de absorção de nutrientes por unidade de massa da raiz, por exemplo, a taxa de absorção de  $\text{NO}_3^-$  em uma gramínea foi positivamente correlacionada com o comprimento da raiz fibrosa, superfície e volume de cada classe de diâmetro (WANG et al., 2006).

A inoculação com ambas as estirpes aumentou o número de pontas das raízes das plantas aos 38 DAP, embora as raízes das plantas inoculadas com Ab-Sp245 apresentarem número de pontas semelhantes ao controle. Zemrany et al. (2007) verificaram que as plantas de milho inoculadas com *Azospirillum* aumentaram o número de pontas, área de superfície e comprimento total das raízes. Assim, como o ocorrido nesse estudo, esses autores não observaram mudanças no diâmetro médio das raízes em razão da inoculação de 7 até 35 dias após a semeadura, apesar de os valores médios terem sido 3 vezes menores que os encontrados nesse experimento. Santos et al. (2019) observaram um aumento de 48 e 72% no número de pontas e bifurcações, respectivamente, em gemas de cana-de-açúcar inoculadas com um mix de



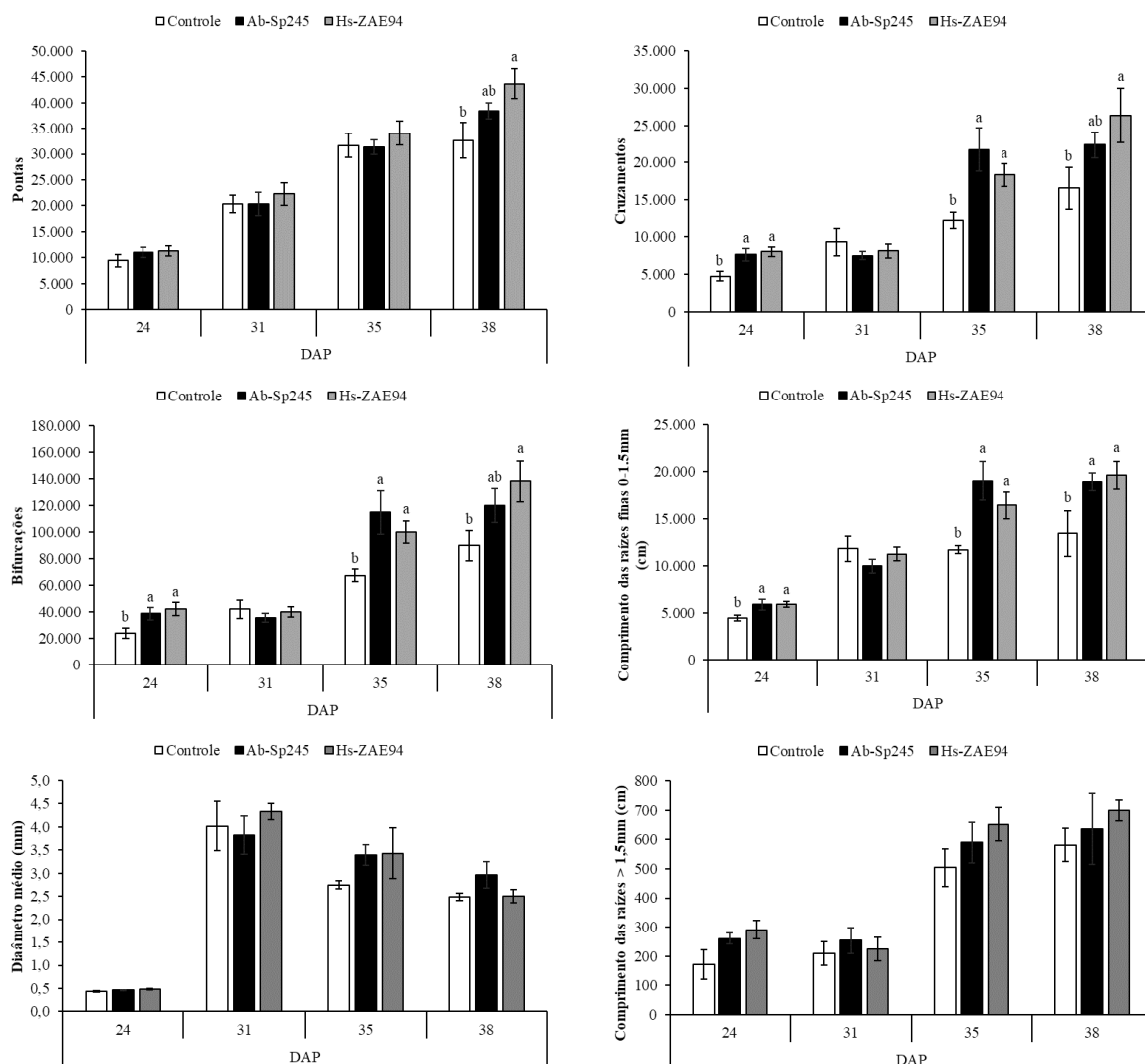
5 bactérias diazotróficas, os incrementos encontrados aqui nestes mesmos parâmetros foram de 34 e 54% nas plantas inoculadas com Hs-ZAE94 aos 38 DAP.

Rozier et al. (2016) verificaram mudanças na arquitetura radicular em um de dois genótipos de milho avaliados e inoculados com *Azospirillum*, os autores relacionaram o ganho de biomassa radicular (100%) com o aumento no comprimento total das raízes, e que este aumento estava relacionado ao maior número de raízes secundárias na radícula e raízes seminais laterais resultando no maior número de pontas e, portanto, gerando um aumento na superfície total da raiz.



Continua na próxima página a **Figura 33...**

### Continuação da Figura 33.



**Figura 33.** Arquitetura das raízes analisadas pelo software WinRHIZO Pro<sup>TM</sup> de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 24, 31, 35 e 38 DAP. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

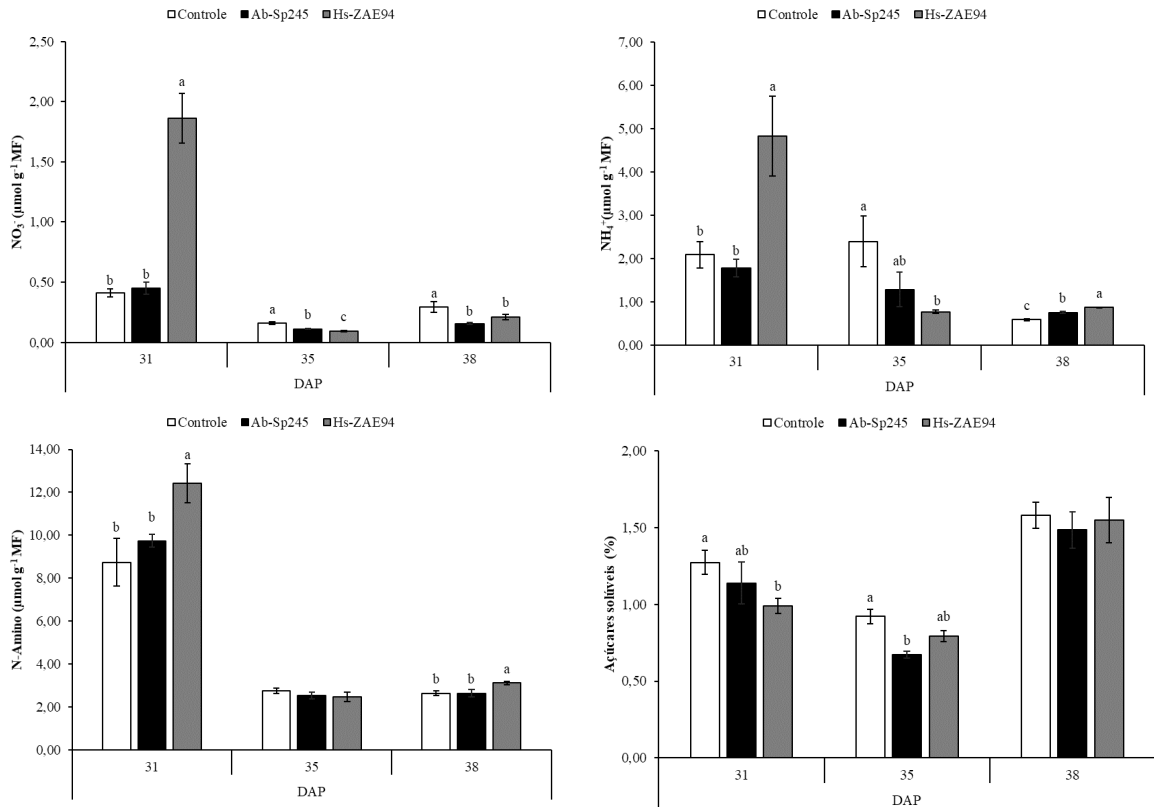
#### 4.4.5 Análise de metabólitos solúveis

As plantas inoculadas com Hs-ZAE94 apresentaram maiores teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e N-amino na coleta aos 31 DAP (Figura 34). Os teores de açúcares solúveis desse mesmo tratamento foram mais baixos do que as plantas do tratamento controle, mas não diferiram do Ab-Sp245.

Na coleta aos 35 DAP as plantas referentes ao tratamento controle apresentaram maiores teores de  $\text{NO}_3^-$  quando comparado aos demais tratamentos. Esse maior teor de  $\text{NO}_3^-$  corrobora com os menores valores de atividade da NR quando comparado ao tratamento com Ab-Sp245 (Figura 32), entretanto esses tratamentos não diferiram nos teores de  $\text{NH}_4^+$  e N-amino. Por outro lado, o tratamento inoculado com Hs-ZAE94 diferiu do Ab-Sp245 por apresentar menor teor de  $\text{NO}_3^-$ , apesar de não diferirem nas demais frações nitrogenadas e nem de açúcares.

Na coleta aos 38 DAP as plantas do tratamento controle também apresentaram os maiores teores de  $\text{NO}_3^-$ , dados que novamente corroboram com a menor aNR quando

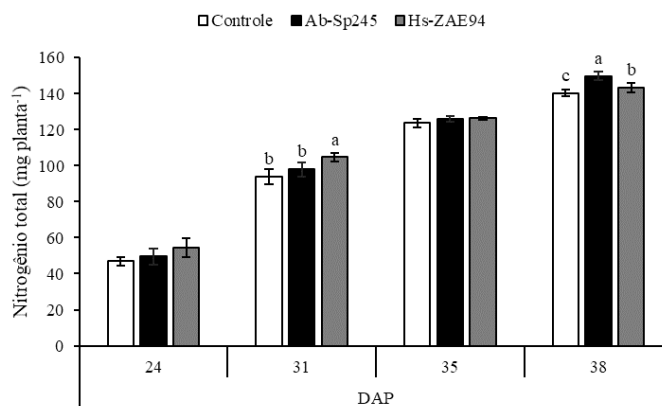
comparada com as plantas inoculadas com Hs-ZAE94, que nesta ocasião apresentaram maior atividade da enzima, e isso se refletiu nos menores teores de  $\text{NH}_4^+$  e N-amino, mas sem diferenças nos teores de açúcares solúveis. Comportamento inverso foi observado nas plantas inoculadas com Hs-ZAE94, que apresentaram os maiores teores de  $\text{NH}_4^+$  e N-amino em função da maior aNR encontrada. Já as plantas inoculadas com Ab-Sp245 apresentaram maiores teores de  $\text{NH}_4^+$  em função dos menores teores  $\text{NO}_3^-$  quando comparado ao tratamento controle, apesar de não diferirem na aNR nessa mesma coleta.



**Figura 34.** Teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , N-amino e açúcares solúveis na parte aérea das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 31, 35 e 38 DAP. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

O conteúdo de N foi afetado positivamente pela inoculação aos 31 e 38 DAP (Figura 35). Na coleta aos 31 DAP o tratamento com Hs-ZAE94 acumulou 7 e 12% a mais de N que os tratamentos Ab-Sp245 e controle, respectivamente. No entanto, na coleta aos 38 DAP as plantas inoculadas com Ab-Sp245 aumentaram significativamente em 5 e 7% de N em relação aos tratamentos Hs-ZAE94 e controle, respectivamente. O acúmulo de N nessa última coleta pode estar atribuído a produção de massa seca para este mesmo órgão, uma vez que seguiu o mesmo comportamento, sendo superior para o tratamento com Ab-Sp245 seguidos por Hs-ZAE94 e controle nessa ordem. Santos et al. (2015) observaram incrementos muito superiores ao encontrado neste experimento para o conteúdo total de N, sendo ele 44,32% quando as plantas de milho foram inoculadas com Hs-ZAE94 e suplementadas com  $60 \text{ kg ha}^{-1}$  de N aos 45 DAP, enquanto neste trabalho as plantas inoculadas com essa mesma estirpe aumentaram apenas em 2,2% na coleta aos 38 DAP. Breda et al. (2019a) observaram maior acúmulo de N nas folhas das plantas de milho inoculadas com Ab-Sp245 associadas a dose de  $50 \text{ kg ha}^{-1}$  a partir de 28 dias após a emergência (DAE) quando comparadas as plantas controle e Hs-ZAE94, enquanto

que as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 acumularam mais N quando a adubação foi de 100 kg ha<sup>-1</sup> de 28 a 63 DAE. Por outro lado, Dotto et al. (2010) não observaram incrementos no teor de N nas folhas plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae*.



**Figura 35.** Conteúdo de nitrogênio total na parte aérea das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 31, 35 e 38 DAP. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

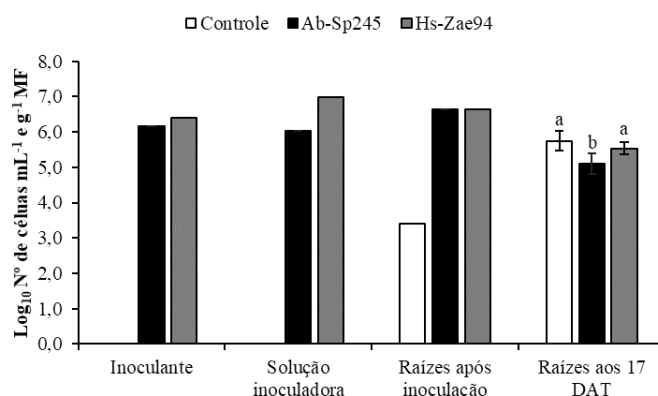
#### 4.5 Modificações no Metabolismo de Nitrogênio em Plantas de Milho Inoculadas com Duas Espécies de Bactérias Diazotróficas: Experimento V

##### 4.5.1 Contagem de bactérias diazotróficas

A população inicial dos inoculantes ajustada para 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> com auxílio da câmara de Neubauer foi confirmada pela da técnica do NMP, e conforme esperado não houve crescimento positivo para a solução utilizada na imersão das raízes do tratamento controle (Figura 36). A contagem nas raízes das plântulas imediatamente após o processo de inoculação demonstrou que o mesmo foi efetivo, onde as plantas inoculadas com ambas as estirpes apresentaram log<sub>10</sub> n° de cel g<sup>-1</sup> de massa fresca compatível com as populações inoculadas e superiores ao controle 1000 vezes. Alves et al. (2020) inocularam sementes de milho de modo que cada semente recebeu 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>. Bashan (1986) testaram três estirpes de *Azospirillum* em trigo em diferentes concentrações, que variaram 10<sup>2</sup> a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, a fim de determinar o nível ideal para a inoculação bacteriana. Para isso, realizou comparações entre a população bacteriana inoculada e o aumento na área superficial da raiz. Todas as estirpes mostraram a mesma tendência em influenciar o crescimento da raiz, com nível ideal entre 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, a diminuição da concentração bacteriana para 10<sup>2</sup> - 10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup> teve um efeito positivo menor, enquanto concentrações muito altas como a de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> teve efeito negativo, diminuindo a área de superfície da raiz. Neste sentido, reduziu-se a população para 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> para verificar se os benefícios obtidos no experimento IV quando essa mesma população foi utilizada se repetiria em condição hidropônica.

Aos 17 DAT a população do tratamento controle não diferiu do inoculado com Hs-ZAE94 e foram superiores ao inoculado com Ab-Sp245. No experimento II, para o mesmo período de amostragem as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 mantiveram a população superior as inoculadas com Ab-Sp245 em substrato estéril. Conceição et al. (2009) realizaram a contagem nas raízes das plantas de milho 40 dias após a semeadura pela mesma técnica utilizada neste trabalho em meio semi-sólido JNFb e verificaram que os tratamentos onde a inoculação

com *H. seropedicae* estava presente houve um incremento de três unidades logarítmicas em relação as plantas controle.



**Figura 36.** Contagem de bactérias pela técnica do número mais provável presente no inoculante, na solução inoculadora, nas raízes após a inoculação e aos 17 dias após o transplântio (DAT) (n = 3). NMP com meio semi-sólido NFb sem nitrogênio.

#### 4.5.2 Monitoramento da depleção de nitrogênio na solução nutritiva

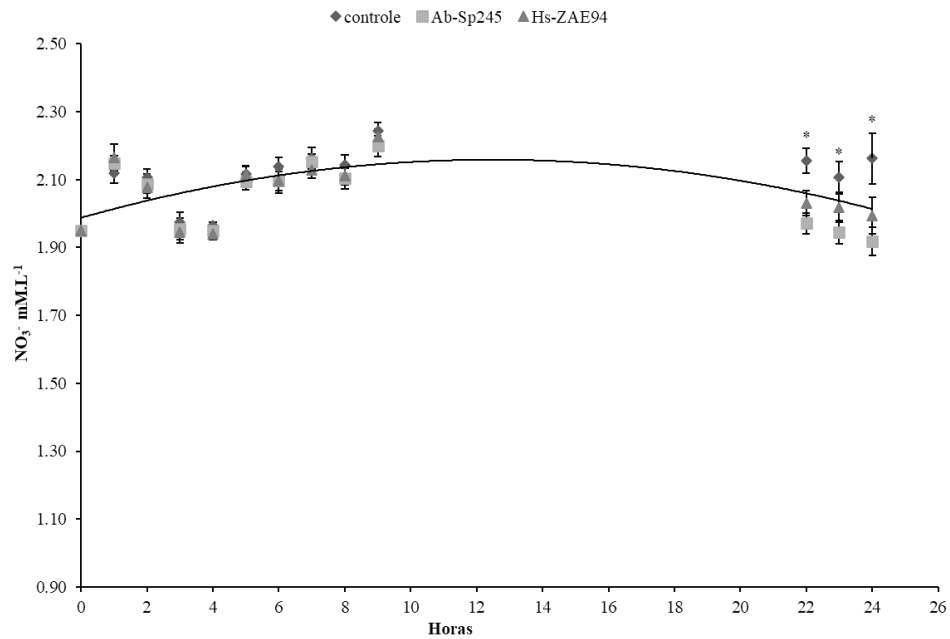
As medições de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva foram realizadas durante 24 h após o início do ressurgimento com as fontes de N, excluindo o período noturno (Figuras 37 e 38). Resolveu-se excluir o período noturno observando ensaios anteriores, como no experimento III onde não houve mudanças significativas na concentração de  $\text{NO}_3^-$  entre o último ponto amostrado as 18 h e o primeiro do dia seguinte as 8 h da manhã. Matt et al. (2001) também observaram que a absorção de  $\text{NO}_3^-$  durante o período diurno foi 40% superior que a absorção durante a noite em plantas de tabaco.

Após o início da avaliação da depleção, nas primeiras horas é possível observar o efluxo de  $\text{NO}_3^-$ , isso pode estar associado ao *feedback* negativo exercido pelas elevadas concentrações internas dos produtos resultantes do metabolismo do N nas plantas. As concentrações iniciais de  $\text{NO}_3^-$  foram 7 vezes maiores que as de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva, e a utilização pelas plantas foi praticamente estável após 24 h. No entanto, a concentração de  $\text{NO}_3^-$  foi significativamente menor no tratamento inoculado com Ab-Sp245 em comparação com controle não inoculado, nas três últimas horas de avaliação (22, 23 e 24 h) (Figura 37). Kapulnik et al. (1985) verificaram que a inoculação com *Azospirillum* em plantas de trigo aumentou a absorção de  $\text{NO}_3^-$  da solução nutritiva.

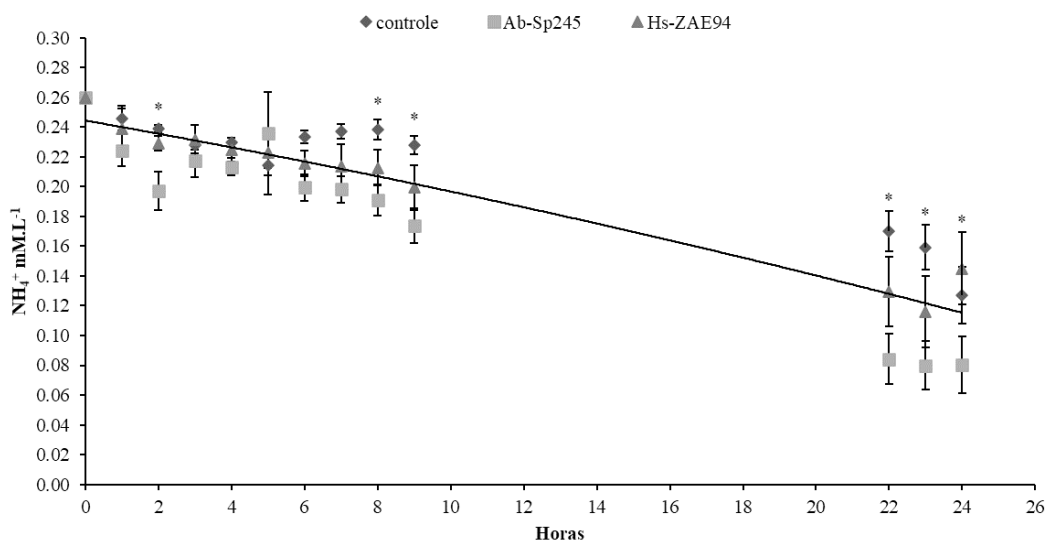
Na Figura 38 é possível observar que ocorreu um esgotamento quase completo de  $\text{NH}_4^+$  na solução durante as primeiras 24 h, tempo em que ocorreu o monitoramento das concentrações. O processo de absorção de  $\text{NH}_4^+$  foi muito mais intenso do que o de  $\text{NO}_3^-$ , para todos os tratamentos, sendo isso também observado através do acúmulo de ambas as frações nos tecidos foliares. Isso pode ser justificado pelo grande gasto de energético necessário para a absorção de N, especialmente  $\text{NO}_3^-$ , em que 8e- a mais são necessários para sua redução. A este propósito, já foi investigado que mesmo quando a absorção de  $\text{NO}_3^-$  atinge seu ponto máximo, se ambas as fontes estiverem em concentrações equimolares, ainda assim as plantas absorvem de 5 a 10 vezes mais N como  $\text{NH}_4^+$  do que como  $\text{NO}_3^-$ , portanto, a absorção de  $\text{NH}_4^+$  por plantas é mais rápida que a de  $\text{NO}_3^-$  sob amplas condições de variação ambiental (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018).

A partir de 22 h é possível observar que a concentração  $\text{NH}_4^+$  na solução das plantas inoculadas com Ab-Sp245 é muito baixa. De acordo com Fernandes, Souza & Santos (2018),

quando isso acontece a velocidade de absorção do íon também é muito baixa, podendo atingir a um valor de concentração em que influxo líquido é igual a zero, sendo este ponto nominado  $C_{min}$ . Nesse caso, a resposta mais rápida de absorção pelas plantas inoculadas com Ab-Sp245 provavelmente contribuiu para o alcance do  $C_{min}$  a partir desta amostragem, pois não houve mudanças de absorção nos pontos monitorados adiante, ou seja, a absorção líquida  $NH_4^+$  cessou antes que ele fosse completamente esgotado, corroborando também com o início de maior absorção de  $NO_3^-$  para as plantas do mesmo tratamento. Esse maior influxo de  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$  nas plantas inoculadas pode ser resultado do estímulo da atividade das  $PMH^+$ -ATPase, como já observado em outros trabalhos (BASHAN, 1990; BASHAN et al. 1989; CANELLAS et al., 2013).



**Figura 37.** Análise da depleção de nitrato na solução nutritiva durante 24h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 8 repetições e \* difere em  $p \leq 0,05$ . Para 22 e 24h - Controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- a, para 23h- controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94-ab.



**Figura 38.** Análise da depleção de nitrato na solução nutritiva durante 24h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 8 repetições e \* difere em  $p \leq 0,05$ . Para 22 e 24h - Controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- a, para 23h- controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94-ab.

#### 4.5.3 Acúmulo de biomassa

A inoculação com ambas as estirpes afetou significativamente o acúmulo de massa seca nos diferentes órgãos (Figura 39a). Aos 17 DAT as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 não diferiram do tratamento controle no acúmulo de biomassa, mas foram diferentes das inoculadas com Ab-Sp245, onde estas incrementaram 57 e 47% na massa seca da parte aérea e raiz, respectivamente. Na coleta antes da fome (21 DAT), 4 dias após a coleta anterior e com suprimento ainda constante de 2,0 mM de N, as plantas inoculadas com Ab-Sp245 continuaram apresentando as maiores médias, porém diferenças significativas só foram encontradas na massa seca de raiz, com aumentos de 50 e 87% quando comparado aos tratamentos Hs-ZAE94 e controle, respectivamente.

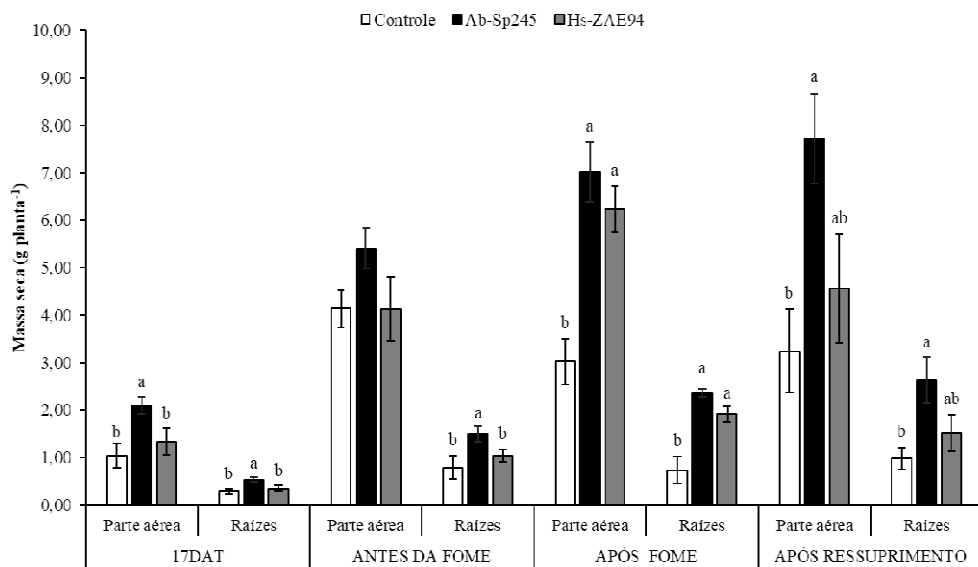
Após o período de privação com fonte de N de 72 h, as plantas inoculadas com ambas as estirpes apresentaram maior biomassa total (Figura 39b), com contribuição tanto da parte aérea quanto das raízes, já que ambos os tecidos foram significativamente diferentes e acumularam mais biomassa que o tratamento controle. Na coleta final, após o ressurgimento com ambas as fontes de N (nitrato e amoniacal) as plantas inoculadas com Ab-Sp245 foram diferentes do controle e acumularam 144% a mais de biomassa. De uma maneira geral, as plantas inoculadas com Ab-Sp245 foram as que apresentaram maior acúmulo de biomassa total nos diferentes tempos amostrados, incrementos que variaram de 96 a 144% na massa seca total da primeira para a última avaliação em relação ao controle. Vale ressaltar, que esse efeito da inoculação na massa de raiz vai ao encontro da morfologia deste órgão, onde as plantas inoculadas com Ab-Sp245 foram as que mais modificaram os diferentes parâmetros radiculares avaliados. Contudo, nenhuma diferença na razão raiz/parte aérea foi encontrada entre os tratamentos nas épocas de amostragem (Figura 39c).

Na coleta após o ressurgimento o diâmetro do colmo seguiu o mesmo comportamento observado para biomassa, sendo superior para Ab-Sp245, seguido da Hs-ZAE94 que mesmo sendo semelhante ao controle na biomassa diferiu deste, incrementos 27 e 18% foram encontrados nesse parâmetro para Ab-Sp245 e Hs-ZAE94, respectivamente (Figura 39e). Por

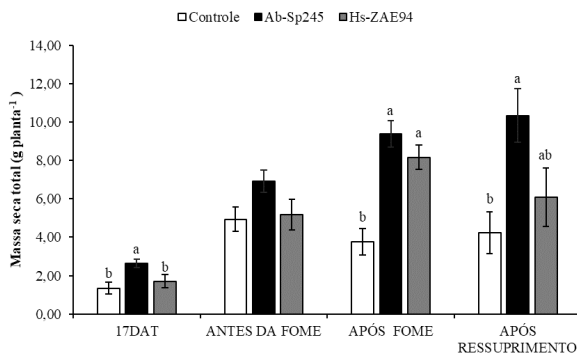
outro lado, Galindo et al. (2019) não encontraram diferenças no diâmetro de colmo de plantas de milho inoculadas com duas estirpes de *A. brasilense*. O mesmo aconteceu com Inagaki et al. (2015), quando plantas de milho foram inoculadas com *A. brasilense* e *H. seropedicae*, porém quando as estirpes foram inoculadas de forma combinada foram capazes de aumentar em 7% o diâmetro do colmo quando comparado ao controle. Esses mesmos autores observaram que quando a área foliar foi avaliada não houve diferença entre os tratamentos inoculados e o controle, apenas a inoculação com ambas as estirpes resultaram em maior área foliar que as plantas inoculadas somente com a *H. seropedicae*, aumento médio de 22%.

Nesse experimento, a área foliar só foi modificada pela inoculação com Ab-Sp245, com incrementos significativos de 112 e 79% quando comprado ao controle e Hs-ZAE94, respectivamente (Figura 39d).

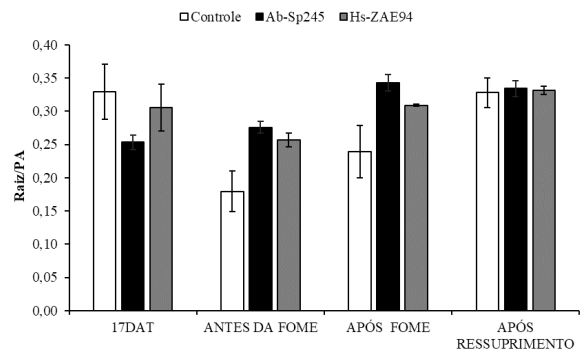
a)



b)



c)

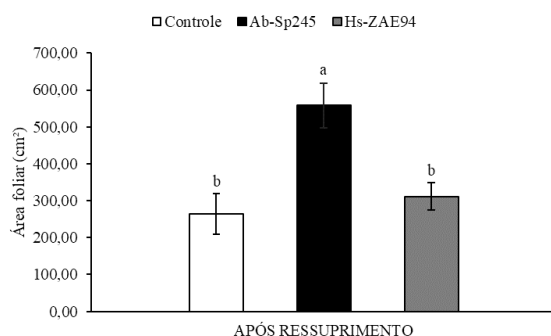


Continua na próxima página a **Figura 39...**

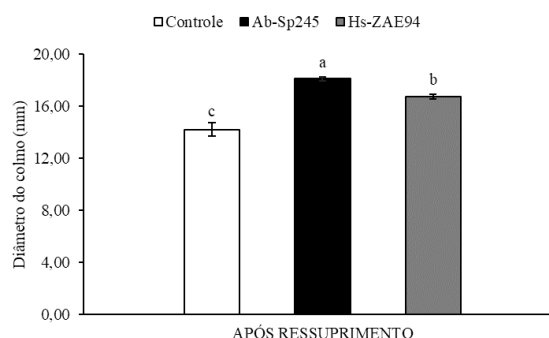


Continuação da **Figura 39**.

d)



e)

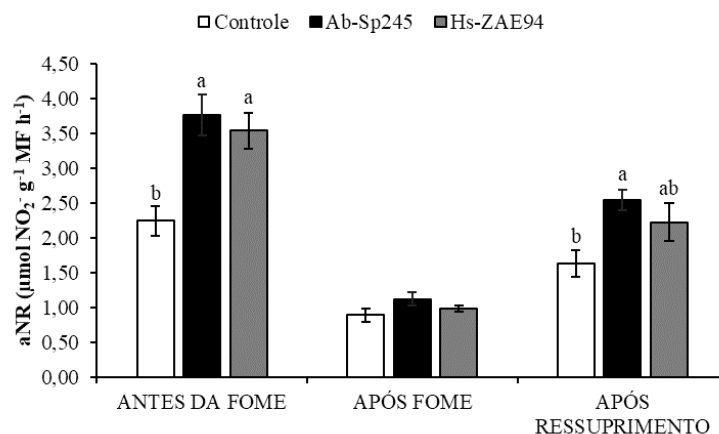


**Figura 39.** Massa seca acumulada, da parte aérea e das raízes das plantas aos 17DAT, antes da fome (21DAT), após fome (24DAT) e após o ressuprimento (25DAT), razão raiz/parte aérea e área foliar e diâmetro do colmo após o ressuprimento. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 5 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.5.4 Atividade enzimática da nitrato redutase

A atividade da NR nas folhas de plantas de milho variou em função da disponibilidade de N e entre os tratamentos avaliados (Figura 40). Na coleta antes da fome onde as plantas estavam sob suprimento constante de N, a inoculação com ambas as estirpes proporcionou incrementos na aNR, cerca de 68 e 58% para Ab-Sp245 e Hs-ZAE94, respectivamente. No entanto, quando as plantas foram submetidas a privação de N por 72 h ocorreu uma significativa redução da aNR, valores três vezes menores dos encontrados na coleta anterior e sem diferença entre os tratamentos. Este fato já era esperado, uma vez que aNR está intimamente relacionada ao fluxo de  $\text{NO}_3^-$  no citosol no momento de sua determinação e não ao  $\text{NO}_3^-$  armazenado nos vacúolos (COOKSON et al., 2005). Breda et al. (2019b) também não observaram diferenças na aNR após a privação de N, tanto nas folhas quanto nas raízes das plantas de milho inoculadas com as mesmas estirpes deste trabalho. Ainda, esses autores só encontraram diferenças na aNR com relação a dose de N aplicada e nenhuma com inoculação, mesmo após o ressuprimento com a fonte de N.

Quando as plantas foram submetidas ao ressuprimento de N a aNR volta a aumentar em todos os tratamentos, fato também esperado pela volta do influxo de  $\text{NO}_3^-$ , mas somente a inoculação com Ab-Sp245 proporcionou um incremento de 56% na atividade desta enzima quando comparada ao controle. Estes resultados estão de acordo com a curva de depleção apresentada para  $\text{NO}_3^-$ , indicando uma maior absorção e assimilação do N disponível por parte das plantas inoculadas com Ab-Sp245. Santos et al. (2019) verificaram que aNR em folhas de cana-de-açúcar responderam positivamente a inoculação com 5 bactérias diazotróficas sendo sempre superior ao controle, tanto na presença quanto ausência de N. Gewehr et al. (2020) avaliaram aNR em plantas de trigo inoculadas ou não com *Azospirillum* e associadas a aplicação de doses crescentes de N (0, 30, 60, 90 e 120 Kg ha<sup>-1</sup>), os resultados demonstraram que aNR foi maior nas plantas inoculadas e que para cada kg de N aplicado o incremento foi 0,0181 nmol  $\text{NO}_2^-$  g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup>.



**Figura 40.** Atividade da enzima nitrato redutase nas folhas das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 avaliadas antes e após a fome, e após o ressuprimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 6 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

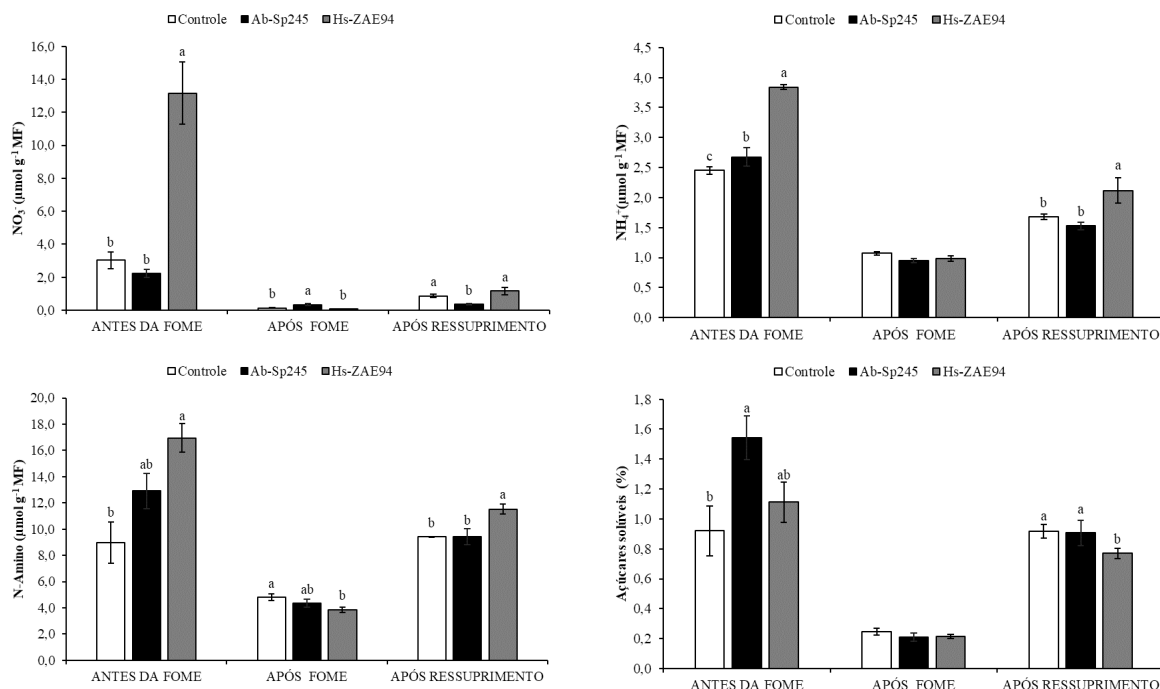
#### 4.5.5 Análise de metabólitos solúveis

O tratamento que recebeu inoculação com Hs-ZAE94 apresentou maiores teores foliares de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e N-Amino na coleta realizada antes da fome (Figura 41). As plantas inoculadas com Ab-Sp245 também apresentaram maiores teores de  $\text{NH}_4^+$  quando comparadas ao controle, corroborando com os maiores valores da aNR nesta mesma coleta para ambas as estirpes. Por outro lado, as plantas inoculadas com Ab-Sp245 apresentaram 6 vezes menos  $\text{NO}_3^-$  e 43% menos  $\text{NH}_4^+$  nos tecidos foliares quando comparado ao Hs-ZAE94.

A deficiência de N por 72 h consumiu grande parte do  $\text{NO}_3^-$  que estava nos tecidos foliares das plantas em todos os tratamentos, sendo a maior redução para o tratamento com Hs-ZAE94. Contudo, a inoculação com Ab-Sp245 proporcionou maior acúmulo deste em 161 e 467% quando comparado aos tratamentos controle e Hs-ZAE94, respectivamente, isso pode indicar que em condições de deficiência de  $\text{NO}_3^-$  as plantas inoculadas com essa estirpe possuem maior capacidade de armazenar  $\text{NO}_3^-$ , em outras palavras, um maior pool de reserva e assim podem usar de forma mais eficiente o N. Em trabalhos com diferentes culturas, foi sugerido que o acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  em plantas sob condições limitantes de N é uma característica estratégica muito importante para o desenvolvimento vegetal durante a fase reprodutiva (HIREL et al., 2007; KANT et al., 2008; SPERANDIO et al. 2014).

Após o ressuprimento com N, as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 e controle aumentaram significativamente os teores de  $\text{NO}_3^-$ , cerca de 20 e 6 vezes, respectivamente, enquanto que as plantas inoculadas com Ab-Sp245 manteve os mesmos teores mesmo absorvendo mais  $\text{NO}_3^-$  que o controle conforme observado na curva de depleção, isso indica que todo o  $\text{NO}_3^-$  da parte aérea está sendo assimilado e corrobora com os maiores valores de atividade da NR. Nas plantas inoculadas com Hs-ZAE94 há um aumento nos teores de  $\text{NH}_4^+$  e N-amino, condizente com a redução de  $\text{NO}_3^-$  que se iniciou com a alta aNR para a mesma coleta, assim como os teores de açúcares solúveis que são significativamente mais baixos para esse tratamento. Para evitar possíveis efeitos tóxicos em função da presença de  $\text{NH}_4^+$  livre nos tecidos, as plantas necessitam de esqueletos de carbono para assimilá-lo, sintetizando aminoácidos e amidas, e a fonte desses esqueletos de carbono seriam os carbonos prontamente assimiláveis como os açúcares solúveis (FERNANDES, 1978; BORGES et al., 2009). Assim, os elevados teores de N-amino justificam a queda nos teores de açúcares solúveis para esse

mesmo tratamento. Breda et al. (2019b) também observaram maiores teores de  $\text{NH}_4^+$  e menores de açúcares nas folhas das plantas de milho inoculadas com Hs-ZAE94 quando comparado com as plantas inoculadas com Ab-Sp245.



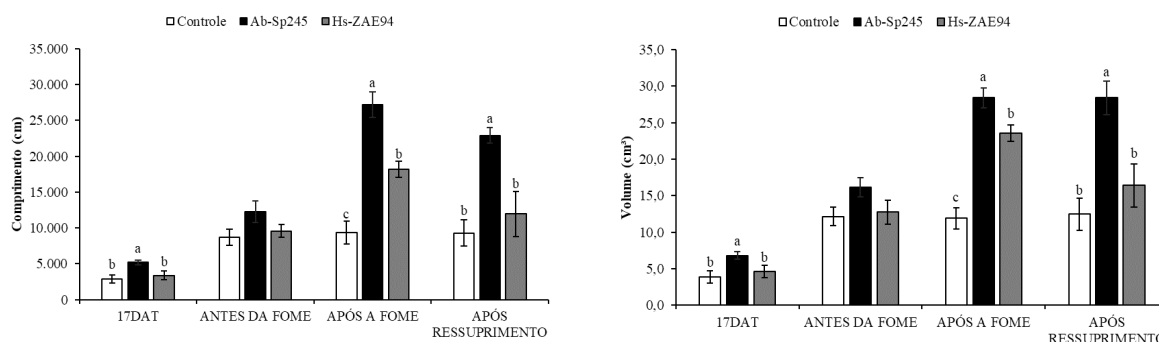
**Figura 41.** Teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , N-amino e açúcares solúveis nas folhas das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 antes e após a fome e após o ressuprimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.6 Avaliação de parâmetros radiculares

Aos 17 DAT as plantas inoculadas com Ab-Sp245 apresentaram maiores valores para quase todos os parâmetros analisados, não diferindo apenas no parâmetro diâmetro médio (Figura 42). Antes de aplicar a fome (21 DAT) nenhuma diferença foi encontrada entre os tratamentos. Porém, após passarem por período de privação de N (72 h) as raízes das plantas inoculadas com ambas as estirpes apresentam uma resposta plástica e se expandiram em busca de nutrientes de forma mais eficiente que o controle não inoculado. Novamente as plantas inoculadas com Ab-Sp245 apresentaram médias superiores para os parâmetros avaliados, seguido do tratamento inoculado com Hs-ZAE94 que não foi diferente do anterior para diâmetro médio. Já é apontado na literatura que determinadas estirpes de *Azospirillum* tem a capacidade de perceber sinais fisiológicos produzidos pelas plantas sob condições de estresse ambiental, como a limitação de água e nutrientes, e então modificam seu metabolismo e aumentam a produção de fitohormônios para coordenar uma resposta única junto a planta (CASSÁN et al., 2014). Ainda, de acordo com Cassán et al. (2020) o principal resultado da inoculação com *Azospirillum* são as mudanças na arquitetura radicular, desencadeadas por essa produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal, principalmente AIA (ácido indol-3-acético). Marques et al. (2020) observaram maior comprimento e área superficial das raízes de plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*. Vale ressaltar que as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 apesar de diferentes da Ab-Sp245 também diferiram do controle com valores

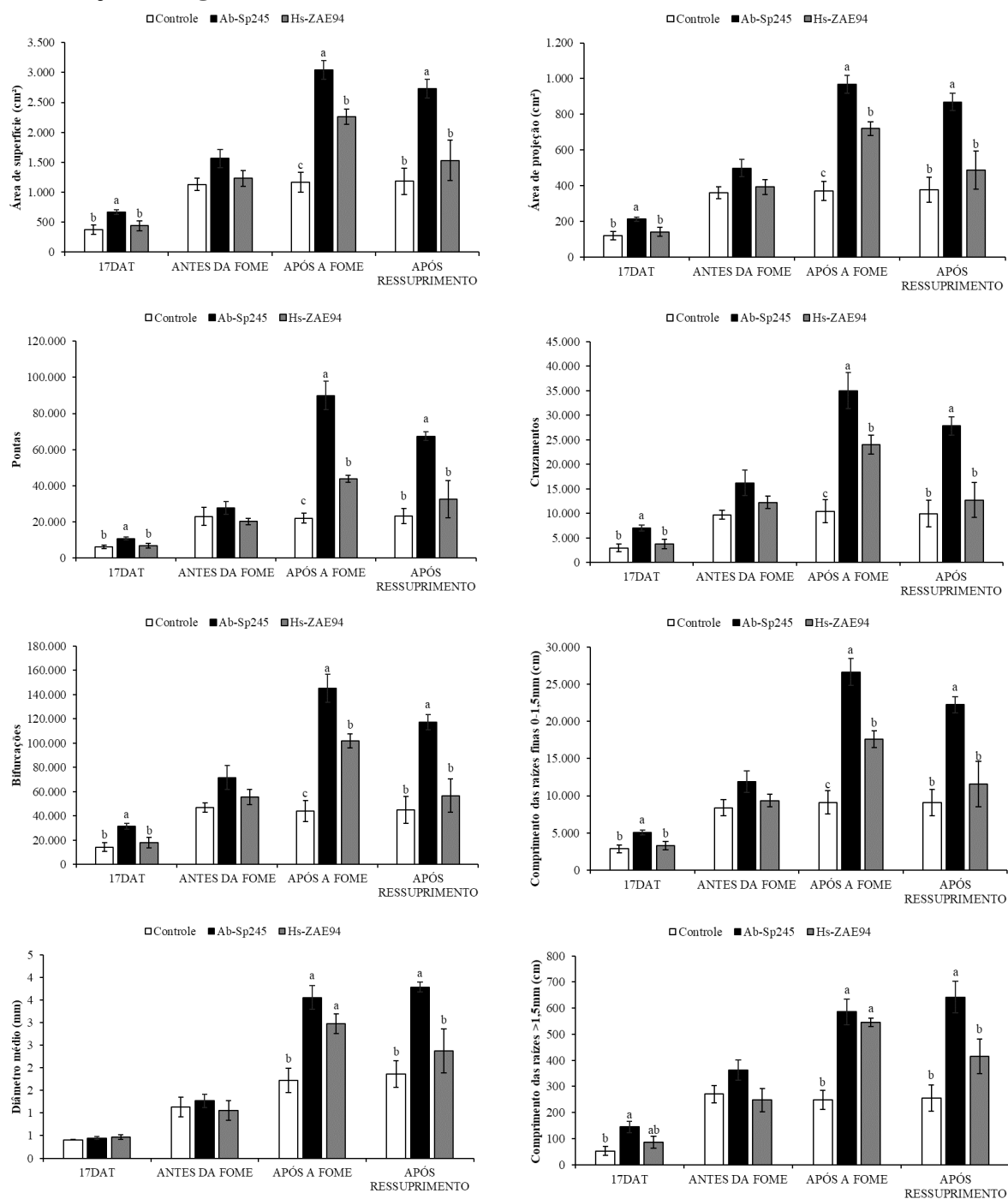
médios superiores para todos os parâmetros, demonstrando sua alta capacidade adaptativa frente a deficiência de N. Alves et al. (2021) observaram que a inoculação com Hs-ZAE94 aumentaram em 25% o volume de raízes e 9% o comprimento de raízes finas (0-1,5mm) em milho refletindo em 27 e 8% no ganho de massa seca de parte aérea e raízes, respectivamente. Essa contribuição da inoculação no comprimento de raízes finas (0-1,5mm) também foi observado nesse experimento para ambas as estirpes, com destaque para Ab-Sp245 que apresentou incrementos máximos de 193% com relação ao controle, enquanto Hs-ZAE94 incrementou 93%. Rosolem et al. (1994) verificaram que um genótipo de milho com alta eficiência na aquisição e utilização de nutrientes do solo apresentou maior proporção de raízes finas. Além disso, conforme verificado em estudos anteriores a maior contribuição para o comprimento total radicular de plantas de milho foi das raízes com classe de diâmetro entre 0,2 e 0,4 mm (COSTA et al., 2002), aqui foi verificado uma correlação forte e positiva entre o comprimento total das raízes com o comprimento na classe de raízes finas (Tabela 6). Esse aumento no comprimento das raízes finas também foi observado nas plantas inoculadas do experimento IV, onde as estirpes aumentaram em até 46 e 63% para Hs-ZAE94 e Ab-Sp245, respectivamente, este parâmetro ao longo do período de 38 dias após o plantio. Por outro lado, no experimento I quando as plantas foram submetidas a doses contrastantes de N em hidroponia, somente a inoculação com Ab-Sp245 proporcionou incremento nessa classe de diâmetro no final de 32 dias após a transferência para o sistema hidropônico diferenças essas encontradas somente na dose alta, pois nenhuma foi encontrada na dose baixa. Já no experimento II também sob doses contrastantes de N, mas em substrato de areia e vermiculita, as plantas inoculadas com Ab-Sp245 aumentaram o comprimento de raízes finas em ambas as condições de N, enquanto a Hs-ZAE94 só proporcionou incrementos na dose alta de N. A partir disso, entende-se que a inoculação com Ab-Sp245 pode contribuir de maneira mais efetiva para aumento de raízes finas em condição de baixo ou nenhum suprimento de N.

Na coleta final, após o ressuprimento, as plantas inoculadas com Ab-Sp245 mantém o comportamento observado nas coletas anteriores e se destaca com os maiores valores médios para todos os parâmetros analisados. Por outro lado, as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 não diferiram do controle em nenhum dos parâmetros. Com base nessas observações, é possível compreender os demais resultados encontrados nesse experimento para plantas inoculadas com Ab-Sp245, como absorção mais intensa de N, maior aNR, biomassa e acúmulo de N.



Continua na próxima página a **Figura 42...**

Continuação da **Figura 42.**



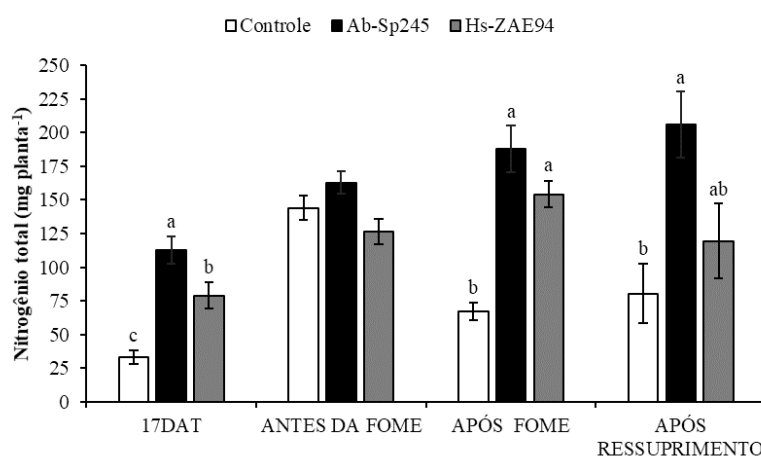
**Figura 42.** Arquitetura das raízes analisadas pelo software WinRHIZO Pro<sup>TM</sup> de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 17 DAT, antes e após a fome e após ressurgimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 6.** Matriz do coeficiente de correlação de Pearson das variáveis biomassa e arquitetura radicular na coleta final (25 DAT) das plantas de milho inoculadas ou não.

Variáveis <sup>1</sup>	PSPA	PSR	CT	AP	AS	DM	V	P	B	C	CT≤1,5	CT>1,5
PSPA	1,00											
PSRAIZ	0,97*	1,00										
CT	0,93*	0,89*	1,00									
AP	0,96*	0,93*	0,99*	1,00								
AS	0,96*	0,93*	0,99*	1,00*	1,00							
DM	0,91*	0,84*	0,93*	0,93*	0,93*	1,00						
V	0,97*	0,95*	0,97*	0,99*	0,99*	0,90*	1,00					
P	0,86*	0,82*	0,97*	0,94*	0,94*	0,93*	0,90*	1,00				
B	0,9*	0,87*	0,98*	0,98*	0,98*	0,88*	0,97*	0,94*	1,00			
C	0,88*	0,85*	0,98*	0,97*	0,97*	0,87*	0,95*	0,94*	1,00*	1,00		
CT≤1,5	0,93*	0,89*	1,00*	0,99*	0,99*	0,93*	0,96*	0,97*	0,98*	0,98*	1,00	
CT>1,5	0,96*	0,94*	0,91*	0,94*	0,94*	0,90*	0,96*	0,88*	0,90*	0,88*	0,91*	1,00

\* indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ); <sup>1</sup>PSPA= peso seco da parte aérea; PSR= peso sedo da raiz; CT= comprimento total; AP= área de projeção; AS= área superficial; DM= diâmetro médio; V= volume; P= n° de pontas; B= bifurcações; C= cruzamentos; CT≤1,5= comprimento total das raízes finas (0-1,5mm); CT>1,5= comprimento total das raízes com diâmetro maior que 1,5 mm.

O conteúdo de N total na parte aérea foi afetado de forma positiva pela inoculação (Figura 43). Os tratamentos inoculados com ambas as estirpes foram significativamente superiores nas datas amostradas, exceto aos 21 DAT (antes da fome de N) que não diferiram do controle, sendo este o mesmo comportamento observado para as variáveis morfologia de raiz e acúmulo de biomassa. Aos 17 DAT, os tratamentos com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 proporcionaram um incremento de 241 e 139%, respectivamente, no acúmulo de N na parte aérea em relação ao controle. Porém, nessa mesma coleta os tratamentos inoculados diferiram entre si, e as plantas inoculadas com Ab-Sp245 aumentaram em 43% o N total em comparação a Hs-ZAE94. Após o período de restrição de N, ambas as estirpes foram diferentes do controle apresentando as maiores médias no conteúdo de N, comportamento que se mantém na coleta final após o ressuprimento com ambas as fontes de N, embora o conteúdo das plantas inoculadas com Hs-ZAE94 seja semelhante ao do controle não inoculado. Pereira et al. (2015) observaram diferenças no conteúdo foliar de N e no peso seco de raízes e parte aérea quando inoculados com *Azospirillum*.



**Figura 43.** Conteúdo de nitrogênio total na parte aérea das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aos 17DAT, antes e após a fome, e após ressuprimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

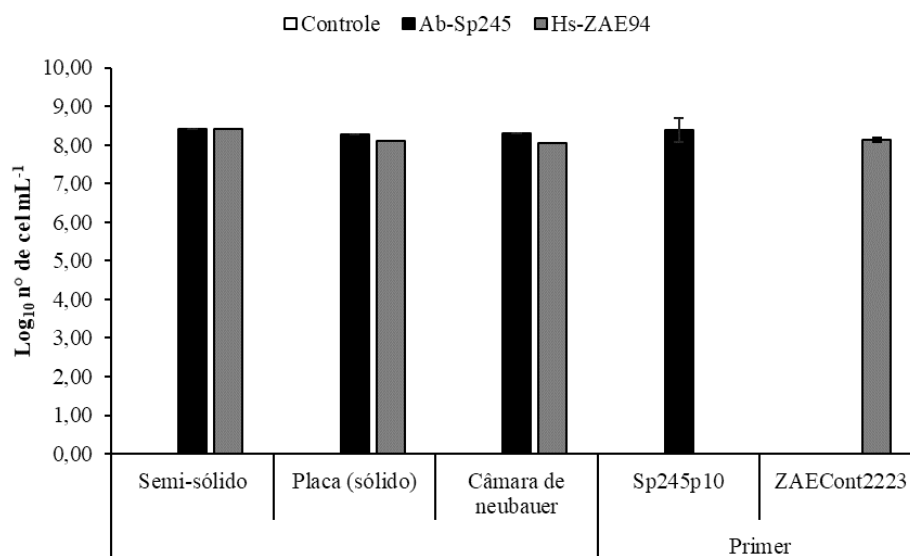
#### 4.6 Avaliação da Expressão Gênica de Isoformas de PMH<sup>+</sup>- ATPases, Transportadores de Nitrato de Alta Afinidade e Enzimas do Ciclo de N: Experimento VI

##### 4.6.1 Contagem de bactérias diazotróficas

Os inoculantes foram aplicados de forma a disponibilizar a concentração bacteriana de  $10^8$  cel planta<sup>-1</sup>, a contagem dos mesmos foi realizada por diferentes metodologias (Figura 44). Houve diferença entre os métodos de contagem somente para a Hs-ZAE94, onde a contagem em câmara de Neubauer foi menor quando comparado aos métodos de contagem em placa e qPCR, mas mantendo a mesma ordem de grandeza. A contagem em câmara de Neubauer é um método de contagem direta de células, frequentemente utilizado para quantificar diversos microrganismos, principalmente, quando é necessário realizar a normalização da concentração de células em uma determinada amostra. Spolaor et al. (2016), utilizou esta técnica para contagem e normalização do inoculante com *A. brasilense* para milho, assim como Matoso et al. (2019), que verificou a densidade populacional no inoculante aplicado em cana-de-açúcar por este mesmo método. De acordo com Madigan et al. (2016), na contagem microscópica é

difícil alcançar precisão, mesmo que sejam realizadas repetições, um erro médio percentual deve adotado de  $5,2 \pm 8,8\%$  (LUCARINI et al., 2004).

A contagem do inoculante através da qPCR só detectou a estirpe alvo no respectivo inoculante produzido a partir dela e confirmou a população inoculada nas raízes de plântulas de milho, reconhecendo ainda a sensibilidade de cada par de primer para as estirpes alvos do trabalho.

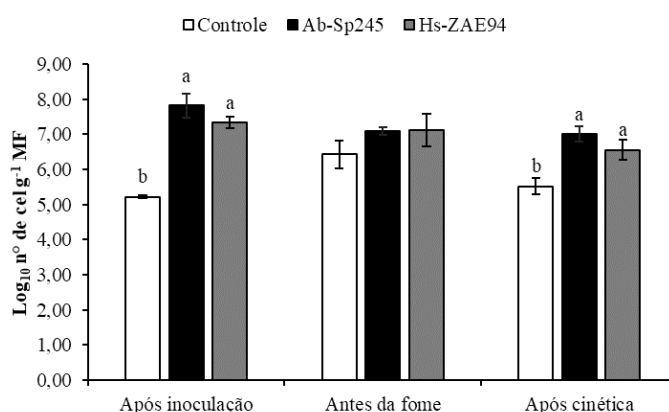


**Figura 44.** Quantificação das bactérias Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 realizadas pelas técnicas do NMP, contagem padrão em placas, câmara de Neubauer e qPCR presentes no inoculante. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 3 repetições.

A contagem dos tecidos de raízes de milho confirmou que as plantas inoculadas mantiveram uma população superior quando comparada ao tratamento controle após a inoculação e o ensaio de cinética (Figura 45). Já é sabido que a técnica do NMP com o uso de meios de cultivos semi-sólidos livres de nitrogênio é comumente utilizada para isolar e estimar a população de bactérias diazotróficas em diversas culturas (BALDANI et al, 2014). Apesar do meio semi-sólido NFB ter sido desenvolvido originalmente para *Azospirillum*, a estirpe de *H. seropedicae* utilizada neste trabalho também se desenvolve nele, sem prejuízos ao seu crescimento, não sendo assim possível discriminar a população de ambas as estirpes (ou outros diazotróficos) quando ele é utilizado.

A partir daí, dentre as ferramentas conhecidas na área de biologia molecular capazes de quantificar microrganismo em amostras do tecido vegetal decidiu-se utilizar a qPCR. Essa técnica é considerada sensível, rápida e eficaz para monitorar e quantificar microrganismos em interação com plantas, mas é imprescindível o desenvolvimento de um primer (COUILLEROT et al., 2010; CUNHA et al., 2020; SØRENSEN et al., 2009). Para isso, utilizou-se par de primer estirpe-específico, para ambas as estirpes inoculadas neste trabalho, sendo possível identificá-las e quantificá-las de forma independente.

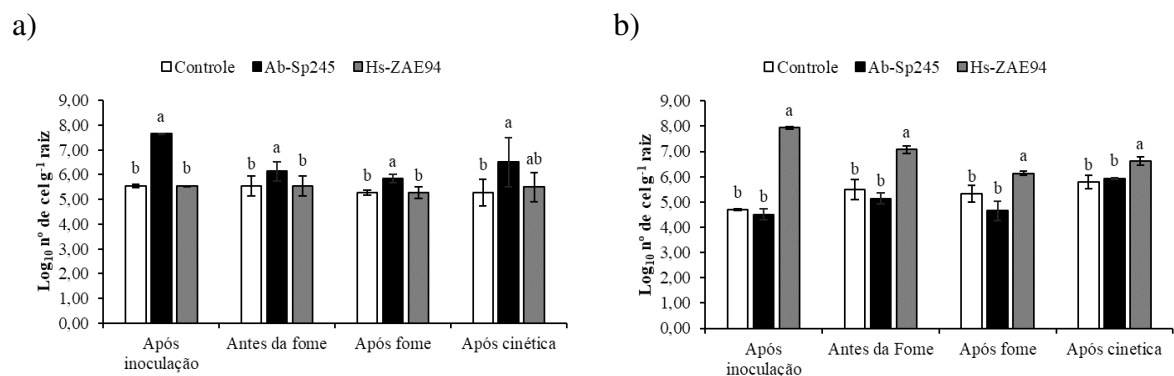




**Figura 45.** Quantificação das bactérias pela técnica NMP presente nos tecidos de raiz das plantas de milho após a inoculação, antes da fome e após o ensaio de cinética com  $\text{NO}_3^-$ . As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 3 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

A quantificação das estirpes Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 por qPCR nas raízes de plantas de milho inoculadas ou não com as respectivas estirpes pode ser observada na Figura 46 (a, b), respectivamente. Nota-se que em quase todas as coletas, os tratamentos inoculados com as estirpes alvos apresentaram número de células  $\text{g}^{-1}$  de massa fresca superior aos demais tratamentos, porém somente após o final do ensaio de cinética (Figura 46a), a população de Ab-Sp245 foi igual ao tratamento inoculado com Hs-ZAE94, isto sugere que as condições experimentais relativas a estratégia para a indução do sistema de transporte de alta afinidade do  $\text{NO}_3^-$  possa ter favorecido a população endógena nativa de Ab-Sp245 em plantas inoculadas com Hs-ZAE94, demonstrando uma maior competência daquela estirpe em função desta neste caso.

Além disso, observa-se que a quantificação da estirpe de Hs-ZAE94 nas plantas controle cresce ao longo do experimento, cerca de 23%, comparando o  $\log_{10}$  n° de cel  $\text{g}^{-1}$  de massa fresca logo após a inoculação e ao final do ensaio de cinética. Enquanto, que a população de Ab-Sp245 praticamente se mantém, não mudando a ordem de grandeza neste mesmo tratamento. Um fato interessante é que ambas as estirpes alvos após o período de inanição (fome de N) reduzem as populações significativamente nos tratamentos inoculados com elas, porém se mantem no tratamento controle. Isso sugere que a inoculação ainda não está desassociada da fertilização nitrogenada em milho, ou seja, para um melhor estabelecimento das interações e que as populações inoculadas se mantenham mais altas faz-se necessário a presença de nitrogênio. Breda et al. (2016) verificaram efeito positivo na produtividade de milho inoculado com Hs-ZAE94 somente em combinação com doses de N mineral. Morais et al. (2016) mostraram que a manutenção de nitrogênio garante maior produtividade milho mesmo na presença *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) na região do Cerrado. Ademais, Alves et al. (2020) mostraram que a inoculação em milho com as mesmas estirpes utilizadas neste trabalho associada a uma dose de  $100 \text{ kg ha}^{-1}$  de N aumentou a produtividade.



**Figura 46.** Quantificação das bactérias Ab-Sp245 (a) e Hs-ZAE94 (b) pela técnica de qPCR presente nos tecidos de raiz das plantas de milho após a inoculação, antes e após a fome, e após o ensaio de cinética com  $\text{NO}_3^-$ . As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Couillerot et al. (2010b) verificou que a quantificação da população bacteriana da estirpe de CRT1 de *A. lipoferum* detectada na rizosfera de plantas de milho inoculadas via semente, em diferentes tipos de solo e casa de vegetação, variou de 4 a 6  $\log_{10}$  UFC  $\text{g}^{-1}$ . Ainda, monitorando as estirpes UAP-154 e CFN-535 de *A. brasilense* foram observadas entorno de 6  $\log_{10}$  UFC equivalentes por sistema radicular e 5  $\log_{10}$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de raiz seca (COUILLEROT et al. 2010a). Nossos resultados mostraram quantidades semelhantes, para ambas as estirpes inoculadas em milho, conforme também quantificado por qPCR.

Apesar de ter sido encontrada certa correlação entre os resultados através da técnica do NMP e qPCR, Couillerot et al. (2010b) aponta que a adição de DNA extraído do tecido de raiz na construção da curva-padrão pode aumentar o limite de detecção da quantificação da estirpe específica pela qPCR. Isso foi verificado por Soares (2020) em tecidos das raízes de braquiária em condição de campo e milho em casa de vegetação, onde as médias de quantificação para a curva padrão com tecido foram menores quando comparadas com a curva somente com DNA bacteriano.

#### 4.6.2 Acúmulo de biomassa e nitrogênio total

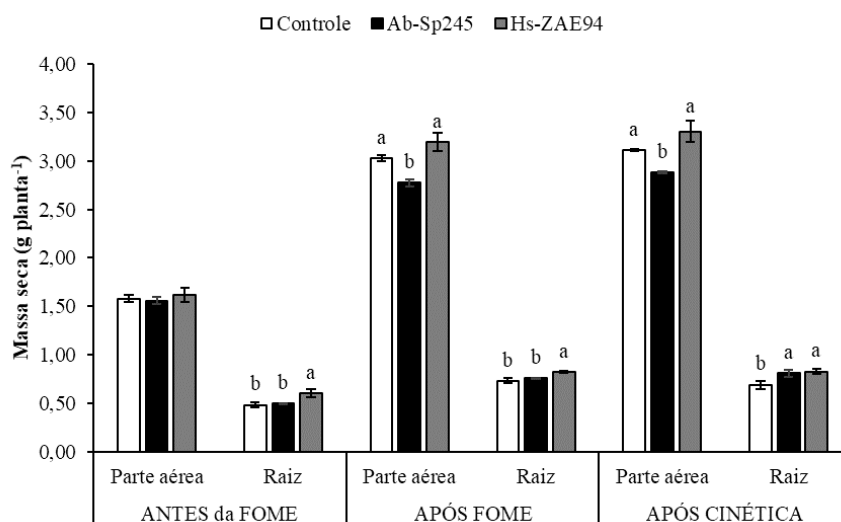
O acúmulo de biomassa foi superior nas plantas inoculadas com a Hs-ZAE94 quando comparada aos demais tratamentos após a fome e o ensaio de cinética (Figura 47b). O maior percentual deste acúmulo foi na parte aérea (Figura 47a), cerca de 80% para as duas coletas, essa relação se manteve próxima nos demais tratamentos, porém com significativa queda na massa seca total acumulada. O maior investimento no crescimento de parte aérea pelas plantas inoculadas com Hs-ZAE94 pode ter contribuído para a produção de fotoassimilados, essenciais para o desenvolvimento e produtividade. Breda et al. (2019b) também verificaram este mesmo cenário para plantas inoculadas com Hs-ZAE94 em hidroponia, porém com taxa de acúmulo na parte aérea de 56%.

Na coleta antes da fome não houve diferença no acúmulo total de biomassa entre os tratamentos, só foram encontradas diferenças significativas para massa seca de raiz, sendo os ganhos do tratamento inoculado com Hs-ZAE94 de 25 e 22% quando comparado ao controle e Ab-Sp245, respectivamente, dados estes que corroboram com os resultados encontrados para morfologia de raízes. A inoculação com esta mesma estirpe de *H. seropedicae* tem sido alvo de diversas pesquisas e tem demonstrado incrementos significativos no acúmulo de massa seca de raízes e parte aérea em plantas de milho (Breda et al. 2019b; ARAÚJO et al., 2013; ARAÚJO

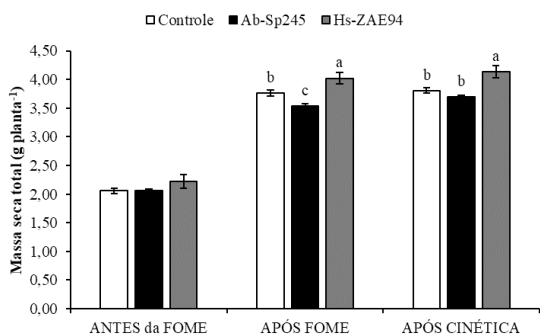
et al., 2015). Alves et al. (2015) mostraram que plantas de milho inoculadas com ela aumentaram em 34% o rendimento em condição de campo, dependendo do genótipo, e ainda revelou 37% de contribuição de FBN para mesmo híbrido utilizado neste trabalho.

A razão raiz/parte aérea foi maior para a Hs-ZAE94 antes da fome, demonstrando que mesmo sob a presença de N suficiente, a inoculação desta estirpe foi mais eficiente para proporcionar um maior crescimento radicular (Figura 47c). A mudança de condição experimental sob N suficiente para privação total deste nutriente alterou a relação raiz:parte aérea, o que já era esperado uma vez que as plantas tendem a alocar mais biomassa para o órgão a capturar o recurso limitante de acordo com o conceito de equilíbrio funcional (BROUWER, 1983). As plantas inoculadas com a Ab-Sp245 aumentaram seu sistema radicular quando submetidas a 72 h de privação de N, seguido do ressuprimento com  $\text{NO}_3^-$ , quando comparado ao controle não inoculado, ou seja, as raízes deste cresceram proporcionalmente menos que a parte aérea e isso pode comprometer a capacidade de absorção de nutrientes. Esse maior investimento em biomassa de raiz em condições limitantes além de demonstrar resposta ao estresse nutricional resulta em maior capacidade de absorção de nutrientes.

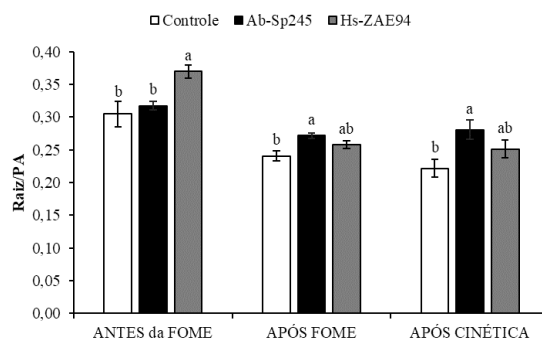
a)



b)



c)



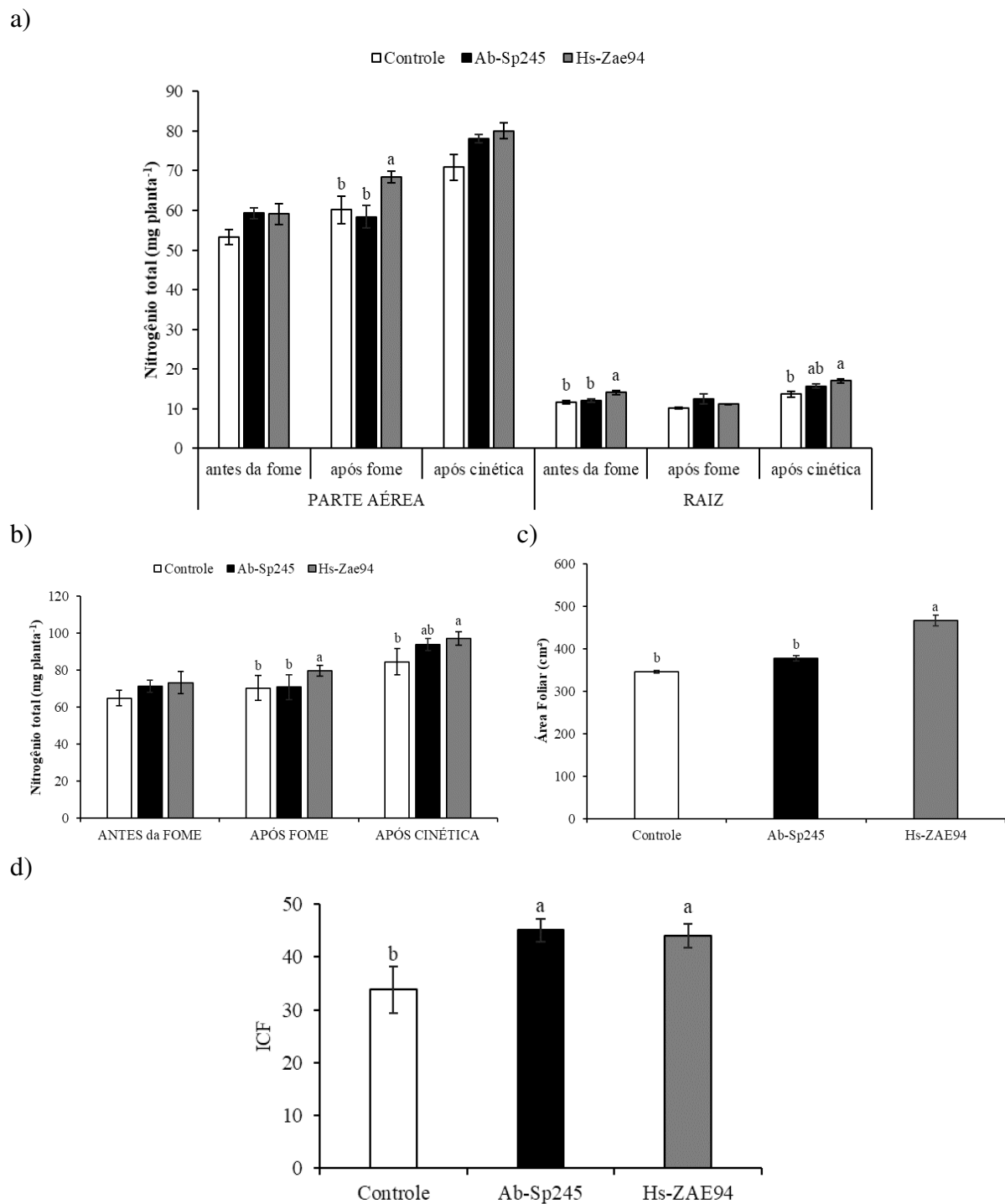
**Figura 47.** Massa seca acumulada, da parte aérea e das raízes das plantas antes da fome (15DAT), após fome (18DAT) e após cinética (18DAT) e razão raiz/parte aérea. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

O tratamento inoculado com Hs-ZAE94 acumulou mais N na raiz na coleta antes da fome, cerca de 21 e 17% quando comparado ao tratamento controle e Ab-Sp245,

respectivamente (Figura 48a). Por outro, este comportamento não foi observado na parte aérea e no N total acumulado nessa mesma coleta (Figura 48a e b). Ainda assim, as plantas inoculadas com essa mesma estirpe acumularam mais N total quando compara ao controle nas demais coleta, sendo similar ao tratamento com Ab-Sp245 após o ensaio de cinética (Figura 48b). Araújo et al. (2013) e Alves et al. (2015) também encontraram maior acúmulo de N para as plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae*. O aumento do teor de N em plantas inoculadas com bactérias dizotróficas pode ser resultado tanto da FBN quanto dos mecanismos de promoção de crescimento, que podem maximizar a capacidade das plantas em absorver nutrientes (DOBBELAERE et al., 2001).

Ainda, ao final do ensaio de cinética as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 apresentaram maior área foliar (Figura 48c), 35 e 24% de aumento com relação ao controle e Ab-Sp245, respectivamente, esses dados corroboram com o maior acúmulo de biomassa encontrado. O desenvolvimento de área foliar é considerado um importante preditor na produção agrícola para potencializar a intercepção de radiação solar e alcançar altas produtividades da cultura (SINCLAIR et al. 2004). Cunha et al. (2014) e Mumbach et al. (2017) não observaram diferenças na área foliar de plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* assim como este estudo.

O índice de clorofila nas folhas foi superior para as plantas inoculadas com ambas as estirpes (Figura 48d), cerca de 32% em relação ao controle, este parâmetro é considerado um importante indicativo da nutrição nitrogenada e foi ao encontro dos dados de acúmulo de N para a mesma coleta. Barassi et al. (2008) relataram que as plantas inoculadas com *Azospirillum* apresentaram melhoria em parâmetros fotossintéticos das folhas, como o teor de clorofila, assim como Bashan et al. (2006) que observaram incrementos em vários pigmentos fotossintéticos dentre eles a clorofila a e b. Especialmente em milho esse maior teor de clorofila foi encontrado nas plantas inoculadas com *A. brasilense* (JORDÃO et al. 2010; KAPPES et al. 2013; QUADROS et al. 2014). Galindo et al. (2016) também constatam maiores índices de clorofila foliar em plantas de milho inoculadas com duas estirpes de *A. brasilense* em duas safras consecutivas. Daughtry et al. (2000) encontraram boa correlação entre a área foliar e a concentração de clorofila nas folhas de milho, demonstrando sua relação com a absorção de luz e nutrientes. A correlação de pearson entre essas duas variáveis encontrada aqui foi 0,49, porém não significativa.



**Figura 48.** Nitrogênio total, da parte aérea e das raízes das plantas de milho antes da fome (15 DAT), após fome (18 DAT) e após cinética (18 DAT). A área foliar e ICF aos 18 DAT. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.6.3 Atividade enzimática da GS

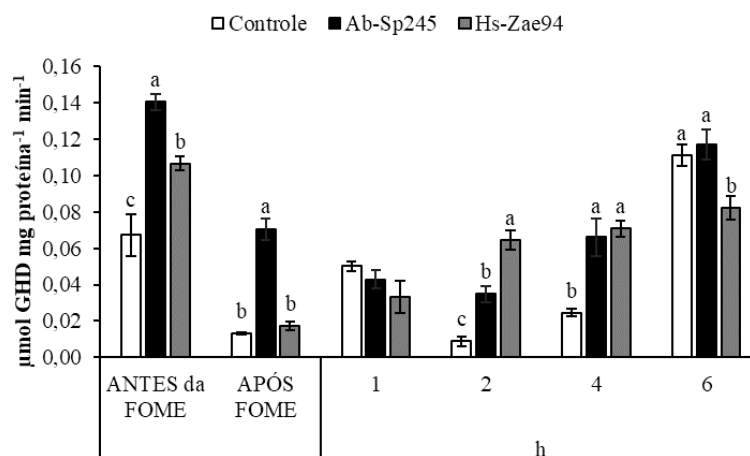
Na coleta antes da fome, ocasião em que as plantas estavam supridas com 2,0 mM de N, a aGS foi maior nas raízes das plantas inoculadas com ambas as estirpes (Figura 49), sendo os tratamentos com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 aumentaram em 109 e 64%, respectivamente, a

atividade quando comparadas ao tratamento controle. Trabalhos anteriores demonstraram a existência de correlação positiva entre a inoculação com *Azospirillum* e a atividade da GS nas raízes de plantas de milho (MACHADO et al., 1998; RIBAUDO et al. 2001). Além disso, Ribaudó et al. (2006) relataram que a atividade da GS foi mais evidente nas raízes do que nas folhas de plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae*, cerca de 3 vezes superior quando comparado ao tratamento controle, comportamento também observado no experimento I para as plantas cultivadas sob baixo N.

A segunda coleta ocorreu após 72 h da retirada de N da solução nutritiva (após fome), nessa circunstância é possível observar uma redução significativa na aGS de todos os tratamentos. As plantas inoculadas com Ab-Sp245 reduziram em 50% a aGS em comparação a coleta anterior, mas apesar disso se manteve superior aos demais tratamentos. Santos et al. (2019) observaram maior atividade da GS somente nas folhas de cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas, tanto em condição de alto N quanto após 72 h de privação de N na solução nutritiva e nenhuma diferença foi encontrada nas raízes. Canellas et al. (2013) também não observaram mudanças na aGS em raízes de plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae*, inclusive não ocorreu nenhum estímulo significativo em todos os demais tratamentos que estavam associados a inoculação com essa bactéria.

Após este período de inanição com N, as plantas foram suprimidas novamente com este nutriente, porém com concentração baixa (0,5 mM) na forma de  $N-NO_3^-$ . Nessas condições, a aGS foi afetada, as plantas inoculadas com Ab-Sp245 reduziram em 65% sua atividade e não diferiram na primeira hora, mas após 2 e 4 h as plantas inoculadas se mantêm com aGS mais alta que o controle. Ao final do ensaio de cinética, as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 tiveram a aGS 46% mais baixa que os demais tratamentos. Essa maior aGS sob baixo suprimento de N é um indicativo de que está ocorrendo maior produção de amônio, mas vale ressaltar que garantir a atividade da GS mais alta, nessas condições, ajuda a manter as concentrações de amônio nas células mais baixas para evitar seus efeitos tóxicos (LOTHIER et al., 2011). Ainda, de acordo com YI-BO et al. (2010), a maior atividade da GS contribui para o melhor desenvolvimento em condições de baixo suprimento de N.

Em plantas, a GS é uma enzima chave responsável por catalisar a reação entre amônio e glutamato para a formação de glutamina, com gasto de ATP. Dessa forma, a síntese de glutamina pela GS é considerada base de sustentação da produtividade das plantas e por este motivo é comparável a nível de importância com a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) (UNNO et al., 2006; BUCHANAN et al., 2000). A seleção de genótipos de milho é baseada na menor acumulação de  $NH_4^+$  livre no tecido, uma vez que o mesmo se torna tóxico em altos níveis, e na maior atividade da enzima GS no tecido verde da planta, indicando que aGS pode ser um bom parâmetro para selecionar genótipos responsivos a aplicação de N (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000). Correlações significativas também foram encontradas entre a aGS e características agrônômicas em plantas de milho, como a produção e peso de grãos (MACHADO et al., 1992; HIREL et al., 2001). Magalhães & Machado (1995) indicaram que a determinação da atividade desta enzima pode ser utilizada como um parâmetro auxiliar na seleção de genótipos mais eficientes na utilização de N. Nesse contexto, a inoculação com bactérias diazotróficas pode auxiliar as plantas através de mecanismo de regulação de N na maximização de benefícios para a produção agrícola (CARVALHO et al., 2014).



**Figura 49.** Atividade da enzima glutamina sintetase nas raízes das plantas de milho antes da fome (15 DAT), após fome (18 DAT) e após o ressurgimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.6.4 Análise de metabólitos solúveis

Os teores das frações nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , N-amino) e açúcares solúveis totais foram estimados nas folhas e raízes das plantas de milho (Figuras 50a, b, c, d). Na coleta antes da fome, quando as plantas estavam supridas com 2,0 mM de N, o tratamento inoculado com Ab-Sp245 apresentou maiores teores de  $\text{NO}_3^-$  tanto nas folhas quanto nas raízes quando comparado aos demais tratamentos, com aumento entorno de 65% (Figura 50a). Com 72 h sem N na solução nutritiva (após a fome), observa-se que os níveis de  $\text{NO}_3^-$  decresceram drasticamente, onde o controle manteve valores similares ao inoculado com Hs-ZAE94, e diferindo do inoculado com Ab-Sp245 nas raízes, essa característica pode ser uma resposta adaptativa das plantas inoculadas com Ab-Sp245 a ambientes com baixo ou transitório suprimento de N. Após o ressurgimento com 0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  observa-se um aumento gradativo nos teores deste íon nas raízes quando comparado as folhas de todos os tratamentos, sendo esses teores superiores nas plantas inoculadas com ambas as estirpes após 6 h. Hirel et al. (2001) demonstraram que o aumento da produtividade de genótipos de milho foi devido a sua habilidade em acumular  $\text{NO}_3^-$  em suas folhas durante o crescimento vegetativo. Os dados encontrados nesse experimento demonstram o potencial das plantas inoculadas com Ab-Sp245 em acumular este íon para posterior utilização.

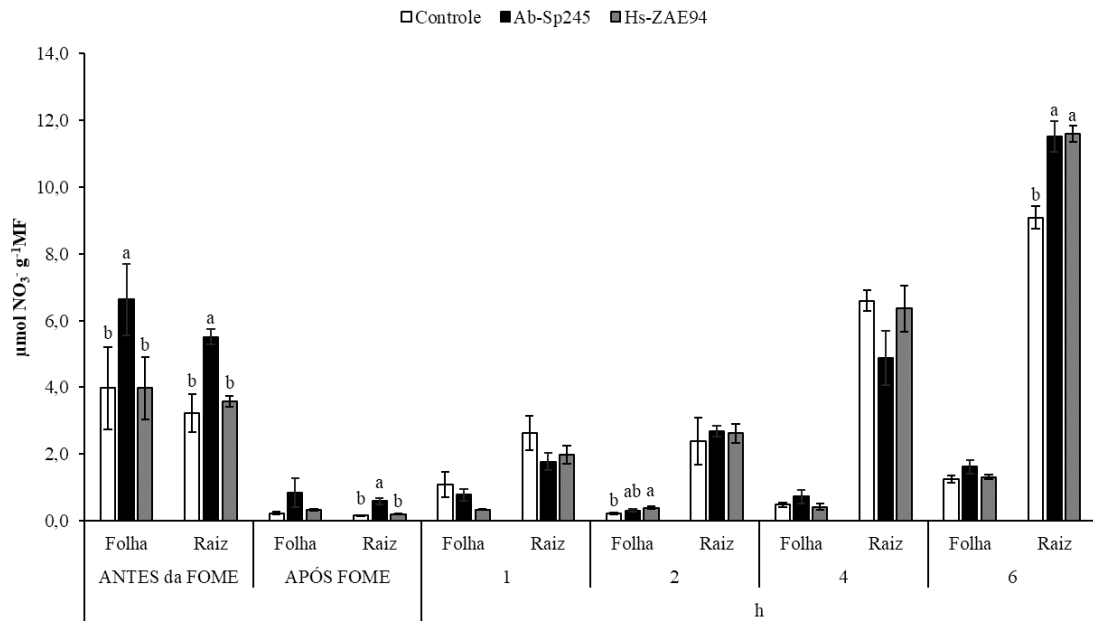
As diferenças nos teores de  $\text{NH}_4^+$  verificadas antes da fome, foram encontradas nas raízes das plantas inoculadas com Hs-ZAE94 que apresentaram os menores valores e diferiram do tratamento controle, estes dados estão de acordo com as diferenças encontradas na atividade da GS entre esses mesmos tratamentos. Quando observamos os valores médios dos tratamentos, os teores de  $\text{NH}_4^+$  foram superiores nas folhas quando comparado as raízes ao longo de toda avaliação, isso sugere que nessas condições a assimilação do N ocorra de forma preferencial nas folhas (Figura 50b). Após o período de fome nenhuma diferença foi encontrada entre os tratamentos, esse mesmo comportamento foi observado por Breda et al. (2019b) nas plantas de milho submetidas ao esgotamento de N e inoculadas com as mesmas estirpes deste trabalho. A redução no teor de  $\text{NH}_4^+$  apresentada pelas plantas inoculadas com Ab-Sp245 associada ao maior teor de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes após 6 h do ressurgimento é um indicativo que parte deste  $\text{NO}_3^-$  foi direcionado ao vacúolo. Para o tratamento com Hs-ZAE94 os maiores teores de  $\text{NH}_4^+$  apresentados nessas condições podem estar associados a menor aGS conforme já verificado.

Os teores de N-amino não foram afetados pela inoculação na coleta antes da fome (Figura 50c). No experimento I foi verificado que a inoculação com as mesmas estirpes reduziu o teor de N-amino nas folhas das plantas de milho submetidas a dose constante de 3,0mM de N. Nota-se que após o período de fome, mesmo com a falta externa de N, os níveis de N-amino não sofreram drásticas reduções, indicando que a fim de manter uma homeostase metabólica as plantas devem ter remobilizado o  $\text{NO}_3^-$  acumulado nos vacúolos, e que através da ação das enzimas de assimilação de N mantiveram os teores de N-amino, mas sem diferenças significativas. Santos et al. (2005) observaram essa mesma situação para plantas de arroz após a privação de fonte de N na solução nutritiva. Por outro lado, Breda et al. (2019b) notaram considerável decréscimo nos teores de N-amino nas plantas de milho que passaram por período de restrição de N, mas ainda assim diferenças significativas não foram encontradas para plantas inoculadas com as mesmas estirpes deste trabalho. Nota-se que após o ressuprimento com  $\text{NO}_3^-$  há um aumento gradativo nos teores de N-amino tanto nas folhas quanto nas raízes. Após 2 h as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 apresentaram teores de N-amino nas folhas 40% superiores ao tratamento controle. De acordo com Miller et al. (2004), a maior atividade da GS poderia resultar em um acúmulo de N-amino nos tecidos, principalmente glutamina e glutamato. Neste caso o tratamento com Hs-ZAE94 apresentou maior aGS nas raízes, o que pode sugerir que houve uma translocação do N assimilado nas raízes para a folhas, o que explicaria os maiores teores de N-amino encontrados nesse órgão. Além da aGS nas raízes desse mesmo tratamento, foi analisada a expressão relativa de 3 isoformas de GS encontradas em milho, e em duas isoformas (GS1.1 e GS2) houve o aumento da expressão nesse mesmo período.

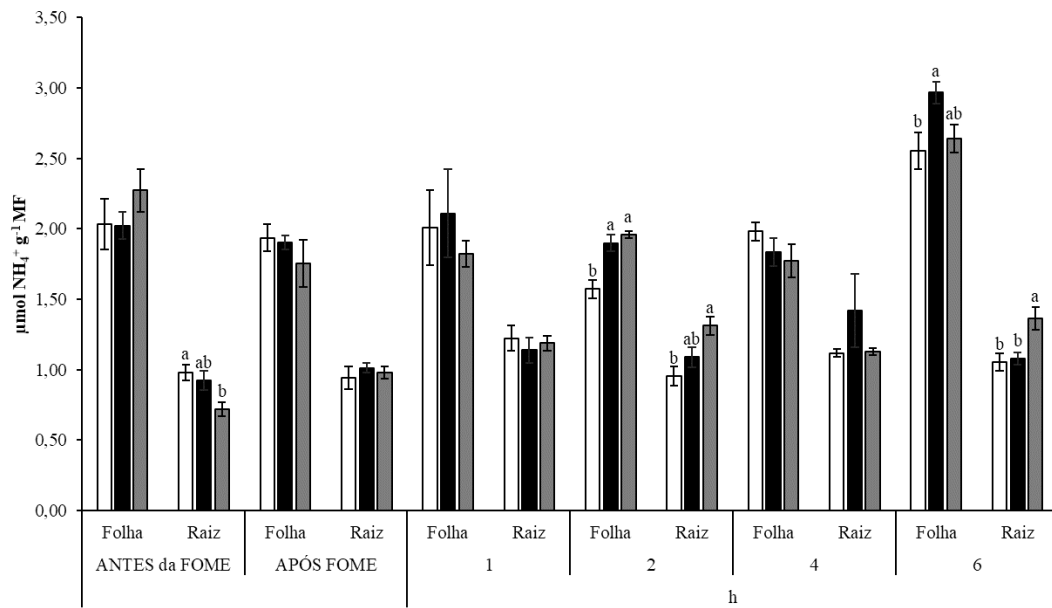
Os teores de açúcares foram afetados pela inoculação com Ab-Sp245 após o período de fome, apresentando redução de 30 e 67% nas folhas e raízes, respectivamente, quando comparado ao controle não inoculado (Figura 50d). Essa redução nos teores de açúcares com o aumento dos teores de  $\text{NO}_3^-$  já era esperado, pois o aumento deste possivelmente aumentou o consumo de esqueleto de carbono usado para a assimilação do N levando então as reduções dos teores de açúcares (SANTOS et al., 2005). Em contrapartida, Breda et al. (2019) não observaram mudanças nos teores de açúcares nas folhas nem nas raízes das plantas de milho inoculadas com Ab-Sp245 nessa mesma condição de crescimento, o mesmo foi observado para cana-de-açúcar inoculada com um mix de 5 bactérias diazotróficas (SANTOS et al., 2019). Após 6 h do ressuprimento com  $\text{NO}_3^-$  novamente os teores de açúcares foram menores para as plantas inoculadas com Ab-Sp245, indicando que esses resultados podem estar associados a intensa absorção de  $\text{NO}_3^-$  pelas plantas inoculadas com essa estirpe.



a)



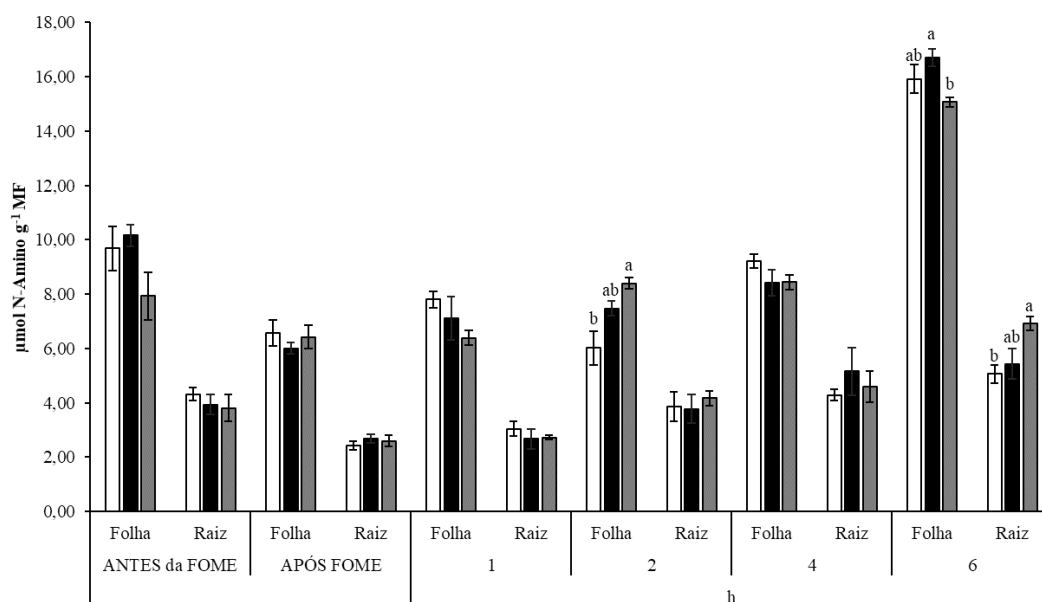
b)



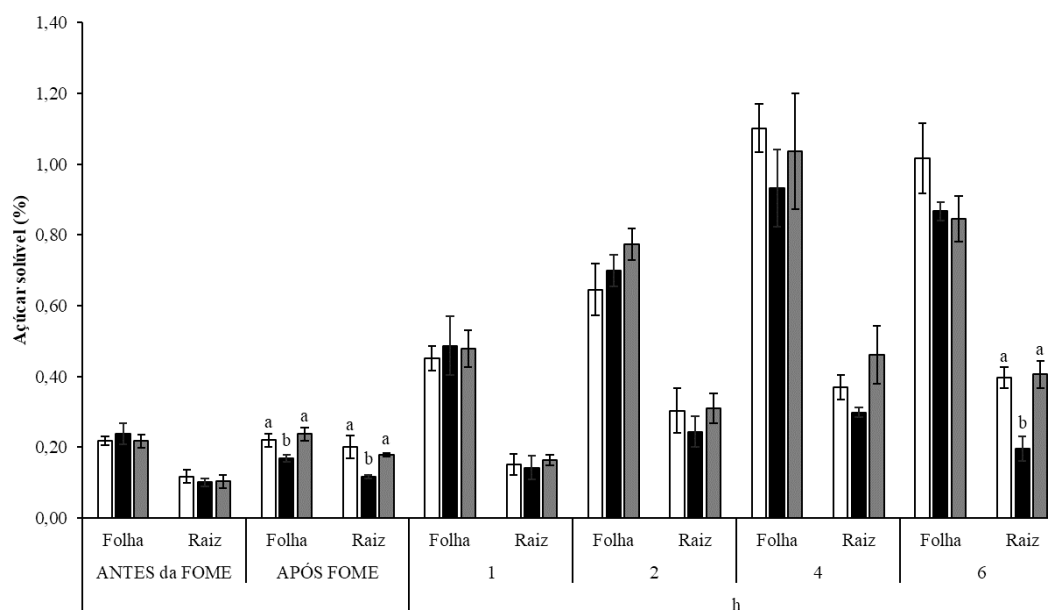
Continua na próxima página a **Figura 50...**

Continuação da **Figura 50**.

c)



d)



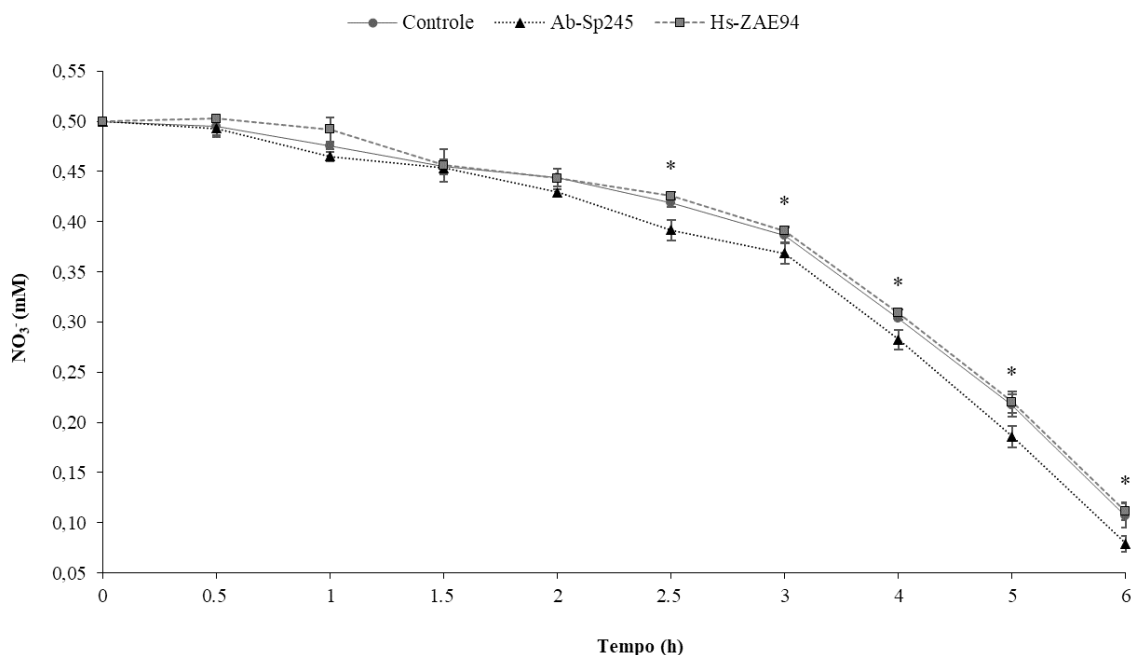
**Figura 50.** Teores de  $\text{NO}_3^-$  (a),  $\text{NH}_4^+$  (b), N-amino (c) e açúcares solúveis (d) nas folhas e raízes das plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 antes e após a fome e após o ressurgimento com nitrogênio. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.6.5 Cinética de absorção de $\text{NO}_3^-$

A depleção de  $\text{NO}_3^-$  foi monitorada ao longo do tempo na solução nutritiva (Figura 51). As plantas inoculadas com Ab-Sp245 mostraram maior captação de  $\text{NO}_3^-$  a partir de 2,5 h após o seu ressurgimento, dados estes que corroboram com os valores de  $V_{\text{max}}$  encontrados (Tabela 7). Esses dados podem estar associados a maior massa seca e volume de raiz encontrados nesse tratamento ao final do ensaio quando comparado ao controle. Mantelin e Touraine (2004)

ressaltam que a inoculação com BPCP pode aumentar a capacidade de absorção de  $\text{NO}_3^-$ , indiretamente como consequência do desenvolvimento radicular e, possivelmente, de forma direta pela estimulação do sistema de transporte. Cassán et al. (2020) também apontam que o estímulo do crescimento de raiz proporcionado pela inoculação com *Azospirillum* induz ao aumento de aquisição de N mas também água e outros nutrientes.

Por outro lado, as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 não diferiram do controle em nenhum dos tempos analisados, mesmo com mudanças notáveis nos parâmetros radiculares. Apesar da correlação entre a absorção de N e a arquitetura radicular já ter sido demonstrada, provavelmente além deste outros mecanismos podem estar envolvidos na promoção da captação de N pela planta durante interações com bactérias diazotróficas (COQUE et al., 2008; CARVALHO et al., 2014).



**Figura 51.** Análise da depleção de nitrato na solução nutritiva durante 6 h após a troca da solução. As barras representam o erro padrão de 4 repetições e \* difere em  $p \leq 0,05$ . Para todos os pontos que diferiram: Controle- b; Ab-Sp245-a; Hs-ZAE94- b.

Os parâmetros cinéticos utilizados para a avaliação da absorção de  $\text{NO}_3^-$  nas plantas foram  $V_{\text{max}}$ ,  $K_m$  e  $\alpha$  (Tabela 7). As plantas inoculadas com Ab-Sp245 apresentaram maior  $V_{\text{max}}$  quando submetidas ao ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  em relação ao tratamento controle, indicando que sob baixa disponibilidade deste íon elas apresentam maior velocidade de absorção. Entende-se que a  $V_{\text{max}}$  representa a velocidade máxima de transporte de um nutriente quando todos os sítios de transporte estão carregados e está relacionada então há uma maior quantidade de transportadores atuando na absorção; já a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) representa a afinidade do transportador iônico pelo íon a ser transportado, quanto menor o  $K_m$  maior é a afinidade (FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018). Enquanto,  $\alpha$  é dado a partir da relação entre  $V_{\text{max}}$  e  $K_m$  e fornece uma visão integrada da absorção de nutrientes, onde valores mais altos representam parâmetros cinéticos mais favoráveis (PEREIRA et al., 2021). Ainda, quanto maior for  $\alpha$  maior será a taxa de absorção por unidade de raiz em concentrações muito baixas de determinado nutriente em solução (MARSCHNER, 1995). De maneira geral, não foram observadas alterações nos valores de  $K_m$  e  $\alpha$  nos tratamentos

avaliados, apenas uma tendência de menor Km para o tratamento controle e maior  $\alpha$  para o tratamento inoculado com Ab-Sp245. Fernandes, Souza & Santos (2018) apontam que plantas melhoradas possuem maior capacidade de absorção de íons e por isso apresentam maior Vmax, mas que, no entanto, plantas mais rústicas possuem sítios de absorção mais eficientes, ou seja, com menor Km. Porém, o cenário desejável do ponto de vista de adaptabilidade das plantas seria, elevados valores de Vmax associados a baixos valores de Km, desta forma sugerindo maior capacidade de absorção e eficiência do uso de N (ROCHA et al., 2014).

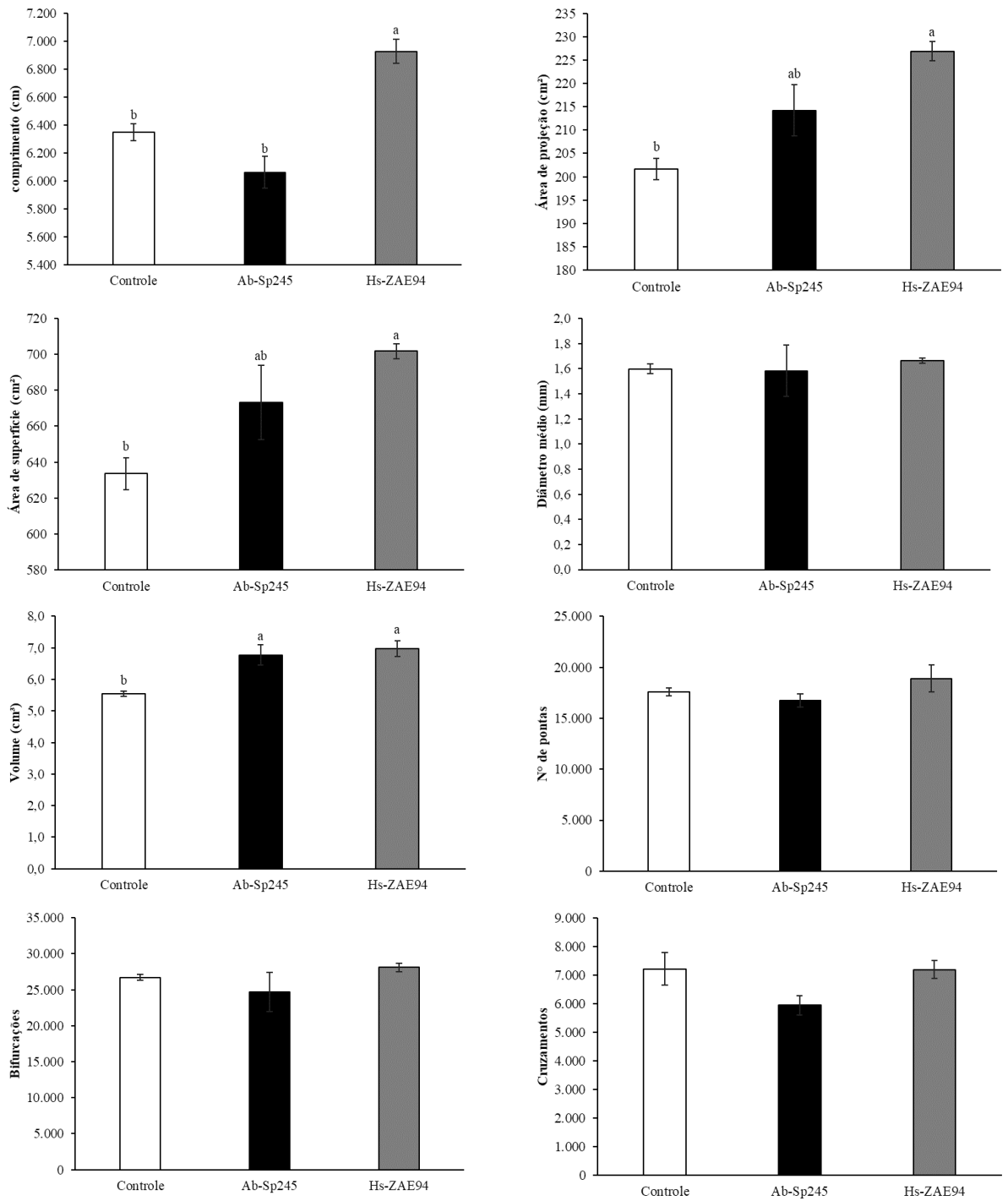
**Tabela 7.** Cinética de absorção de nitrato em plantas de milho inoculadas com bactérias diazotróficas.

Tratamento	Km ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Vmax ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	$\alpha$ (Vmax/Km) ( $\text{L g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )
Controle	89,26	3,94 b	0,044
Ab-Sp245	106,94	5,85 a	0,060
Hs-ZAE94	92,22	4,63 ab	0,051

As letras entre linhas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). Valores médios de 4 repetições.

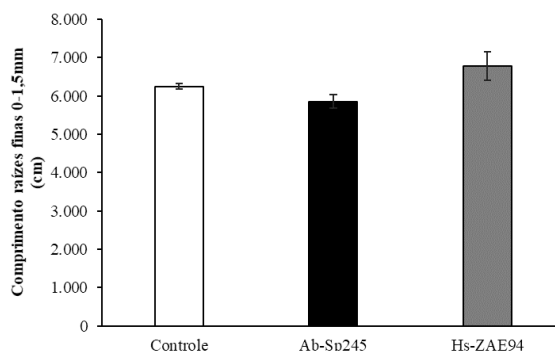
#### 4.6.6 Avaliação dos parâmetros radiculares

Os resultados dos parâmetros radiculares obtidos ao final do ensaio de cinética a partir do software WinRHIZO™ Pro são demonstrados na Figura 52. O comprimento, a área superficial e de projeção assim como o volume de raízes foram significativamente maiores para as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 quando comparados com o tratamento controle, sendo o maior incremento observado para o volume radicular (26%). As plantas inoculadas com Ab-Sp245 embora similar ao controle, também aumentaram seu sistema radicular, tal observação foi acompanhada do aumento na biomassa de raiz em detrimento da parte aérea conforme observado pela razão raiz/PA e biomassa total nos diferentes órgãos. Pii et al. (2019) avaliaram a morfologia de raiz das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*, e verificaram que a inoculação proporcionou aumento no comprimento total e na área superficial o que refletiu em ganhos de biomassa de raiz. Por outro lado, a inoculação não modificou os parâmetros diâmetro médio e o número de pontas mesmo quando na presença de  $\text{NO}_3^-$ . Os autores sugeriram que tanto a presença de  $\text{NO}_3^-$  quanto da bactéria induziram, preferencialmente, o alongamento de raízes secundárias pré-existentes, ao invés de induzir a emissão de novas raízes laterais. Igualmente nesse experimento, não foram observadas diferenças nos parâmetros diâmetro médio e número de pontas em função da inoculação com ambas as estirpes. Por outro lado, Alves et al. (2021) mostraram que a inoculação com Hs-ZAE94 proporcionaram 20% de incremento no diâmetro médio das raízes de plantas de milho em hidroponia, mas no número de pontas e bifurcações houve uma redução quando comparado ao controle. Esses mesmos autores observaram que dentre os oito parâmetros radiculares também avaliados pelo software WinRHIZO™, o volume foi o que proporcionou o maior incremento (25%), resultado similar ao encontrado nesse estudo. Como já mencionado, as mudanças na arquitetura radicular mediadas pela inoculação com BPCP tem sido apontada principalmente pela capacidade desses microrganismos em sintetizar e excretar fitohormônios.



Continua na próxima página a **Figura 52...**

Continuação da **Figura 52.**



**Figura 52.** Arquitetura das raízes analisadas pelo software WinRHIZO Pro <sup>TM</sup> de plantas de milho inoculadas ou não com Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 após ressuprimento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas (p<0,05).

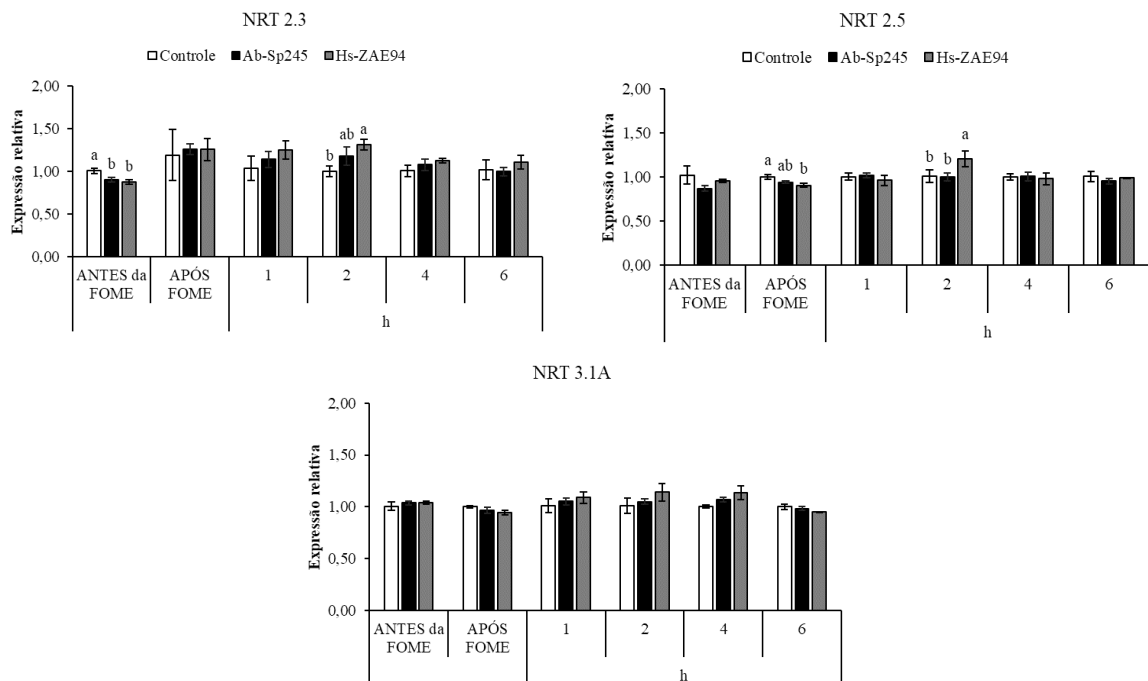
#### 4.6.7 Expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>- ATPases, transportadores de nitrato de alta afinidade e enzimas do ciclo de N nas raízes

Entre os transportadores de alta afinidade de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o que apresentou menor expressão nas plantas inoculadas com ambas as estirpes quando o suprimento de N era de 2,0 mM (antes da fome) foi o *ZmNRT2.3* (Figura 53). Após o período de restrição de N mudanças só foram encontradas na expressão do *ZmNRT2.5*, onde as plantas referentes ao tratamento controle apresentaram níveis de expressão 11% mais alta que as plantas inoculadas com Hs-ZAE94, mas não diferiram das inoculadas com Ab-Sp245. Por outro lado, Hardoim et al. (2019) verificaram que a expressão de *ZmNRT2.5* foi reprimida quando as plantas de milho foram inoculadas com Ab-Sp245. Já foi relatado, que este transportador desempenha um papel essencial na aquisição e remobilização de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em plantas adultas sob severa privação de N, sendo sua expressão induzida nessa ocasião, e este se torna o transcrito mais abundante entre os membros da família NRT2 tanto nas raízes quanto nas folhas (LEZHNEVA et al., 2014). Ademais, a expressão deste transportador foi detectada em todas as condições de cultivo, sob restrição e suprimento de N, ao contrário de Garnett et al. (2013) que só observaram sua expressão quando as plantas de milho foram cultivadas com 0,5 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Somente após 2 h da indução do sistema de transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 foram capazes de aumentar a expressão de *ZmNRT2.3* (*ZmNAR2.1*) e *ZmNRT2.5* quando comparado ao controle, inclusive foi capaz de aumentar em 1,5 vezes a abundância de transcritos de *ZmNRT2.3* quando comparada a coleta antes da fome.

A expressão do *ZmNRT3.1A* não diferiu em nenhum dos tempos analisados neste trabalho e se manteve “constante” durante as estratégias de indução do sistema de transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não alterando significativamente entre os tempos do período de ensaio. Garnett et al. (2013) encontraram níveis de transcrição para este transportador de 20 a 100 vezes menores quando comparado aos *ZmNRT2.1* e *ZmNRT2.2* para plantas de milho. Mas vale ressaltar, que dentre a família NRT3, Pii et al. (2016) encontram os maiores níveis de expressão para *ZmNRT3.1A* nas raízes de plantas de milho submetidas tanto a privação de N quanto a 0,25mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Em plantas de milho inoculadas com bactérias diazotróficas, Hardoim et al. (2019) apontaram que a inoculação com *A. baldaniorum* e *H. seropedicae* induziram a expressão de *ZmNRT3.1A*. Em plantas superiores, os membros da família NRT2 são frequentemente co-expressos com a proteína acessória NRT3, também conhecida por NAR2 (FAN et al., 2017; OKAMOTO et al. 2006; PII et al. 2016). Como já anteriormente apontado para *Arabidopsis* e arroz (FENG et al., 2011; ORSEL et al. 2006; SPERANDIO et al. 2011), Pii et al. (2016)

também sugerem que a absorção de  $\text{NO}_3^-$  via *ZmNRT2.1* em milho depende da interação com a proteína *ZmNRT3.1A*.

Azevedo et al. (2019) observaram a expressão de dois transportadores de  $\text{NO}_3^-$  em plantas de milho inoculadas ou não com *H. seropedicae* cultivadas em meio mínimo, e observaram que a inoculação reprimiu a expressão dos *ZmNRT2.1* e *ZmNRT1.1* quando comparada ao controle. O NRT2.1 é o principal componentes do HATS induzível em raízes de *Arabidopsis*, foi demonstrado que as plantas mutantes para NRT2.1 perderam mais 75% da capacidade de absorver  $\text{NO}_3^-$  (LAUGIER et al., 2012). Pii et al. (2016) observaram níveis de expressão mais elevados para *ZmNRT2.1* e *ZmNRT2.2* dentre os HATS em plantas de milho. Sendo assim, sugere-se que outros transportadores de  $\text{NO}_3^-$  sejam avaliados, inclusive o *ZmNRT1.1*, apontado como de dupla afinidade em *Arabidopsis* e que opera tanto em baixas como altas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  (LIU et al., 1999; FANG et al., 2021), para que possa ser melhor compreendida as suas funções e regulações na absorção de nitrato na presença de dessas bactérias.



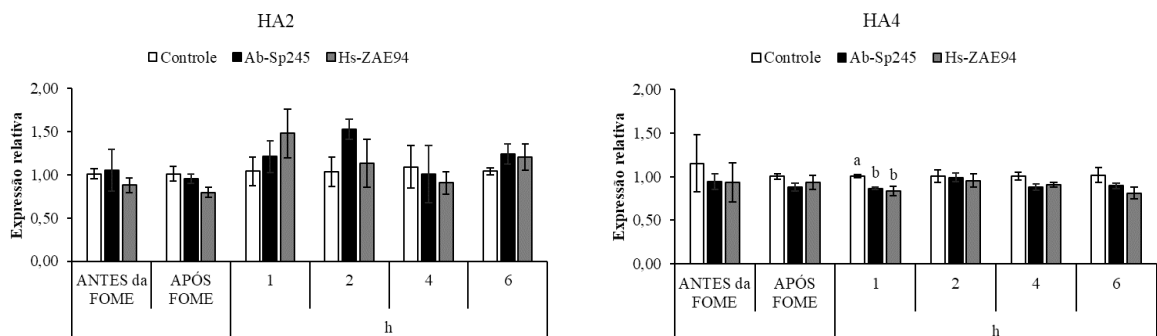
**Figura 53.** Expressão relativa dos genes que codificam para os transportadores de alta afinidade de nitrato em raízes de plantas de milho, antes e após a fome e 1, 2, 4 e 6 h após receberem 0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  (ensaio de cinética). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Em várias espécies de plantas, as PM  $\text{H}^+$ -ATPases são codificadas por uma família multigênica, compreendendo 12 isoformas em *Arabidopsis thaliana*, 10 em *Oryza sativa* e *Zea mays*, 9 em *Nicotiana plumbaginifolia* e 8 em *Vitis vinifera* (PALMGREN, 2001; ARANGO et al., 2003; SPERANDIO et al., 2011; LANG et al., 2014; PII et al., 2014). Posteriormente no genoma de milho, 11 PM  $\text{H}^+$ -ATPases foram identificadas, porém apenas duas isoformas (*ZmHA2* e *ZmHA4*) entre as cinco expressas nas raízes mostraram modulações transcricional em resposta a indução de  $\text{NO}_3^-$  (PII et al., 2016). A expressão destas isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPase é apresentada na Figura 54. Não houve diferença na expressão relativa de ambas isoformas na maioria dos tempos analisados, somente após 1 h da indução do sistema de transporte de  $\text{NO}_3^-$  onde as plantas inoculadas reduziram entorno de 20% a expressão da

isoforma *ZmHA4*. Pii et al. (2019) encontraram diferenças na expressão relativa dessa mesma isoforma após 8 h da indução do sistema de transporte de  $\text{NO}_3^-$  em plantas inoculadas com *A. brasilense*, com expressão significativamente aumentada, porém após 24 h elas reduziram significativamente a expressão.

Analisando a expressão de ambas isoformas, observa-se que a *ZmHA2* sofre mais oscilações durante as diferentes estratégias metodológicas, aumentando após o ressuprimento com  $\text{NO}_3^-$ , enquanto que a *ZmHA4* mantém um padrão de expressão que não foi alterado diante das metodologias impostas. Pii et al. (2016) observaram que *ZmHA2* foi a que mostrou os níveis mais altos de expressão nas raízes de milho diante de cinco isoformas e ainda exibiu uma indução significativamente superior após 4 h em resposta a indução com  $\text{NO}_3^-$ , o mesmo comportamento foi observado para *ZmHA4*, porém com níveis de expressão 5 vezes menor. Frías et al. (1996) já haviam apontado *ZmHA2* como a isoforma mais abundante em milho. Por outro lado, Santi et al. (2003) verificaram a indução na expressão das isoformas *ZmHA3* e *ZmHA4* em raízes de plantas de milho expostas a  $\text{NO}_3^-$ , onde a máxima expressão dessas PM  $\text{H}^+$ -ATPases ocorreram 2 h após o suprimento com N e que o aumento na atividade ocorreu após 6 h. Outro fato interessante foi que o maior crescimento de raízes laterais estava acompanhado da maior expressão da isoforma *ZmHA4* em plantas de milho supridas com  $\text{NO}_3^-$  (LIU et al., 2008).

As PM  $\text{H}^+$ -ATPases desempenham um papel central no metabolismo das plantas, pois sua atividade gera um gradiente de potencial eletroquímico nas membranas celulares, ou seja, um gradiente elétrico e um gradiente de prótons sendo este processo necessário para a ativação da translocação de espécies iônicas que é essencial no processo de nutrição mineral das plantas. Ademais, a sua atividade resulta na acidificação do apoplasto e promove o aumento da plasticidade da parede celular, de acordo com a teoria do crescimento ácido, contribuindo assim para a manutenção de diversos processos fisiológicos nas plantas (SZE, 1985; COSGROVE, 2000; GAXIOLA et al. 2007; FERNANDES, SOUZA & SANTOS, 2018). Azevedo et al. (2019) observaram a expressão relativa da isoforma *ZmHA1* em plantas de milho cultivadas em meio mínimo, e encontraram expressão seis vezes maior nas raízes das plantas inoculadas com *H. seropedicae* em relação ao controle, mas sem diferenças estatísticas.

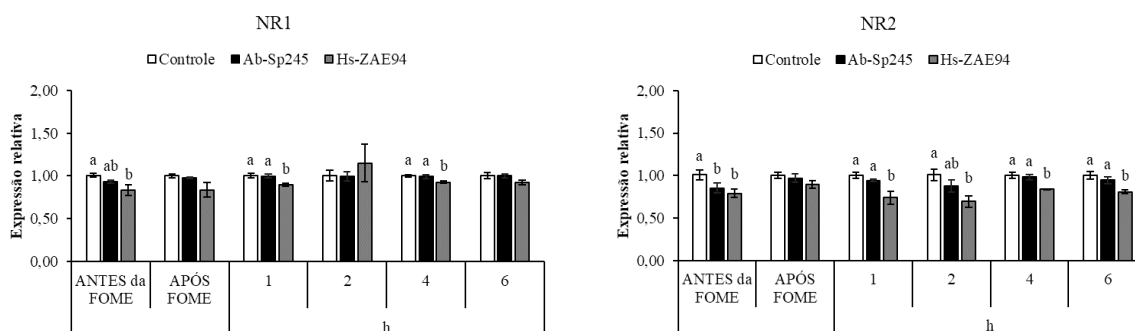


**Figura 54.** Expressão relativa das isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPase em raízes de plantas de milho inoculadas ou não, antes e após a fome e 1, 2, 4 e 6 h após receberem 0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  (ensaio de cinética). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Antes da fome o tratamento controle apresentou maior expressão da isoforma *ZmNR2* quando comparado aos demais tratamentos, enquanto que a *ZmNR1* só foi superior quando comparada ao tratamento Hs-ZAE94, esses dados corroboram com os menores valores de  $\text{NO}_3^-$  encontrados nos tecidos de raízes para o mesmo tratamento nessa mesma coleta.



Após 72 h sem N na solução nutritiva nenhuma diferença significativa foi verificada, apenas uma pequena tendência de menor expressão para as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 (Figura 55). Logo, após a indução do sistema de transporte de  $\text{NO}_3^-$  isso se confirmou, a expressão da *ZmNR2* foi menor quando comparada ao controle não inoculado em todos os tempos amostrados. Para *ZmNR1* o comportamento foi similar, porém, com diferenças encontradas apenas para 1 e 4 h, com um pico em 2 h mas que não diferiu significativamente. As plantas inoculadas com Ab-Sp245 mantiveram o mesmo comportamento observado para o controle não inoculado nos quatro tempos amostrados. De certa forma, assim como a literatura aponta e conforme já havia sido verificado em experimentos anteriores a maior atividade da NR nas plantas de milho não é na raiz e sim nas folhas, o que não se sabia era se a inoculação sob essas condições de privação e ressurgimento de N pudesse alterar essa dinâmica. A presença de expressão das isoformas de NR após o período de restrição de fonte de N, indicam que havia uma remobilização do  $\text{NO}_3^-$  armazenado, uma vez que Cao et al. (2008) já haviam sinalizado que o principal fator que regula a indução da NR é a presença de  $\text{NO}_3^-$ , mas outros fatores também desempenham papéis reguladores como a luz, níveis de  $\text{CO}_2$ , citocininas, metabólitos nitrogenados como a glutamina e carbono (CRAWFORD, 1995). Hardoim et al. (2019) observaram a indução transcricional dos genes que codificam a nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR) nas plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae* e *A. brasilense*, respectivamente. Pereira-Defilippi et al. (2017) observaram que a inoculação com *A. brasilense* levou ao aumento na expressão dos transcritos de *ZmNR1* em plantas de milho, mas isso foi dependente do genótipo e da maneira como a adubação nitrogenada foi aplicada. Esses autores observaram que a expressão foi induzida nas folhas de dois híbridos inoculados via semente e sem adubação de cobertura, mas o mesmo não ocorreu para uma da variedade analisada. Com isso, entende-se que além dos fatores ambientais e fisiológicos supracitados os fatores genéticos também podem regular a expressão dos genes que codificam para NR.



**Figura 55.** Expressão relativa das isoformas de NR em raízes de plantas de milho inoculadas ou não, antes e após a fome e 1, 2, 4 e 6 h após receberem 0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  (ensaio de cinética). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

A expressão da isoforma *ZmGS1.5* foi menor para as plantas inoculadas com ambas as estirpes na coleta antes da fome, ou seja, quando as plantas estavam com suprimento constante de 2,0 mM de N (Figura 56). O mesmo aconteceu para a isoforma *ZmGS2* nessa mesma coleta, porém, as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 foram similares ao controle. Após a fome, a inoculação não provocou mudanças na expressão dessas isoformas. Por outro lado, após o ressurgimento da fonte de N, observou-se que o aumento da expressão das isoformas *ZmGS1.1* e *ZmGS2* estão correlacionados com o aumento de atividade da GS nas raízes de plantas inoculadas com Hs-ZAE94 após 2 h da indução do sistema de transporte de  $\text{NO}_3^-$ . O mesmo não foi observado por Plett et al. (2016), onde nenhum dos padrões de abundância dos

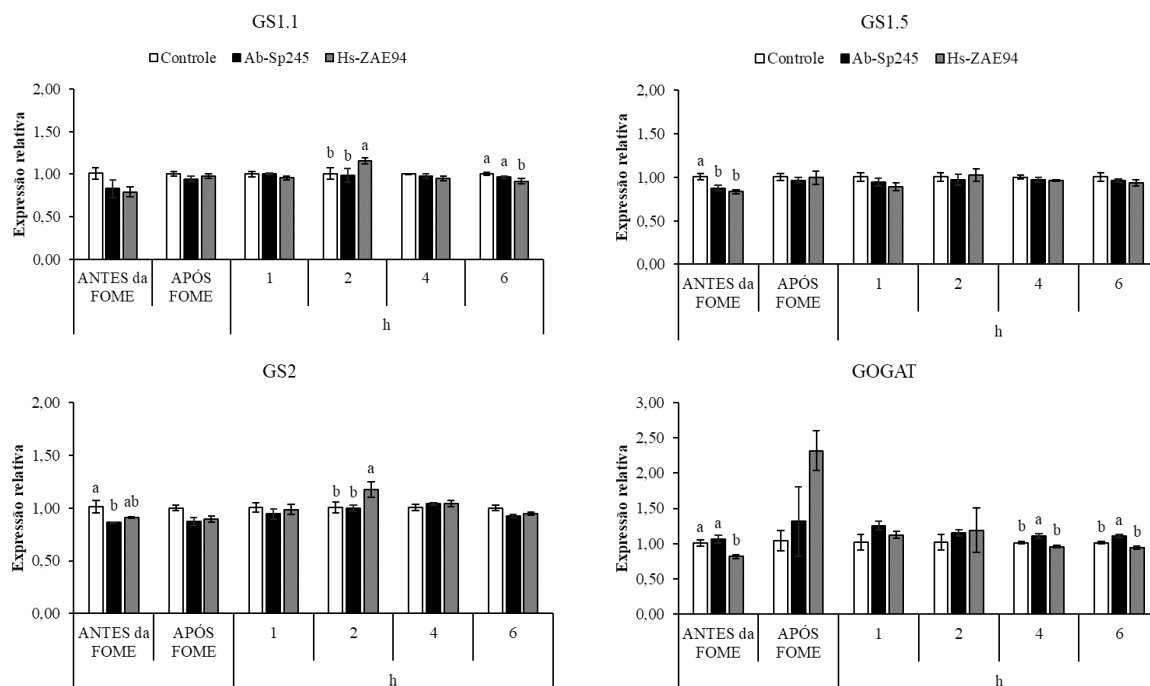
transcritos de GS foram semelhantes aos padrões de atividade da enzima, tanto em folhas quanto raízes de milho ao longo do ciclo de vida. A dificuldade em se conectar informações metabólicas e de transcritos já havia sido descrita em milho e *Arabidopsis* (AMIOUR et al., 2012; KRAPP et al., 2011). Ao final do ensaio de cinética (6 h) os dados de expressão de *ZmGS1.1* foram maiores para as plantas controle e inoculadas com Ab-Sp245 assim como a aGS.

Plett et al. (2016) analisando todas as isoformas de GS em milho, verificaram que quatro deles tiveram maior abundância de transcritos na raiz quando comparado as folhas, independente da dose de N (0,5 ou 2,5 mM de  $\text{NO}_3^-$ ), sendo os mais expressivos *ZmGS1.1* e *ZmGS1.5*. Ainda, esses mesmos autores verificaram que *ZmGS2* e *ZmGS1-2* tiveram perfis de abundância de transcritos nas raízes de milho muito semelhantes entre dose de N, mas que houve uma redução significativa nas plantas cultivadas com 0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  após 29 dias da germinação. Pereira-Defilippi et al. (2017) verificaram que a inoculação com *A. brasilense* induziu a expressão dos transcritos de *ZmGS1-3* nas folhas de plantas de milho.

Em milho foram encontradas 6 isoformas de GS, sendo elas citossólicas (GS1) e plastidial (GS2). Da família GS1 já foram identificados 5 genes (*ZmGS1.1* a *ZmGS1.5*), entre eles *ZmGS1.3* e *ZmGS1.4* são altamente expressos em tecidos foliares e desempenham papéis essenciais na mediação da partição de N nas plantas (LI et al., 2021; MARTIN et al., 2006). Ademais, experimentos iniciais indicaram que os 5 genes citossólicos foram diferencialmente expressos além das folhas, nas raízes e colmos de milho (SAKAKIBARA et al., 1992; LI et al., 1993).

A expressão da isoforma de *ZmNADH-GOGAT* variou em função da disponibilidade de N, sendo mais baixa para as plantas inoculadas com Hs-ZAE94 quando as plantas estavam supridas com 2,0 mM de N, o que corrobora com os menores teores de N-amino para o mesmo órgão, embora sem diferenças estatísticas. Mas, após 4 e 6 h da indução do sistema de transporte de alta afinidade de  $\text{NO}_3^-$  foi significativamente maior nas plantas inoculadas com Ab-Sp245, e esse comportamento explica o incremento de 7% nos teores de N-amino. A enzima glutamato sintase também conhecida como GOGAT (glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase) está presente de duas formas nas plantas a depender do doador de elétrons (NADH ou ferredoxina reduzida) (VANONI et al., 2005). A Fd-GOGAT está localizada predominantemente nos cloroplastos foliares, enquanto a isoforma NADH-GOGAT está localizada, principalmente, em tecidos não fotossintetizantes, como as raízes (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Em milho já foram identificadas quatro isoformas de GOGAT, a depender do doador de elétrons. E isso, foi constatado por Plett et al. (2016), onde as isoformas de GOGAT dependentes de NADH tiveram maior abundância de transcritos nas raízes do que nas folhas de plantas de milho, e o contrário ocorreu na isoforma dependente de ferredoxina apresentando maior abundância nas folhas. Esses mesmos autores, ainda observaram que os perfis de abundância entre as isoformas dependentes de NADH foram muito similares nas raízes das plantas de milho ao longo do ciclo de vida e não diferiram em relação a disponibilidade de N (0,5 ou 2,5 mM de  $\text{NO}_3^-$ ), o fato interessante é que elas seguiram comportamento similar ao *ZmGS2* e *ZmGS1-2* conforme supracitado, reduzindo na dose baixa de N para o mesmo período analisado e não correspondendo ao perfil de atividade da enzima GOGAT.

Pii et al. (2019) observaram maior expressão da *ZmNADH-GOGAT* nas raízes de plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* após 8 h da indução do sistema de transporte de N com 0,25 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Por outro lado, Hardoim et al. (2019) observaram uma repressão na expressão da GOGAT em plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae*.



**Figura 56.** Expressão relativa de isoformas de GS e GOGAT em raízes de plantas de milho inoculadas ou não, antes e após a fome e 1, 2, 4 e 6 h após receberem 0,5 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (ensaio de cinética). As colunas representam o valor médio e as barras representam o erro padrão de 4 repetições. As letras acima das barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

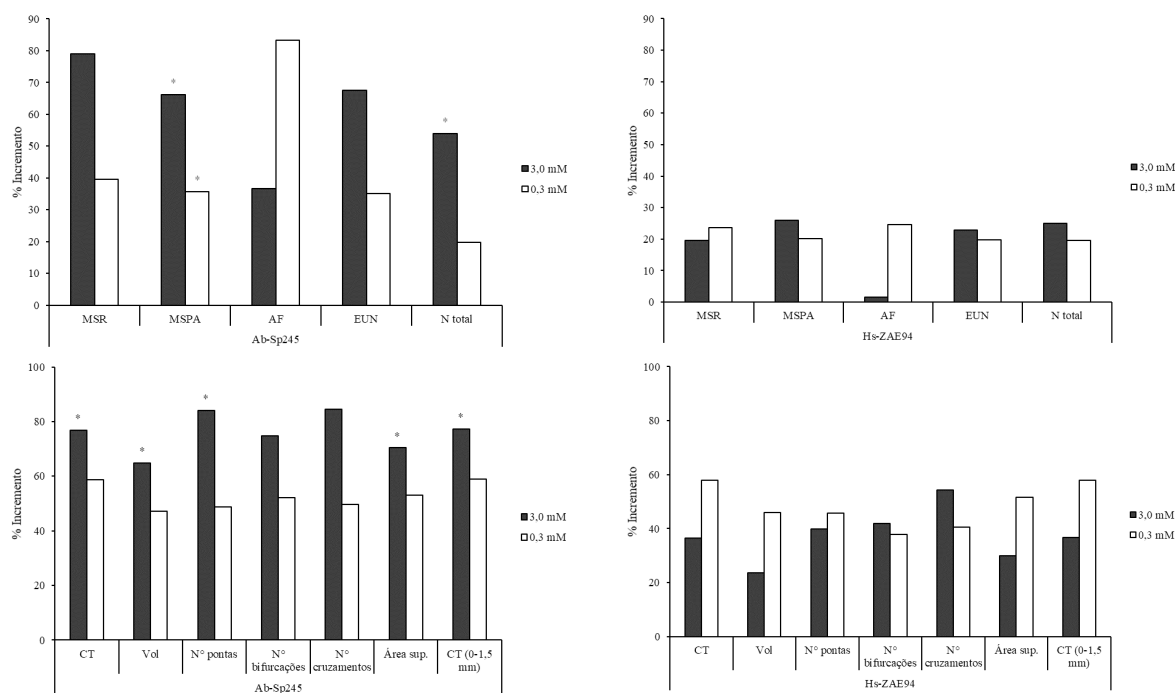
#### 4.7 Considerações Sobre as Duas Espécies de Bactérias Diazotróficas que Tiveram Enfoque no Trabalho

*A. baldaniorum* e *H. seropedicae* são duas espécies de bactérias diazotróficas pertencentes a gêneros distintos associadas a importantes culturas, como o milho, e através do processo de interação promovem o crescimento das plantas aumentando a sua produtividade. O sequenciamento e análises do genoma dessas espécies tem permitido observar o tamanho e revelar a organização dos genes, facilitando o seu conhecimento e possíveis explorações do ponto de vista biotecnológico (REIS et al., 2018). Embora haja diferenças no tamanho do genoma de ~ 2 Mb (Tabela 4), ambas possuem genoma considerado grande, e compartilham entre si diferentes características fisiológicas, como o complexo enzimático da nitrogenase e a capacidade de produzir e secretar diferentes fitohormônios como auxinas e giberilinas. Uma das principais diferenças apontadas na literatura é quanto ao padrão de colonização, enquanto *A. baldaniorum* é descrita como endofítica facultativa, a *H. seropedicae* é considerada um endófito obrigatório, sendo esta capaz de colonizar nichos específicos no interior dos tecidos vegetais, com a possibilidade de transferência mais eficiente dos compostos nitrogenados produzidos e ainda, de não sofrer limitações de substâncias ricas em carbono (OLIVARES et al., 1996). Assim também, a alta motilidade aliada à quimiotaxia positiva da *A. baldaniorum* para determinadas substâncias, como ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos, possivelmente, lhe conferem uma vantagem seletiva significativa na rizosfera, onde a disponibilidade de nutrientes é muitas das vezes limitada favorecendo a sua movimentação para zonas com maior exsudação radicular (BARAK, NUR & OKON, 1983; ZHULIN & ARMITAGE, 1993). A análise do perfil do transcriptoma de milho inoculados com essas espécies revelou um total de 764 e 3.595 genes diferencialmente expressos para *A. baldaniorum* e *H. seropedicae*, respectivamente, enquanto 455 destes foram compartilhados por ambas (HARDOIM et al.,

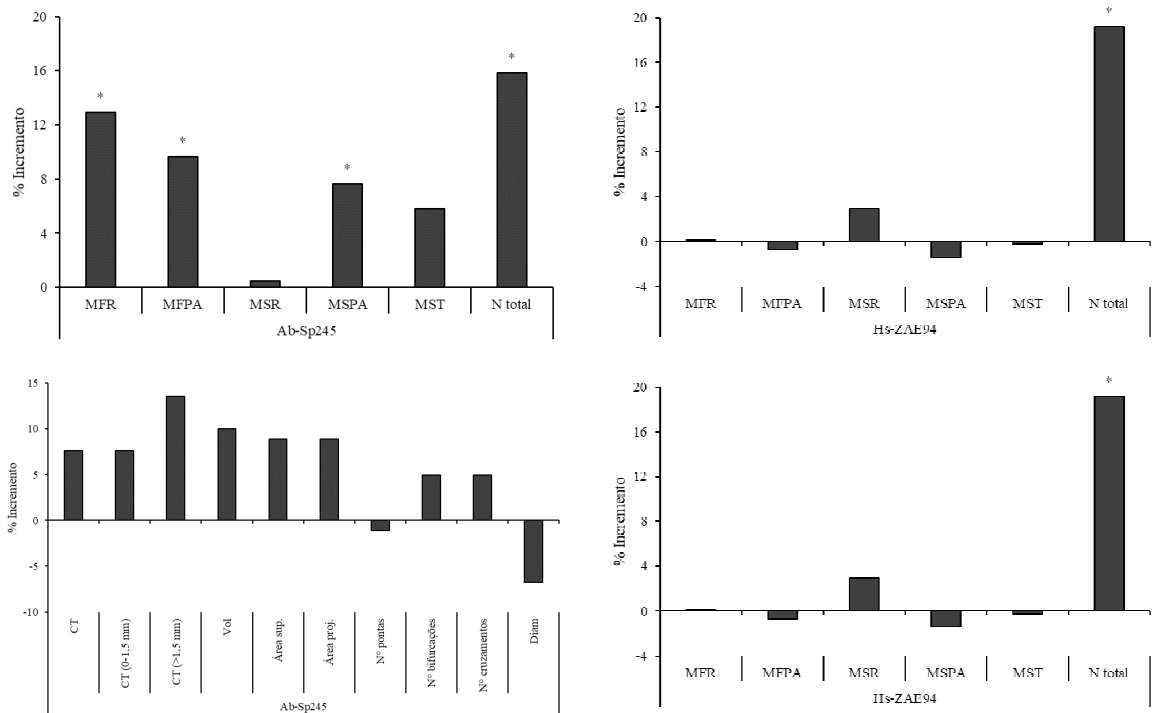
2019). Logo, embora as duas espécies possam compartilhar muitos mecanismos similares desencadeados durante o processo de interação, alguns destes são inerentes de cada microrganismo.

Os resultados encontrados nesse trabalho mostraram um padrão de resposta distinto entre a inoculação de Ab-Sp245 e Hs-ZAE94 no genótipo de milho SHS5050, o que se deve não só as características intrínsecas de cada relação mutualística, mas também as condições ambientais impostas.

Em sistema hidropônico na fase inicial de crescimento das plantas foi possível observar incrementos com ambas as estirpes para as variáveis associadas a biomassa e morfologia radicular independente da dose de N. No entanto, o que chamou atenção foi o comportamento oposto das estirpes, a Ab-Sp245 promoveu maiores incrementos na dose alta de N na maioria dos parâmetros avaliados quando comparado a dose baixa, exceto AF, enquanto a Hs-ZAE94 quando esses percentuais de incrementos não estavam equiparados ele foi superior na dose baixa de N, isso principalmente associado a parâmetros de morfologia radicular (Figura 57). Esse comportamento mais pronunciado da inoculação com Ab-Sp245 sob dose alta de N nas fases iniciais de crescimento das plantas de milho se repetiu em hidroponia com os mesmos parâmetros avaliados (Figura 58).

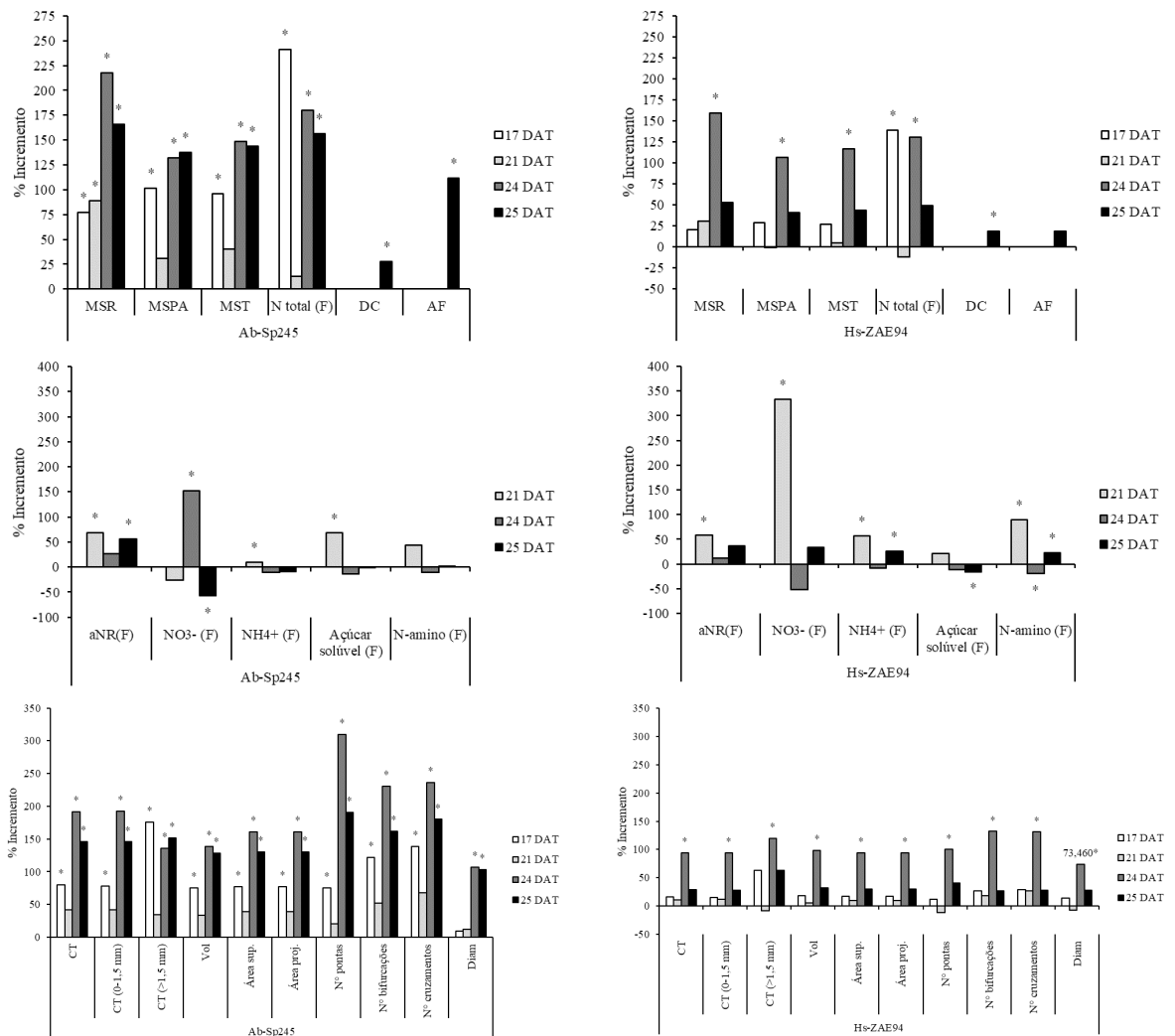


**Figura 57.** Incremento ou não observado em hidroponia sob dose contrastante de N. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea; AF, área foliar; EUN, eficiência do uso de N, N total, acúmulo de nitrogênio total; CT, comprimento total da raiz; CT (0-1,5 mm), comprimento total das raízes finas; Vol, volume total da raiz; Área Sup., área superficial da raiz.

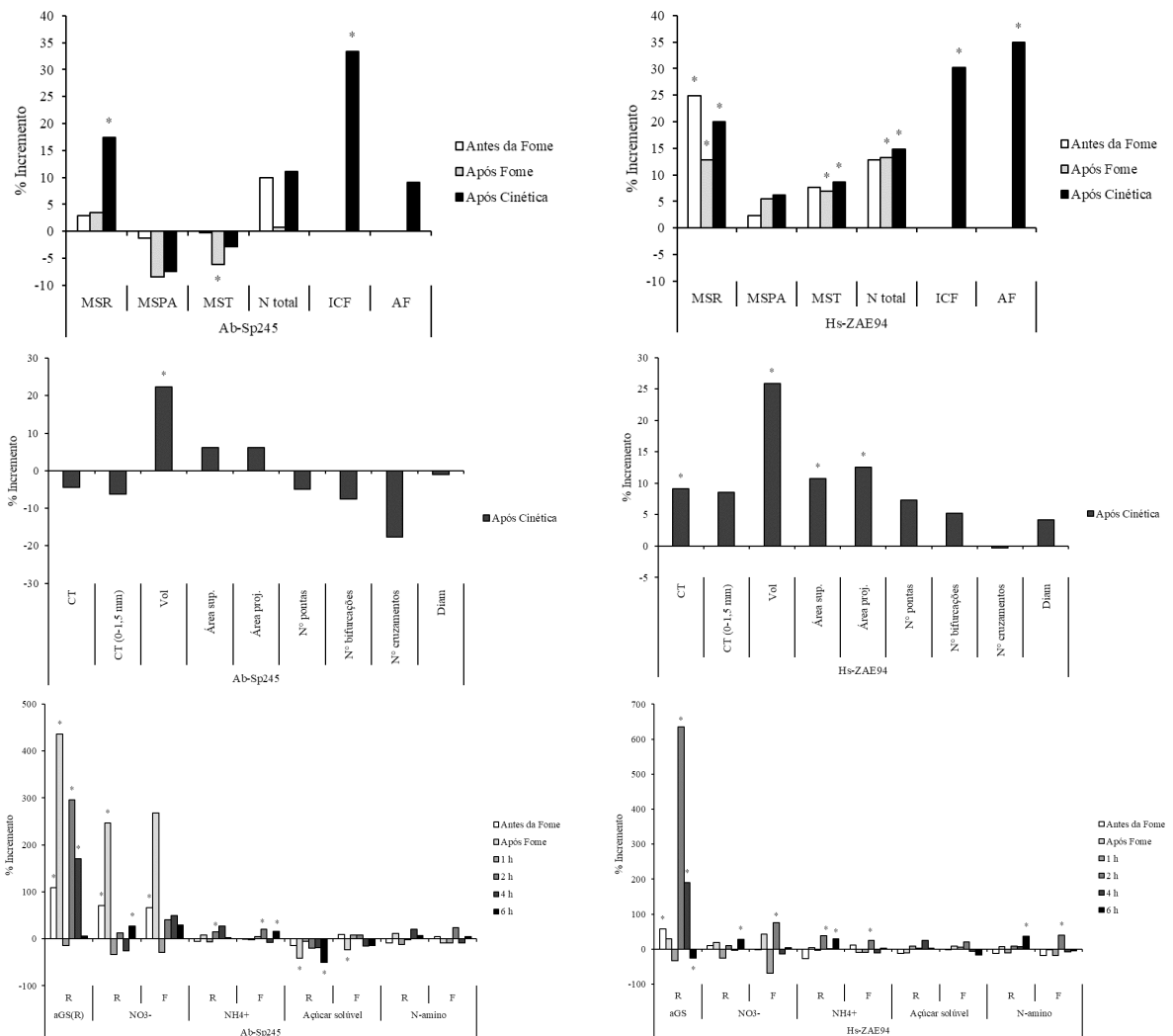


**Figura 58.** Incremento ou não observado em hidroponia sob dose alta de N. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MFR, massa fresca de raiz; MFPA, massa fresca da parte aérea; MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea; N total, acúmulo de nitrogênio total; CT, comprimento total da raiz; CT (0-1,5 mm), comprimento total das raízes finas; CT (>1,5 mm), comprimento das raízes grossas; Vol, volume total da raiz; Área Sup., área superficial da raiz; Área proj., área de projeção da raiz; Diam, diâmetro médio das raízes.

Ainda em hidroponia, quando as plantas foram submetidas a restrição de N por 72 h, ambas as estirpes incrementaram biomassa, especialmente na raiz, com destaque para a Hs-ZAE94, sendo este o período de avaliação com maior percentual de incremento quando comparado aos demais (Figura 59). Além disso, antes e após o período de restrição de N quando as plantas estavam sob dose alta de N a Ab-Sp245 proporcionou maiores incrementos na aNR nas folhas, por outro lado a Hs-ZAE94 proporcionou maiores incrementos nos teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e N-amino e menores nos teores de açúcares (Figura 59). Porém, avaliando a restrição de N pelo mesmo período supracitado com posterior ressurgimento com dose baixa de N (0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$ ), foi possível observar maiores incrementos proporcionados pela Hs-ZAE94 na maioria dos parâmetros avaliados, mas a Ab-Sp245 também foi capaz de promover incrementos na biomassa radicular principalmente após este período de privação de N proporcionando maior razão raiz/parte aérea nessas condições (Figura 60). Vale ressaltar que embora pouca mudança na morfologia radicular tenha sido observada para Ab-Sp245, ainda assim ela foi mais eficiente na captação de  $\text{NO}_3^-$ .



**Figura 59.** Incremento ou não observado em hidroponia com restrição de N por 72 h e ressurgimento com dose alta de N. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea; AF, área foliar; DC, diâmetro do colmo, N total, acúmulo de nitrogênio total; aNR, atividade da enzima nitrato redutase; CT, comprimento total da raiz; CT (0-1,5 mm), comprimento total das raízes finas; CT (>1,5 mm), comprimento das raízes grossas; Vol, volume total da raiz; Área Sup., área superficial da raiz; Área proj., área de projeção da raiz; Diam, diâmetro médio das raízes.

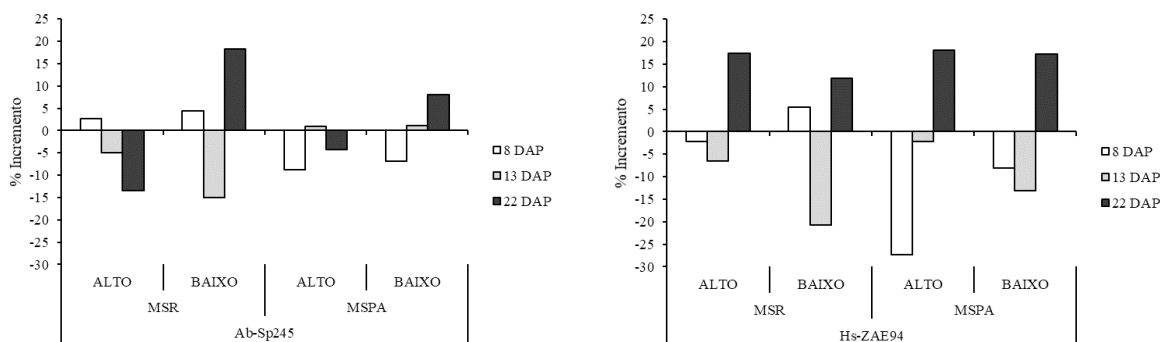


**Figura 60.** Incremento ou não observado em hidroponia com restrição de N por 72 h e ressurgimento com dose baixa de N. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea; MST, massa seca total; N total, acúmulo de nitrogênio total; ICF, índice de clorofila Falker; AF, área foliar; aGS, atividade da enzima glutamina sintetase; CT, comprimento total da raiz; CT (0-1,5 mm), comprimento total das raízes finas; CT (>1,5 mm), comprimento das raízes grossas; Vol, volume total da raiz; Área Sup., área superficial da raiz; Área proj., área de projeção da raiz; Diam, diâmetro médio das raízes.

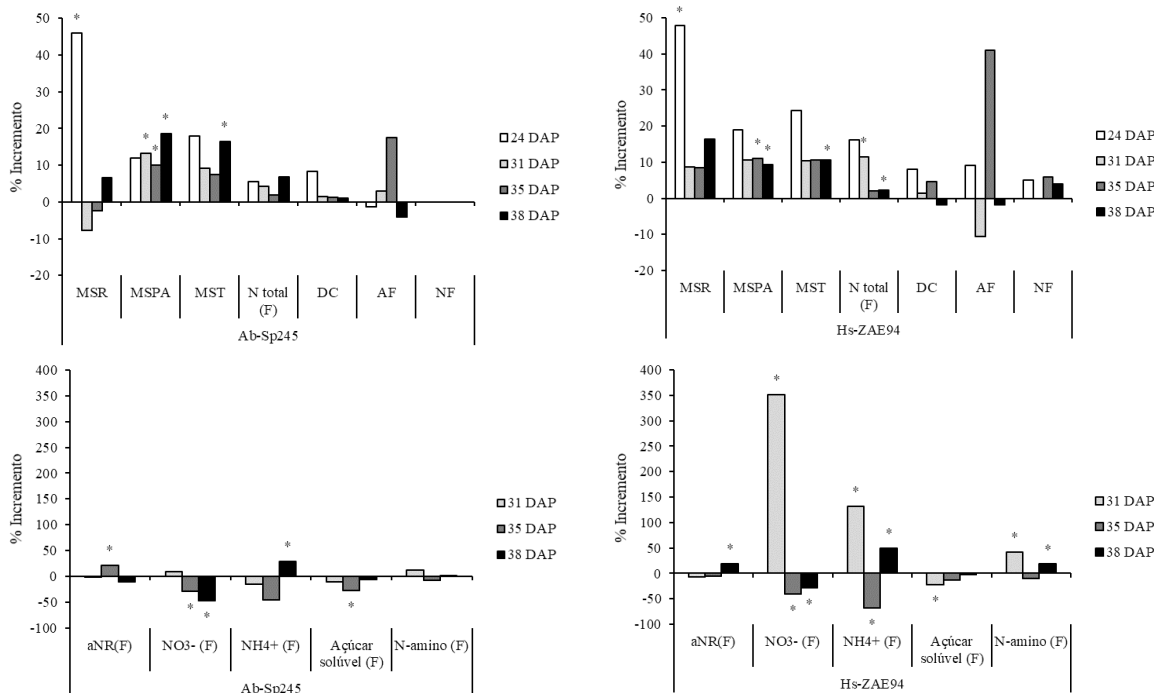
Analogamente, quando o substrato areia e vermiculita foi utilizado o comportamento das estirpes também foi distinto, principalmente quando houve doses contrastantes de N, a Hs-ZAE94 teve um bom desempenho no incremento de biomassa em ambas as doses de N no período mais longo de avaliação, enquanto com Ab-Sp245 os incrementos foram observados somente na dose baixa de N para o mesmo período (Figura 61). Quando a dose de N não foi um fator considerado a partir do mesmo substrato, a Hs-ZAE94 se diferenciou da Ab-Sp245 por proporcionar maiores incrementos na biomassa radicular em todas as coletas realizadas e acúmulo de N e biomassa total nas coletas iniciais (Figura 62). A Hs-ZAE94 também proporcionou maiores incrementos nos teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e N-amino nas folhas das plantas quando comparada com Ab-Sp245.

Houve uma tendência de melhor contribuição da inoculação com Hs-ZAE94 sob dose baixa de N em sistema hidropônico, enquanto Ab-Sp245 promoveu maiores incrementos na

dose alta de N para este mesmo sistema de cultivo. Quando o substrato areia e vermiculita foi utilizado a Hs-ZAE94 contribuiu de maneira positiva independente da dose de N.



**Figura 61.** Incremento ou não observado em substrato areia e vermiculita sob doses contrastantes de N. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea.



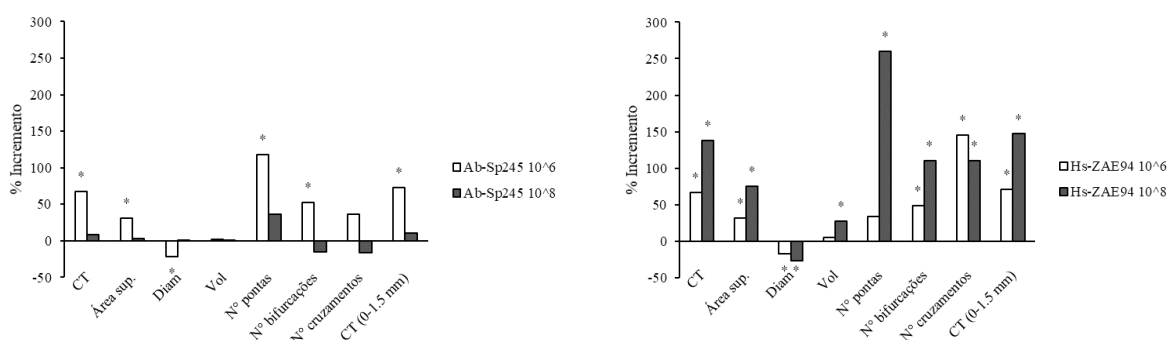
**Figura 62.** Incremento ou não observado em substrato areia e vermiculita. Incremento (%) = inoculado menos o controle. MSR, massa seca de raiz; MSPA, massa seca da parte aérea; MST, massa seca total; N total, acúmulo de nitrogênio total; DC, diâmetro do colmo; AF, área foliar; NF, número de folhas; aNR, atividade da enzima nitrato redutase.

Convém, no entanto, apontar que a resposta à inoculação está condicionada a vários fatores e dentre eles o genótipo da planta desempenha um papel essencial nesse processo (REIS et al., 2000). Por isso avaliou-se a resposta do mesmo híbrido SHS5050 utilizados em todos os experimentos através de bioensaios, a partir da aplicação das duas densidades bacterianas, as mesmas aplicadas nos experimentos e a aplicação de AIA exógeno.

No ensaio em que o número populacional do inoculante foi avaliado, observou-se que para Ab-Sp245 os maiores incrementos nos parâmetros de morfologia radicular resultaram com a população aplicada de  $10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, enquanto para Hs-ZAE94 foi de  $10^8$  cel mL<sup>-1</sup>.



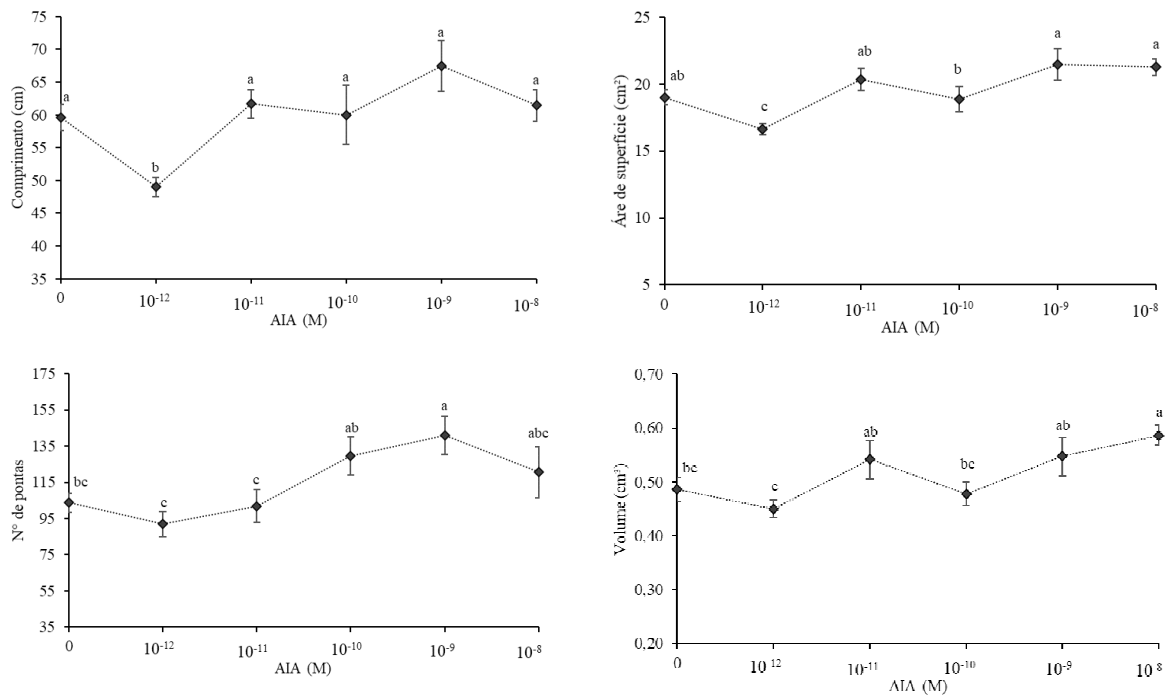
Ainda assim, a Hs-ZAE94 aceita uma maior amplitude da população aplicada, enquanto a Ab-Sp245 foi menos tolerante a essa população 100 vezes superior (Figura 63). O diâmetro médio das raízes foi o único parâmetro com redução para as populações inoculadas de Hs-ZAE94, isso caracteriza-se como uma resposta positiva, pois raízes com menor diâmetro aumentam a superfície de contato com o solo e proporcionam uma maior exploração do mesmo. Por isso, um limite de células é essencial para a obtenção de resposta positiva da planta, por exemplo de  $10^5 - 10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  já foram descritas para *Azospirillum* (BASHAN, 1986; BASHAN et al., 2014). Além disso, as respostas ao estímulo destas populações também podem estar condicionadas a presença de compostos indólicos e outras substâncias produzidas por essas estirpes que foram exsudadas durante a sua multiplicação, uma vez em que foi aplicada a suspensão bacteriana e não somente as células ressuspensas.



**Figura 63.** Incremento ou não observado nos parâmetros de morfologia radicular em função da densidade populacional aplicada. Incremento (%) = inoculado menos o controle. CT, comprimento total da raiz; CT (0-1,5 mm), comprimento total das raízes finas; Diam, diâmetro médio das raízes; Vol, volume total da raiz; Área Sup., área superficial da raiz.

Já é sabido que ambas as espécies de bactérias utilizadas nesse trabalho são produtoras de AIA, e este pode estar envolvido em diversos processos relacionados principalmente à sinalização para o estabelecimento do processo de interação e grande influência na morfologia radicular, sendo apontado como um dos principais mecanismos envolvidos na promoção de crescimento por essas bactérias (CASSÁN et al., 2014). A síntese e a excreção de AIA por essas bactérias podem estimular o desenvolvimento do sistema radicular, contribuindo para melhor absorção de água e nutrientes pelas plantas, porém este estímulo ocorre dentro de uma faixa estreita de concentração, sendo os efeitos de indução da formação de raízes laterais e adventícias observados em concentrações nanomolares (WOODWARD & BARTEL, 2005). Conforme apontado na literatura, o padrão de maior produção de AIA está condicionado a presença de triptofano, nesse caso as estirpes foram capazes de produzir *in vitro* 12,26 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para Hs-ZAE94 e Ab-Sp245, respectivamente (ESTRADA et al. 2013; ONA et al., 2005).

No ensaio de avaliação da aplicação de concentrações crescentes de AIA exógeno o híbrido de milho respondeu melhor a dose de  $10^{-9}$  M de AIA, onde foi possível observar maior número de pontas quando comparado ao controle, ou seja, sem a presença do regulador vegetal (Figura 64). O número de pontas é um indicativo de emissão de raízes laterais, sendo assim, a melhora deste parâmetro também corresponde ao aumento do número de sítios de emergências das raízes laterais que podem fornecer pontos de entrada que facilitam a colonização dos tecidos internos pelas bactérias endofíticas. Ademais, trabalhos já demonstraram a importância de AIA bacteriano nas modificações radiculares quando a bactéria produtora estava associada à planta hospedeira, assim como resultados de experimentos com mutantes defectivos para a síntese de AIA que apoiam essa teoria (PATTEN & GLICK, 2002; SPAEPEN et al., 2014; BARBIERI et al., 1986; BARBIERI & GALLI, 1993; DOBELAERE et al., 1999).



**Figura 64.** Morfologia radicular com aplicação crescente de doses de AIA.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, foi possível concluir que a inoculação com a Ab-Sp245 em hidroponia proporcionou maior plasticidade na morfologia radicular mesmo sob restrição de N, foi responsável pela maior absorção de macronutrientes, especialmente N, independente do ciclo de desenvolvimento e proporcionou uma maior EUN nas plantas cultivadas com baixo suprimento de N.

Uma resposta mais intensa promovida pela Ab-Sp245 sob disponibilidade adequada de N foi observada nas mudanças de arquitetura radicular, acúmulo de biomassa e N total e na aNR nas folhas. Já a Hs-ZAE94 mostrou uma tendência de melhor contribuição na dose baixa de N para este mesmo sistema de cultivo, principalmente quando o período de restrição de N foi aplicado com posterior ressuprimento com dose baixa, ela promoveu maiores acúmulos de biomassa e N total, aumento da área foliar e da expressão relativa das isoformas de *ZmNRT2.3*, *ZmNRT2.5*, *ZmGS1.1* e *ZmGS2* no tempo de 2 h, assim como a melhora dos principais parâmetros de morfologia radicular analisados. A inoculação com Hs-ZAE94 também promoveu aumento nos teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e N-amino e menores teores de açúcares nas folhas das plantas de milho sob condições ideais de N, independente do substrato utilizado, sendo esses um bom indicativo do processo de assimilação de N. Todavia quando o substrato areia e vermiculita foi utilizado a Hs-ZAE94 contribuiu de maneira positiva em ambas as doses de N, ou seja, o substrato pode condicionar um melhor processo de interação dessa estirpe com o genótipo de milho utilizado independente da dose de N aplicada.

De maneira geral, a inoculação com ambas as espécies de bactérias diazotróficas testadas promoveu o melhor desenvolvimento das plantas de milho em casa de vegetação por meio de alterações positivas na arquitetura radicular e no metabolismo de N, modificando a absorção, a assimilação e o acúmulo de N.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A compreensão de como o milho reage ao processo de inoculação sob variada disponibilidade de N mineral, especialmente durante as primeiras semanas de crescimento, é uma estratégia para verificar se o processo de inoculação pode auxiliar a planta na aquisição de N, já que milhões de toneladas de fertilizante nitrogenados são aplicados em todo o mundo e menos de 50% dessas aplicações podem ser usados de forma eficiente pelas culturas.

O efeito genotípico já é reconhecido e exerce um papel primordial no processo de interação, e por isso a resposta do genótipo de milho ao processo de inoculação com bactérias diazotróficas possibilita a seleção de estirpes eficientes para cada cenário de disponibilidade de nitrogênio de forma a poder conferir vantagens adaptativas às plantas.

Ademais, o conhecimento dos mecanismos regulatórios envolvidos no processo de interação (planta-bactéria) também precisam ser melhor compreendidos, sobretudo os que atuam em vias moleculares e bioquímicas envolvidas no processo nutricional das plantas. Nesse sentido, abordagens genômicas como os estudos de transcriptomas por meio da técnica de RNA-Seq abrem novos caminhos na observação simultânea das mudanças no nível de expressão gênica de ambos os organismos durante este processo de interação. E, ajudam a entender de maneira mais ampla como a inoculação com bactérias diazotróficas pode afetar a aquisição, acúmulo, translocação e a remobilização de N em culturas de importância econômica, como o milho, representando uma ferramenta importante para o alcance de uma maior EUN e com isso potencializar os benefícios para a produção agrícola. Dessa forma, sugere-se que em estudos futuros este tipo de abordagem possa ser considerada, assim como o aprofundamento da conexão do metabolismo de carbono e N durante o processo de interação.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESEMOYER, A. O.; KLOEPPER, J. W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 1-12, 2009.

ADESEMOYE, A.O.; TORBERT, H.A.; KLOEPPER J.W. Plant growth promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, v. 58, p. 921-929, 2009.

AMIOUR, N.; IMBAUD, S.; CLÉMENT, G.; AGIER, N.; ZIVY, M.; VALOT, B.; BALLIAU, T.; ARMENGAUD, P.; QUILLERÉ, I.; CANÃS, R.; TERCET-LAFORGUE, T.; HIREL, B. The use of metabolomics integrated with transcriptomic and proteomic studies for identifying key steps involved in the control of nitrogen metabolism in crops such as maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 14, p. 5017-5033, 2012.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES (ANPII) - **Estatísticas**. Disponível em: < <http://anpii.org.br/estatisticas/>>. Acesso em: 17 mai. 2021.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS (ANDA)- **Estatísticas**. Disponível em: < <http://anda.org.br/estatisticas/>>. Acesso em: 10 mar. 2020.

ALBAREDA, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N.; TEMPRANO, F.J. Soybean inoculation: dose, N fertilizer supplementation and rhizobia persistence in soil. **Field Crops Research**, v. 113, p. 352-356, 2009.

ALVES, G.C. **Estudo da Interação da Bactéria BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae* com Plantas de Milho**. 2011. 52 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

ALVES, G.C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho**. 2007. 54p. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

ALVES, G.C.; VIDEIRA, S.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, p. 307-321, 2015.

ALVES, G.S.; SANTOS, C.L.R.; ZILLI, J.E.; REIS JUNIOR, F.B.; MARRIEL, I.E.; BRENDA, F.A.F.; BODDEY, R.M.; REIS, V.M. Agronomic evaluation of *Herbaspirillum seropedicae* strain ZAE94 as an inoculant to improve maize yield in Brazil. **Pedosphere**, v. 31, n. 4, p. 583-595, 2021.

ALVES, G.S.; SOBRAL, L.F.; REIS, V.M. Grain yield of maize inoculated with diazotrophic bacteria with the application of nitrogen fertilizer. **Revista Caatinga**, v. 33, n.3, p. 644-652, 2020.

ARANGO, M.; GÉVAUDANT, F.; OUFATTOLE, M.; BOUTRY, M. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. **Planta**, v. 216, p. 355-365, 2003.

ARAÚJO, F.F.; FOLONI, J.S.S.; WUTZKE, M.; MELEGARI, A.S.; RACK, E. Híbridos e variedades de milho submetidos a inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. **Semina**, v. 34, n. 3, p. 1043-1054, 2013.

ARAÚJO, E.O.; MARTINS, M.R.; VITORINO, A.C.T; MERCANTE, F.M.; URQUIAGA, S.S. Effect of nitrogen fertilization associated with diazotrophic bacteria inoculation on nitrogen use efficiency and its biological fixation by corn determined using <sup>15</sup>N. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 9, p. 643-650, 2015.

ARDAKANI, M.R.; MAZAHARI, D.; MAFAKHERI, S.; MOGHADDAM, A. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 2, p. 181-192, 2011.

ARKHIPOVA, T.N.; PRINSEN, E.; VESELOV, S.U.; MARTINENKO, E.V.; MELENTIEV, A.I.; KUDOYAROVA, G.R. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. **Plant and Soil**, v. 292, p. 305-315, 2007.

AWIKA, J.M. Major cereal grains production and use around the world. **ACS Symposium series**, v. 1089, Chapter 1, p. 1-13, 2011.

AZEVEDO, I.G.; OLIVARES, F.L.; RAMOS, A.C.; BERTOLASI, A.A.; CANELLAS, L.P. Humic acids and *Herbaspirillum seropedicae* change the extracellular H<sup>+</sup> flux and gene expression in maize roots seedlings. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 6, n. 8, p. 1-10, 2019.

BABALOLA, O.O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnological Letters**, v. 32, p. 1559-1570, 2010.

BABALOLA, O.O.; SANNI, A.I.; ODHIAMBO, G.D. TORTO, B. Plant growth-promoting rhizobacteria do not pose any deleterious effect on cowpea and delectable amounts of ethylene are produced. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 747-752, 2007.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov.: a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986b.

BALDANI, V.; ALVAREZ, M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum spp.* in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 90, p. 35-46, 1986a.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal os Systematic Evolutionary Bacteriology**, v.29, p.911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; GUEDES, H.V.; VIDAL, M.S.; SCHWAB, S.; TEIXEIRA, K.R.S.; CRUZ, L.M.; ARAUJO, J.L.S. **Base de dados genômica de estirpes que compõem o inoculante de cana-de-açúcar e milho**. Seropédica, Rio de Janeiro, 2011. (Embrapa Agrobiologia, Documentos, 282).

BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S.; BODDEY, L.H.; BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, p. 413-431, 2014.

BALDOTTO, M.A.; BALDOTTO, L.E.B.; SANTANA, R.B.; MARCIANO, C.R. Initial performance of maize in response to NPK fertilization combined with *Herbaspirillum seropedicae*. **Revista Ceres**, v. 59, n. 6, p. 841-849, 2012.

BARAK, R.; NUR, I.; OKON, Y. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 53, p. 399-403, 1983.

BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina***. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p. 49-59, 2008.

BASHAN, Y. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 18, n. 3, p. 297-301, 1986.

BASHAN Y. Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux of intact wheat roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 419-425, 1990.

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

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth. A critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.; PRABHU, S.R.; HERNANDEZ J.P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, p. 1-33, 2014.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H.; MITIKU, G. Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense* Cd. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 691-697, 1989.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 591-608, 1990.

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

BASHAN, Y.; HOGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.

BARBIERI, P.; ZANELLI, T.; GALLI, E.; ZANETTI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 36, n. 1, p. 87-90, 1986.

BARBIERI, P.; GALLI, E. Effect on wheat root development of inoculation with na *Azospirillum brasilense* mutante with altered indole-3-acetic acid production. **Research in Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 69-75, 1993.

BORÉM, A.; GALVÃO, J.C.C.; PIMENTEL, M.A. **Milho: do plantio à colheita**. Ed UFV, 351p., 2015.

BORGES, E.A.; FERNANDES, M.S.; LOSS, A.; SILVA, E.E.; SOUZA, S.R. Acúmulo e remobilização de nitrogênio em variedades de milho. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 3, p. 278-286, 2006.

BORGES, E.A.; LOSS, A.; SILVA, E.E.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Cinética de absorção de amônio e efluxo de prótons em variedades de milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 513-526, 2009.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R.P. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, p. 45-47, 1989.

BOUWMAN, A.F; BOUMANS, L.J.M.; BATJES, N.H. Emissions of N<sub>2</sub>O and NO from fertilized fields: summary of available measurement data. **Global Biogeochemical Cycle**, v. 16, p. 1058, 2002.

BREDA, F.A.F.; ALVES, G.C.; REIS, V.M. Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 1, p. 45-52, 2016.

BREDA, F.A.F.; ALVES, G.C.; LOPEZ, B.D.O.; ARAGÃO, A.R.; ARAUJO, A.P.; REIS, V.M. Inoculation of diazotrophic bacteria modifies the growth rate and grain yield of maize at different levels of nitrogen supply. **Archives Agronomy Soil Science**, v. 1, p. 1-15, 2019a.

BREDA, F.A.F.; SILVA, T.R.F.; SANTOS, S.G.; ALVES, G.C.; REIS, V.M. Modulation of nitrogen metabolism of maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Archives of Microbiology**, v. 201, p. 547-558, 2019b.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C.M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S. Nitrogen Total. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). **Methods of soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological**



**Properties.** Agronomy Monograph no. 9. 2nd ed. Madison: American Society of Agronomy, 1983. p. 595-624.

BROUWER, R. Functional equilibrium: sense or nonsense?. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v. 31, n. 4, p. 335-348, 1983.

BUGBEE, B. Nutrient management in recirculating hydroponic culture. **Acta Horticulturae**, v. 648, p. 99-112, 2004.

BUCHANAN, R. B.; GRUISSEM, W. & JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 4. ed. Rockville, Maryland. 2000. 1367p.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VER LOREN VAN THEMAAT, E.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

CALZAVARA, A.K.; PAIVA, P.H.G.; GABRIEL, L.C.; OLIVEIRA, A.L.M.; MILANI, K.; OLIVEIRA, H.C.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; OLIVEIRA, M.C.N.; DIAS-PEREIRA, J.; STOLF-MOREIRA, R. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. **Plant Biology**, v. 20, p. 870-878, 2018.

CAMILIOS-NETO, D.; BONATO, P.; WASSEM, R.; TADRA-SFEIR, M.Z.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.; VALDEMERI, G.; DONATTI, L.; FAORO, H.; WEISS, V.A.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, v. 15, p. 378, 2014.

CANELLAS, L.P.; BALMORI, D.M.; MÉDICI, L.O.; AGUIAR, N.O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R.C.C.; FAÇANHA, A.R.; OLIVARES, F.L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, p. 119-132, 2013.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; AMARAL, F.P.; FALEIRO, A.C.; HUERGO, L.F.; ARISI, A.C.M. Identification of six differentially accumulated proteins of *Zea mays* seedlings (DKB240 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2. **European Journal of Soil Biology**, v. 58, p. 45-50, 2013.

CANTÚ, T.; VIEIRA, C.E.; PIFFER, R.D.; LUIZ G.C.; SOUZA, S.G.H. Transcriptional modulation of genes encoding nitrate reductase in maize (*Zea mays*) grown under aluminum toxicity. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n.43, p.2465-2473, 2016.

CAO, Y.; FAN, X.R.; SUN, S.B.; XU, G.H.; HU, J.; SHEN, Q.R. Effect of nitrate on activities and transcript levels of nitrate reductase and glutamine synthetase in rice. **Pedosphere**, v. 18, n. 5, p. 664-673, 2008.

CARVALHO, T.L.G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R.M.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n.19, p. 5631-5642, 2014.

CASANOVAS, E.M.; BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J. *Azospirillum* inoculation mitigates water stress effects in maize seedlings. **Cereal Research Communications**, v. 30, p. 343-350, 2002.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. In current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117-130, 2016.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 1, p. 28-35, 2009.

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

CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 853-855, 1975.

CHIBEBA, A.M.; KYEI-BOAHEN, S.; GUIMARÃES, M.F.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Feasibility of transference of inoculation-related technologies: a case study of evaluation of soybean rhizobial strains under the agro-climatic conditions of Brazil and Mozambique. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 261, p. 230-240, 2018.

COHEN, A.C., TRAVAGLIA, C.N., BOTTINI, R., PICCOLI, P.N. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. **Botany**, v. 87, p.455-462, 2009.

COMETTI, N.N. **Nutrição Mineral da Alface (*Lactuca sativa* L.) em Cultura Hidropônica - Sistema NFT**. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2020/21. Nono levantamento. Brasília, DF, 2021. 120 p.

CONCEIÇÃO, P.M.; VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.O.; CONCEIÇÃO, P.S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1880-1883, 2009.

COOKSON, S.J.; WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Light–dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in Arabidopsis leaf cells. **Plant Physiology**, v. 138, p. 1097-1105, 2005.

CORUZZI, G.; LAST, R.; DUDAREVA, N.; AMRHEIN, N. Amino acids. In: BUCHANAN B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (editors). **Biochemistry and molecular biology of plants**. 2 ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, John Wiley & Sons; 2015. p. 289-336.

COSGROVE, D.J. Loosening of plant cells walls by expansins. **Nature**, v. 407, p. 321-326, 2000.

COSTA, C.; DWYER, L.M.; ZHOU, X.; DUTILLEUL, P.; HAMEL, C.; REID, L.M.; SMITH, D.L. Root morphology of contrasting maize genotypes. **Agronomy Journal**, v. 94, n. 1, p. 96-101, 2002.

COUILLEROT, O.; POIRIER, M.A.; PRINGET-COMBARET, C.; MAVINGUI, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 528-538, 2010a.

COUILLEROT, O.; BOUFFAUD, M.L.; BAUDOIN, E.; MULLER, D.; CABALLERO-MELLADO, J.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298-2305, 2010b.

CRAWFORD, N.M. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, v. 7, p. 859-868, 1995.

CRUZ, J.C.; MAGALHÃES, P.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; MOREIRA, J.A.A. **Milho: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Embrapa Informação Tecnológica, 2011, 338p.

CROZIER A., KAMIYA Y., BISHOP G., YOKOTA T. **Biosynthesis of hormones and elicitor molecules**. In: Buchanan BB, Grissem W, Jones RL (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiology, Rockville, p. 850-929, 2000.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indóis in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2833-2837, 1988.

CUNHA, E.T.; PEDROLO, A.M.; PALUDO, F.; SCARIOT, M.C.; ARISI, A.C.M. *Azospirillum brasilense* viable cells enumeration using propidium monoazide-quantitative PCR. **Archives of Microbiology**, n. 202, p. 1653-1662, 2020.

CUNHA, F.; SILVA, N.; BASTOS, F.; CARVALHO, J.; MOURA, L.; TEIXEIRA, M.; ROCHA, A.; SOUCHIE, E. Efeito da *Azospirillum brasilense* na produtividade de milho no sudoeste goiano. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 13, p. 261-272, 2014.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 1023- 1029.

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

DAVIES, P.J. **The plant hormones: their nature, occurrence and functions**. In: Davies PJ (ed) Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer, Dordrecht, p. 1-12, 1995.

DAUGHTRY, C.S.T; WALTHALL, C.L; KIM, M.S; COLSTOUN, E.B; MCMURTREY, J.E; Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. **Remote Sensing of Environment**, v. 74, n. 2, p. 229-239, 2000.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, p. 155-164, 1999.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 871-879, 2001.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 1464-1473, 1976.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in non leguminous crop plants**. Science Tech, Springer Verlag, Madison, p. 1-155 (Brock/Springer series in contemporary bioscience), 1987.

DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: DF: EMBRAPA-SPI, 1995. 60 p.

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; SOUZA, E.S.; FRANÇA, J.G.E.; MACIEL, G.A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 1087-1093, 2004.

DOTTO, A.P.; LANA, M.C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J.F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n.3, p. 376-82, 2010.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

ESTRADA, G.A.; BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, D.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, v. 369, p. 115-129, 2013.

- EUCLYDES, R. **Sistema para análises estatísticas** (SAEG 9.1). Viçosa: Funarbe, 2007.
- FALHOF, J.; PEDERSEN, J.T.; FUGLSANG, A.T.; PALMGREN, M. Plasma membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase regulation in the center of plant physiology. **Molecular Plant**, n. 9, p. 323-337, 2016.
- FALEIRO, A.C.; NETO, P.A.V.; SOUZA, T.V.; SANTOS, M.; ARISI, A.C.M. Microscopic and proteomic analysis of *Zea mays* roots (P30F53 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 63-71, 2015.
- FALEIRO, A. C.; PEREIRA, T.P.; ESPINDULA, E.; BROD, F.C.A.; ARISI, A.C.M. Real time PCR detection targeting *nifA* gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, v. 61, n. 3, p. 125-133, 2013.
- FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. Y. Okon (Ed.), *Azospirillum/plant associations*, CRC Press, Boca Raton, p. 87-109, 1994.
- FANG, X.F.; FANG, S.Q.; YE, Z.Q.; LIU, D.; ZHAO, K.L.; JIN, C.W. NRT1.1 dual-affinity nitrate transport/signalling and its roles in plant abiotic stress resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 1-12, 2021.
- FAN, X.; NAZ, M.; FAN, X.; XUAN, W.; MILLER, A. J.; XU, G. Plant nitrate transporters: from gene function to application. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, p. 2463-2475, 2017.
- FAO, FAOSTAT. **Food Balances**. 2018. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS> Acesso em: 4 abr. de 2021.
- FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v. 49, p. 1080-1080, 1977.
- FENG, H.; YAN, M.; FAN, X.; LI, B.; SHEN, Q.; MILLER, A.J.; XU, G. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2319-2332, 2011.
- FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R.; SANTOS, L.A. (Editores). **Nutrição Mineral de plantas**. 2 ed, 670 p. Viçosa-MG: SBCS, 2018.
- FERNANDES, M.S. **Absorção e metabolismo de nitrogênio em plantas**. Boletim técnico, v.1, 50 p., 1978.
- FERREIRA, D. **Sisvar**: versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010.
- FERREIRA, N.S.; SANT'ANA, F.H.; REIS, V.M.; AMBROSINI, A.; VOLPIANO, C.G.; ROTHBALLER, M.; SCHWAB, S.; BAURA, V.A.; BALSANELLI, E.; PEDROSA, F.O.; PASSAGLIA, L.M.P.; SOUZA, E.M.; HARTMANN, A.; CASSAN, F.; ZILLI, J.E. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. **International Journal of Systematic and eEvolutionary Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 6203-6212, 2020.

FORDE, B.G. Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 21, p. 30-36, 2014.

FRÍAS, I.; CALDEIRA, M.T. PÉREZ-CASTINEIRA, J.R.; NAVARRO-AVINÓ, P.; CULLIANEZ-MACIÁ, F.A.; KUPPINGER, O.; STRANSKY, H.; PAGÉS, M.; HAGER, A.; SERRANO, R. A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1533-1544, 1996.

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

GALINDO, F.S.; TEIXEIRA FILHO, M.C.M.; BUZETTI, S.; PAGLIARI, P.H.; SANTINI, J.M.K.; ALVES, C.J.; MEGDA, M.M.; NOGUEIRA, T.A.R.; ANDREOTTI, M.; ARF, O. Maize yield response to nitrogen rates and sources associated with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, v. 111, n. 4, p. 985-1997, 2019.

GALINDO, F.S.; TEIXEIRA FILHO, M.C.M.; BUZETTI, S.; PAGLIARI, P.H.; SANTINI, J.M.K.; ALVES, C.J.; NOGUEIRA, L.M.; LUDKIEWICZ, M.G.Z.; ANDREOTTI, M.; BELLOTTE, J.L.M. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, p. 1-18, 2016.

GARNETT, T.; CONN, V.; PLETT, D.; CONN, S.; ZANGHELLINI, J.; MACKENZIE, N.; ENJU, A.; FRANCIS, K.; HOLTHAM, L.; ROESSNER, U.; BOUGHTON, B.; BACIC, A.; SHIRLEY, N.; RAFALSKI, A.; DHUGGA, K.; TESTER, M.; KAISER, B.N. The response of the maize nitrate transport system to nitrogen demand and supply across the lifecycle. **New Phytologist**, v. 198, n. 1, p. 82-94, 2013.

GARNETT, T.; PLETT, D.; CONN, V.; CONN, S.; RABIE, H.; RAFALSKI, J.A.; DHUGGA, K.; TESTER, M.A.; KAISER, B.N. Variation for N uptake system in maize: genotypic response to N supply. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-13, 2015.

GAXIOLA, R.A.; PALMGREN, M.G.; SCHUMACHER, K. Plant próton pumps. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2204-2214, 2007.

GEWEHR, E.; RODRIGUES, D.B.; AMARANTE, L.; MARTINS A.C.; ALMEIDA, A.S.; TUNES, L.V.M. Biochemical characterization of wheat seeds produced with the association of *Azospirillum brasilense* with nitrogen. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 58140-58151, 2020.

GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica, Hindawi Publishing Corporation**, v. 2, p. 1-15, 2012.

GLICK, B.R.; PENROSE, D.M.; LI, J.P. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 190, n. 1, p. 63-68, 1998.

GLICK, B.R.; TODOROVIC, B.; CZARNY, J.; CHENG, Z.Y.; DUAN, J.; MCCONKEY, B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 26, p. 227-242, 2007.

HARDOIM, P.R.; DE CARVALHO, T.L.G.; BALLESTEROS, H.G.F.; BELLIENY-RABELO, D.; ROJAS, C.A.; VENANCIO, T.M.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. Genome-wide transcriptome profiling provides insights into the responses of maize (*Zea mays* L.) to diazotrophic bacteria. **Plant Soil**, v. 451, p. 121-143, 2019.

HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1-18, 2008.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1258-1270, 2001.

HIREL, B.; LEGOUIS, J.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2369-2387, 2007.

HOAGLAND, D.R., ARNOLD, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Circular number 347. California Agricultural Experiment Station, 1950.

HOULTON, B.; ALMARAZ, M.; ANEJA, V.; AUSTIN, A.T.; BAI, E.; CASSMAN, K.G.; COMPTON, J.E.; DAVIDSON, E.A.; ERISMAN, J.W.; GALLOWAY, J.N.; GU, B.; YAO, G.; MARTINELLI, L.A.; SCOW, K.; SCHLESINGER, W.H.; TOMICH, T.P.; WANG, C.; ZHANG, X. A world of cobenefits: Solving the global nitrogen challenge. **Earth's Future**, v. 7, n. 8, p. 865-872, 2019.

HÖRBE, T.A.N.; AMADO, T.J.C.; FERREIRA, A.O.; ALBA, P.J. Optimization of corn plant population according to management zones in Southern Brazil. **Precision Agriculture**, v. 14, n. 4, p. 450-465, 2013.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ LM, CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. **Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense***. In: Cassán FD, GarciadeSalamone I (eds) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, p. 17-36, 2008.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo.** Londrina: EMBRAPA-SOJA, 38p. (Documentos EMBRAPA-SOJA, ISSN 2176-2937, n.325), 2011.

HUSSAIN, A.; HASNAIN, S. Interaction of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p. 2645-2654, 2011.

IFA- International Fertilizer Association. **Assessment of fertilizer use by crop at the global level 2014-15.** A. 17, 134 rev., 2017.

INAGAKI, A.M.; GUIMARÃES, V.F.; LANA, M.C.; KLEIN, J.; COSTA, A.C.P.R.; RODRIGUES, L.F.O.S.; RAMPIM, L. Maize initial growth with the inoculation of plant growth-promoting bacteria (PGPB) under diferente soil acidity levels. **Australian jornal of Crop Science**, v. 9, n. 4, p. 271-280, 2015.

JAIN, D.K.; PATRIQUIN, D.G. Characterization of substance produced by *Azospirillum* with causes branching of wheat root hairs. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 206-210, 1985.

JAMES, E.K; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Review in Plant Science**, v. 17, n. 1, p. 77-119, 1998.

JANICKA-RUSSAK, M.; KABALA, K. **The role of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in salinity stress of plants.** In: Progress in Botany, Lüttge U. and Beyschlag W. (eds), vol. 76, (Cham: Springer International Publishing), p. 77-92, 2015.

JAWORSKI, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 43, p. 1274-1279, 1971.

JENSEN, E.S.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M.; GRESSHOFF, P.M.; HAUGGAARD-NIELSEN, H.; ALVES, B.; MORRISON, M.J. Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 2, p. 329-364, 2012.

JORDÃO, L.T.; LIMA, F.F.; LIMA, R.S.; MORETTI, P.A.E.; PEREIRA, H.V.; MUNIZ, A.S.; OLIVEIRA, M.C.N. **Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária.** In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 29., Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 31., Simpósio Brasileiro de Microbiologia do solo, 11., Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 8. Anais...FERTBIO: Guarapari, ES, p1-5, 2010.

KANDEL, S.L.; JOUBERT, P.M.; DOTY, S.L. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 1-26, 2017.

KANT, S. Understanding nitrate uptake, signalling and remobilisation for improving plant nitrogen use efficiency. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 74, p. 89-96, 2018.



KANT, S.; BI, Y.M.; WERETILNYK, E.; BARAK, S.; ROTHSTEIN, S.J. The Arabidopsis halophytic relative *Thellungiella halophila* tolerates nitrogen-limiting conditions by maintaining growth, nitrogen uptake, and assimilation. **Plant Physiology**, v. 147, p. 1168-1180, 2008.

KANG, S.M.; RADHAKRISHNAN, R.; KHAN, A.L.; KIM, M.J.; PARK, J.M.; KIM, B.R.; SHIN, D.H.; LEE, I.J. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 84, p. 115-124, 2014.

KAISER, W.M.; HUBER, S.C. Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant Physiology**, v. 106, p. 817-821, 1994.

KEMPERS, A. J.; ZWEERS, A. Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method. **Community in Soil Science Plant Analysis**, v. 17, p. 715-723, 1986.

KISTLER, L.; MAEZUMI, S.Y.; SOUZA, J.G.; PRZELOMSKA, N.A.S; COSTA, F.M.; SMITH, O.; LOISELLE, H.; RAMOS-MARDRIGAL, J.; WALES, N.; RIBEIRO, E.R.; MORRISON, R.R.; GRIMALDO, C.; PROUS, A.P.; ARRIAZA, B.; GILBERT, M.T.P.; FREITAS, F.O.; ALLABY, R.G. Multiproxy evidence highlights a complex evolutionary legacy of maize in South America. **Science**, v. 362, p. 1309-1313, 2018.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. **Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes**. In Station de Pathologie, Proceeding of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Tours, France, 27 August- 2 september, Végétale et Phyto-Bactériologie, Ed., p. 879-882, 1978.

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

KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSKES, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better explored. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KRAISER, T.; GRAS, D.E.; GUTIÉRREZ, A.G.; GONZÁLEZ, B.; GUTIÉRREZ, R.A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1455-1466, 2011.

KRAPP, A.; BERTHOMÉ, R.; ORSEL, M.; MERCEY-BOUTET, S.; YU, A.; CASTAINGS, L.; ELFTIEH, S.; MAJOR, H.; RENOU, J.P.; DANIEL-VEDELE, F. Arabidopsis roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. **Plant Physiology**, v. 157, n. 3, p. 1255-1282, 2011.

KUMAR, A.; BAHADUR, I.; MAURYA, B.R.; RAGHUWANSHI, R.; MEENA, V.S. SINGH, D.K.; DIXIT, J. Does a plant growth promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability?. **Journal of pure and applied microbiology**, v. 9, n. 1, p. 715-724, 2015.

KUMAR, P.K.R.; LONSANE, B.K. Microbial production of gibberellins: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 34, p. 29-139, 1989.

LAUGIER, E.; BOUGUYON, E.; MAURIÈS, A.; TILLARD, P.; GOJON, A.; LEJAY, L. Regulation of High-Affinity nitrate uptake in roots of *Arabidopsis* depends predominantly on posttranscriptional control of the NRT2.1/NAR2.1 transporter system. **Plant Physiology**, v. 158, n. 2, p. 1067-1078, 2012.

LANA, M.C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J.E.H. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v.59, p.399-405, 2012.

LANG, V.; PERTL-OBERMEYER, H.; SAFIARIAN, M.; OBERMEYER, G. Pump up the volume - a central role for the plasma membrane H<sup>+</sup> pump in pollen germination and tube growth. **Protoplasma**, V. 251, P. 477-488, 2014.

LEZHNEVA, L.; KIBA, T.; FERIA-BOURRELLIER, A-B.; LAFOUGE, F.; BOUTET-MERCEY, S.; ZOUFAN, P.; SAKAKIBARA, H.; DANIEL-VEDELE, F.; KRAPP, A. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT 2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. **The Plant Journal**, v. 80, p. 230-241, 2014.

LÉRAN, S.; VARALA, K.; BOYER, J.-C.; CHIURAZZI, M.; CRAWFORD, N.; DANIELVEDELE, F.; DAVID, L.; DICKSTEIN, R.; FERNANDEZ, E.; FORDE, B.; GASSMAN, W.; GEIGER, D.; GOJON, A.; GONG, J. M.; HALKIER, B. A.; HARRIS, J. M.; HEDRICH, R.; LIMANI, A. N.; RENTSCH, D.; SEO, M.; TSAY, Y. F.; ZHANG, M.; CORUZZI, G.; LACOMBE, B. A unified nomenclature of nitrate transporter 1/peptide transporter family members in plants. **Trend in Plant Science**, v. 19, p. 5-9, 2014.

LI, X.; JI, P.; ZHOU, B.; DONG, W.; ZHANG, L.; XIAO, K.; YIN, B.; ZHANG, Y. Nitrogen partitioning traits and expression patterns of N metabolism-associated genes in maize hybrids with contrasting N utilization efficiencies. **Agronomy Journal**, v. 113, p. 1439-1456, 2021.

LI, M.G.; VILLEMUR, R.; HUSSEY, P.J.; SILFLOW, C.D.; GANTT, J.S.; SNUSTAD, D.P. Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p. 401-440, 1993.

LIN, W.; OKON, Y.; HARDY, R.W.F. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1775-1779, 1983.

LIPPER, L.; THORNTON, P.; CAMPBELL, B.M.; BAEDEKER, T.; BRAIMOH, A.; BWALYA, M.; CARON, P.; CATTANEO, A.; GARRITY, D.; HENRY, K.; HOTTLE, R.; JACKSON, L.; JARVIS, A.; KOSSAM, F.; MANN, W.; MCCARTHY, N.; MEYBECK, A.; NEUFELDT, H.; REMINGTON, T.; SEN, P.T.; SESSA, R.; SHULA, R.; TIBU, A.; TORQUEBIAU, E.F. Climate-smart agriculture for food security. **Nature Climate Change**, v. 4, p. 1068-1072, 2014.

LIU, J.; HAN, L.; CHEN, F.; BAO, J.; ZHANG, F.; MI, G. Microarray analysis reveals early responsive genes possibly involved in localized nitrate stimulation of lateral root development in maize (*Zea mays* L.). **Plant Science**, v. 175, p. 272-282, 2008.

LIU, K.H.; HUANG, C.Y.; TSAY, Y.F. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. **Plant Cell**, v. 11, p. 865-874, 1999.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOTHIER, J.; GAUFICHON, L.; SORMANI, R.; LEMAÎTRE, T.; AZZOPARDI, M.; MORIN, H.; CHARDON, F.; REISDORF-CREN, M.; AVICE, J. C.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in Arabidopsis rosettes when nitrate supply is not limiting. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n. 4, p. 1375-1390, 2011.

LPSN - **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <<https://www.bacterio.net/>>. Acesso em: 10 de mar. 2020.

LUCANGELI, C., BOTTINI, R. Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. **Symbiosis**, v. 23, p. 63-71, 1997.

LUCARINI, A.C.; SILVA, L.A.; BIANCHI, R.A.C. Um sistema para contagem semi-automática de microrganismos. **Pesquisa & Tecnologia FEI**, n. 26, p. 36-40, 2004.

MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistente to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549-553, 1991.

MACHADO, A.T.; MAGALHÃES, J.R.; MAGNAVACA, R.; SILVA, M.R. Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em diferentes genótipos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 1, p. 45-47, 1992.

MACHADO, A.T.; SODEK, L.; DÖBEREINER, J.; REIS, V.M. Evaluation of nitrogen fertilizer and inoculation with diazotrophic bacteria on the biochemical behavior of the maize cultivar nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 961-70, 1998.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock**. 14 ed, Porto Alegre: Artmed, 2016, 960p.

MAGALHÃES, J.R.; MACHADO, A.T. **Biochemical parameters selecting maize for nitrogen assimilation efficiency under stress conditions**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM PERSPECTIVA, 1995, Belo Horizonte, MG. Anais... Belo Horizonte: EMBRAPA/CNPMS, 1995. 449p. p 345-367.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal Experimental Botany**, v. 55, n. 394, p. 27-34, 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2 ed. London: Academic Press, 1995, 889p.

MARTIN, A.; LEE, J.; KICHEY, T.; GERENTES, D.; ZIVY, M.; TATOUT, C.; TATOUT, C.; DUBOIS, F.; BALLIAU, T.; VALOT, B.; DEVANTURE, M.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; QUILLERÉ, I.; COQUE, M.; GALLAIS, A.; GONZALEZ-MORO, M.B.; BETHENCOURT, L.; HABASH, D.Z.; LEA, P.J.; CHARCOSSET, A.; PEREZ, P.; MURIGNEUX, A.; SAKAKIBARA, H.; EDWARDS, K.J.; HIREL, B. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. **The Plant Cell**, v. 18, n.11, p. 3252-3274, 2006.

MARTINS, M.R.; JANTALIA, C.P.; REIS, V.M.; DÖWICH, I.; POLIDORO, J.C.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Impact of plant growth-promoting bacteria on grain yield, protein content, and urea-15N recovery by maize in a Cerrado Oxisol. **Plant and soil**, v. 422, n. 1-2, p. 239-250, 2017.

MARQUES, D.M.; MAGALHÃES, P.C.; MARRIEL, I.E.; JÚNIOR, C.C.G.; SILVA, A.B.; MELO, I.G.; SOUZA, T.C. *Azospirillum brasilense* favors morphophysiological characteristics and nutrient accumulation in maize cultivated under two water regimes. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 19, p. 1-17, 2020.

MARQUES, D.M.; MAGALHÃES, P.C.; MARRIEL, I.E.; JÚNIOR, C.C.G.; SILVA, A.B.; MELO, I.G.; SOUZA, T.C. Gas exchange, root morphology and nutrients in maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense* cultivated under two water conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, p. 1-11, 2021.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v. 105, p. 1141-1157, 2010.

MATT, P.; GEIGER, M.; WALCH-LIU, P.; ENGELS, C.; KRAPP, A.; SITTI, M. The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. **Plant Cell and Environment**, v. 24, p. 170-190, 2001.

MATOSO, E.S.; REIS, V.M.; GIACOMINI, S.J.; SILVA, M.T.; AVANCINI, A.R.; SILVA, S.D.A. Diazotrophic bacteria and substrates in the growth and nitrogen accumulation of sugarcane seedlings. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 1, p. 1-9, 2019.

MEHNAZ, S.; KOWALIK, T.; REYNOLDS, B.; LAZAROVITS, G. Growth promotion effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 1848-1856, 2010.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v. 10, p. 326-335, 2006.

MI, G.; CHEN, F.; ZHANG F. Physiological and genetic mechanisms for nitrogen-use efficiency in maize. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 57-63, 2010.

MITCHELL, L. Micro determination of nitrogen in plant & tissues. **J. AOAC**, 1, p.1-3, 1972.

MIYAZAWA, M., PAVAN, M.A., BLOCK, M.F.M. Spectrophotometry determination of nitrate in soil extracts without chemical reduction. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, p. 129-133, 1985.

MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A.M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; SCHMIDT, M.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; PANKIEVICZ, V.C.S.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. *Herbaspirillum* plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, p.175-196, 2012.

MONTEIRO, R.A.; SCHMIDT, M.A.; BAURA, V.A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; YATES, M.G.; RANDI, M.A.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 932-937, 2008.

MORAIS, T.P.; BRITO, C.H.; BRANDÃO, A.M.; REZENDE, W.S. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 2, p. 290-298, 2016.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. (eds.) **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA, p. 449-542, 2006.

MUMBACH, G.L.; KOTOWSKI, I.E.; SCHNEIDER, J.A.; MALLMANN, M.T.; BONFADA, E.B.; PORTELA, V.O.; BONFADA, E.B.; KAISER, D.R. Resposta da inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de trigo e milho safrinha. **Revista Scientia Agraria**, v. 18, n. 2, p. 97-103, 2017.

MÜLLER, T.M.; SANDINI, I.E.; RODRIGUES, J.D.; NOVAKOWISKI, J.H. BASI, S.; KAMINSKI, T.H. Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases corn yield. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 210-215, 2016.

NENDEL, C.; MELZER, D.; THORBURN, P.J. The nitrogen nutrition potential of arable soils. **Nature: Scientific Reports**, v. 9, p. 1-9, 2019.

NOGUEIRA, A.R.; SOUZA, G.B. **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos-SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005, 334p.

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A.; NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1687-1698, 2011.

NYE, P.H.; TINKER, P.B. **Solute movement in the soil-root system**. Oxford: Blackwekk, 1977, 542p.

OKAMOTO, M.; KUMAR, A.; LI, W.; WANG, Y.; SIDDIQI, M.Y.; CRAWFORD, N.M.; GLASS, A.D. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene *AtNRT3.1*. **Plant Physiology**, v. 140, p. 1036-1046, 2006.

OKON, Y.; HEYTLER, P.G.; HARDY, R.W. F. N<sub>2</sub> fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 46, p. 694-697, 1983.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **American Society of Microbiology News**, v. 63, p. 366-370, 1997.

OLDROYD, G.E.; MURRAY, J.D.; POOLE P.S.; DOWNIE, J.A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 119-44, 2011.

OLSEN, K.K. Multiple wavelength ultraviolet determinations of nitrate concentration, method comparisons from the preakness brook monitoring project, October 2005 to October 2006. **Water, air and soil pollution**, v. 187, p. 195-202, 2008.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 59-61, 2003.

OLIVEIRA, S. A. S.; STARK, E. M. L. M.; FREITAS, J. A. E.; BERBARA, R. L.; SOUZA, S. R. Partição de nitrogênio em variedades de milho (*Zea mays* L.) com a aplicação foliar de microorganismos eficazes e nitrato. **Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida**, v. 31, n. 1, p. 57-69, 2011.

ONA, O.; IMPE, J.V.; PRINSEN, E.; VANDERLEYDEN, J. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, p. 125-132, 2005.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. **Dinitrogen-Fixing Prokaryotes**. In: The The prokaryotes: Prokaryotic physiology and biochemistry. Ed E. Rosenberg, E.F. de Long, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson. Berlin, Springer-Verlag, p. 427-451, 2013.

ORSEL, M.; CHOPIN, F.; LELEU, O.; SMITH, S.J.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F.; MILLER, A.J. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction, **Plant Physiology**, v. 142, p. 1304-1317, 2006.

OSORIO, N.W. Effectiveness of phosphate solubilizing microorganisms in increasing plant phosphate uptake and growth in tropical soils. In: MAHESHWARI D.K. (ED) **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management** (Vol. III) Springer-Verlag Berlin, p. 65-80, 2011.

PAES, M.C.D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006, 6p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 75).

PANKIEVICZ, V.C.S.; AMARAL, F.P.; SANTOS, K.F.D.N.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHUELLER, M.J.; ARISI, A.C.M.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.;

STACEY, G.; FERRIERI, R. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **The Plant Journal**, v. 81, p. 907-919, 2015.

PALMGREN, M.G. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 817-845, 2001.

PALMGREN, M. G. & NISSEN, P. P-Type ATPases. **Annual Review Biophysics**, v. 40, p. 243-266, 2011.

PALLARDY, S.G. Nitrogen Metabolism. *In: Physiology of Woody Plants*, chapter 9. 3ed, Elsevier, 464p. 2008.

PARENTONI, S. N.; MENDES, F. F.; GUIMARÃES, L. J. M. Melhoramento para eficiência no uso de P. *In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos*. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. p. 250-255.

PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntrc* (*GlnG*) type genes. **FEMS Microbiology Letters**, n. 23, p. 95-101, 1984.

PEDROSA, F.O.; OLIVEIRA, A.L.M.; GUIMARÃES, V.F.; ETTO, R.M.; SOUZA, E.M.; FURMAM, F.G.; GONÇALVES, D.R.P.; SANTOS, O.J.A.P.; GONÇALVES, L.S.A.; BATTISTUS, A.G.; GALVÃO, C.W. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: A new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, p. 45-56, 2020.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. The role of bacterial indoleacetic acid in the development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3795-3801, 2002.

PENG, J.; DAN, L.; WANG, Y.P.; TANG, X.; YANG, X.; YANG, F.; LU, X.; PAK, B. Role contribution of biological nitrogen fixation to future terrestrial net land carbon accumulation under warming condition at centennial scale. **Journal of Cleaner Production**, v.202, p.1158-1166, 2018.

PEREIRA, E.G.; FERREIRA, L.M.; FERNANDES, E.C.; LIMA, B.R.; SANTOS, L.A.; FERNANDES, M.S. Root morphology and ammonium uptake kinetics in two traditional rice varieties submitted to different doses of ammonium nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 1, p. 1-14, 2021.

PEREIRA, L.M.; PEREIRA, E.M.; REVOLTI, L.T.M.; ZINGARETTI, S.M.; MÔRO, G.V. Seed quality, chlorophyll content index and leaf nitrogen levels in maize inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, n. 3, p. 630-637, 2015.

PEREIRA-DEFILIPPI, L.; PEREIRA, E.M.; SILVA, F.M.; MORO, G.V. Expressed sequence tags related to nitrogen metabolism in maize inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1-14, 2017.

PIETERSE, C.M.J.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEONREYES, A.; VAN WEES, S.C.M. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 489-521, 2012.

PII, Y.; ALESSANDRINI, M.; GUARDINI, K.; ZAMBONI, A.; VARANINI, Z. Induction of high-affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in grapevine roots is an active process correlated to the expression of specific members of the NRT2 and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene families. **Functional Plant Biology**, v. 41, p. 353-365, 2014.

PII, Y.; MIMMO, T.; TOMASI, N.; TERZANO, R.; CESCO, S.; CRECCHIO, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, p. 403-415, 2015.

PII, Y.; ALESSANDRINI, M.; DALL'OSTO, L.; GUARDINI, K.; PRINSI, B.; ESPEN, L.; ZAMBONI, A.; VARANINI, Z. Time-Resolved investigation of molecular components involved in the induction of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> High Affinity Transport System in maize roots. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-12, 2016.

PII, Y.; ALDRIGHETTI, A.; VALENTINUZZI, F.; MIMMO, T.; CESCO, S. *Azospirillum brasilense* inoculation counteracts the induction of nitrate uptake in maize plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 4, p. 1313-1324, 2019.

PINDER, R.W.; DAVIDSON, E.A.; GOODALE, C.L.; GREAVES, T.L.; HERRICK, J.D.; LIU, L.L. Climate change impacts of US reactive nitrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 7671-7675, 2012.

PIPERNO, D.R.; RANERE, A.J.; HOLST, I.; IRIARTE, J.; DICKAU, R. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 13, p. 5019-5024, 2009.

PLETT, D.; TOUBIA, J.; GARNETT, T.; TESTER, M.; KAISER, B.N.; BAUMANN, U. Dichotomy in the NRT gene families of dicots and grass species. **PloS ONE**, v. 5, n. 12, p. 1-12, 2010.

PLETT, D.; HOLTHAN, L.; BAUMANN, U.; KALASHYAN, E.; FRANCIS, K. ENJU, A.; TOUBIA, J. ROESSNER, U.; BACIC, A. RAFALSKI, A.; DHUGGA, K.S.; TESTER, M.; GARNETT, T. Nitrogen assimilation system in maize is regulated by developmental and tissue-specific mechanisms. **Plant Molecular Biology**, v. 92, p. 293-312, 2016.

PUENTE, M.E.; BASHAN, Y.; LI, C.Y.; LEBSKY, V.K. Microbial populations and activities in the rhizosphere of rock-weathering desert plants I. Root colonization and weathering of igneous rocks. **Plant Biol.**, v. 6, p. 629-642, 2004.

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

PRADO, R. de M. **Nutrição de plantas**. Editora UNESP, 408 p., 2008.

RAMOS, A.S.; SANTOS, T.M.C.; SANTANA, T.M.; GUEDES, E.L.F.; MONTALDO, Y.C. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Verde**, v. 5, n. 4, p. 113-117, 2010.



RAO, H.; SAVALGI, V.P. Isolation and screening of nitrogen fixing endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* GdS25. **Internatinal Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 1364-1373, 2017.

RASHID, M.; BERA, S.; MEDVINSKY, A.B.; SUN, G.Q.; LI, B.L.; CHAKRABORTY, A. Adaptive regulation of nitrate transceptor NRT1.1 in fluctuating soil nitrate conditions. **iScience**, v. 2, p. 41-50, 2018.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing disposable**, 2019.

REETZ, H.F. **Fertilizantes e o seu uso eficiente**. ANDA: São Paulo, 2017, 178p.

REIS, V.M. **Inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio para aplicação em gramíneas**. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 27., Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 11., Simpósio Brasileiro de Microbiologia do solo, 9., Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 6., 2006, Bonito, MS. A busca das raízes. Anais... Bonito: SBM. DOURADOS; Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 1 CD ROM. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 82).

REIS, V.M. Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. **Embrapa Agrobiologia (Documentos 232)**, p.22, 2007.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 19, n .3, p. 227-247, 2000.

REIS, V.M.; JESUS, E.C.; SCHWAB. S.; OLIVEIRA, A.L.M.; OLIVARES, F.O.; BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I. **Fixação Biológica de nitrogênio simbiótica e associativa**. In: Nutrição Mineral de plantas. Cap. VIII. FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R.; SANTOS, L.A. (Editores). 2 ed, 670 p. Viçosa-MG: SBCS, 2018.

RIBAUDO, C.M.; RONDANINI, D.P.; CURÁ, J.A.; FRASCHINA, A.A. Response of *Zea mays* to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 4, p. 631-634, 2001.

RIBAUDO, C.M.; RONDANINI, D.P.; TRINCHERO, G.D.; CURÁ, J.A. Effect of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation on maize nitrogen metabolism. **Maydica**, v. 51, p. 481-485, 2006.

ROCHA, J.G.; FERREIRA, L.M.; TAVARES, O.C.H.; SANTOS, A.M.; SOUZA, S.R. Cinética de absorção de nitrogênio e acúmulo de frações solúveis nitrogenadas e açúcares em girassol. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 4, p. 381-390, 2014.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J.R.V.A.; VICTOT, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. Citri Tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, p. 16, 1986.

ROESCH, L.F.W.; QUADROS, P.D.; CAMARGO, F.A.O.; TRIPLETT, E.W. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. For nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1377-1383, 2007.

ROESCH, L.F.W.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M; TRIPLETT, E.W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil root and stem of field-grown maize. **Plant and Soil**, v. 302, p. 91-104, 2008.

ROSOLEM, C.A.; ASSIS, J.S.; SANTIAGO, A.D. Root growth and mineral nutrition of corn hybrids as affected by phosphorus and lime. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 25, n.13-14, p. 2491-2499, 1994.

ROZIER, C.; ERBAN, A.; HAMZAOU, J.; PRIGENT-COMBARET, C.; COMTE, G.; KOPKA, J.; CZARNES, S.; LEGENDRE, L. Xylem sap metabolite profile changes during phytostimulation of maize by the plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum lipoferum* CRT1. **Metabolomics**, v. 6, n.3, p. 1-10 2016.

RUBIO-ASENSIO, J.S; RACHMILEVITCH, S.; BLOOM, A.J. Plant responses to rising CO<sub>2</sub> depend on nitrogen source and nighttime CO<sub>2</sub> levels. **Plant Physiology**, v. 168, n. 1, p. 156-163, 2015.

SAKAKIBARA, H.; KAWABATA, S.; HASE, T.; SUGIYAMA, T. Differential effect of nitrate and light on the expression of glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. **Plant and Cell Physiology**, v. 33, n. 8, p. 1193-1198, 1992.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 3, p. 345-352, 2005.

SALAZAR-CEREZO, S.; MARTÍNEZ-MONTIELA, N.; GARCÍA-SÁNCHEZ, J.; PÉREZ-Y-TERRÓN, R.; MARTÍNEZ-CONTRERAS, R.D. Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. **Microbiological Research**, v. 208, p. 85-98, 2018.

SANDHU, K.S.; SINGH, N.; MALHI, N.S. Some properties of corn grains and their flours I: Physicochemical, functional and chapati-making properties of flours. **Food Chemistry**, v. 101, p. 938-946, 2007.

SANTOS, J.S.; VIANA, T.O.; JESUS, C.M.; BALDANI, V.L.D.; FERREIRA, J.S. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitoria da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 1, p. 78-85, 2015.

SANTOS, K.F.D.N.; MOURE, V.R.; HAUER, V.; SANTOS, A.R.S.; DONATTI, L.; GALVÃO, C.W.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; WASSEM, R.; STEFFENS, M.B.R. Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 415, n. 1-2, p. 245-255, 2017.

SANTOS, L.A.; BUCHER, C.A.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Metabolismo de nitrogênio em arroz sob níveis decrescentes de nitrato. **Agronomia**, v.39, n. 1-2, p. 28-33, 2005.

SANTOS, L.A.; SANTOS, W.A.; SPERANDIO, M.V.L.; BUCHER, C.A.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrate uptake kinetics and metabolic parameters in two rice varieties grown in high and low nitrate. **Journal of Plant Nutrition**, v. 34, p. 988-1002, 2011.

SANTOS, L.A. **Efeito da Superexpressão dos Fatores de Transcrição ZmDof1 e OsDof25 sobre a Eficiência de Uso de Nitrogênio em *Arabidopsis thaliana* L.** 2009. 81 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

SANTOS, S.G.; RIBEIRO, F.S.; ALVES, G.C.; SANTOS, L.A.; REIS, V.M. Inoculation with five diazotrophs alters nitrogen metabolism during the initial growth of sugarcane varieties with contrasting responses to added nitrogen. **Plant and Soil**, v. 451, p. 25-44, 2019.

SATURNO, D.F.; CEREZINI, P.; MOREIRA DA SILVA P.; OLIVEIRA, A.B.D.; OLIVEIRA, M.C.N.D.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A. Mineral nitrogen impairs the biological nitrogen fixation in soybean of determinate and indeterminate growth types. **Journal of Plant Nutrition**, v. 40, p. 1690-1701, 2017.

SCHIAVON, M.; ERTANI, A.; NARDI, S. Effects of an Alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 11800-11808, 2008.

SHAHZAD, R., WAQAS, M., KHAN, A.L., ASAF, S., KHAN, M.A., KANG, S.M.; YUN, B.W.; LEE, I.J. Seedborne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p.236–243, 2016.

SHEN, H.; CHEN, J.; WANG, Z.; YANG, C.; SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H.; YAN, X. Root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 6, p. 1353-1362, 2006.

SMERCINA, D.N.; EVANS, S.E.; FRIESEN, M.L.; TIEMANN, L.K. To fix or not to fix: controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 6, p.1-14, 2019.

SILVA, F.M.; ALVES, L.S.; BOTELHO FILHO, F.B.; SILVA, I.S. Liquidez dos contratos futuros de milho negociados na BM&FBOVESPA. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia**, v. 9, p. 26-44, 2017.

SINCLAIR, T.R.; GILBERT, R.A.; PERDOMO, R.E.; SHINE, J.M.; POWELL, G.; MONTES, G. Sugarcane leaf area development under field conditions. **Field Crops Research**, v. 88, n. 02-03, p. 171-178, 2004.

SIVASANKAR, S.; COLLINSON, S.; GUPTA, R.; DHUGGA, K. "Maize", in **Handbook of Bioenergy Crop Plants**, eds C. Kole, C. Joshi, and D. Shonnard (Boca Ratan, FL: CRC Press), p. 405-432, 2012.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, n. 2, p. 191-196, 1999.

SOMERS, E.; PTACEK, D.; GYSEGOM, P.; SRINIVASAN, M.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1803-1810, 2005.

SONDERGAARD, T.E.; SHULTZ, A.; PALMGREN, M.G. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase. **Plant Physiology**, v. 136, p. 2475-2482, 2004.

SOARES, I.C.; PACHECO, R.S.; SILVA, C.G.N.; SANTOS, R.S.; BALDANI, J.I.; URGUAGA, S.; VIDAL, M.S.; ARAUJO, J.L.S. Real-time PCR method to quantify Sp245 strain of *Azospirillum baldaniorum* on *Brachiaria* grasses under field conditions. **Plant and Soil**, v. 468, p. 1-14, 2021.

SOARES, I.C. **Avaliação da população de duas espécies diazotróficas associativas em tecidos de braquiária e milho utilizando PCR quantitativa**. 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

SØRENSEN, J.; NICOLAISEN, M.H.; RON, E.; SIMONET, P. Molecular tools in rhizosphere microbiology-from single-cell to whole-community analysis. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 483-512, 2009.

SPAEPEN, S.; BOSSUYT, S.; ENGELEN, K.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J. Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. **New Phytologist**, v. 201, p. 850-861, 2014.

SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L.A.; BUCHER, C.A.; FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. Isoforms of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. **Plant Science**, v. 180, p. 251-258, 2011.

SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L.A.; ARAÚJO, O.J.L.; BRAGA, R.P.; COELHO, C.P.; NOGUEIRA, E.M.; FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. Response of nitrate transporters and PM H<sup>+</sup>-ATPase expression to nitrogen flush on two upland rice varieties contrasting in nitrate uptake kinetics. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 4, p. 568-576, 2014.

SPOLAOR, L.T.; GONÇALVES, L.S.A.; SANTOS, O.J.A.P.; OLIVEIRA, A.L.M.; SCAPIM, C.A.; BERTAGNA, F.A.B.; KUKI, M.C. Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônômico de milho pipoca. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 33-40, 2016.

STETS, M.I.; ALQUERES, S.M.; SOUZA, E.M. PEDROSA, F.O.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; CRUZ, L.M. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 bacteria in wheat roots by strain-specific quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6700-6709, 2015.

STITT, M.; MÜLLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.R.; KRAPP, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 959-970, 2002.

SUR, S. BOTHR, A.K.; SEM, A. A symbiotic nitrogen fixation - A bioinformatics perspective. **Biotechnology**, v. 9, p. 257-273, 2010.

SZE, H. H<sup>+</sup>-Translocating ATPases: advances using membrane vesicles. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 36, p. 175-208, 1985.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 858 p., 2017.

TAKAHASHI, N.; YAMAGUCHI, I.; YAMANE, H. Gibberellins. In: TAKAHASHI, N. (Ed.) **Chemistry of plant hormones**. Boca Raton: CRC Press, 1988. cap. 3, p. 57-151.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum liporefum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (*Beijerinck*) com. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal Microbiology**, v. 24, p. 976-980, 1978.

UNNO, H.; UCHIDA, T.; SUGAWARA, H.; KURISU, G.; SUGIYAMA, T.; YAMAYA, T.; SAKAKIBAR, H.; HASE, T.; KUSUNOKI, M. Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 29, n. 281, p.29287-29296, 2006.

USDA. United States Department of Agriculture – **World Agricultural Projections**. Circular series, june 2021, 43 p.

VANBLEU, E.; VANDERLEYDEN, J. **Molecular genetics of rhizosphere and plant-root colonization**. In: Elmerich C, Newton WE, editors. Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Nitrogen fixation: origins, applications and research progress. vol. 5. Dordrecht: Springer, p. 85-112, 2007.

VANDE BROEK, A.; DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; VAN DOMMELEN, A. ***Azospirillum* -plant root interactions: signaling and metabolic interactions**. In **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process**. Edited by E. W. Triplett. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. p. 761-777, 2000.

VANONI, M.; DOSSENA, L.; VAN DEN HEUVEL, R.; CURTI, B. Structure–function studies on the complex iron-sulfur flavoprotein glutamate synthase: the key enzyme of ammonia assimilation, **Photosynthesis Research**, v. 83, p. 219-238, 2005.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizosphere as biofertilisers. **Plant and Soil**, v. 255, p. 571-586, 2003.

VON WIRÉN, N.; GAZZARRINI, S.; GOJON, A.; FROMMER, W.B. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 3, p. 254-261, 2000.

WANG, H.; INUKAI, Y.; YAMAUCHI, A. Root development and nutrient uptake. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 3, p. 279-301, 2006.

WERNER, T.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin action in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 5, p. 527-538, 2009.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; BORZIAK, K.; KHALSA-MOYERS, G.; ALEXANDRE, G.; SUKHARNIKOV, L.O.; WUICHET, K.; HURST, G.B.; McDONALD, W.H.; ROBERTSON, J.S.; BARBE, V.; CALTEAU, A.; ROUY, Z.; MANGENOT, S.; PRIGENT-COMBARET, C.; NORMAND, P.; BOYER, M.; SIGUIER, P.; DESSAUX, Y.; ELMERICH, C.; CONDEMINE, G.; KRISHNEN, G.; KENNEDY, I.; PATERSON, A.H.; GONZÁLEZ, V.; MAVINGUI, P.; ZHULIN, I. B. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. **Plos Genetics**, v. 7, n. 12, 2011.

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, v. 95, n. 5, p. 707-735, 2005.

WU, L.; KOBAYASHI, Y.; WASAKI, J.; KOYAMA, H. Organic acid excretion from roots: a plant mechanism for enhancing phosphorus acquisition, enhancing aluminum tolerance, and recruiting beneficial rhizobacteria. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 64, n. 6, p. 697-704, 2018.

XIE, J.B.; DU, Z.; BAI, L.; TIAN, C.; ZHANG, Y.; XIE, J.Y.; WANG, T.; LIU, X.; CHEN, X.; CHENG, Q.; CHEN, S.; LI, J. Comparative genomic analysis of N<sub>2</sub>-fixing and non-N<sub>2</sub>-fixing *Paenibacillus* spp.: organization, evolution and expression of the nitrogen fixation genes. **Plos Genetics**, v. 10, n. 3, p. 1-17, 2014.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A.J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 153-182, 2012.

XU, P.; CHEN, A.; HOULTON, B.Z.; ZENG, Z.; WEI, S.; ZHAO, C.; LU, H.; LIAO, Y.; ZHENG, Z.; LUAN, S.; ZHENG, Y. Spatial variation of reactive nitrogen emissions from China's croplands codetermined by regional urbanization and its feedback to global climate change. **Geophysical Research Letters**, v. 47, p. 1-12, 2020.

XUAN, W.; BEECKMAN, T.; XU, G. Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 39, p. 57-65, 2017.

XUE, Y.; WARBURTON M. L.; SAWKINS, M.; ZHANG, X.; SETTER, T.; XU, Y.; GRUDLOYMA, P.; GETHI, J.; RIBAUT, J.-M.; LI, W.; ZHANG X, ZHENG Y, YAN J. Genome-wide association analysis for nine agronomic traits in maize under well-watered and water-stressed conditions. **Theoretical and applied genetics**, v. 126, p. 2587-2596, 2013.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.

YEMM, E.W., COCKING, E.C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

YI-BO, T.; YA-JUAN, L.; PING, F.; GUI-XIAO, L. Characterization of nitrogen metabolism in the low-nitrogen tolerant *lnt1* mutant of *Arabidopsis thaliana* under nitrogen stress. **Pedosphere**, v. 20, n.5, p. 623-632, 2010.

YU, W.; KAN, Q.; ZHANG, J.; CHEN, Q. Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the regulation of organic acid exudation under aluminum toxicity and phosphorus deficiency. **Plant Signaling & Behavior**, v. 11, n. 1, p. 1-4, 2015.

ZAHARAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2, p. 143-153, 2001.

ZAIED, K.A.; EL-HADY, A H.; AFIFY, A H.; NASSEF, M. A. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 344-358, 2003.

ZEMRANY, H.E.; CORTET, J.; LUTZ, M.P.; CHABERT, A.; BAUDOIN, E.; HAURAT, J.; MAUGHAN, N.; FÉLIX, D.; DÉFAGO, G.; BALLY, R.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1712-1726, 2006.

ZEMRANY, H.E.; CZARNES, S.; HALLETT, P.D.; ALAMERCERY, S.; BALLY, R.; MONROZIER, L.J. Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. **Plant and Soil**, v. 291, n. 1-2, p. 109-118, 2007.

ZHANG, C.; LEE, U.; TANABE, K. Hormonal regulation of fruit set, parthenogenesis induction and fruit expansion in Japanese pear. **Plant Growth Regulation**, v. 55, n. 231, 2008.

ZHULIN, I.B.; ARMITAGE, J.P. Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 4, p. 952-958, 1993.

ZILLI, J.E. MARSON, L.C.; ALVES, G.C.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; CORDEIRO, A.C.C. **Contribuição da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para rendimento de grãos de arroz e milho em Roraima**. Embrapa Roraima, Boletim de Desenvolvimento e Pesquisa Boa Vista-RR, v. 6, p.20, 2007.

## 8 ANEXOS

### 8.1 Meios de Cultura

#### DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986)

2,0 g de glicose  
2,0 g de ácido málico  
1,5 g de peptona bacteriológica  
2,0 g de extrato de levedura  
0,5 g de  $K_2HPO_4$   
0,5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   
1,5 g de ácido glutâmico

Composição referente a 1 L de meio preparado em água destilada, o ajuste de pH foi dependente da espécie: pH 6,8 para *Azospirillum* e pH 6,0 para *Herbaspirillum*.

#### JNFb (DÖBEREINER et al., 1995)

5,0 g de ácido málico  
0,6 g de  $K_2HPO_4$   
1,8 g de  $KH_2PO_4$   
0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   
0,1 g de NaCl  
0,02g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$   
2,0 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura  
2,0 mL de Azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2 N de KOH)  
4,0 mL de solução FeEDTA (sol. 1,64%)  
1,0 mL de solução de vitaminas  
4,5 g de KOH

O ajuste de pH foi para 5,8, composição referente a 1 L de meio preparado em água destilada. Proporção de ágar usado foi 1,6 e 15 g L<sup>-1</sup> para semi-sólido e sólido, respectivamente. Para o meio sólido foi adicionado 20 mg de extrato de levedura para cada 1 L de meio de cultura, enquanto para o meio líquido foi adicionado 1 g de  $NH_4Cl$  para cada 1 L de meio.

#### NFb (DÖBEREINER et al., 1976)

5,0 g de ácido málico  
0,5 g de  $K_2HPO_4$   
0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   
0,1 g de NaCl  
0,02g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$   
4,0 mL de solução FeEDTA (sol. 1,64%)  
2,0 mL de Azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2 N de KOH)  
2,0 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura  
1,0 mL de solução de vitaminas  
4,5 g de KOH



O ajuste de pH foi para 6,5, composição referente a 1 L de meio preparado em água destilada. Proporção de ágar usado foi 1,6 e 15 g L<sup>-1</sup> para semi-sólido e sólido, respectivamente. Para o meio sólido foi adicionado 50 mg de extrato de levedura para cada 1 L de meio de cultura.

## 8.2 Solução Salina para Diluição

0,1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,05 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O  
0,02 g de NaCl  
0,05g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O  
1,0 mL de solução FeEDTA (sol. 1,64%)  
0,5 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura

O ajuste de pH foi para 6,5 com solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5%), composição referente a 1 L de solução preparado em água destilada.

## 8.3 Solução de Micronutrientes

0,200 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O  
0,235 g de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O  
0,280 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
0,008 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O  
0,024 g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

Composição referente a 200 mL de solução preparada com água destilada e mantida sob refrigeração.

## 8.4 Solução de Vitaminas (DÖBEREINER et al., 1995)

0,01 g de Biotina  
0,02 g de Piridoxol – HCl

Composição referente a 100 mL de solução preparada com água destilada e mantida sob refrigeração.