

INTERAÇÃO MILHO-*Herbaspirillum seropedicae*: SELEÇÃO DE
ESTIRPES, RESPOSTA FISIOLÓGICA E PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO EM GENÓTIPOS SUBMETIDOS À SECA

JOSÉ DO BONFIM FREIRE SILVA JÚNIOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2008

INTERAÇÃO MILHO-*Herbaspirillum seropedicae*: SELEÇÃO DE
ESTIRPES, RESPOSTA FISIOLÓGICA E PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO EM GENÓTIPOS SUBMETIDOS À SECA

JOSÉ DO BONFIM FREIRE SILVA JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2008

INTERAÇÃO MILHO-*Herbaspirillum seropedicae*: SELEÇÃO DE ESTIRPES, RESPOSTA FISIOLÓGICA E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO EM GENÓTIPOS SUBMETIDOS À SECA

JOSÉ DO BONFIM FREIRE SILVA JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2008

Comissão Examinadora:

Prof. Fábio Lopes Olivares (Doutor, Ciências do Solo) – UENF

Profa. Rosana Rodrigues (Doutora, Produção Vegetal) – UENF

Prof. Carlos Pimentel (Ph.D., Fisiologia Vegetal) – UFRRJ

Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira (Doutor, Biologia Vegetal) – UENF

Orientador

Aos meus pais,
José do Bonfim Freire Silva e Jáira Nascimento Silva,
com todo amor e carinho.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Antes, a Deus, inteligência suprema e causa primeira de todas as coisas.

Aos meus familiares, pela confiança e apoio nas minhas decisões.

Ao prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira, pela orientação, confiança e oportunidade de fazer parte de sua equipe de pesquisa.

Ao prof. Fábio Lopes Olivares, pela co-orientação, dedicação e, principalmente, pela amizade.

À profa. Rosana Rodrigues, por ter aceitado o convite para compor a minha equipe de conselheiros.

Ao prof. Messias Gonzaga Pereira, pela doação do material vegetal, fundamental para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Fábio Bueno dos Reis Júnior, pela doação do material microbiológico, colaborando assim para o enriquecimento deste trabalho.

Aos professores Alexandre Pio Viana, Ângela Pierre Vitória e Eliemar Campostrini, pela cooperação no desenvolvimento deste estudo.

Ao prof. Carlos Pimentel, por ter aceitado o convite para compor a banca de avaliação deste trabalho.

Aos amigos Roberto Batista Marques Júnior, Erineudo de Lima Canuto e Marcos Góes Oliveira, pela amizade e pelas mãos sempre estendidas durante as diversas etapas do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do Mestrado, e a todos os seus professores e funcionários.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela bolsa de mestrado concedida.

Ao CNPq e à FAPERJ, pelo apoio financeiro.

Aos incríveis talentos com quem cruzei e que, direta ou indiretamente, me ajudaram, cada um a seu modo, a construir essa vitória que não é só minha, por ser absolutamente coletiva.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. O milho (<i>Zea mays</i>)	03
2.1.1. Origem da espécie	03
2.1.2. Importância econômica	04
2.1.3. Relações hídricas	05
2.1.4. Respostas fisiológicas à seca	07
2.2. Bactérias associadas às plantas	08
2.2.1. Aspectos gerais	08
2.2.2. Importância do estudo das bactérias endofíticas	09
2.2.3. Potencial na agricultura	09
2.3. Fotossíntese	12
2.3.1. Metabolismo do carbono	12
2.3.2. Fluorescência da clorofila <i>a</i> como indicador de estresse em plantas	13

3. TRABALHOS

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILHO HÍBRIDO UENF 506-8	16
Resumo	16
Abstract	17
3.1. Introdução	18
3.2. Material e Métodos	19
3.3. Resultados e Discussão	22
3.4. Conclusão	27
Referências Bibliográficas	28
RESPOSTA FISIOLÓGICA E VARIÁVEIS MORFOAGRONÔMICAS EM PLANTAS JOVENS DE TRÊS GENÓTIPOS DE MILHO, INOCULADOS COM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> E SUBMETIDOS À SECA	31
Resumo	31
Abstract	33
3.5. Introdução	34
3.6. Material e Métodos	36
3.6.1. Material vegetal	36
3.6.2. Inoculação do material microbiológico	38
3.6.3. Aplicação dos tratamentos e delineamento experimental	38
3.6.4. Avaliação do potencial da água	39
3.6.5. Medidas de trocas gasosas e variáveis climáticas	39
3.6.6. Medidas de fluorescência da clorofila <i>a</i>	40
3.6.7. Variáveis morfoagronômicas	41
3.6.8. Contagem bacteriana	41
3.6.9. Análise estatística dos dados	42
3.7. Resultados e Discussão	43
3.8. Conclusão	58
Referências Bibliográficas	58
4. CONCLUSÕES GERAIS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

APÊNDICE	85
APÊNDICE A	86

RESUMO

SILVA JÚNIOR, José do Bonfim Freire, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro de 2008, Interação milho-*Herbaspirillum seropedicae*: seleção de estirpes, resposta fisiológica e promoção do crescimento em genótipos submetidos à seca. Professor Orientador: Jurandi Gonçalves de Oliveira. Professores Conselheiros: Fábio Lopes Olivares e Rosana Rodrigues.

Dentre as principais características das plantas de interesse agrônomo necessárias para o melhoramento genético destacam-se a alta produtividade e a resistência a fitopatógenos e às pragas agrícolas. As bactérias diazotróficas endofíticas, além de poderem conferir essas características a sua planta hospedeira, conferem também resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, fixação biológica de nitrogênio atmosférico, suprimento de nutrientes, síntese de fitormônios, entre outros. Este trabalho teve como objetivos selecionar estirpes da bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae* que tenham potencial para a promoção de crescimento na cultura do milho (*Zea mays*) e, posteriormente, avaliar a sua interação com três genótipos distintos de milho submetidos à seca. Inicialmente, sete estirpes isoladas de milho e uma estirpe padrão isolada de arroz (*Oryza sativa*) foram crescidas em meio de cultivo específico e aplicadas direta e individualmente sobre sementes de milho híbrido UENF 506-8. A partir da análise das respostas morfoagronômicas das plantas a essas inoculações, observaram-se diferenças entre as estirpes. A estirpe denominada HIII206a obteve os melhores resultados na associação, enquanto a estirpe denominada HIII313d não demonstrou nenhum resultado

expressivo. Posteriormente, o potencial da estirpe HIII206a foi avaliado em três genótipos de milho com níveis distintos de resistência à seca, denominados Composto Braquítico Caboclo (resistente), Composto Tripsacóide (intermediário) e UENF 506-8 (sensível), cultivados a partir de sementes. O experimento foi desenvolvido no período de maio a julho de 2007, em casa de vegetação, seguindo-se um delineamento experimental inteiramente casualizado constituído pelo fatorial 3x2x2 (três genótipos, com e sem estresse, na ausência ou presença da bactéria), com 11 repetições por tratamento. Durante a indução da seca – 39º ao 54º dia após a germinação – foram monitoradas as variáveis: taxa de assimilação líquida de CO₂ (A); condutância estomática (gs); taxa de transpiração (E); concentração intracelular de CO₂ (Ci); rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m); rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{PSII}); *quenching* fotoquímico (qP); *quenching* não-fotoquímico (NPQ); potencial da água (ψ_a); altura da planta e o diâmetro do caule. Terminado o período de indução de seca (15 dias após o seu início), as plantas foram colhidas sendo analisadas as variáveis morfoagronômicas matéria fresca e seca da raiz e da parte aérea e área foliar, bem como a contagem bacteriana. A seca imposta foi confirmada pela queda no potencial da água de todas as plantas estressadas após os 15 dias consecutivos de estresse. Os resultados de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e respostas morfoagronômicas revelaram que o híbrido UENF 506-8, quando inoculado e comparado com os demais genótipos, obteve os menores danos ocasionados pelo período de seca. Isso sugere uma contribuição importante acarretada pela interação com a bactéria. Estes resultados demonstram, por sua vez, uma especificidade entre a estirpe bacteriana (HIII206a) e o híbrido de milho (UENF 506-8). Por outro lado, o genótipo Composto Braquítico Caboclo, quando não inoculado e comparado com os demais genótipos, também apresentou os menores danos ocasionados pela seca, demonstrando, assim, a sua resistência à seca. Concluiu-se, portanto, que a estirpe da bactéria diazotrófica endofítica HIII206a, pertencente à espécie *H. seropedicae*, é capaz de contribuir para a redução dos danos causados pela seca e promover o aumento percentual das variáveis morfoagronômicas matéria fresca (MFR) e seca (MSR) da raiz em plantas de milho, tendo potencial para utilização como inoculante nesta cultura visando a aumentos de produtividade.

ABSTRACT

SILVA JÚNIOR, José do Bonfim Freire, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February, 2008, Interaction maize-*Herbaspirillum seropedicae*: selection of strains, physiological response and growth promotion in genotypes under drought. Advisor: Jurandi Gonçalves de Oliveira. Committee Members: Fábio Lopes Olivares and Rosana Rodrigues.

The most important agronomic characteristics for genetic breeding are high yield and resistance to plant diseases and agricultural pests. Endophytic diazotrophic bacteria can confer these characteristics to their host plant besides conferring resistance against stress conditions, changes in physiological conditions, biological fixation of atmospheric nitrogen, nutrient supply, and synthesis of phytohormones, among others. The purpose of this study was to select strains of the endophytic diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* with growth-promoting activity in corn (*Zea mays*) and evaluate their interaction with three distinct maize genotypes under water stress. Initially, seven strains isolated from corn and one standard strain isolated from rice (*Oryza sativa*) were grown on specific culture medium and applied directly and separately onto maize seeds of hybrid UENF 506-8. The morphoagronomic plant responses to inoculations differed between strains. The strain designated HIII206a performed best in the association whereas results of strain HIII313d were not significant. Strain HIII206a was then evaluated in three seed-grown genotypes with different drought-resistance levels: Compound Braquítico Caboclo (resistant), compound Tripsacóide (intermediate) and UENF 506-8 (sensitive). The experiment was

conducted from May to July 2007 in a greenhouse, based on a completely randomized factorial design (3x2x2 - three genotypes, with and without water stress, in absence or presence of the bacterium), with 11 replications per treatment. During induced drought from the 39th to the 54th day after germination, the following variables were monitored: net CO₂ assimilation rate (A), stomatal conductance (gs); transpiration rate (E); intracellular CO₂ concentration (Ci); maximum quantum yield of photosystem II (F_v/F_m); effective quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII}); photochemical quenching (qP); non-photochemical quenching (NPQ); water potential (ψ_a); stem height and diameter. After the drought period (after 15 days), the plants were harvested and the following morphoagronomic variables assessed: root and shoot fresh and dry matter, leaf area, and bacterial count. The drought effect was confirmed by a drop in the water potential of all stressed plants after 15 consecutive days of drought. The results of gas exchange, chlorophyll a fluorescence and morphoagronomic responses revealed that the drought damage to hybrid UENF 506-8 inoculated with the selected strain was lower than in other genotypes. That suggests an important contribution of the interaction with the bacteria. These results they demonstrate a specific effect of the bacterial strain (HIII206a) on hybrid maize (UENF 506-8). On the other hand, the drought-damage observed in the non-inoculated compound genotype Braquítico Caboclo was also lower than in the other genotypes, demonstrating drought resistance. It was concluded that the strain of the endophytic diazotrophic bacterium HIII206a of the species *H. seropedicae* can alleviate drought damage and promote increases of root fresh (MFR) and dry matter (MSR) of maize plants, recommending its use as inoculum for crop yield increases.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias diazotróficas são habitantes comuns da superfície e do interior da maioria dos vegetais, podendo desenvolver relações neutras e simbióticas com a planta hospedeira. Quando habitam o interior da planta hospedeira sem causar dano aparente, essas bactérias são chamadas de endofíticas.

O estudo desses microrganismos é de grande importância para a fisiologia vegetal devido à falta de informações para a elucidação da base biológica das interações endófitos-planta, e também por ser potencialmente vantajoso em diversos aspectos, tais como: controle de fitopatógenos e pragas agrícolas; resistência a condições de estresse; síntese de metabólitos de interesse farmacológico, entre outros. Os endófitos têm recebido atenção especial, pois, além de interagirem com a planta hospedeira influenciando o seu crescimento, promovem o desenvolvimento e a saúde da planta através da fixação biológica de nitrogênio atmosférico, síntese de fitormônios e disponibilização de nutrientes.

O milho (*Zea mays*), por sua vez, ocupa, entre os cereais, o terceiro lugar em área semeada e em produção no mundo. No Brasil, esse cereal tem uma grande importância econômica, pois além de ser utilizado na alimentação humana e animal é também produto de exportação. Além disso, nos próximos dez anos o consumo de milho deverá crescer em torno de 22%, impulsionado principalmente pela transformação do cereal em etanol nas indústrias e pelo crescente uso de óleos vegetais nos combustíveis por diversos países.

Embora a cultura do milho tenha grande importância econômica para o Brasil e o mundo, poucos estudos visando conhecer e obter aplicações práticas da interação desses microrganismos com esta planta foram feitos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: (i) selecionar, com base em variáveis morfoagronômicas, uma estirpe da bactéria diazotrófica endofítica *H. seropedicae* que apresente potencial para a promoção de crescimento na cultura do milho e (ii) avaliar a interação da estirpe bacteriana selecionada com três genótipos distintos de milho submetidos à seca.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Milho (*Zea mays* L.)

2.1.1. Origem da espécie

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea que pertence ao reino Plantae; divisão Magnoliophyta; classe Liliopsida; ordem Poales; família Poaceae (Gramineae); gênero *Zea*; espécie *Zea mays* (Borém, 1999).

Segundo Pohl et al. (2007), a origem e a domesticação do milho ocorreu no sudoeste tropical do México, há aproximadamente 7.300 anos. Evidências genéticas e moleculares indicam ser o milho descendente de uma espécie anual de teosinte mexicano (*Zea mays* subsp. *parviglumis*) (Doebley, 2004; Buckler e Stevens, 2006). Mas, de acordo com Matsuoka et al. (2002), a análise de um grande número de microssatélites do genoma de milho sugere que a sua domesticação ocorreu há mais de 9.100 anos. Porém, apesar dos imensos avanços nas pesquisas moleculares, outras formas de pesquisas são necessárias para determinar a idade da domesticação do milho conclusivamente; e isso, por sua vez, torna a história da origem do milho alvo de muita discussão (Pohl et al., 2007).

2.1.2. Importância econômica

O milho é uma das plantas cultivadas que, tendo atingido o mais elevado estágio de domesticação, na sua forma atual, não apresenta indicativos de que possa subsistir sem os cuidados do homem (Cerigioli, 2005).

Mundialmente, o milho ocupa, entre os cereais, o terceiro lugar em área semeada e em produção (Cerigioli, 2005). De acordo com o IBGE (2007), o milho representou aproximadamente 21% da área agrícola colhida no Brasil na safra de 2006, isto é, cerca de 12 milhões de ha do total de aproximadamente 57 milhões de ha, com uma estimativa de aproximadamente 13 milhões de ha a serem colhidos na safra de 2007. Ainda de acordo com os dados do IBGE (2007), foram colhidos 42.631.977 ton. de grãos de milho na safra de 2006, sendo esperada uma colheita de 51.435.358 ton. na safra de 2007. Tais dados correspondem a um rendimento médio de 3.383 Kg/ha na safra de 2006 e de 3.768 Kg/ha na safra de 2007 (IBGE, 2007).

Já a safra de 2005 do Estado do Rio de Janeiro foi de 26.970 ton. em 11.814 ha de área colhida (IBGE, 2007), enquanto que no Estado de São Paulo, por exemplo, a safra de 2003/2004 foi de 4,34 milhões de toneladas em 1.063.704 ha de área colhida, sendo comparável, em produção, a Minas Gerais, ficando atrás apenas do Paraná (Agrianual, 2004). Na safra 2003/2004, o Brasil foi superado apenas pelos Estados Unidos e China, tendo aumentado as suas exportações em 2004 para 4,8 milhões de toneladas, comparado com os 3,7 milhões de toneladas no ano anterior (Agrianual, 2004).

Em se tratando de alimentação humana, o milho pode ser consumido *in natura*, na forma de fubá ou de farinha. Já na alimentação animal, o seu grão é utilizado como o maior componente de rações para aves e suínos. Na bovinocultura, por exemplo, é utilizado como forma de volumoso, podendo ser utilizado na forma de silagem de grão úmido ou de planta inteira. Na indústria, o milho pode ser transformado em vários subprodutos. O óleo pode ser usado direto para consumo humano ou então transformado em margarina, maionese, entre outros produtos. O amido, por sua vez, pode ser transformado em dextrina, que será usada, por exemplo, em adesivos e xaropes; ser transformado em dextrose, que será utilizada em enlatados ou ainda na forma de frutose, sendo usado como principal adoçante da indústria de doces e bebidas (Peixoto, 2002).

O consumo do milho deverá crescer em torno de 22% nos próximos dez anos, impulsionado principalmente pela transformação do cereal em etanol e pelo crescente uso de óleos vegetais nos combustíveis por diversos países (Agriannual, 2004).

2.1.3. Relações hídricas

O milho é uma planta de metabolismo do carbono tipo C_4 . Devido ao tamanho do dreno e por apresentar características fisiológicas favoráveis no que se refere à eficiência de conversão de carbono mineral (representado pelo gás carbônico da atmosfera) em compostos orgânicos como os carboidratos, é uma das plantas mais eficientes na produção de grãos (Bergonci e Bergamaschi, 2002). Além disso, o milho está no grupo de espécies com maior eficiência do uso da radiação solar ou eficiência quântica (Bergamaschi et al., 2004).

Entretanto, sendo uma planta de origem tropical, o milho exige durante o seu período vegetativo, temperatura ideal e principalmente água para se desenvolver e produzir satisfatoriamente, proporcionando produtividades compensadoras. Segundo Fancelli e Dourado Neto (2000), a temperatura ideal para a germinação do milho e, conseqüentemente, para o seu desenvolvimento está entre 25 e 30 °C, havendo prejuízo em temperaturas inferiores a 10 °C e superiores a 40 °C. Ainda de acordo com estes autores, a necessidade de suprimento hídrico para o pleno desenvolvimento dos vegetais decorre das múltiplas funções que a água desempenha na fisiologia das plantas, pois praticamente todos os processos metabólicos são influenciados pelo conteúdo de água celular.

De acordo com Aldrich et al. (1982), dois dias de seca durante a fase do florescimento do milho diminui o rendimento de grãos em mais de 20%, ao passo que se o período de seca perdurar por quatro a oito dias, nesta mesma fase de florescimento, as perdas podem chegar a mais de 50%. Bergamaschi et al. (2006) afirmam que a ocorrência de seca durante a fase vegetativa também interfere no cultivo do milho, principalmente em relação ao crescimento da planta em função de decréscimos na área foliar e na biomassa. Porém, os efeitos da seca sobre a produção final de grãos podem ser atenuados se as condições hídricas se tornarem favoráveis ainda na fase vegetativa (Bergamaschi et al., 2006).

O milho é uma das culturas mais sensíveis à seca (Lima, 1995) e, segundo Blum (1997), a seca é considerada a maior causa de redução na produtividade agrícola em clima tropical. Na região tropical, verifica-se que 95% do cultivo do milho são feitos em áreas sujeitas à seca, que pode causar uma queda de 10% a 50% da produção (Bolaños e Edmeades, 1995).

Segundo Bergonci et al. (2000), o potencial da água (Ψ_a) na folha do milho descreve o estado energético dela, cujos gradientes explicam os fluxos da água no sistema solo-planta-atmosfera. Embora haja variação ao longo do dia, mesmo em plantas irrigadas, o Ψ_a descreve o estado hídrico da planta, e tem sido muito utilizado em estudos das relações hídricas dos vegetais.

Bergonci et al. (2000) ressaltam que as medições do potencial da água na folha de milho usando-se a câmara de Schollander requerem alguns cuidados, a fim de que os dados obtidos reflitam o verdadeiro estado hídrico da planta, dentre os quais podem-se citar: i) deve-se evitar a perda de água após a coleta da folha; ii) o tempo entre a retirada da folha e a medição deve ser o menor possível; iii) a pressurização deve ser lenta e iv) utilização de lupa e iluminação eficiente para a determinação do ponto de equilíbrio, isto é, quando a seiva inicia a saída do xilema.

Boyer (1970) observou em seu trabalho que, antes do potencial da água na folha decrescer, a expansão foliar já estava sendo mais severamente inibida do que a fotossíntese e a respiração nas plantas de milho, soja e girassol.

Um dos mecanismos de adaptação à seca no milho é o acúmulo de solutos osmoticamente ativos na célula, em relação às plantas bem hidratadas. Tal fenômeno, chamado de ajustamento osmótico, permite a manutenção da turgescência, crescimento e fotossíntese, sob baixos valores de potencial da água da folha (Morgan, 1984).

O potencial de água foliar de base – ou simplesmente potencial de base – corresponde à medição do Ψ_a feita pela manhã, antes do Sol nascer. Dessa forma, uma das grandes vantagens do potencial de base, quando comparado com outras variáveis que descrevem o estado hídrico da planta, é a sua independência com relação às condições ambientais diurnas. Na realidade, essa variável é a que melhor reflete o equilíbrio de potencial da água entre o solo, a planta e a atmosfera (Katerji e Hallaire, 1984).

2.1.4. Respostas fisiológicas à seca

Segundo McCree e Fernández (1989), as respostas mais proeminentes das plantas à seca consistem no fechamento dos estômatos, no decréscimo da área foliar, na aceleração da senescência e na abscisão das folhas. Os trabalhos de Herrero e Johnson (1981), com milho, e Ball et al. (1994), com algodão, demonstraram que, em condições de seca, há um acentuado declínio na expansão das folhas. Já Cirilo e Andrade (1996) relataram uma significativa redução da área foliar em plantas de milho quando foram submetidas à seca.

De acordo com Costa et al. (2003), condições extremas de estresse ambiental, como por exemplo seca severa, também podem afetar os eventos no tilacóide. Nesse caso, a eficiência da fotossíntese é comprometida pela inativação do PS II e, conseqüentemente, pela inativação da cadeia de transporte de elétrons responsáveis por originar o ATP e o NADPH₂. Ressalta-se que ambas as moléculas são fundamentais no ciclo de Calvin para o processo de fixação do carbono atmosférico (CO₂).

Davies e Zhang (1991) sugerem que há evidências de sinais químicos das raízes agindo diretamente na dinâmica dos estômatos em condições de seca. Pimentel e Rossiello (1995) afirmaram que um ligeiro ressecamento do solo, mesmo que não afete as relações hídricas da parte aérea, causa um aumento na concentração de ácido abscísico (ABA) no xilema, provavelmente produzido na coifa das raízes, levando ao fechamento estomático e à diminuição da expansão celular. A seca promove uma rápida redistribuição e acumulação do ABA nos tecidos da planta; assim, de acordo com Tuberosa et al. (1994), ocorre um aumento na concentração do ABA no apoplasto das células-guarda, reduzindo a condutância estomática. Taiz e Zeiger (2004) definem condutância estomática como sendo a medida do fluxo de vapor d'água e CO₂ através do estômato, para fora e para dentro da câmara sub-estomática, respectivamente. Segundo os autores, a condutância estomática é o inverso da resistência estomática – medida da limitação da difusão livre de gases a partir da folha e para o interior dela, imposta pelo poro estomático.

Os experimentos de Lea et al. (1995) com plantas de milho cultivadas em campo e em laboratório demonstraram que a acumulação de ABA originados nas

raízes foi responsável pela restrição do desenvolvimento das folhas e manutenção do desenvolvimento do sistema radicular.

2.2. Bactérias associadas às plantas

2.2.1. Aspectos gerais

Bactérias são habitantes comuns da superfície e do interior da maioria dos vegetais, podendo apresentar relações neutras e simbióticas com a planta hospedeira. Quando habitam o interior da planta hospedeira sem causar dano aparente, as bactérias são chamadas de endofíticas (Petrini, 1991; Azevedo, 1998a; Sturz et al., 2000).

A origem, forma de penetração, colonização e transmissão de bactérias endofíticas ainda são muito discutidas. Essas bactérias podem ser provenientes de sementes, da rizosfera, do fitoplano (superfície foliar) e de material propagado vegetativamente (McInroy e Kloepper, 1995a; Hallmann et al., 1997b; Reinhold-Hurek e Hurek, 1998). Segundo Pelczar et al. (1997), a rizosfera é a região onde o solo e as raízes das plantas entram em contato. Ainda de acordo com o autor, o crescimento bacteriano nessa região é estimulado por nutrientes como aminoácidos e vitaminas liberadas do tecido radicular.

A penetração pode ocorrer pelos estômatos, ferimentos, áreas de emergências laterais das raízes, e podem produzir enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular dos vegetais, sendo este um possível mecanismo de penetração (Di Fiore e Del Gallo, 1995; Quadt-Hallmann et al., 1997a; Shishido et al., 1999; McCully, 2001).

A colonização e distribuição de bactérias endofíticas no hospedeiro podem ser influenciadas por interações com outros microrganismos associados à planta, nematóides parasitas e por características próprias de seu hospedeiro (Lindow e Andersen, 1996; Quadt-Hallmann et al., 1997b; Hirano e Hupper, 2000). Ademais, outros fatores, tais como variações sazonais, tipos de tecido vegetal (Mocali et al., 2003), cultivares e espécies de hospedeiros, tipo de solo (Dalmastri et al., 1999; Kinkel et al., 2000; Fromin et al., 2001) e interação com microrganismos benéficos ou patogênicos (Araújo et al., 2001; Araújo et al., 2002) podem influenciar também o padrão de colonização dessas bactérias.

2.2.2. Importância do estudo das bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas têm sido isoladas de raiz, nódulos, caule, folhas e frutos em uma extensa variedade de plantas, incluindo muitas de interesse agrícola, tais como cana-de-açúcar (Cavalcante e Döbereiner, 1988), milho (McInroy e Kloepper, 1995b; Araújo et al., 2000), videira (Bell et al., 1995), algodão (Quadt-Hallmann et al., 1997a), arroz (Stoltzfus et al., 1997), tomate (Pillay e Nowak, 1997), citros (Araújo et al., 2001; Marcon, 2002), batata (Reiter et al., 2002), trigo e sorgo (Zinniel et al., 2002), entre outras.

De acordo com Misaghi e Donndelinger (1990), as bactérias endofíticas possuem uma íntima relação com seus hospedeiros por meio de processos co-evolutivos e podem ter influência na fisiologia das plantas por mecanismos ainda não completamente esclarecidos. Portanto, várias são as razões para que investigações sejam conduzidas com bactérias endofíticas, entre elas podem-se citar: i) síntese de antibióticos e outros metabólitos de interesse farmacológico (Azevedo et al., 2000b; Marcon, 2002; Peixoto Neto et al., 2002); ii) utilização como agentes no controle biológico de pragas e de doenças (Azevedo et al., 2000a; Sturz et al., 2000; Melo, 2005) e iii) utilização como promotores de crescimento vegetal, produzindo fitohormônios, fixando nitrogênio ou por outros mecanismos (Sturz et al., 2000; Khalig et al., 2004; Kuss, 2006). Mas apesar da grande quantidade de relatos sobre a ocorrência de comunidades endofíticas em tecidos vegetais saudáveis, Cerigioli (2005) afirma que o estudo acerca dessas bactérias também é de suma importância devido à falta de informações a respeito das interações endófitos-planta.

2.2.3. Potencial na agricultura

De um modo geral, os estudos sobre bactérias endofíticas se concentram no potencial destes microrganismos atuarem na fixação biológica do nitrogênio (FBN), no controle biológico de insetos-praga ou de outros microrganismos e, principalmente, na promoção de crescimento vegetal (Sturz e Matheson, 1996; Chanway, 1998; James, 2000; Azevedo et al., 2000a,b; Lodewyckx et al., 2002; Khalig et al., 2004; Melo, 2005; Kuss, 2006).

A FBN, principal via de entrada, suprimento e incremento de nitrogênio nos sistemas vivos, é o processo de conversão do nitrogênio atmosférico (N_2), um gás inerte presente em grande quantidade na atmosfera, em amônia (NH_3), que é subsequente assimilada em aminoácidos e proteínas pelas plantas. Esse processo é mediado estritamente por bactérias, porque possuem o complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para a conversão (Neves e Rumjanek, 1998). Portanto, a FBN se apresenta como uma opção alternativa e natural de adubação nitrogenada. Segundo Baldani et al. (2002), a cultura de arroz, por exemplo, consome 10 milhões de toneladas de adubos nitrogenados para produzir 500 milhões de toneladas de grãos no planeta. A substituição de 25% da demanda de N_2 pela fixação biológica geraria uma economia de, aproximadamente, 380 milhões de dólares por ano (sendo de U\$ 150,00 o custo médio da tonelada de uréia).

O controle biológico é um processo natural de regulação populacional por meio de inimigos naturais. As bactérias endofíticas, por estarem presentes em todas as espécies vegetais, colonizando ativamente os tecidos do hospedeiro de forma local ou sistêmica, acabam, segundo Hallmann et al. (1997b), ocupando um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por patógenos, demonstrando assim o seu potencial para o controle biológico. No entanto, este controle pode ser resultante de diversos mecanismos: i) competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira; ii) produção de compostos antimicrobianos e/ou iii) indução de resistência sistêmica (Sturz et al., 2000; Ramamoorthy et al., 2001).

O mecanismo de promoção de crescimento vegetal, por sua vez, é um processo complexo que pode ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos (Bloemberg e Lugtenberg, 2001). Em se tratando de fatores bióticos, o mecanismo de promoção de crescimento vegetal condicionado pelas bactérias endofíticas pode ser resultado tanto de ações indiretas, como o controle biológico por competição de nutrientes, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro, citados anteriormente, quanto de ações diretas, como disponibilização de nutrientes para as plantas, FBN e síntese de reguladores de crescimento vegetal (ou fitormônios) (Shishido et al., 1999; Sturz et al., 2000). Porém, a síntese de fitormônios é um mecanismo de interação bactéria-planta, sendo influenciado por vários fatores, como o genótipo do hospedeiro e do próprio microrganismo (Jain e Patriquin, 1985).

Uma série de trabalhos tem verificado o aumento do crescimento vegetal de plantas inoculadas com bactérias endofíticas em relação aos tratamentos controle, isto é, plantas não inoculadas (Asghar et al., 2002; Canuto et al., 2003; Khaliq et al., 2004), bem como a produção de fitormônios como auxinas em plantas não-leguminosas inoculadas com espécies do gênero *Herbaspirillum*, entre outras (Patten e Glick, 1996; Dobbelaere et al., 2003; Creus et al., 2004).

O ácido indol acético – AIA (um tipo de auxina) –, por exemplo, quando secretado por bactérias no interior das plantas, pode promover o crescimento da raiz, diretamente, pela estimulação da elongação da célula vegetal ou divisão celular, ou, indiretamente, pela influência sobre a atividade da ACC desaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato, um precursor do etileno) (Patten e Glick, 2002). Porém, a resposta da planta ao AIA liberado pode variar de efeitos benéficos a deletérios dependendo de sua concentração; quando em baixas concentrações, pode estimular e, quando em altas concentrações, pode inibir o desenvolvimento da raiz vegetal. Logo, a promoção de crescimento vegetal por bactérias tem sido atribuída, em parte, à produção de fitormônios, que são capazes de promover o desenvolvimento e proliferação das raízes (Mirza et al., 2001), mas não se sabe até que ponto a formação de pêlos radiculares depende de fatores genéticos, ambientais e, ou, da produção de substâncias promotoras de crescimento pelas plantas e pela maioria das bactérias endofíticas (Mirza et al., 2001; Radwan et al., 2002).

Visto que a seca pode causar severa inibição da fotossíntese, mesmo em plantas C_4 como, por exemplo, o milho, sobretudo em razão da maior resistência difusiva à entrada do CO_2 (Kaiser, 1987) acarretada pelo fechamento dos estômatos (McCree e Fernández, 1989), o desenvolvimento de pêlos radiculares (aumento do seu número, da sua densidade, da sua biomassa, do seu comprimento, do acoplamento de transportadores, entre outros fatores) pelas bactérias endofíticas pode, contudo, promover efeitos benéficos sobre a fisiologia do hospedeiro como um todo. Dentre os efeitos benéficos possibilitados por essa alteração na morfologia radicular do hospedeiro está a ampliação da área de exploração do solo, resultando assim em maior absorção de água, o que, por sua vez, evitaria o fechamento dos estômatos.

Fica evidente, então, que o uso desses microrganismos tem se mostrado promissor para melhorar e aumentar a produtividade de grandes culturas, sendo, portanto, uma ferramenta biotecnológica de grande utilidade na agricultura.

2.3. Fotossíntese

2.3.1. Metabolismo do carbono

O entendimento dos fluxos de CO_2 na fotossíntese tem permitido desvendar as três etapas básicas acopladas ao processo fotossintético: os aspectos fotoquímicos (captação de energia luminosa e dissipação da mesma na forma de calor ou fluorescência), fotofísicos (transferência de elétrons com a formação de ATP e NADPH_2) e bioquímicos (fixação de carbono em compostos orgânicos) (Magalhães et al., 2002).

Entretanto, a relação entre fotossíntese e produção é bastante complexa e, às vezes, contraditória. Isto se deve a diversos fatores que podem estar envolvidos, entre os quais podem-se citar: i) a abertura estomática e a condutância de CO_2 no interior das células do mesofilo; ii) idade e localização das folhas; iii) estresses ambientais; iv) tipo de via para fixação do carbono (C_3 , C_4 ou intermediária) e v) concentração de nitrogênio nas folhas (Magalhães et al., 2002).

O evento fotoquímico primário da fotossíntese é a separação de cargas nos centros de reação dos fotossistemas I e II (PSI e PSII) durante a captação de energia luminosa. A separação de cargas resulta no acúmulo de espécies moleculares reduzidas e oxidadas constituindo-se na força motriz para o transporte de elétrons fotossintéticos que ocorre concomitantemente. O fluxo de elétrons através da cadeia fotossintética de transporte eletrônico é acompanhado pelo fluxo de prótons (H^+) (Romano, 2001). Por sua vez, esse gradiente de prótons é a força motriz para a síntese de ATP (Ort e Melandri, 1982) e modula o transporte de elétrons (Horton e Lee, 1986). Enfim, o estado redox do “pool” de ferredoxina é a força motriz para a redução de NADP^+ a NADPH_2 (Foyer, 1993) que, juntamente com o ATP formado, serão utilizados na etapa de fixação do carbono.

Pelo fato de o conteúdo de CO_2 na atmosfera – 0,03% ou 370 partes por milhão (ppm) do ar (Taiz e Zeiger, 2004) – ser um fator limitante para muitas

espécies vegetais, houve a necessidade de elas tornarem-se eficientes na fixação desse gás.

Análises da fixação de CO_2 em vários níveis da concentração interna (C_i) de CO_2 produziram informações sobre a limitação da fixação de CO_2 nas folhas. Baseado nas propriedades cinéticas da RUBISCO (ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase), atribui-se à sua atividade a limitação da fotossíntese em baixas concentrações internas de CO_2 e a regeneração de ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP) em altas concentrações internas de CO_2 (von Caemmerer e Farquhar, 1981), bem como do uso de triose fosfato.

As plantas C_4 , como o milho, são aquelas cujo primeiro produto estável, formado na fotossíntese, possui quatro átomos de carbono (malato e/ou aspartato). Apesar disso, as plantas C_4 também utilizam a rota C_3 . O importante é que, nas plantas C_4 , a rota C_3 é precedida por passos adicionais, nos quais há uma fixação preliminar de CO_2 através da enzima PEPcase (fosfoenolpiruvato carboxilase) resultando em uma maior concentração do CO_2 no ambiente de atuação da Rubisco (Taiz e Zeiger, 2004).

Devido ao fechamento estomático em plantas tropicais para evitar a perda excessiva de água por transpiração, o fluxo de CO_2 da atmosfera para as células da bainha dos feixes vasculares é reduzido, causando uma diminuição na concentração de CO_2 neste sítio. Conseqüentemente, o metabolismo fotossintético de plantas C_3 fica prejudicado. No entanto, em plantas C_4 , esse prejuízo é atenuado pela presença da enzima PEPcase, que tem uma afinidade muito mais alta por CO_2 (Taiz e Zeiger, 2004), fixando-o mais eficientemente e minimizando ou mesmo não permitindo, desta forma, o processo de fotorrespiração que limita a eficiência das plantas C_3 .

Segundo Baker e Ort (1992), sob baixa luz, a fotossíntese pode proceder com máxima eficiência quântica; essa eficiência quântica vai diminuindo com o incremento da luminosidade.

2.3.2. Fluorescência da clorofila a como indicador de estresse em plantas

Como qualquer outro processo de troca de energia, a conversão da energia luminosa em energia química pelo processo fotossintético não é perfeita. Isso se deve ao fato de que, no estado excitado, a clorofila a é extremamente

instável e, ao retornar ao estado inicial, libera parte de sua energia para o meio na forma de calor ou na forma de luz, isto é, fluorescência (F) (Taiz e Zeiger, 2004) enquanto o restante da energia é transferida para a síntese de compostos orgânicos.

Baseado neste princípio, o uso das variáveis da fluorescência da clorofila *a* tem sido bastante empregado, principalmente no estudo da fotossíntese por ser um método que, além de não destrutivo, permite análise qualitativa e quantitativa da absorção e aproveitamento da energia luminosa através do PS II e possíveis relações com a capacidade fotossintética (Mouget e Tremblin, 2002; Netto et al., 2005). Esta técnica tem permitido um aumento no conhecimento dos processos fotoquímicos e não-fotoquímicos que ocorrem na membrana dos tilacóides (Genty et al. (1989), além de possibilitar o estudo dos fatores relacionados à capacidade de absorção e transferência da energia luminosa na cadeia de transporte de elétrons (Krause e Weis, 1991). Segundo Mouget e Tremblin (2002), mudanças no rendimento da fluorescência resultam de variações nas taxas de dissipação da energia fotoquímica e não-fotoquímica, demonstrando, dessa forma, ausência ou presença de comprometimentos no processo fotossintético.

A quantificação da indução da fluorescência através de equipamentos modulados fornece informações sobre a capacidade do aparelho fotossintético na utilização da energia luminosa e seus efeitos na escala de minutos. Tais equipamentos baseiam-se na aplicação de pulsos de luz modulada para excitar as moléculas de clorofila dos centros de reação em uma dada região de tecido foliar previamente adaptada ao escuro. A fluorescência detectada quando pulsos de luz de baixa intensidade (luz de medição) são aplicados corresponde à fluorescência inicial (F_0). Segundo Krause e Weis (1991), a F_0 representa a emissão da fluorescência pelas moléculas de clorofila *a* do complexo coletor de luz do PS II quando todos os centros de reação estão “abertos”, ou seja, oxidados. A fluorescência máxima (F_m) é obtida a partir da aplicação de um pulso de luz de alta intensidade, isto é, um pulso de luz saturante (em geral acima de $2.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de forma a “fechar” (ou seja, reduzir) todos os centros de reação. Logo, o F_m indica a completa redução da plastoquinona A (Q_A) a partir da incidência do pulso de luz saturante no centro de reação do PS II (Silva et al., 2006).

O emprego do fluorímetro modulado permite que outros parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, relacionados a processos fotoquímicos da atividade fotossintética, possam ser obtidos (Genty et al., 1989):

a) Fluorescência Variável (F_v) – diferença entre a F_m e a F_0 , que representa o incremento da fluorescência a partir de F_0 até F_m , ou o fluxo de elétrons do centro de reação do PS II até a plasto-hidroquinona (PQH_2) (Silva et al., 2006);

b) Rendimento Quântico Máximo do PS II – variável determinada pela relação entre F_v/F_m , que reflete a máxima capacidade fotoquímica do PS II. Quando uma planta está com seu aparelho fotossintético intacto, o rendimento quântico máximo deve variar entre 0,75 e 0,85 (Bolhàr-Nordenkampf et al., 1989), enquanto que a queda deste valor reflete a presença de dano fotoinibitório nos centros de reação do PS II (Björkman e Demming, 1987);

c) *Quenching* Fotoquímico (qP) – esse *quenching* reflete o estado de oxidação da Q_A (Schreiber et al., 1986). Logo, a reoxidação da Q_A causa a “extinção” fotoquímica (Krause e Weis, 1991);

d) *Quenching* Não-Fotoquímico (qN) – esse *quenching*, por sua vez, engloba todos os processos de “extinção” que não estão relacionados com a fotoquímica;

e) Rendimento Quântico Efetivo do PS II (Φ_{PSII}) – variável determinada pela relação entre $\Delta F/F_m'$ (onde ΔF representa a variação entre a fluorescência máxima e a fluorescência no estado de equilíbrio – F_s – e F_m' representa a fluorescência máxima em um tecido vegetal adaptado a qualquer intensidade luminosa), que reflete a proporção de elétrons do PS II que serão utilizados na fase fotoquímica da fotossíntese para redução do $NADP^+$ a $NAPH_2$.

3. TRABALHOS

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae* PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO EM MILHO HÍBRIDO UENF 506-8

RESUMO

Sete estirpes da bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae*, isoladas de plantas saudáveis de milho e uma estirpe padrão (Z67), isolada de arroz, foram avaliadas quanto à sua capacidade de promover o crescimento de plantas de milho híbrido UENF 506-8 com o objetivo de se obter a melhor associação estirpe bacteriana-planta. As estirpes foram crescidas individualmente em meio de cultivo líquido DYGS durante 24 horas. Após o ajuste das suspensões bacterianas para a concentração equivalente a 10^8 células por mililitro, as mesmas foram aplicadas direta e individualmente sobre as sementes na proporção de um mililitro por semente. Treze dias após a germinação em incubadora, as plântulas foram então transferidas e cultivadas sob condições de casa de vegetação. Avaliações de crescimento a partir da altura da planta e do diâmetro do caule foram realizadas a cada dois dias, a partir do 19º dia após a

germinação. No 32º dia após a germinação, o experimento foi colhido para a determinação da matéria fresca e seca da raiz e parte aérea, área foliar e contagem bacteriana. Os resultados obtidos demonstraram que a resposta à inoculação do milho híbrido com a estirpe HIII206a, apesar de não ter sido significativamente diferente do controle (plantas não inoculadas), foi a que obteve os maiores incrementos percentuais: 32%; 35%; 4%; 35% e 1% para matéria fresca da parte aérea, matéria fresca da raiz, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e área foliar, respectivamente, em relação ao controle e 32%; 36%; 20%; 39% e 33% respectivamente, para as mesmas variáveis em relação à associação do milho híbrido com a estirpe padrão. Por outro lado, apesar da resposta à inoculação do milho híbrido com a estirpe HIII313d também não ter apresentado diferenças significativas em relação ao controle, observou-se, contudo, uma redução percentual de 65% na variável matéria seca da parte aérea quando comparada ao controle.

ABSTRACT

Seven strains of the endophytic diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae*, isolated from healthy maize plants and a standard strain (Z67), isolated from rice, were assessed for their growth-promoting ability in plants of hybrid maize UENF 506-8 to obtain the best plant-bacterial strain combination. The strains were grown individually in DYGS medium for 24 hours. After the adjustment of bacterial suspensions to a concentration of 10^8 cells per milliliter, they were applied directly and separately to maize seeds at a proportion of one seed per milliliter. Thirteen days after germination in the incubator, seedlings were transferred and grown under greenhouse conditions. Plant height and stem diameter were evaluated every two days, beginning on the 19th day after germination. The experiment was harvested on the 32nd day after germination to determine the fresh and dry root and shoot matter, leaf area and bacterial counts. Results showed highest percentage increases in the response to maize hybrid

inoculation with strain HIII206a, despite not significantly different from the control (non inoculated plants): 32%, 35%, 4%; 35% and 1% for shoot fresh matter, root fresh matter, shoot dry matter, root dry matter and leaf area, respectively, compared to the control with 32%, 36%, 20%, 39% and 33%, respectively, for the same variables for the association of hybrid maize with the standard strain. On the other hand, although the response to hybrid maize inoculation with strain HIII313d was not significantly different in the case of the control, the shoot dry matter was reduced by 65% in comparison to the control.

3.1. INTRODUÇÃO

O milho ocupa, entre os cereais, o terceiro lugar em área semeada e em produção global (Cerigioli, 2005). De acordo com os dados do IBGE (2007), foram colhidas 42.631.977 toneladas de grãos de milho na safra de 2006, sendo esperada uma colheita de 51.435.358 toneladas na safra de 2007. Porém, o consumo do milho deverá crescer em torno de 22% nos próximos dez anos, impulsionado principalmente pela transformação do cereal em etanol e pelo crescente uso de óleos vegetais como biocombustíveis por diversos países (Agriannual, 2004).

Por outro lado, existe uma necessidade crescente, em todas as culturas agrícolas, de aumentar a resistência a doenças; aumentar a tolerância a sais, seca e calor; melhorar a qualidade de grãos e outros produtos e, principalmente, de melhorar os sistemas de fixação biológica de nitrogênio (Conway, 1999; Cocking, 2003).

Segundo Radwan et al. (2004), durante a última década, várias bactérias capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico foram descritas, sendo a espécie *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1986) a primeira espécie endófitas a ser identificada, apesar de na época este fato não ter sido reconhecido. As espécies denominadas endófitas são assim descritas, porque não são capazes de sobreviver por longos períodos no solo (Baldani et al., 1997). Olivares (1997),

investigando diferentes aspectos ecológicos relacionados à ocorrência natural de *H. seropedicae* em raízes, colmos e folhas de espécies, predominantemente da família das Poaceas, observou a ausência de bactérias em solo desnudo e a baixa persistência no solo e em solo rizosférico, comparada à elevada persistência no interior das raízes. O autor concluiu então que *H. seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio que se associa endofiticamente à cana-de-açúcar e outras espécies da família Poacea, mas que não persiste por mais de quatro semanas em números detectáveis após a inoculação no solo.

Desde então, pesquisas envolvendo bactérias diazotróficas endofíticas têm demonstrado a capacidade destes microrganismos em fixar o nitrogênio atmosférico (Kuss, 2006).

Outras pesquisas têm demonstrado que esses microrganismos, além de fixarem o nitrogênio atmosférico, são capazes de promover o aumento da massa aérea e da massa radicular do hospedeiro através da alteração no padrão morfológico das raízes, com um predomínio de raízes mais finas e maior ramificação mediante a síntese de fitormônios, tais como o ácido 3-indolacético (AIA), citocininas e giberelinas (Bastián et al., 1998; Radwan et al., 2002; Cerigioli, 2005; Mendonça et al., 2006).

Dessa forma, fica claro que o uso desses microrganismos tem se mostrado promissor para o aumento de produtividade de grandes culturas, sendo, portanto, uma ferramenta biotecnológica de grande utilidade na agricultura. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial individual de diferentes estirpes bacterianas endofíticas da espécie *H. seropedicae* isoladas de plantas de milho e a estirpe padrão Z67, utilizada como referência e isolada de arroz, quanto à capacidade de promover o crescimento de plantas de milho híbrido UENF 506-8.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense

Darcy Ribeiro – UENF, localizada no município de Campos dos Goytacazes, RJ, no período de novembro a dezembro de 2007.

Dentre as atuais variedades comerciais de milho, o genótipo conhecido como UENF 506-8 (geração mais avançada do híbrido interpopulacional UENF 506-6) foi desenvolvido pelo Programa de Melhoramento Genético do Milho da UENF via seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos. Esse genótipo apresenta internódios curtos, folhas largas, colmo grosso e elevado índice de prolificidade (a maioria das plantas com duas espigas comerciais), florescendo aos 68 dias após o plantio com maturação aos 140 dias (Messias Gonzaga Pereira, informações pessoais).

As estirpes bacterianas denominadas HIII206a, HIII206b, HIII215, HIII313a, HIII313d, HIV206 e HIV301a, isoladas de plantas de milho e gentilmente cedidas pelo Dr. Fábio Bueno dos Reis Júnior (Tabela 1), e Z67, Baldani et al. (1986), isolada de raízes de arroz (*Oryza sativa*) e utilizada como referência, segundo metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995), todas da espécie *H. seropedicae*, foram crescidas, individualmente, em meio de cultivo líquido DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986), sob agitação constante a 100 rpm, durante 24 horas à temperatura de 30 °C.

Tabela 1 - Estirpes bacterianas de *H. seropedicae* isoladas de diferentes variedades de milho utilizadas neste trabalho e as respectivas características das plantas de origem

Estirpe bacteriana	Planta de origem	Características da planta
HIII206a HIII206b HIII313a HIII313d HIV206	Raízes de milho (BR 451)	Ciclo precoce; grãos brancos, semi-dentados e com alta qualidade protéica. Derivada da população 64 QPM do <i>International Maize and Wheat Improvement Center</i> (CIMMYT).
HIII215	Raízes de milho (MC 10)	Grãos amarelos e semi-dentados. Formada a partir do cruzamento entre a variedade Eldorado e Campeão, objetivando uma variedade produtiva, de grãos dentados e com potencial no uso de fósforo.
HIV301a	Raízes de milho (BRS 4157)	Grãos alaranjados com segregação para branco; duros e com oito ciclos de seleção visando à maior eficiência na utilização de nitrogênio.

As suspensões bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro para o número de células equivalente a 10^8 cél.mL⁻¹ e aplicadas diretamente sobre cada semente de milho do híbrido UENF 506-8 não germinada, presente na superfície do substrato comercial (Plantmax®) em copos plásticos de 300 mL, na proporção de 1 mL por semente e germinadas em incubadora. Aos 13 dias após a germinação (d.a.g.), as plantas foram transferidas para vasos de 5 Kg, contendo o mesmo substrato, sendo cultivadas sob condições de casa de vegetação.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições. A altura da planta, compreendida entre o colo da planta e a emergência das novas folhas, e o diâmetro do caule foram mensurados a cada dois dias a partir do 19º d.a.g., perfazendo um total de cinco avaliações (19, 21, 23, 25 e 27 d.a.g.), utilizando-se uma régua metálica e um paquímetro digital (Modelo Starrett 727), respectivamente. No 32º d.a.g., as plantas foram colhidas e tiveram avaliadas as seguintes variáveis: área foliar, por meio do medidor de área foliar modelo 3100 – LI-COR; matéria fresca da raiz e da parte aérea, por uma balança analítica modelo PR 1000 – Núcleo; matéria seca da raiz e da parte aérea após o material vegetal permanecer em estufa a 60 °C por 48 horas, e a contagem do número de bactérias presentes nas raízes pela metodologia do Número Mais Provável (NMP), como descrita por Döbereiner et al. (1995). Para tal, um grama de raízes lavadas e desinfestadas superficialmente foi macerado em solução salina, realizada uma diluição seriada de até 10^{-6} , e uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi adicionada em frascos contendo 5 mL do meio de cultivo semi-sólido JNFb suplementado com o antibiótico ácido nalidíxico (10 mg.L⁻¹) como marca de resistência, objetivando-se eliminar a população de diazotróficos nativos. Foram utilizadas três repetições para cada tratamento, e os frascos incubados durante sete dias a 30 °C.

Os dados de altura da planta e diâmetro do caule foram avaliados mediante a comparação das plantas inoculadas com o controle (não-inoculado) por meio da análise de regressão dos dados, utilizando-se o software Origin 6.0, segundo equações polinomiais. Já os dados de área foliar e matéria fresca e seca da raiz e da parte aérea foram avaliados através da análise de variância feita pelo teste F (5%); quando detectada significância, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação de médias.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das respostas morfoagronômicas das plantas de milho à inoculação permitiu separar as oito estirpes avaliadas em três grupos: (I) Responsivo; (II) Intermediário e (III) Não-responsivo. No grupo I, foi alocada apenas a estirpe HIII206a. As plantas inoculadas com esta estirpe tiveram um maior desenvolvimento percentual em todas as variáveis morfoagronômicas avaliadas (matéria fresca da parte aérea – MFPA e da raiz – MFR; matéria seca da parte aérea – MSPA e da raiz – MSR; área foliar – AF) com incrementos de 32%; 35%; 4%; 35% e 1% para MFPA, MFR, MSPA, MSR e AF, respectivamente, quando comparadas com as plantas controle (não inoculadas) (Tabela 2).

Respostas de incrementos percentuais induzidas por inoculação também foram obtidas para as estirpes HIII206b, HIII215 e HIV206. Em virtude dos resultados observados, essas estirpes foram alocadas no grupo II, caracterizado por reunir estirpes capazes de induzir incrementos apenas em algumas variáveis morfoagronômicas em relação às plantas controle (não inoculadas). Plantas inoculadas com as estirpes HIII215 e HIV206 tiveram maior desenvolvimento em relação às plantas não inoculadas, sendo observados incrementos percentuais de 10 e 21% para MFPA; 9 e 9% para MFR e 15 e 2% para MSR para HIII215 e HIV206, respectivamente. Para a estirpe HIII206b, foram observados incrementos na MFPA (12%) e na MSR (1%) das plantas em relação às plantas controle (Tabela 2). Já as estirpes bacterianas HIII313a, HIII313d, HIV301a e Z67, por não induzirem nenhum incremento percentual nas variáveis morfoagronômicas do híbrido UENF 506-8, foram consideradas estirpes não-responsivas, sendo, portanto, reunidas no grupo III. Ressalta-se, porém, que as plantas inoculadas com a estirpe HIII313d apresentaram uma redução de 65% na variável MSPA em relação às plantas controle.

Tabela 2 - Resposta das variáveis morfoagronômicas de plantas de milho híbrido UENF 506-8, cultivadas em casa de vegetação, à inoculação com estirpes de *H. seropedicae* isoladas de diferentes variedades de milho e estirpe padrão (Z67). Dados referentes à média de cinco repetições. Coleta aos 30 dias após a germinação. UENF, Campos dos Goytacazes, 2007.

Estirpe	MFPA (g)	MFR (g)	MSPA (g)	MSR (g)	AF (mm ²)
Controle	32,23(AB) ⁽¹⁾	16,71 (AB)	10,56 (A)	1,38 (ABC)	849 (AB)
HIII206a	42,60 (A)	22,56 (A)	10,99 (A)	1,86 (A)	862 (A)
HIII206b	36,14 (AB)	16,39 (AB)	10,15 (A)	1,39 (ABC)	734 (ABC)
HIII215	35,56 (AB)	18,25 (AB)	9,00 (A)	1,59 (AB)	689 (ABC)
HIII313a	24,81 (AB)	14,63 (AB)	8,11 (A)	1,13 (ABC)	501 (BC)
HIII313d	19,17 (B)	11,67 (B)	3,73 (A)	0,81 (C)	414 (C)
HIV206	39,01 (A)	18,27 (AB)	8,47 (A)	1,41 (ABC)	809 (AB)
HIV301a	24,76 (AB)	13,95 (B)	5,04 (A)	1,12 (BC)	560 (ABC)
Z67	28,89 (AB)	14,35 (AB)	8,77 (A)	1,14 (ABC)	575 (ABC)
CV(%)	27,23	24,62	46,17	26,67	25,36

MFPA – matéria fresca da parte aérea, MFR – matéria fresca da raiz, MSPA – matéria seca da parte aérea, MSR – matéria seca da raiz, AF - área foliar.

⁽¹⁾ Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Em se tratando das respostas de crescimento das plantas à inoculação, a variação na altura delas apresentou uma tendência seguindo um modelo quadrático (Figura 1). Notou-se uma tendência de maior altura para as plantas inoculadas com as estirpes HIII215, HIII206a e HIV 206 e menor altura para as plantas inoculadas com a estirpe HIII313d.

Quando se avaliaram as mudanças no diâmetro do caule (Figura 2), observou-se uma tendência semelhante àquela encontrada para a altura das plantas quando inoculadas com as estirpes HIII206a e HIV206. Para as plantas inoculadas com a estirpe HIII313d, também verificou-se um efeito negativo da inoculação sobre o diâmetro do caule numa comparação com as plantas controle.

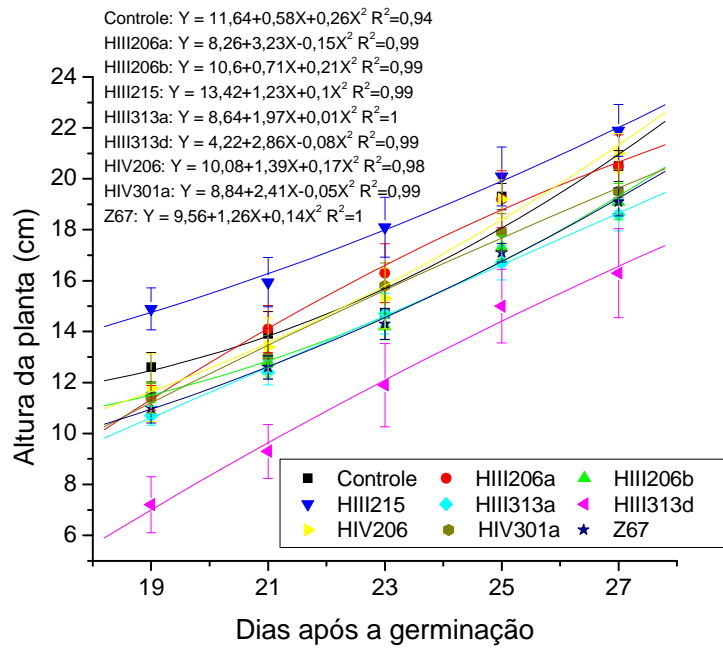


Figura 1 - Altura das plantas de milho híbrido UENF 506-8 inoculadas com *H. seropedicae*, isolados de diferentes variedades de milho e estirpe padrão (Z67), em função do número de dias após a germinação. Dados referentes à média de cinco repetições.

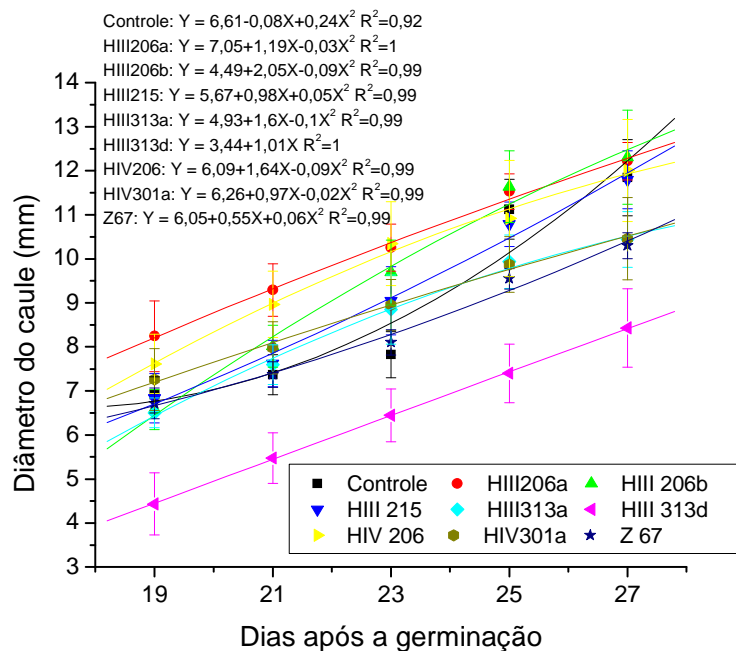


Figura 2 - Diâmetro do caule das plantas de milho híbrido UENF 506-8 inoculadas com *H. seropedicae*, isolados de diferentes variedades de milho e estirpe padrão (Z67), em função do número de dias após a germinação. Dados referentes à média de cinco repetições.

A colonização das plantas de milho híbrido UENF 506-8 com as referidas estirpes bacterianas foi eficiente. Observaram-se populações bacterianas nas raízes das plantas variando entre 4,75 e 7,00 (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) (Tabela 3).

Tabela 3 - Contagem do número de isolados de *H. seropedicae* de diferentes variedades de milho e estirpe padrão (Z67), presentes em raízes desinfestadas superficialmente de plantas de milho híbrido UENF 506-8, aos 32 dias após a germinação

Estirpes								
Controle	HIII206a	HIII206b	HIII215	HIII313a	HIII313d	HIV206	HIV301a	Z67
4,50	5,00	5,75	6,25	6,25	6,75	4,75	7,00	5,25
D ⁽¹⁾	CD	ABCD	ABC	ABC	AB	CD	A	BCD
CV(%) = 11,41								

Dados referentes à média de quatro repetições e expressos em logaritmo do número de células por grama de matéria fresca.

⁽¹⁾ Médias acompanhadas por letras diferentes na linha são significativamente diferentes pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Experimentos realizados por Cerigioli (2005) e Mendonça et al. (2006) demonstraram que algumas estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas foram capazes de promover um maior acúmulo de matéria seca total em plantas de milho, quando comparadas à planta controle. O mesmo foi observado neste trabalho através da comparação das plantas inoculadas com as estirpes HIII206a e HIII215 em relação às plantas controle. Oliveira et al. (2002), ao inocularem diferentes espécies de bactérias diazotróficas, dentre as quais espécies de *Herbaspirillum*, isoladas e em misturas, em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas, observaram um aumento significativo no acúmulo de matéria fresca de colmos destas plantas.

Merece destaque os incrementos em algumas variáveis para a inoculação do milho híbrido UENF 506-8 com a estirpe HIV206 bem como os efeitos negativos encontrados quando da inoculação com a estirpe HIII313d. Efeitos negativos de inoculação também foram observados por Oliveira et al. (2002) e

Canuto et al. (2003) em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas quando inoculadas com uma mistura de duas ou mais estirpes de diferentes espécies de bactérias diazotróficas.

Os incrementos percentuais observados neste trabalho, resultantes da inoculação de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas, podem estar associados ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), à síntese de fitormônios produzidos por estas bactérias ou mesmo a um efeito sinérgico destes fatores atuando sobre o desenvolvimento das plantas. Estudos de inoculação mostraram que bactérias endofíticas (por exemplo, *H. seropedicae*) têm um potencial muito maior para contribuir com a FBN, com a síntese de substâncias promotoras do crescimento ou com o aumento da disponibilidade de nutrientes e controle de doenças do que outros tipos de diazotróficos, uma vez que essas atividades ocorrem dentro da planta (Cocking, 2003; Baldani e Baldani, 2005).

Thakuria et al. (2004) relataram a dificuldade em indicar os mecanismos necessários à maior habilidade da bactéria em promover o crescimento da planta. Esses autores discutem, porém, que um mecanismo de promoção de crescimento pode ser aumentado, em condições de campo, na presença de uma comunidade microbiana complexa. Summer (1990) sugere que bactérias diazotróficas endofíticas isoladas da mesma variedade da planta que se deseja inocular são mais eficientes, especialmente quando a população nativa está presente. Sendo assim, organismos adaptados às condições ambiente da região podem apresentar melhores condições para concorrer com a microbiota nativa, tanto pela adaptação às condições edafoclimáticas quanto pelo aumento populacional promovido pela inoculação (Roesch et al., 2005).

Portanto, é possível que a falta de efeito positivo por parte de algumas estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas, testadas neste trabalho, com relação à promoção do crescimento das plantas de milho híbrido UENF 506-8, pode ter ocorrido devido à utilização de bactérias diazotróficas endofíticas que não são nativas da planta estudada.

A presença de população bacteriana nas plantas controle (não inoculadas) pode ser justificada tanto pelo fato de não terem sido utilizadas sementes desinfestadas superficialmente como pela utilização de substrato não estéril. De acordo com Baldani et al. (1995), existe a possibilidade de que a

disseminação de *H. seropedicae* possa ocorrer através de sementes, já que foram obtidos isolados a partir de sementes de cereais como o arroz.

Os resultados gerados demonstram o potencial destes microrganismos avaliados em promover o incremento das plantas, apesar de atuarem de maneira distinta. Poucos estudos têm sido desenvolvidos com microrganismos endofíticos em associação com plantas de milho, não havendo muitos conhecimentos da relação daqueles com a planta, ficando evidente a necessidade de vários estudos para a utilização de tais bactérias no aumento da produtividade agrícola.

3.4. CONCLUSÃO

1. As estirpes de *H. seropedicae* isoladas de diferentes genótipos de milho e utilizadas neste estudo têm potencial distinto para a promoção de crescimento do milho híbrido UENF 506-8;
2. A estirpe denominada HIII206a obteve os maiores incrementos percentuais em resposta à inoculação no milho híbrido UENF 506-8, quando comparada ao controle. Essa estirpe, além de ter induzido incrementos percentuais em todas as variáveis morfoagronômicas avaliadas, contribuiu em características importantes para o desenvolvimento da planta na região, como porte mediano e caule espesso;
3. Apesar de ter ocorrido a colonização do milho híbrido UENF 506-8 pela estirpe denominada HIII313d, não houve incremento percentual em nenhuma das variáveis morfoagronômicas avaliadas, quando comparadas ao controle;
4. Na associação entre as estirpes e o genótipo testados, a resposta à inoculação bacteriana pode ser influenciada pela estirpe da bactéria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL (2004) Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativa, 200p.
- BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77:549–579.
- BALDANI, J.I., CARUSO, L.V., BALDANI, V.L.D., GOI, S.R., DÖBEREINER, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29:911-922.
- BALDANI, V.L.D., GOI, S.R., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. (1995) Localization of *Herbaspirillum* spp. and *Burkholderia* sp. in rice root system. In: *International Symposium on Microbial Ecology*, 7, Santos: International Committee on Microbial Ecology, p.133. (Abstracts)
- BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., SELDIN, L., DÖBEREINER, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36:86-93.
- BASTIÁN, F., COHEN, A., PICCOLI, P., LUNA, V., BARALDI, R., BOTTINI, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant and Soil*, 24:7-11.
- CANUTO, E.L., SALLES, J.F., OLIVEIRA, A.L.M., PERIN, L., REIS, V.M., BALDANI, J.I. (2003) Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. *Agronomia*, 37(2):67-72.

- CERIGIOLI, M.M. (2005) *Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (Zea mays L.) e potencial para promoção de crescimento*. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 149p.
- COCKING, E.C. (2003) Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil*, 252:169-175.
- CONWAY, G. (1999) *The doubly green revolution: food for all in the twenty-first century*. Ithaca: Cornell University Press, 360p.
- DÖBEREINER, J., BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília, EMBRAPA-SPI, 60p.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2007) *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Brasília.
- KUSS, A.V. (2006) *Fixação de Nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado*. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Santa Maria – RS, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, 110p.
- MENDONÇA, M.M., URQUIAGA, S.S., REIS, V.M. (2006) Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 41(11):1681-1685.
- OLIVARES, F.L. (1997) *Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (Saccharum sp.Híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero Herbaspirillum*. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, 328p.

- OLIVEIRA, A.L.M., URQUIAGA, S., DÖBEREINER, J., BALDANI, J.I. (2002) The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242:205-215.
- RADWAN, T.EL-S.EL-D., MOHAMED, Z.K., REIS, V.M. (2004) Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 39(10):987-994.
- RADWAN, T.EL-S.EL-D., MOHAMED, Z.K., REIS, V.M. (2002) Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. *Symbiosis*, 32:39-54.
- RODRIGUES NETO, J., MALAVOLTA JÚNIOR, V.A., VICTOR, O. (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xhantomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopatologica*, 12:16.
- ROESCH, L.F., CAMARGO, F.O., SELBACH, P.A., SÁ, E.S. (2005) Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. *Ciência Rural*, Santa Maria, 35(5):1201-1204.
- SUMMER, M.E. (1990) Crop responses to *Azospirillum* inoculation. *Advances in Soil Sciences*, New York, 12:54-123.
- THAKURIA, D., TALUKDAR, N.C., GOSWAMI, C., HAZARIKA, S., BORO, R.C., KHAN, M.R. (2004) Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science*, 86:978-985.

**RESPOSTA FISIOLÓGICA E VARIÁVEIS MORFOAGRONÔMICAS EM
PLANTAS JOVENS DE TRÊS GENÓTIPOS DE MILHO, INOCULADOS COM
Herbaspirillum seropedicae E SUBMETIDOS À SECA**

RESUMO

Três genótipos de milho oriundos do Programa de Melhoramento Genético de Milho da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) – Composto Braquítico Caboclo, Composto Tripsacóide e UENF 506-8 – inoculados com a estirpe bacteriana endofítica de *Herbaspirillum seropedicae* – HIII206a – foram testados objetivando-se avaliar, mediante associação bactéria-planta, o efeito da seca sobre a resposta fisiológica e as variáveis morfoagronômicas das plantas. O experimento foi desenvolvido no período de maio a julho de 2007, em casa de vegetação, seguindo-se um delineamento experimental inteiramente casualizado constituído pelo fatorial 3x2x2 (três genótipos, com e sem estresse, na ausência ou presença da bactéria), com 11 repetições por tratamento. Durante a indução à seca – 39^o ao 54^o dias após a germinação – foram monitoradas as seguintes variáveis: taxa de assimilação líquida de CO₂ (A); condutância estomática (gs); taxa de transpiração (E); concentração intracelular de CO₂ (Ci); rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm); rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ΦPSII);

quenching fotoquímico (qP); quenching não-fotoquímico (NPQ); potencial da água (ψ_a); altura da planta e o diâmetro do caule. Terminado o período de indução à seca (15 dias após o seu início), as plantas foram colhidas, sendo analisadas as variáveis morfoagronômicas matéria fresca e seca da raiz e da parte aérea e área foliar, bem como a contagem bacteriana. A seca imposta foi confirmada pela queda no potencial da água de todas as plantas estressadas após os 15 dias consecutivos de estresse. A redução na taxa de assimilação líquida de CO_2 de todas as plantas inoculadas ou não inoculadas e submetidas à seca foi amplamente dependente do fechamento dos estômatos (representado pela condutância estomática) que, por sua vez, contribuiu para reduzir a taxa de transpiração e, conseqüentemente, a perda de água, além de determinar o aumento na concentração intracelular de CO_2 . Durante todo o período em que essas plantas permaneceram submetidas à seca, não foi observado nenhum tipo de dano na atividade do fotossistema II delas, pois o rendimento quântico máximo do fotossistema II, rendimento quântico efetivo do fotossistema II e o *quenching* fotoquímico foram pouco afetados. A única variável de fluorescência da clorofila *a* que apresentou diferenças significativas entre os genótipos durante todo o período de seca avaliado foi o *quenching* não-fotoquímico, isto é, o mecanismo de dissipação de energia não-radioativa. Reduções na altura das plantas, no diâmetro do caule e, principalmente, nas variáveis morfoagronômicas encontradas neste trabalho foram determinadas pela redução na taxa de assimilação líquida de CO_2 , devido ao fechamento estomático em resposta à seca. Portanto, a avaliação conjunta destes resultados indica que a seca em plantas jovens de milho limita a assimilação líquida de CO_2 reduzindo o crescimento delas, o que contribui negativamente para a sua produtividade no futuro. Além disso, foi observada uma variabilidade entre os genótipos em termos de resposta fisiológica à seca, com destaque para o genótipo Composto Braquítico Caboclo não-inoculado com a bactéria em estudo. Este genótipo se apresentou menos suscetível à seca, porém o mesmo ocorreu com o genótipo UENF 506-8 quando inoculado.

ABSTRACT

Three maize genotypes of the maize genetic breeding program of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) - Compound Braquítico Caboclo, Compound Tripsacóide and UENF 506-8 - inoculated with an endophytic bacterial strain of *Herbaspirillum seropedicae* - HIII206a - were tested to evaluate the bacteria-plant association under the effect of drought on the physiological response and morpho-agronomic variables of the plants. The experiment was conducted from May to July 2007 in a greenhouse, based on a completely randomized factorial design (3x2x2 - three genotypes, with and without stress, in absence or presence of bacteria), with 11 replications per treatment. During the induced drought – from the 39th to the 54th day after germination - the following variables were monitored: net CO₂ assimilation rate (A), stomatal conductance (gs); transpiration rate (E); intracellular CO₂ concentration (Ci) ; maximum quantum yield of photosystem II (F_v/F_m); effective quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII}); photochemical quenching (qP); non- photochemical quenching (NPQ); water potential (ψ_a); stem height and diameter. After the drought period (after 15 days), the plants were harvested and the morpho-agronomic variables root and shoot fresh and dry matter and leaf area examined and the bacteria counted. The drought was confirmed by a drop in water potential of all stressed plants after 15 consecutive days of drought. The reduction in the net CO₂ assimilation rate of all inoculated or non inoculated plants under drought was largely dependent on stomata closure (represented by stomatal conductance), which in turn helped to reduce the transpiration rate and consequently the water loss, besides determining the increase in intracellular CO₂ concentration. Throughout the drought period, no impact was observed on the activity of photosystem II of the plants, since the yield maximum quantum of photosystem II, effective quantum yield of photosystem II and photochemical quenching were little affected. The only variable of chlorophyll a fluorescence with significant differences between the genotypes in the drought period was the estimated non-photochemical quenching, that is, the dissipation mechanism of non-radioactive energy. Reductions in plant height, stem diameter and particularly in the morpho-

agronomic variables in this study were measured by the reduction of net CO₂ assimilation rate due to stomatal closure in response to drought. Therefore, the joint assessment of these results indicates that drought in young maize plants limits net CO₂ assimilation which reduces growth and affects future yields. Moreover, a variation was observed among genotypes in terms of physiological response to drought and in the genotype compound Braquítico Caboclo with no inoculation of the bacterium under study. This genotype was less drought-susceptible, although genotype UENF 506-8 performed similarly when inoculated.

3.5. INTRODUÇÃO

Sendo uma planta de origem tropical, o milho exige, durante o seu período vegetativo, calor e principalmente água para se desenvolver e produzir satisfatoriamente, proporcionando produtividades compensadoras (Figueredo Júnior, 2004).

As respostas mais proeminentes das plantas à seca, segundo McCree e Fernández (1989), consistem no fechamento dos estômatos, no decréscimo da produção da área foliar e na aceleração da senescência das folhas seguida de sua abscisão. Porém, o decréscimo na produção da área foliar é evitado geralmente pelo processo de ajustamento osmótico, que permite a planta manter a turgescência das suas células e conseqüentemente o crescimento vegetativo em níveis satisfatórios, mesmo sob baixos valores de potencial de água da planta (Morgan, 1984). O fechamento estomático, oriundo da redução da turgescência das células-guarda do estômato (Silva et al., 2001), pode causar severa inibição da fotossíntese, mesmo em plantas C₄, sobretudo em razão da maior resistência difusiva à entrada do CO₂ (Kaiser, 1987). A senescência e a abscisão das folhas, por sua vez, são acarretadas pelo fato de o solo seco não poder fornecer nitrogênio suficiente para suprir as necessidades de crescimento da planta, sendo o nitrogênio do interior da planta retranslocado das folhas mais velhas para os pontos de crescimento; entretanto, a intensidade da senescência depende da

quantidade de nitrogênio no solo, das reservas de nitrogênio na planta e da demanda de nitrogênio dos pontos de crescimento (Wolfe et al., 1988). Outros efeitos típicos da seca incluem a redução na transpiração e na translocação de assimilados (Hsiao, 1973).

Embora as medidas de trocas gasosas sejam importantes para determinar a atividade fotossintética, podem não ser eficientes para avaliar os efeitos deletérios nos cloroplastos, ocasionados pelas diversas formas de estresse abiótico (Durães, 2003). Condições extremas de estresse ambiental podem afetar os eventos no tilacóide, interferindo na eficiência da fotossíntese e inativando o fotossistema II (PSII) e a cadeia transportadora de elétrons, que dão origem ao ATP e ao NADPH₂ (Costa et al., 2003). Logo, a manutenção da integridade do PSII durante o período de estresse é significativa como característica de resistência, uma vez que permite recuperação do processo fotossintético após o estresse (Liu e Dickmann, 1993).

Uma alternativa é associar as medidas de trocas gasosas com a avaliação da eficiência fotoquímica da fotossíntese, obtida por meio das diversas variáveis da fluorescência da clorofila *a*. Segundo Bolhàr-Nordenkamp et al. (1989), o rendimento da fluorescência da clorofila revela o nível de excitação da energia no sistema de pigmentos que promove a fotossíntese e fornece subsídios para estimar a inibição ou o dano no processo de transferência de elétrons do PSII. Além disso, é uma técnica rápida, não-destrutiva e sensível, constituindo importante avanço em estudos ecofisiológicos de plantas (Krause e Weiss, 1991). Sendo assim, o monitoramento da fluorescência da clorofila *a*, juntamente com o monitoramento das trocas gasosas pelas plantas, pode ser útil na identificação da capacidade de tolerância das plantas à seca.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da seca em plantas jovens de três genótipos de milho oriundos do Programa de Melhoramento Genético de milho da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) – Composto Braquítico Caboclo, Composto Tripsacóide e UENF 506-8 – inoculados com a estirpe bacteriana endofítica *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe HIII206a, sob o ponto de vista da atividade fotossintética e de variáveis morfoagronômicas.

3.6. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF, no município de Campos dos Goytacazes – RJ. Utilizaram-se três genótipos de milho inoculados com uma estirpe de bactéria diazotrófica endofítica, cultivados a partir de sementes em vasos feitos de garrafas “PET” (uma planta por garrafa) contendo o substrato comercial Plantmax®. As plantas foram irrigadas com água corrente até o 39º dia após a germinação (d.a.g.), quando teve início o estresse por falta d’água, imposto pela suspensão da irrigação.

3.6.1. Material vegetal

As sementes de milho dos genótipos Composto Braquítico Caboclo, Composto Tripsacóide e UENF 506-8, obtidos pelo Programa de Melhoramento Genético do milho da UENF, e utilizadas no experimento, foram doadas pelo coordenador do programa, o professor Messias Gonzaga Pereira.

Dentre as atuais variedades comerciais de milho, o híbrido conhecido como UENF 506-8 (geração mais avançada do híbrido interpopulacional UENF 506-6) foi desenvolvido pelo Programa de Melhoramento Genético do Milho da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) via seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos. As populações base foram originadas de uma permuta de material genético de milho entre a Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a UENF. Esse híbrido, apesar de sensível a seca, apresenta internódios curtos, folhas largas, colmo grosso e elevado índice de prolificidade (a maioria das plantas com duas espigas comerciais), florescendo aos 68 dias após o plantio, com maturação aos 140 dias (Messias Gonzaga Pereira, informações pessoais).

O genótipo denominado Composto Tripsacóide, que apresenta características intermediárias no que tange a resistência a seca, originou-se da recombinação de quatro genótipos de Tripsacóides (T1, T2, T3 e T5) que, por sua vez, tiveram origem de cruzamentos entre linhagens de milho e *Tripsacum* spp. O

gênero *Tripsacum*, um dos mais próximos do gênero *Zea*, caracteriza-se pela resistência ou tolerância à seca, às pragas e a problemas de fertilidade do solo (Harlan e de Wet, 1971; Cohen e Galinat, 1984; Smith, 1985). Segundo Lemos (2001), populações de *Tripsacum* sp. provenientes das pesquisas dos professores Jack Harlan e Johann de Wet, depois de introduzidas para estudo no Brasil pelo pesquisador Joachim von Büllow, inicialmente na Universidade de Brasília (UnB) e a partir de 1993 na UENF, foram cruzadas com linhagens de milho portadoras de caracteres para maior resistência à seca durante a floração. As populações obtidas foram, então, cruzadas com cultivares de milho de grande capacidade produtiva na região de Brasília e, após seleção entre e dentro de famílias de meio-irmãos e um ciclo de recombinação em seleção massal, resultaram nos quatro genótipos de Tripsacóides formadores do composto. Logo, os tripsacóides apresentam, além de uma produção estável, genes que conferem resistência a doenças e ao estresse ambiental, conforme relatado por Stalker et al. (1977).

Já o Composto Braquítico Caboclo, também desenvolvido pelo Programa de Melhoramento Genético do Milho da UENF, é um genótipo resistente a seca e originou-se da recombinação de cinco genótipos caboclos (oriundos de produtores rurais) com o genótipo Piranão. Inicialmente, tais genótipos caboclos (homozigotos dominantes para porte alto) foram cruzados individualmente com o genótipo Piranão (homozigoto recessivo para porte baixo), resultando em cinco populações F₁ heterozigotas e distintas. Após a autofecundação e avaliação da população segregante, foram selecionadas as plantas homozigotas recessivas de cada cruzamento para gerar o então Composto Braquítico Caboclo (Messias Gonzaga Pereira, informações pessoais).

Apesar de o fato destes genótipos terem se originado em programas de melhoramento vegetal, Silva (2005) ressalta que o progresso desses programas seria maior se condições de estresse fossem incluídas durante a seleção. No entanto, quase sempre isto não é possível, havendo a necessidade de se estabelecerem estudos específicos do efeito de diferentes estresses na cultura estudada.

3.6.2. Inoculação do material microbiológico

Foi utilizada a estirpe bacteriana denominada HIII206a, isolada de raízes de milho (*Zea mays*), variedade BR 451, e doada pelo Dr. Fábio Bueno dos Reis Júnior, pesquisador da Embrapa Cerrados. A escolha por essa estirpe deu-se através de experimentos preliminares utilizando-se como material vegetal o híbrido UENF 506-8. A bactéria foi crescida em meio de cultivo líquido DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986), sob agitação constante a 100 rpm, durante um período aproximado de 24 horas à temperatura de 30 °C. A suspensão bacteriana ajustada para o número de células equivalente a 10^8 células por mililitro de meio de cultivo foi aplicada diretamente sobre as sementes de milho (um mililitro por semente), contidas na superfície do substrato.

3.6.3. Aplicação dos tratamentos e delineamento experimental

Do total das sementes utilizadas para cada genótipo de milho (88 sementes por genótipo), 50%, ou seja, 44 sementes de cada genótipo foram inoculadas com a estirpe bacteriana HIII206a a fim de compor os tratamentos inoculados. As demais sementes (44 restantes) não receberam inoculação e, portanto, representaram o controle. No 38º d.a.g., isto é, no dia anterior ao início das análises, foi realizada uma seleção aleatória destas plantas para compor o experimento, ou seja, 44 plantas por genótipo, sendo 22 inoculadas e 22 não inoculadas das quais 50% (11 inoculadas e 11 não inoculadas) foram estressadas. O estresse através da seca foi, por sua vez, imposto no 39º d.a.g. através da suspensão da irrigação.

As plantas foram então divididas, casualmente, em três grupos: i) um grupo contendo cinco repetições por tratamento, utilizado para as avaliações morfo-agronômicas (altura da planta, diâmetro do caule, área foliar, matéria fresca e matéria seca da raiz e da parte aérea) e contagem bacteriana; ii) um grupo contendo três repetições por tratamento, utilizado para as avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* e; iii) um grupo contendo três repetições por tratamento, utilizado para a avaliação do potencial da água.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado constituído pelo fatorial 3x2x2 (três genótipos de milho, com e sem estresse hídrico, na ausência ou presença da bactéria), com 11 repetições.

3.6.4. Avaliação do potencial da água

A avaliação do potencial da água (Ψ_a) foi realizada no período antemanhã usando uma bomba de pressão (Modelo 3005, Soil Moisture). Duas medidas foram realizadas: uma medida no 39º d.a.g., tomada como referência (tempo zero) e uma medida no 54º d.a.g., último dia de análise das plantas.

3.6.5. Medidas de trocas gasosas e variáveis climáticas

As avaliações de trocas gasosas foram feitas no período de 07h30min às 11h diretamente na casa de vegetação do LMGV, a partir do início da imposição do estresse (39º d.a.g.), em intervalos de três dias até a obtenção do ponto máximo de estresse (51º d.a.g.). O ponto máximo de estresse foi identificado como sendo o tempo (em dias) em que a assimilação líquida de CO_2 (A) foi próxima ou igual a zero.

Além de A, foram avaliadas a condutância estomática (gs), a transpiração (E) e a concentração intracelular de CO_2 (Ci). Os valores foram obtidos a partir da média da triplicata, feita em cada uma das três repetições, de cada um dos tratamentos, com um sistema portátil de fotossíntese (CIRAS-2, PP System) usando-se a porção mediana da folha mais jovem completamente expandida. Foi utilizado um fluxo de fótons fotossintetizantes (FFF) de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecido por uma lâmpada alógena do próprio equipamento e 375 ppm de CO_2 de referência também fornecido pelo equipamento.

Para o monitoramento das variáveis climáticas dentro da casa de vegetação do LMGV, foram instalados sensores de umidade relativa do ar (UR) e temperatura (t) (WhatchDog modelo 450, Spectrum Technologies). Ambos foram programados para coletar e armazenar dados a cada 15 minutos.

A partir dos dados armazenados de umidade relativa do ar e temperatura, foi possível calcular os valores do déficit de pressão de vapor atmosférico (DPV), segundo a equação apresentada por Naves-Barbiero et al. (2000):

$$DPV = 0,611375e^t * (1 - UR/100)$$

onde t é calculado pela equação:

$$t = 17,502 * (T_{ar}) / (240,97 + T_{ar})$$

3.6.6. Medidas de fluorescência da clorofila a

Para as avaliações da fluorescência da clorofila a, utilizou-se um fluorímetro modulado (Modelo FMS 2, Hansatech) seguindo a metodologia do pulso de saturação, descrita por Schreiber et al. (1994). Para tanto, utilizaram-se as duas folhas mais jovens de cada planta, completamente expandidas. Os valores foram obtidos no período de 13h30min a 15h a partir da média das duas folhas, feita em cada uma das três repetições, de cada um dos tratamentos, no 39º, 42º, 45º, 48º, 51º e 54º d.a.g., perfazendo um total de seis avaliações.

Antes das análises de fluorescência, as folhas permaneceram pré-adaptadas ao escuro por um período de 30 minutos, objetivando-se a completa oxidação dos componentes do sistema de transporte de elétrons. Tal adaptação, na realidade, correspondeu apenas a uma área circular do limbo foliar, de cerca de quatro milímetros de diâmetro, sendo obtida por meio de pinças com um sistema de janela que permite a sua abertura quando da medição, ou fechamento para adaptação ao escuro.

A partir do emprego de um pulso de luz saturante de $18.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (100% da intensidade do equipamento), foram determinadas as seguintes variáveis: fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável (F_v) e o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m). Após 30 segundos, as folhas foram então adaptadas à luz, por um período de 10 segundos, utilizando-se uma luz actínica de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Através de um segundo pulso saturante de mesma intensidade, foram determinadas as variáveis: F_s , $F_{m'}$, $F_{v'}$, Φ_{FSII} , qP e o NPQ. Estas últimas foram calculadas de acordo com as seguintes fórmulas (Schreiber et al., 1994):

$$\Phi_{FSII} = \Delta F / F_{m'} = (F_{m'} - F_s) / F_{m'}$$

$$qP = (F_{m'} - F_s) / (F_{m'} - F_0')$$

$$\text{NPQ} = (F_m - F_{m'})/F_{m'}$$

onde:

F_s : fluorescência no *steady state* (equilíbrio);

F_m : fluorescência máxima obtida em folhas adaptadas à luz;

F_v : fluorescência variável obtida em folhas adaptadas à luz;

Φ_{FSII} : rendimento quântico efetivo do fotossistema II;

qP: *quenching* fotoquímico;

NPQ: *quenching* não-fotoquímico.

3.6.7. Variáveis morfoagronômicas

A variável altura da planta, compreendida entre o colo da planta e a emergência das novas folhas, medida com uma régua metálica de 30 cm, bem como o diâmetro do caule, medido com o auxílio de um paquímetro digital (Modelo Starrett 727), foram avaliados a partir do 39º d.a.g., em intervalos de três dias, perfazendo um total de cinco avaliações (39º, 42º, 45º, 48º e 51º d.a.g.). Já as variáveis correspondentes à matéria fresca e matéria seca da parte aérea e da raiz e à área foliar foram determinadas a partir da coleta das plantas no 55º d.a.g. Antes de realizar as medidas de matéria fresca, as raízes das plantas foram lavadas em água corrente para a remoção do substrato aderido, sendo, em seguida, separadas da parte aérea. A fim de se obterem os referidos valores, utilizou-se um medidor de área foliar (Modelo 3100, LI-COR) e uma balança analítica (Modelo PR 1000, Núcleo). Após as medidas de matéria fresca, tanto as raízes como as partes aéreas das plantas permaneceram em estufa a 60 °C durante sete dias, antes de serem feitas as medidas de matéria seca.

3.6.8. Contagem bacteriana

Para a realização da contagem bacteriana, foram utilizadas três repetições de cada um dos tratamentos do experimento.

Aos 55º d.a.g., amostras de um grama de cada raiz coletada foram lavadas, individualmente, em água corrente e posteriormente maceradas em 9 mL

de solução salina ($\frac{1}{4}$ dos sais do meio de cultivo JNFb). Em seguida, cada macerado foi diluído quatro vezes, também em solução salina, de forma seriada (de 10^{-3} a 10^{-6}), e alíquotas de 0,1 mL referentes a cada diluição foram inoculadas em frascos contendo 5 mL de meio de cultivo semi-sólido JNFb (Baldani et al., 1992), perfazendo um total de três repetições por diluição. Os frascos permaneceram então incubados a 30 °C por cinco dias.

O número de bactérias presentes nas raízes foi, por sua vez, estimado com o auxílio da tabela de McCrady mediante a formação de película característica na superfície dos meios de cultura (película esbranquiçada). Essa metodologia é conhecida como Número Mais Provável (NMP) e foi descrita por Döbereiner et al. (1995).

O tratamento controle foi constituído pelas amostras de raízes de plantas não inoculadas mantidas sob as mesmas condições de desenvolvimento.

3.6.9. Análise estatística dos dados

O efeito da interação entre os tratamentos em todas as variáveis avaliadas, com exceção da contagem bacteriana, foi avaliado estatisticamente com o software SAS (*Statistical Analysis System*) através da análise de variância feita pelo teste F (5%). Quando detectada significância, utilizou-se: i) o *software* Genes para a comparação das médias das variáveis morfoagronômicas (exceto altura da planta e diâmetro do caule) e do potencial da água, através do teste de Tukey (5%) e ii) o *software* Origin 8.0 para plotar os dados de resposta fisiológica (medidas de trocas gasosas e medidas de fluorescência da clorofila *a*), além da altura da planta e diâmetro do caule, por meio da regressão dos dados, segundo equações polinomiais. Para a comparação das médias dentro da contagem bacteriana foi utilizado o teste de Tukey (5%).

3.7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três genótipos de milho estudados (Composto Braquítico Caboclo - CBC, Composto Tripsacóide - CT e UENF 506-8 - U) tiveram quedas significativas na taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) (Figuras 1A e 1B), na condutância estomática (*gs*) (Figuras 1C e 1D) e na taxa de transpiração (*E*) (Figuras 2A e 2B) em resposta à indução à seca, quando comparadas ao controle (plantas não estressadas). Resultados semelhantes também foram observados por Xu e Zhou, (2006), trabalhando com uma espécie de gramínea perene (*Leymus chinensis*) submetida ao efeito combinado de seca e alta temperatura, e Souza et al. (2004), trabalhando com plantas de feijão (*Vigna unguiculata*) submetidas à seca e à recuperação hídrica. Por outro lado, a concentração intracelular de CO₂ (*C_i*) aumentou em todos os três genótipos, após a imposição do estresse (Figuras 2C e 2D).

Nas plantas inoculadas com a bactéria, houve uma redução menos acentuada na taxa de assimilação líquida de CO₂ e na taxa de transpiração no genótipo U. Paralelamente, os resultados mostraram níveis mais baixos na concentração intracelular de CO₂ neste genótipo, destacando-se dos demais, principalmente, entre o 6º e 9º dia sob seca (Figuras 1A, 2A e 2C). Por outro lado, observaram-se respostas semelhantes nas plantas não inoculadas, com destaque para a redução não acentuada também na condutância estomática no genótipo CBC (Figuras 1B, 1D, 2B e 2D).

No 12º dia de avaliação (ponto máximo de estresse), os valores registrados para a assimilação líquida de CO₂ tiveram uma queda de 99%, 100% e 86%, respectivamente para os genótipos inoculados CBC, CT e U. Nos genótipos não inoculados, a queda verificada nesta variável foi de 94% no genótipo CBC e aproximadamente 100% nos genótipos CT e U, em relação ao controle (Figuras 1A e 1B). A concentração intracelular de CO₂, por sua vez, teve no 12º dia de avaliação um aumento em torno de 150% em relação ao controle nos genótipos inoculados e um aumento variando de 25% a 150%, aproximadamente, nos genótipos não-inoculados (Figuras 2C e 2D).

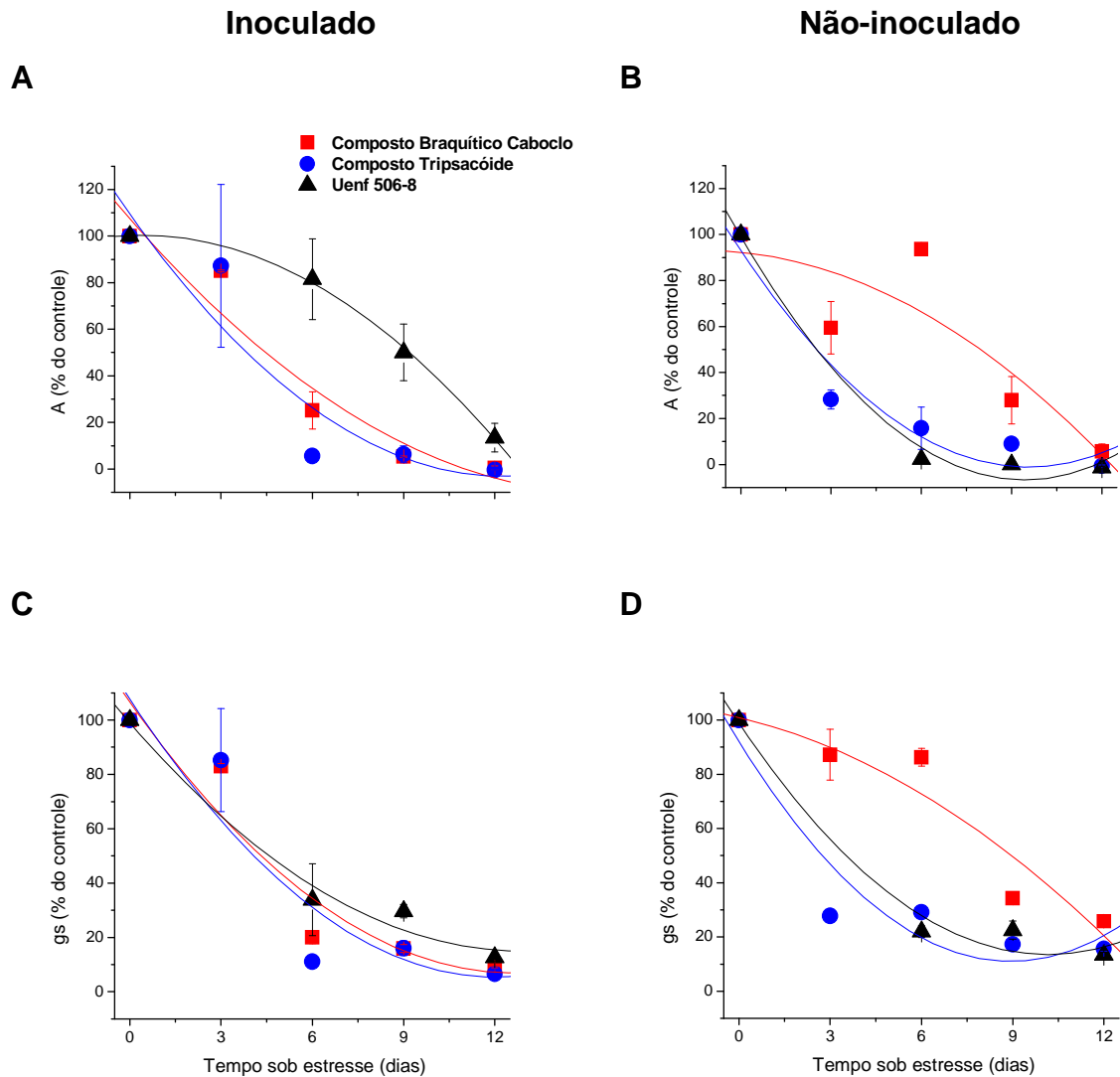


Figura 1 - Taxa de assimilação líquida de CO_2 , A, (A e B) e condutância estomática, gs, (C e D) em plantas jovens de três genótipos de milho, inoculados (A e C) e não-inoculados (B e D) com a bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe HIII206, submetidas à seca em casa de vegetação. Os dados representam a média de três repetições e a barra de erro, o desvio padrão da média.

Destaque para o genótipo U que em associação com a bactéria registrou níveis baixos de concentração intracelular de CO_2 até o 9º dia sob seca, a partir do qual se igualou aos níveis dos demais genótipos no 12º dia (Figura 2C). Este genótipo, quando não-inoculado, destacou-se dos demais apresentando os níveis mais altos de concentração intracelular de CO_2 (Figura 2D). A sua condutância estomática, por sua vez, caiu entre 85% e 80% em relação ao controle, nas plantas inoculadas e não inoculadas, respectivamente (Figuras 1C e 1D).

Em geral, a taxa de transpiração caiu com a imposição da seca. A queda foi menos intensa no genótipo U inoculado, igualando-se, entretanto, aos demais genótipos inoculados ao final da avaliação (Figura 2A). Nas plantas não inoculadas, a queda na transpiração foi menos intensa no genótipo CBC. Após 12 dias de seca, a transpiração nas plantas do genótipo CBC foi de aproximadamente 30% em relação ao controle, enquanto nos demais genótipos foi de cerca de 20% (Figura 2B).

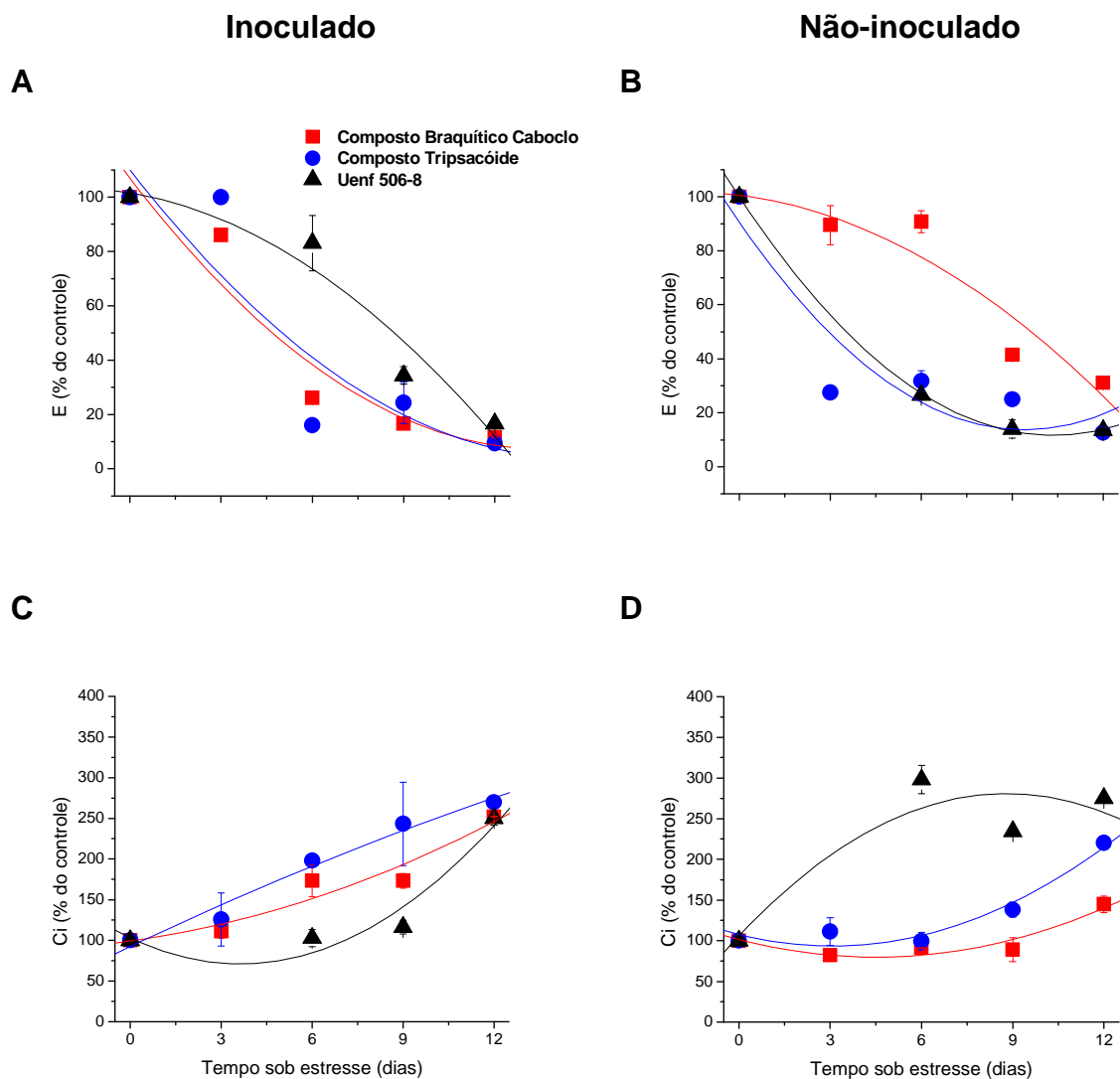


Figura 2 - Taxa de transpiração, E , (A e B) e concentração intracelular de CO_2 , C_i , (C e D) em plantas jovens de três genótipos de milho, inoculados (A e C) e não-inoculados (B e D) com a bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe HIII206, submetidas à seca em casa de vegetação. Os dados representam a média de três repetições e a barra de erro, o desvio padrão da média.

De acordo com Krieg (1993) e Larcher (2000), uma das primeiras tentativas das plantas em manter o seu *status* hídrico é efetivar o fechamento dos estômatos. Esse fechamento estomático, por sua vez, é conseqüência do aumento na concentração de ácido abscísico (ABA) no xilema das plantas, produzido provavelmente na coifa das raízes em resposta a um ligeiro ressecamento do solo, mesmo que esse ressecamento não afete as relações hídricas da parte aérea (Pimentel e Rossiello, 1995). Porém, ressalta-se que decréscimos no potencial da água da planta, fruto da seca, diminuem a turgescência das células-guarda dos estômatos determinando também o fechamento deles. Ainda segundo Mott (1990), os estômatos respondem à concentração intracelular de CO₂ ajustando a difusão desse gás para a fotossíntese. Assim, se outros fatores permanecem inalterados, elevada C_i resulta também num decréscimo da condutância estomática. Isto justifica, portanto, as quedas simultâneas na taxa de assimilação líquida de CO₂, na condutância estomática e na taxa de transpiração observadas nos três genótipos durante a seca.

Por outro lado, ficou claro que o aumento na concentração intracelular de CO₂ foi proporcional à queda na taxa de assimilação líquida de CO₂ nos três genótipos. Sugere-se que essa relação inversa seja conseqüência de uma possível queda na produção de ATP e NADPH₂ necessários ao ciclo de Calvin ou até mesmo conseqüência do processo fotorrespiratório. Este último aspecto, por sua vez, possui imensa importância fisiológica, pois protege o aparelho fotossintético em condições de excesso de radiação ou quando o metabolismo fotossintético tem sua atividade decrescida por algum tipo de estresse ambiental tanto de caráter abiótico (Ribeiro et al., 2004) como biótico (Ribeiro et al., 2003a). Além disso, a fotorrespiração apresenta-se como o principal dreno alternativo de elétrons, sendo responsável pelo consumo de ATP e NADPH₂ gerados pelas reações fotoquímicas (Kozaki e Takeba, 1996), corroborando assim as sugestões descritas para justificar o aumento na C_i.

Os resultados mostraram, portanto, que o genótipo U, quando inoculado, teve a sua taxa de assimilação líquida de CO₂ menos alterada pela seca enquanto o genótipo CT apresentou a maior concentração intracelular de CO₂. Já nos genótipos não-inoculados, a concentração intracelular de CO₂ foi maior no genótipo U e menor no genótipo CBC.

Os resultados das variáveis de fluorescência da clorofila a mostraram que o rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII), determinado pela razão F_v/F_m , foi pouco afetado após 15 dias consecutivos de seca.

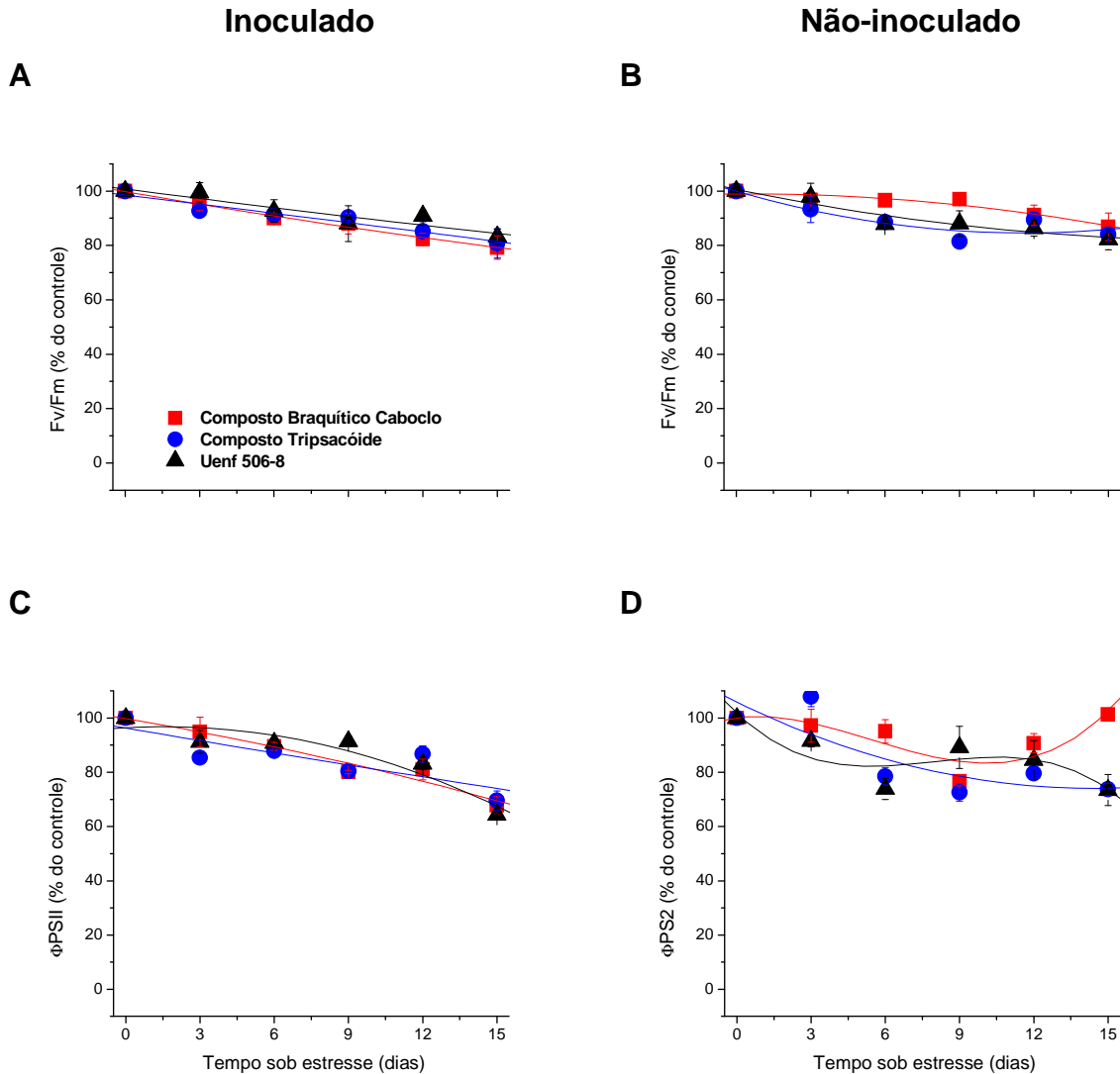


Figura 3 - Rendimento quântico máximo, F_v/F_m , (A e B) e rendimento quântico efetivo, Φ_{PSII} , (C e D) do fotossistema II em plantas jovens de três genótipos de milho, inoculados (A e C) e não-inoculados (B e D) com a bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe HIII206, submetidas à seca em casa de vegetação. Os dados representam a média de três repetições e a barra de erro, o desvio padrão da média.

A razão F_v/F_m , com dados relativos ao controle, apresentou redução máxima de 21% para o genótipo CBC nas plantas inoculadas e redução de 18% para o genótipo U nas plantas não inoculadas (Figuras 3A e 3B). Entre os

genótipos, porém, não foi observada nenhuma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao rendimento quântico máximo nas plantas com ou sem inoculação da bactéria. Este rendimento quântico expressa a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do PSII (Baker, 1991; Krause e Weis, 1991), refletindo a máxima capacidade fotoquímica do PSII.

Segundo Björkman e Demming (1987), o declínio da razão F_v/F_m em plantas submetidas a estresse ambiental, por seca ou alta temperatura, indica a ocorrência de dano fotoinibitório nos centros de reação do PSII. Visto a razão F_v/F_m ter sido pouco afetada, acredita-se que este tipo de dano não tenha ocorrido nos três genótipos de milho inoculados ou não-inoculados avaliados durante o período de seca. Assim como neste trabalho, experimentos conduzidos por Souza et al. (2004) e Xu e Zhou (2006) não registraram grandes alterações na razão F_v/F_m , sugerindo que esta não se apresenta como uma ferramenta ideal para análises ecofisiológicas de plantas submetidas à seca.

O rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}), assim como a razão F_v/F_m , também foi pouco afetado nas plantas inoculadas e submetidas à seca (Figura 3C). Após 15 dias consecutivos sob seca, o rendimento quântico efetivo diminuiu 32%, 30% e 36%, respectivamente, nos genótipos CBC, CT e U. Nas plantas não inoculadas, a redução no rendimento quântico efetivo foi de cerca de 26% entre o início e o final do período de seca nos genótipos CT e U, enquanto que no genótipo CBC, apesar do rendimento quântico efetivo apresentar alguma variação durante todo o período avaliado, não foi verificada diferença entre o início e o final do período de seca, no 15º dia (Figura 3D).

Decréscimos no rendimento quântico efetivo do PSII, que reflete a proporção de elétrons do PSII que serão utilizados na fase fotoquímica da fotossíntese para redução do $NADP^+$ a $NAPH_2$, já foram bem caracterizados por Backer (1993). Esse autor aponta para um aumento da probabilidade da dissipação dos fótons absorvidos pelo complexo coletor na forma de calor, resultando em regulação inibitória da atividade fotossintética (*down-regulation of photosynthesis*), devido à seca.

O *quenching* fotoquímico (qP) das plantas inoculadas permaneceu constante nos três genótipos durante todo o período de seca com médias de 103%, 99% e 96% respectivamente, para CBC, CT e U (Figura 4A). Já nas plantas não inoculadas, a variável qP permaneceu praticamente com valores

médios de 98% para o genótipo CBC, 105% para o genótipo CT e apresentou uma pequena redução de 11% entre o início e o final do período de seca para o genótipo U (Figura 4B). Sendo assim, mesmo sob seca intensa, esta variável tendeu a se manter estável, apresentando-se menos susceptível ao período de seca.

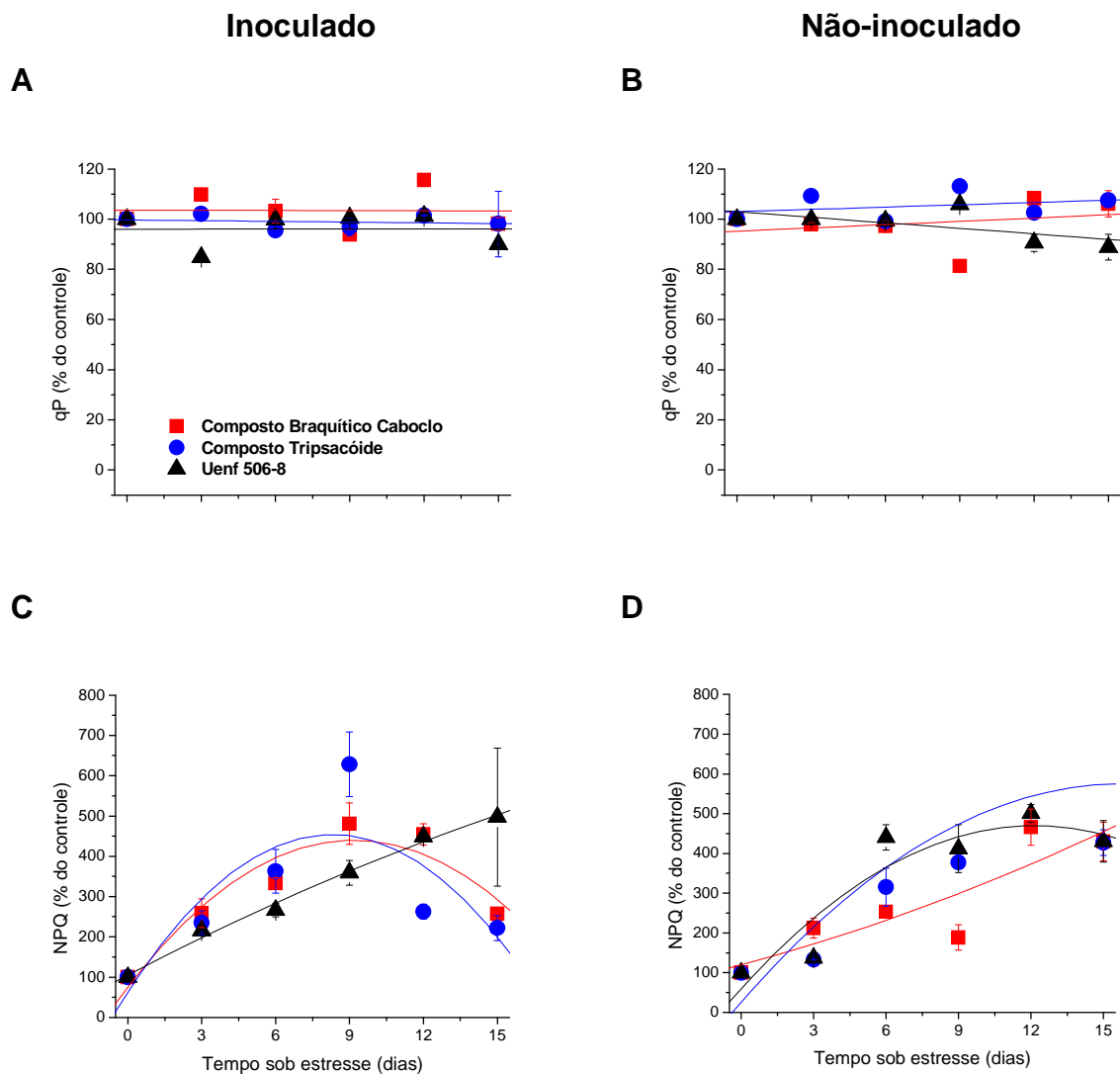


Figura 4 - *Quenching* fotoquímico, qP, (A e B) e *quenching* não-fotoquímico, NPQ, (C e D) do fotossistema II em plantas jovens de três genótipos de milho, inoculados (A e C) e não-inoculados (B e D) com a bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe HIII206, submetidas à seca em casa de vegetação. Os dados representam a média de três repetições e a barra de erro, o desvio padrão da média.

Os resultados anteriores mostraram, portanto, que não houve diferença significativa nas variáveis Φ PSII e qP , nas plantas inoculadas. Entretanto, tal tendência não foi observada nas plantas não inoculadas sendo, verificadas, no final do período de seca, diferenças significativas entre os genótipos, em ambas as variáveis (Figuras 3D e 4B).

As respostas de indução fotossintética obtidas durante o período de seca apresentaram também um aumento do *quenching* não-fotoquímico (NPQ) nos três genótipos, em ambos os tratamentos de inoculação, quando comparados com o controle (Figuras 4C e 4D). Nos genótipos CBC e CT inoculados, o *quenching* não-fotoquímico foi crescente até próximo do 9º dia de estresse, quando então iniciou queda até o final das avaliações (15º dia). Já o genótipo U inoculado apresentou níveis de *quenching* não-fotoquímico crescente durante os 15 dias sob seca (Figura 4C). Nas plantas não inoculadas, foi observada uma tendência, em geral, crescente para a variável NPQ, nos três genótipos avaliados (Figura 4D). Nestas plantas, o *quenching* não-fotoquímico aumentou em cerca de 300% entre o início e o final do período de seca (15º dia).

Esta variável, dentre todas as utilizadas para se avaliar a fluorescência da clorofila *a*, é a responsável por indicar a eficiência da dissipação de energia luminosa na forma de calor (não-fotoquímica) em razão do aumento no gradiente de prótons entre o lúmen e o estroma do cloroplasto (Genty et al., 1989; Maxwell e Johnson, 2000). Logo, a variável NPQ se apresenta como uma ferramenta útil para avaliar efetivamente o nível de proteção do PSII contra danos fotoquímicos (Streit et al., 2005), apesar do mesmo reduzir o rendimento quântico efetivo do PSII, como sugerido por Backer (1993). Porém, a probabilidade da dissipação dos fótons absorvidos pelo complexo coletor na forma de calor em plantas submetidas a estresses, descrita por este autor, corrobora não só os resultados encontrados neste experimento para a variável NPQ como também os resultados obtidos por Maxwell e Johnson (2000), trabalhando com feijão (*Vigna unguiculata*).

Observou-se, contudo, que as plantas inoculadas não demonstraram nenhuma resposta relacionada a um melhor desempenho da atividade fotossintética quando submetidas a um período de 15 dias de seca. Deve-se ressaltar, entretanto, uma pequena variação no padrão de resposta do genótipo U quando inoculado, destacando-se em relação aos demais genótipos.

Nos resultados das variáveis agrônômicas apresentadas na Figura 5, observou-se, nos três genótipos, tanto inoculados como não-inoculados uma redução na altura e no diâmetro do caule das plantas submetidas à seca por um período de 12 dias consecutivos. O genótipo CT foi o que apresentou a maior redução na altura das plantas (54% no tratamento inoculado e 51% no tratamento não-inoculado) enquanto nos demais genótipos a redução foi de 33% e 39% respectivamente para o genótipo CBC e U quando inoculados e de 29% e 37%, respectivamente para ambos quando não-inoculados (Figura 5A e 5B).

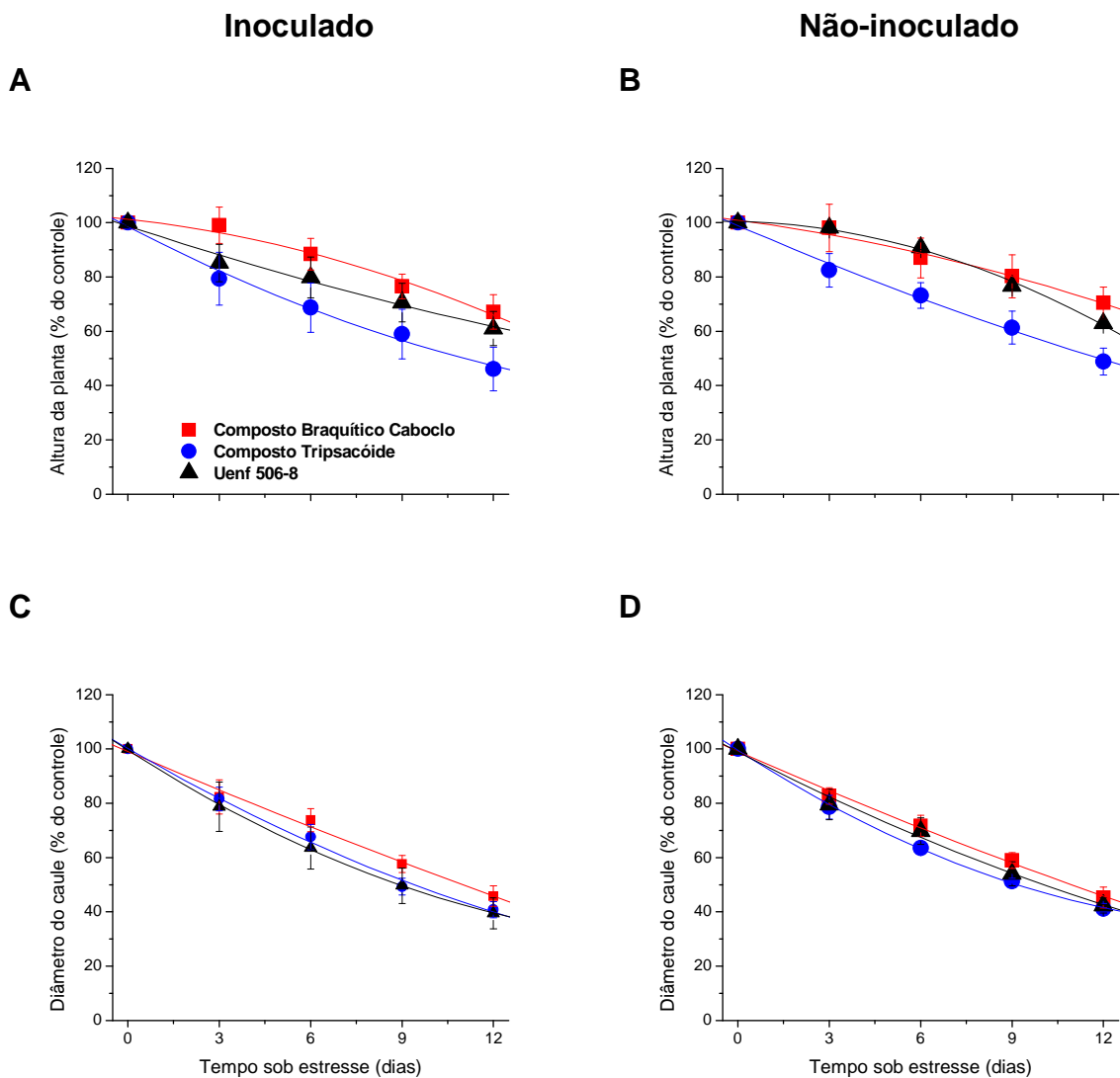


Figura 5 - Altura da planta e diâmetro do caule em plantas jovens de três genótipos de milho submetidas a um período de 12 dias consecutivos de seca, inoculadas ou não inoculadas com a bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe HIII 206, em casa de vegetação. Dados referentes à média de cinco repetições.

Porém, a redução encontrada no diâmetro do caule, resultante da tensão gerada nos elementos de vaso do xilema devido à falta d'água imposta pela seca, não mostrou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os genótipos em nenhum dos dois tratamentos de inoculação, alcançando reduções máximas de 60% nas plantas inoculadas (genótipo U) e de 59% naquelas não inoculadas (genótipo CT) (Figuras 5C e 5D). De acordo com Páez et al. (1995), uma redução na absorção de água e a conseqüente desidratação das células comprometem processos fisiológicos relacionados com os componentes de crescimento dos vegetais resultando, de fato, em plantas menores, como o observado neste trabalho. Segundo Petry (1991), os processos fisiológicos comprometidos pela falta d'água a que se referem Páez et al. (1995) são a divisão celular, expansão celular e a fotossíntese.

É válido ressaltar que a paralisação do crescimento das plantas estressadas por falta d'água em comparação às plantas controle reafirma os resultados obtidos pelas variáveis de assimilação, ou seja, não havendo fixação de CO₂ em compostos orgânicos não há crescimento.

Nas outras variáveis agronômicas apresentadas na Tabela 1, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os genótipos não submetidos à seca (NE – controle) na matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA) e área foliar (AF), tanto nas plantas inoculadas como naquelas não inoculadas (controle). Apesar de não ter sido observado o mesmo padrão de resposta nas variáveis de matéria fresca da raiz (MFR) e matéria seca da raiz (MSR), foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) na MFR e MSR quando a comparação foi feita entre as plantas não estressadas inoculadas e não inoculadas (controle), respectivamente, para o genótipo CBC e para o genótipo U.

O percentual de redução das variáveis MFPA, MSPA e AF ocasionado pela seca variou de 78,7% (MSPA do genótipo CT) a 88,4% (AF dos genótipos CT e U) nas plantas inoculadas, e de 81,2% (MSPA do genótipo CBC) a 90,6% (AF do genótipo U) nas plantas não inoculadas. Já para as variáveis MFR e MSR, o efeito da seca foi menor. Nestas variáveis o percentual de redução foi de 47,3% (MSR do genótipo CBC) e 73,1% (MFR do genótipo CT) nas plantas inoculadas e de 34,2% (MSR do genótipo CBC) e 68,5% (MFR do genótipo U) nas plantas não inoculadas.

Tabela 1 - Matéria fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR), área foliar (AF) e porcentagem de redução nas plantas estressadas ($R = E/NE \times 100$) em três genótipos de milho: não-estressado (NE), estressado (E), inoculado e não-inoculado, cultivados em casa de vegetação. Dados referentes à média de cinco repetições coletadas no 55º dia após a germinação, após 15 dias sob seca. CBC, Composto Braquítico Caboclo; CT, Composto Tripsacóide; U, UENF 506-8

Genótipo	MFPA (g)			MFR (g)			MSPA (g)			MSR (g)			AF (mm ²)			
	NE	E	R(%)	NE	E	R(%)	NE	E	R(%)	NE	E	R(%)	NE	E	R(%)	
Inoculado																
CBC	85,3 B ¹ a	14,7 Aa	82,8	24,8 Aa	7,7 Aa	68,9	25,0 Ba	4,9 Aa	80,4	2,07 Aa	1,09 Aa	47,3	1804,3 Ba	272,4 Aa	84,9	
CT	111,7 Ba	20,1 Aa	82,0	28,3 Aa	7,6 Aa	73,1	31,4 Ba	6,7 Aa	78,7	2,37 Aa	1,04 Aa	56,1	2427,5 Ba	280,4 Aa	88,4	
U	167,3 Aa	22,2 Aa	86,7	26,5 Aa	8,3 Aa	68,7	59,7 Aa	7,5 Aa	87,4	2,66 Aa	1,25 Aa	53,0	3305,6 Aa	384,6 Aa	88,4	
Não Inoculado																
CBC	74,9 Ba ²	10,9 Aa	85,4	16,6 Ab	5,9 Aa	64,4	20,8 Ba	3,9 Aa	81,2	1,52 Aa	1,00 Aa	34,2	1659,0 Ca	168,5 Aa	89,8	
CT	127,5 Aa	18,9 Aa	85,2	22,4 Aa	8,6 Aa	61,6	49,3 Aa	6,6 Aa	86,6	1,99 Aa	1,08 Aa	45,7	2362,8 Ba	281,1 Aa	88,1	
U	154,1 Aa	21,6 Aa	86,0	21,3 Aa	6,7 Aa	68,5	59,4 Aa	7,1 Aa	88,0	1,93 Ab	1,02 Aa	47,1	3035,6 Aa	284,8 Aa	90,6	
CV%	43,09			25,24			60,13			26,67			32,11			

¹ Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, entre os genótipos dentro de cada tratamento.

² Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, entre cada genótipo ao ser comparado o tratamento inoculado com o tratamento não-inoculado.

CV% = coeficiente de variação.

Porém, entre os genótipos não inoculados, o U foi o que apresentou os maiores percentuais de redução em todas as variáveis avaliadas (86,0%, 68,5%, 88,0%, 47,1% e 90,6%, respectivamente, para MFPA, MFR, MSPSA, MSR e AF).

Essa tendência do genótipo U de apresentar as maiores quedas nas variáveis agronômicas em função da seca só não foi mantida para as variáveis MFR (com queda de 68,7%) e MSR (com queda de 53%) nas plantas inoculadas (Tabela 1).

Bergonci et al. (2001) trabalharam com plantas do milho híbrido Pioneer 3230 submetidos a diferentes lâminas de irrigação em campo, nas safras agrícolas de 1993/94 a 1996/97, sendo o controle representado por plantas sem irrigação. Estes autores também encontraram uma redução nas variáveis agronômicas das plantas estudadas, isto é, uma redução de 46,3% na matéria seca da parte aérea das plantas na safra agrícola de 1993/94, ano em que a precipitação foi abaixo da média climática, e uma redução de apenas 24,6% na safra agrícola de 1994/95, ano em que a seca foi pouco severa. Para estes autores a capacidade dos vegetais em produzir biomassa pode ser definida por uma relação fisiológica baseada na quantidade de radiação interceptada pela folha e a conversão eficiente dessa radiação em matéria seca através da fixação do CO₂. Mas segundo Silva (2005), a eficiência de conversão de matéria seca é dependente da duração das etapas de desenvolvimento da planta, bem como da coincidência dessas etapas com condições de oferta de fatores de produção como luz, água, nutrientes, etc.

McCree e Fernández, (1989) e Taiz e Zeiger, (2004), por sua vez, ressaltam que, dentre as respostas mais proeminentes das plantas à seca, está o típico fechamento dos estômatos como também o decréscimo da produção de área foliar, resultado esse observado na Tabela 1. Outra resposta da planta bastante comum, principalmente nas gramíneas, para evitar a perda excessiva de água durante a seca, é o enrolamento das folhas (Carlesso, 1993). Assim, a inter-relação entre estas respostas é de fundamental importância para que a planta converta com sucesso o CO₂ em matéria seca.

Sugere-se, portanto, que as porcentagens de redução encontradas neste trabalho, nas variáveis agronômicas das plantas estressadas, foram conseqüência: i) do fechamento estomático que, além de ter impedido a assimilação do CO₂, dificultou a translocação dos fotoassimilados (Hsiao, 1973) e

ii) do enrolamento das folhas das plantas seguido pela redução da área foliar, que acabou por diminuir a quantidade de fótons que poderia ser interceptada pela folha, comprometendo a eficiência do processo fotoquímico e, conseqüentemente, a síntese de ATP e NADPH₂ fundamentais para o processo bioquímico de fixação do carbono em compostos orgânicos.

A seca diminuiu drasticamente o potencial da água (ψ_a) das plantas em todos os três genótipos, tanto nas plantas inoculadas como naquelas não inoculadas. Após 15 dias de seca, as plantas apresentaram um ψ_a médio em torno de -2,45 MPa, enquanto nas plantas controle, o ψ_a médio foi de -0,22 MPa (Tabela 2). Bergonci et al. (2000), trabalhando com plantas de milho híbrido Pioneer 3230 sem irrigação, encontraram valores de ψ_a das plantas variando de -1,60 MPa a -2,00 MPa.

Tabela 2 - Potencial da água (Ψ_a) de três genótipos de milho cultivados em casa de vegetação, inoculados e não-inoculados e submetidos ou não à seca por um período de 15 dias. CBC, Composto Braquítico Caboclo; CT, Composto Tripsacóide e U, UENF 506-8

Genótipo	Ψ_a (MPa)			
	Tempo (dias)		Tempo (dias)	
	0 ⁽²⁾	15 ⁽³⁾	0 ⁽²⁾	15 ⁽³⁾
	Estressado		Não-estressado	
	Inoculado			
CBC	-0,31 A ⁽¹⁾	-2,45 A	-0,27 A	-0,20 A
CT	-0,21 A	-2,15 B	-0,24 A	-0,26 A
U	-0,20 A	-2,46 A	-0,24 A	-0,23 A
	Não Inoculado			
CBC	-0,30 A	-2,56 A	-0,29 A	-0,19 A
CT	-0,22 A	-2,57 A	-0,23 A	-0,18 A
U	-0,16 A	-2,52 A	-0,13 A	-0,22 A

⁽¹⁾ Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, entre os genótipos dentro de cada tratamento.

⁽²⁾ Dados referentes à média de duas repetições coletadas no 39º dia após a germinação.

⁽³⁾ Dados referentes à média de três repetições coletadas no 54º dia após a germinação, 15 dias sob seca.

Diferença significativa ($P < 0,05$) no ψ_a das plantas dos três genótipos só foi encontrada quando as plantas inoculadas foram submetidas à seca. O genótipo CT apresentou ψ_a (-2,15 MPa) maior que aquele apresentado pelos demais genótipos. Isto mostra uma diferença do genótipo CT em relação aos

outros genótipos, favorecendo-o em condições de seca. Apesar da síntese e conseqüente secreção de auxinas pelos endófitos do gênero *Herbaspirillum*, o que promove o crescimento da raiz diretamente pela estimulação da divisão celular e alongação da célula vegetal (Patten e Glick, 2002) e, com isso, uma maior ampliação da área de exploração do solo e maior absorção de água, a associação do endófito com os três genótipos não foi capaz de evitar a drástica redução do potencial da água das plantas estressadas como era de se esperar.

O número de bactérias diazotróficas endofíticas (*H. seropedicae*, estirpe HIII206) isoladas das raízes de plantas jovens de milho em cada um dos três genótipos, aos 55 dias após a germinação, está representado na Tabela 3. Porém, há de se ressaltar que estes números apresentados representam uma estimativa do número de bactérias presentes no material vegetal, uma vez que estas são isoladas e mantidas em meio de cultura por cerca de cinco dias antes de sua contagem, podendo haver morte de algumas delas durante esse período.

Tabela 3 - Contagem do número de bactérias diazotróficas endofíticas presentes em raízes desinfestadas superficialmente de três genótipos de milho cultivados em casa de vegetação, inoculados e não-inoculados e submetidos ou não à seca por um período de 15 dias. Dados referentes à média de três repetições coletadas no 55º dia após a germinação e expressos em logaritmo do número de células por grama de massa fresca da raiz. CBC, Composto Braquítico Caboclo; CT, Composto Tripsacóide e U, UENF 506-8

Genótipo	Log do número de cél.g ⁻¹ MFR	
	Estressado	Não-estressado
	Inoculado	
CBC	3,69 A ⁽¹⁾ a	3,32 Aa
CT	3,55 Aa	5,22 Aa
U	0,00 Ba	4,73 Aa
	Não-inoculado	
CBC	0,00 Bb ⁽²⁾	0,00 Bb
CT	3,25 Aa	5,04 Aa
U	0,00 Ba	0,00 Bb

⁽¹⁾ Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente a 0,1% de probabilidade, pelo teste de Tukey, entre os genótipos dentro de cada tratamento.

⁽²⁾ Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey, entre cada genótipo ao ser comparado o seu tratamento inoculado com o seu tratamento não-inoculado.

Nas raízes das plantas do genótipo CT, foi verificada a presença da estirpe bacteriana em todas as plantas, inoculadas ou não, independente da aplicação ou não do estresse hídrico (Tabela 3).

Estes resultados demonstram que esse genótipo apresenta uma condição favorável à manutenção da estirpe no interior dos seus tecidos, até mesmo em condições máximas de seca (após 15 dias consecutivos). A presença da estirpe bacteriana nas raízes do genótipo CT não-inoculado pode ser justificada tanto pelo fato de não terem sido utilizadas sementes desinfestadas superficialmente como pela utilização de substrato e água de irrigação não estéril. Segundo Baldani et al. (1995), a disseminação de *H. seropedicae* através de sementes é possível por já terem sido obtidos isolados bacterianos a partir de sementes de cereais como o arroz.

Nas raízes das plantas do genótipo U que foram inoculadas e submetidas à seca, não foi encontrado a presença da estirpe bacteriana (Tabela 3). Visto a presença da mesma nas raízes das plantas inoculadas, mas não submetidas à seca, propõe-se que a sua ausência nas plantas estressadas tenha sido determinada pela falta d'água. Uma vez que são nos elementos de vaso do xilema os sítios prováveis para o processo de fixação de nitrogênio pelas bactérias endofíticas (James et al., 1994; Rolfe et al., 1998), acredita-se ser esse um dos locais de estabelecimento das estipes bacterianas no interior das plantas. Sugere-se, portanto, que a tensão ocasionada no xilema pela falta d'água tenha contribuído para a morte das bactérias nas raízes deste genótipo.

No genótipo CBC, como era de se esperar, a estirpe bacteriana foi encontrada nas raízes coletadas das plantas inoculadas tanto estressadas como não estressadas, estando esta ausente nas plantas controle (não inoculadas) tanto estressadas como não estressadas (Tabela 3).

Assim, os resultados obtidos neste trabalho podem representar uma ferramenta importante para o melhor entendimento entre a associação de bactérias diazotróficas endofíticas com plantas de milho. Fica evidente, porém, a necessidade, ainda, de vários estudos objetivando a utilização de tais microrganismos no aumento da produtividade agrícola.

3.8. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho apresentaram diferenças entre os genótipos de milho estudados e inoculados ou não com a estirpe de bactéria diazotrófica endofítica HIII206a, como também entre estes para com as plantas controle, permitindo concluir que:

1. O genótipo híbrido de milho UENF 506-8, quando inoculado com a estirpe bacteriana e comparado com os demais genótipos, foi o que apresentou os menores danos ocasionados pelo período de seca.
2. O genótipo de milho Composto Braquítico Caboclo, quando não-inoculado com a estirpe bacteriana estudada e comparado com os demais genótipos, foi menos suscetível aos danos ocasionados pela seca, confirmando, assim, a sua rusticidade.
3. Na associação entre a estirpe bacteriana e os genótipos de milho, a resposta à inoculação pode ser influenciada pelo genótipo da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDANI, V.L.D., GOI, S.R., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. (1995) Localization of *Herbaspirillum* spp. and *Burkholderia* sp. in rice root system. In: *International Symposium on Microbial Ecology*, 7, Santos: International Committee on Microbial Ecology, p.133. (Abstracts)
- BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I., OLIVARES, F.L., DÖBEREINER, J. (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, 13:65-73.

- BAKER, N.R. (1993) Light-use efficiency and photoinhibition of photosynthesis in plants under environmental stress. *In*: SMITH, J.A.C., GRIFFITHS, H. (eds.) *Water deficit plant responses from cell to community*. Oxford: Bios Scientific Publisher, 221-235.
- BAKER, N.R. (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 81 (4):563-70.
- BERGONCI, J.I., BERGAMASCHI, H., SANTOS, A.O., FRANÇA, S., RADIN, B. (2001) Eficiência da irrigação em rendimento de grãos e matéria seca de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36 (7):941-948.
- BERGONCI, J.I., BERGAMASCHI, H., BERLATO, M.A., SANTOS, A.O. (2000) Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35:1531-1540.
- BJÖRKMAN, O., DEMMING, B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 k among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170:61-66.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R., LONG, S.P., BAKER, N.R., ÖQUIST, G., SCHREIBER, U., LECHNER, E. G. (1989) Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Functional Ecology*, 3:497-514.
- CARLESSO, R. (1993) *Influence of soil water deficits on maize growth and leaf area adjustments*. Tese (Doutorado em Crop and Soil Science) – East Lansing – MI, Michigan State University – MSU, 268p.
- COHEN, J.I., GALINAT, W.C. (1984) Potential use of alien germplasm for maize improvement. *Crop Science*, 24 (1):1011-1015.
- COSTA, E.S, BRESSAN-SMITH, R., OLIVEIRA, J.G., CAMPOSTRINI, E. (2003) Chlorophyll a fluorescence analysis in response to excitation irradiance in bean

plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp) submitted to high temperature stress. *Photosynthetica*, 41:77-82.

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

DURÃES, F.O.M. (2003) Fotossíntese e fluorescência da clorofila: Parâmetros indicadores de tolerância a estresses; www.cnpms.embrapa.br/nucleos/nea/pesquisa/gest002.html em 17/10/07.

FIGUEREDO JÚNIOR, L.G.M. (2004) *Modelo para estimação da produtividade de grãos de milho no Estado de São Paulo*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – ESALQ, USP, 85p.

GENTY, B., BRIANTAIS, J.M., BAKER, N. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990:87-92.

HARLAN, J.R., DE WET, J.M.J. (1971) Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, 20(4):509-517.

HSIAO, T.C. (1973) Plant response to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24:519-570.

JAMES, E.K., REIS, V.M., OLIVARES, F.L., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. (1994) Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany*, 45:757-766.

KAISER, W.M. (1987) Effect of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, 71:142-49.

KOZAKI, A., TAKEBA, G. (1996) Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation. *Nature*, 384:557-560.

- KRAUSE, G.H., WEIS, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology*, 42:313-349.
- KRIEG, D.R. (1993) Stress tolerance mechanisms in above ground organs. In: *Proceedings of the Workshop on Adaptation of Plants to Soil Stress*. Nebraska: Intersomil, 65-79.
- LARCHER, W. (2000) *Ecofisiologia vegetal*. Tradução de Carlos Henrique Britto de Assis Prado. 2.Ed. São Carlos: Rima Artes e Textos, 531p.
- LEMOS, G.C.S. (2001) *Monitoramento morfoagronômico, molecular e citológico da introgressão de genes em tripsacóides*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 66p.
- LIU, C.H., DICKMANN, D.I. (1993) Responses of two hybrid clones to flooding, drought, and nitrogen availability. II. Gas exchange and water relations. *Canadian Journal of Botany*, 71:927-938.
- MAXWELL, K., JOHNSON, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51 (345):659-668.
- MCCREE, K.J., FERNÁNDEZ, C.J. (1989) Simulation model for studying physiological water stress responses of whole plants. *Crop Science*, 29:353-360.
- MORGAN, J.M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35:299-319.
- MOTT, K.A. (1990) Sensing of atmospheric CO₂ by plants. *Plant Cell and Environmental*, 13:731-737.

- NAVES-BARBIERO, C.C., FRANCO, A.C., BUCCI, S.J., GOLDSTEIN, G. (2000) Fluxo de seiva e condutância estomática de duas espécies lenhosas sempre-verdes no campo sujo e cerradão. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12:119-134.
- PÁEZ, A., GONZÁLES, M.E., YRAUSQUÍN, O.X. (1995) Water stress and clipping management effects on guineagrass: I. Growth and biomass allocation. *Agronomy Journal*, 87:698-706.
- PATTEN, C.L., GLICK, B.R. (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:3795-3801.
- PETRY, C. (1991) *Adaptação de cultivares de soja a deficiência hídrica no solo*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Santa Maria – RS, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, 106p.
- PIMENTEL, C., ROSSIELO, R.O.P. (1995) Entendimento sobre relações hídricas. *Simpósio Internacional sobre Estresse Ambiental: O Milho em Perspectiva*, 1995, Belo Horizonte: EMBRAPA/CNPMS, p. 131-146.
- RIBEIRO, R.V., MACHADO, E.C., OLIVEIRA, R.F. (2004) Growth and leaf temperature effects on photosynthesis of sweet orange seedlings infected with *Xylella fastidiosa*. *Plant Pathology*, 53:334-340.
- RIBEIRO, R.V., MACHADO, E.C., OLIVEIRA, R.F. (2003a) Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62:167-173.
- RODRIGUES NETO, J., MALAVOLTA JÚNIO, V.A., VICTOR, O. (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopatologica*, 12:16.

- ROLFE, B.G. (and 13 others) (1998) Round table: agriculture 2020: 8 billion people. In: ELMERICH, C., KONDOROSI, A., NEWTON, W.E. (eds.). *Biological nitrogen fixation for the 21st century*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 685–692.
- SCHREIBER, U., BILGER, W., NEUBAUER, C. (1994) Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D., Caldwell, M.M. (eds.) *Ecophysiology of photosynthesis*. New York: Springer Verlag, p. 49-70.
- SILVA, C.J. (2005) *Influência de estresses abióticos na fase reprodutiva do milho*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Jaboticabal – SP, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 60p.
- SILVA, S., SOARES, A.M., OLIVEIRA, L.E.M. MAGALHÃES, P.C. (2001) Respostas fisiológicas de gramíneas promissoras para revegetação ciliar de reservatórios hidrelétricos, submetidos à deficiência hídrica. *Ciência e Agrotecnologia*, 25 (1):124-133.
- SMITH, S. (1985) Maize (*Zea mays* L.): Historical development, breeding, and utilization. *Journal of Plant Food*, 6:3-17.
- SOUZA, R.P., MACHADO, E.C., SILVA, J.A.B., LAGÔA, A.M.M.A., SILVEIRA, J.A.G. (2004) Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany*, 51:45-56.
- STALKER, H.T., HARLAN, J.R., WET, J.M.J. (1977) Cytology and morphology of maize-*Tripsacum* introgression. *Crop Science*, 17:745-748.
- STREIT, N.M., CANTERLE, L.P., CANTO, M.W., HECKTHEUER, L.H.H. (2005) As clorofilas. *Ciência Rural*, 35(3):748-755.

- TAIZ, L., ZEIGER, E. (2004) *Fisiologia vegetal*. Tradução de Eliane Romanato Santarém et al. 3.Ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.
- WOLFE, D.W., HENDERSON, D.W., HSIAO, T.C., ALVINO, A. (1988) Interactive water and nitrogen effects on senescence of maize. I: Leaf area duration, nitrogen distribution, and yield. *Agronomy Journal*, 80:859-864.
- XU, Z.Z., ZHOU, G.S. (2006) Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta*, 224:1080-1090.

4. CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho teve como escopo o estudo de diferentes genótipos de milho (*Zea mays*) submetidos à seca e associados à comunidade bacteriana da espécie *Herbaspirillum seropedicae*. Desta forma, com base nos resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

1. Diferentes estirpes de *H. seropedicae* isoladas de vários genótipos de milho e utilizadas neste trabalho possuem potencial distinto para a promoção de crescimento do milho híbrido UENF 506-8. Porém, este genótipo ao ser inoculado com a estirpe de *H. seropedicae* denominada HIII206a e comparado com os outros dois genótipos (Composto Tripsacóide e Composto Braquítico Caboclo), todos submetidos a um período de seca, foi o que apresentou os menores danos. Em contrapartida, o genótipo de milho Composto Braquítico Caboclo, quando não inoculado com a estirpe HIII206a e comparado com os demais genótipos, foi menos suscetível aos danos ocasionados pela seca, confirmando, assim, a sua rusticidade.

2. A estirpe HIII206a obteve os maiores incrementos percentuais em resposta a inoculação no milho híbrido UENF 506-8 quando comparada ao controle. Esta estirpe apresenta, portanto, potencial aplicação biotecnológica como promotora de crescimento vegetal, abrindo perspectivas para a sua utilização em programas

de melhoramento genético de milho, com incremento do crescimento vegetal e aumento na produção de grãos.

3. A associação entre as estirpes bacterianas e os genótipos de milho estudados pode ser influenciada tanto pela estirpe da bactéria quanto pelo genótipo do milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agriannual (2004) Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativa, 200p.
- Aldrich, S.R., Scott, W.O., Leng, E.R. (1982) *Modern corn production*. 2. ed. Champaign: A & L Publication, 371p.
- Araújo, W.L., Marcon, J., Maccheroni Jr, W., Van Elsas, J.D., Van Vuurde, J.W.L., Azevedo, J.L. (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:4906-4914.
- Araújo, W.L., Maccheroni Jr, W., Aguilar-Vildoso, C.I., Barroso, P.A.V., Saridakis, H.O., Azevedo, J.L. (2001) Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, 47:229-236.
- Araújo, J.M., Silva, A.C., Azevedo, J.L. (2000) Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43:447-451.

- Asghar, H.N., Zahir, Z.A., Arshad, M., Khaliq, A. (2002) Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, 35:231-237.
- Azevedo, J.L., Maccheroni Jr, W., Pereira, J.O., Araújo, W.L. (2000b) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants; *Electronic Journal of Biotechnology*, 3. http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4_em_21/07/2007.
- Azevedo, J.L., Araújo, W.L., Maccheroni Jr, W. (2000a) Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. *In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds.) Controle Biológico*. Jaguariúna: Embrapa-Meio Ambiente, v. 3, p. 57-93.
- Azevedo, J.L. (1998a) Microrganismos endofíticos. *In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds.) Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, v. 4, p. 117-137.
- Baker, N.R. (1993) Light-use efficiency and photoinhibition of photosynthesis in plants under environmental stress. *In: Smith, J.A.C., Griffiths, H. (eds.) Water deficit plant responses from cell to community*. Oxford: Bios Scientific Publisher, p. 221-235.
- Baker, N.R., Ort, D.R. (1992) Light and photosynthetic performance. *In: Baker, N.R., Thomas, H. (eds.) Crop photosynthesis*. Amsterdam: Elsevier Science, p. 289-312.
- Baker, N.R. (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 81 (4):563-70.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77:549-579.

- Baldani, J.I., Reis, V.R.S., Teixeira, K.R.S., Baldani, V.L.D. (2002) Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. *In*: Serafini, L.A., Barros, N.M., Azevedo, J.L. (org.) *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: Educs, 433p.
- Baldani, J.I., Caruso, L.V., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Döbereiner, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29:911-922.
- Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1995) Localization of *Herbaspirillum* spp. and *Burkholderia* sp. in rice root system. *International Symposium on Microbial Ecology*, 7, Santos: International Committee on Microbial Ecology, p. 133. (Abstracts).
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Olivares, F.L., Döbereiner, J. (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, 13:65-73.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L., Döbereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36:86-93.
- Ball, R.A., Oosterhuis, D.M., Mauromoustakos, A. (1994) Growth dynamics of the cotton plant during water-deficit stress. *Agronomy Journal*, 86:788-795.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant and Soil*, 24:7-11.
- Bell, C.R., Dickie, G.A., Harvey, W.L.G., Chan, J.W.Y.F. (1995) Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal Microbiology*, 41:46-53.

- Bergamaschi, H., Dalmago, G.A., Comiran, F., Bergonci, J.I., Müller, A.G., França, S., Santos, A.O., Radin, B., Bianchi, C.A.M., Pereira, P.G. (2006) Déficit hídrico e produtividade na cultura do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 41 (2):243-249.
- Bergamaschi, H., Dalmago, G.A., Bergonci, J.I., Bianchi, C.A.M., Müller, A.G., Comiran, F., Heckler, B.M.M. (2004) Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 39 (9):831-839.
- Bergonci, J.I., Bergamaschi, H. (2002) Ecofisiologia do milho. CD-ROM dos *Anais do Congresso Nacional de Milho e Sorgo*, 24, Florianópolis, SC, Brasil.
- Bergonci, J.I., Bergamaschi, H., Santos, A.O., França, S., Radin, B. (2001) Eficiência da irrigação em rendimento de grãos e matéria seca de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36 (7):941-948.
- Bergonci, J.I., Bergamaschi, H., Berlato, M.A., Santos, A.O. (2000) Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 35 (8):1531-1540.
- Björkman, O., Demming, B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 k among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170:61-66.
- Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4:343-350.
- Blum, A. (1997) Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In: Belhassen, E. (ed.) *Drought tolerance in higher plants*. Genetical, physiological and molecular biological analysis. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 57-70.

- Bolanos, J., Edmeades, G.O. (1995) Maize breeding for drought tolerance. *International Symposium on Environmental Stress*, 1992, Belo Horizonte: Embrapa-CNPMS/Ciudad del México: CIMMYT/UNDP, p. 397-431.
- Bolhàr-Nordenkampf, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G. (1989) Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Functional Ecology*, 3:497-514.
- Borém, A. (1999) *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 817p.
- Boyer, J.S. (1970) Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiology*, Rockville, 46 (2):233-235.
- Buckler, E.S., Stevens, N.M. (2006) Maize origins, domestication, and selection. *In: Motley, T.J., Zerega, N., Cross, H. (eds.) Genetics and origins of crops*. New York: Columbia, p. 67-90.
- Canuto, E.L., Salles, J.F., Oliveira, A.L.M., Perin, L., Reis, V.M., Baldani, J.I. (2003) Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. *Agronomia*, 37 (2):67-72.
- Carlesso, R. (1993) *Influence of soil water deficits on maize growth and leaf area adjustments*. Tese (Doutorado em Crop and Soil Science) – East Lansing – MI, Michigan State University – MSU, 268p.
- Cavalcante, V., Döbereiner, J. (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar-cane. *Plant and Soil*, 108:23-31.
- Cerigioli, M.M. (2005) *Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (Zea mays L.) e potencial para promoção de crescimento*. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 149p.

- Chanway, C.P. (1998) Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia*, 50:149-170.
- Cirilo, A.G., Andrade, F.H. (1996) Sowing date and kernel weight in maize. *Crop Science*, 36:325-331.
- Cocking, E.C. (2003) Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil*, 252:169-175.
- Cohen, J.I., Galinat, W.C. (1984) Potential use of alien germplasm for maize improvement. *Crop Science*, 24 (1):1011-1015.
- Conway, G. (1999) *The doubly green revolution: food for all in the twenty-first century*. Ithaca: Cornell University Press, 360p.
- Costa, E.S., Bressan-Smith, R., Oliveira, J.G., Campostrini, E. (2003) Chlorophyll *a* fluorescence analysis in response to excitation irradiance in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp) submitted to high temperature stress. *Photosynthetica*, 41:77-82.
- Creus, C.M., Sueldo, R.J., Barassi, C.A. (2004) Water relations and yield in *Azospirillum* inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany*, 82 (2):273-281.
- Dalmastri, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A., Tabacchiono, S. (1999) Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microbial Ecology*, 38:273-284.
- Davies, W.J., Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in rying soil. *Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology*, 42:55-76.
- Di-Fiore, S., Del-Gallo, M. (1995) Endophytic bacteria: their possible role in the host plant. *Azospirillum VI and Related Microorganisms*, 37:169-187.

- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22 (2):107-149.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI, 60p.
- Doebley, J. (2004) The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics*, USA, 38:37-59.
- Durães, F.O.M. (2003) *Fotossíntese e fluorescência da clorofila: Parâmetros indicadores de tolerância a estresses*; www.cnpms.embrapa.br/nucleos/nea/pesquisa/gest002.html em 17/10/07.
- Fancelli, A.L., Dourado Neto, D. (2000) *Produção de milho*. Guaíba: Agropecuária, 360p.
- Figueredo Júnior, L.G.M. (2004) *Modelo para estimação da produtividade de grãos de milho no Estado de São Paulo*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 85p.
- Foyer, C.H. (1993) Interactions between electron transport and carbon assimilation in leaves: Coordination of activities and control. In: Abrol, Y.P., Mohanty, P., Govindjee (eds.) *Photosynthesis: photoreactions to plant productivity*. New Delhi: Oxford & IBH, p. 199-224.
- Fromin, N., Achouak, W., Thiery, J.M., Heulin, T. (2001) The genotypic diversity of *Pseudomonas brassicacearum* populations isolated from roots of *Arabidopsis thaliana*: influence of plant genotype. *FEMS Microbial Ecology*, 37:21-29.

- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990 (1):87-92.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. (1997b) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:895-914.
- Harlan, J.R., de Wet, J.M.J. (1971) Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, 20 (4):509-517.
- Herrero, M.P., Johnson, R.R. (1981) Drought stress and its effects on maize reproductive systems. *Agronomy Journal*, 21:105-110.
- Hirano, S.S., Hupper, C.D. (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:624-653.
- Horton, P., Lee, P. (1986) Observation of enhancement and state transitions in isolated intact chloroplasts. *Photosynthesis Research*, 10 (3):297-302.
- Hsiao, T.C. (1973) Plant response to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24:519-570.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2007) *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Brasília.
- Jain, D.K., Patriquin, D.G. (1985) Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Canadian Journal of Microbiology*, 31:206-210.
- James, E.K. (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, 65:197-209.

- James, E.K., Reis, V.M., Olivares, F.L., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1994) Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany*, 45:757-766.
- Kaiser, W.M. (1987) Effect of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, 71:142-149.
- Katerji, N., Hallaire, M. (1984) Les grandeurs de référence utilisables dans l'étude de l'alimentation en eau des cultures. *Agronomie*, 4 (10):999-1008.
- Khalig, A., Arshad, M., Zahir, Z.A. (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96:473-480.
- Kinkel, L.L., Wilson, M., Lindow, S.E. (2000) Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. *Microbial Ecology*, 39:1-11.
- Kozaki, A., Takeba, G. (1996) Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation. *Nature*, 384:557-560.
- Krause, G.H., Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basic. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42:313-349.
- Krieg, D.R. (1993) Stress tolerance mechanisms in above ground organs. *Proceedings of the Workshop on Adaptation of Plants to Soil Stress*. Nebraska: Intsormil, p. 65-79.
- Kuss, A.V. (2006) *Fixação de Nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado*. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Santa Maria – RS, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, 110p.

- Larcher, W. (2000) *Ecofisiologia vegetal*. Tradução de Carlos Henrique Britto de Assis Prado. 2. ed. São Carlos: Rima Artes e Textos, 531p.
- Lea, P.J., Al-Sulait, A., Palmer, S., Davie, W.J. (1995) Absorção e metabolismo de nitrogênio sobre estresse hídrico. *Simpósio Internacional sobre Estresse Ambiental: O Milho em Perspectiva*, Belo Horizonte: EMBRAPA/CNPMS, p. 163-194.
- Lemos, G.C.S. (2001) *Monitoramento morfoagronômico, molecular e citológico da introgressão de genes em tripsacóides*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 66p.
- Lima, M.G. (1995) *Calibração e validação do modelo cereas-maize em condições tropicais do BrasPiracicaba*. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 119p.
- Lindow, S.E., Andersen, G.L. (1996) Influence of immigration on epiphytic bacteria populations on navel orange leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:2978-2987.
- Liu, C.H., Dickmann, D.I. (1993) Responses of two hybrid clones to flooding, drought, and nitrogen availability. II. Gas exchange and water relations. *Canadian Journal of Botany*, 71:927-938.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M., Van Der Lelie, D. (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21:583-606.
- Magalhães, P.C., Durães, F.O.M., Carneiro, N.P., Paiva, E. (2002) *Fisiologia do milho*. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 23p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 22).

- Marcon, J. (2002) *Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de Citrus spp. e interação com Xylella fastidiosa*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – São Paulo – SP, Universidade de São Paulo – USP, 91p.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sanchez, J., Buckler, E., Doebley, J. (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99:6080-6084.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51 (345):659-668.
- McCree, K.J., Fernández, C.J. (1989) Simulation model for studying physiological water stress responses of whole plants. *Crop Science*, 29:353-360.
- McCully, M.E. (2001) Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28:983-990.
- McInroy, J.A., Kloepper, J.W. (1995b) Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, 173:337-342.
- McInroy, J.A., Kloepper, J.W. (1995a) Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. *Canadian Journal of Microbiology*, 41:895-901.
- Melo, F.M.P. (2005) *Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca Bacillus pumilus MAIIM4a*. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 102p.
- Mendonça, M.M., Urquiaga, S.S., Reis, V.M. (2006) Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 41 (11):1681-1685.

- Mirza, M.S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Malik, K.A. (2001) Isolation, partial characterization and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane "in vitro". *Plant Soil*, 237:47-54.
- Mishagi, I.J., Donndelinger, C.R. (1990) Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 80:808-811.
- Mocali, S., Bertelli, E., Celli, F.D., Mengoni, A., Sfalanga, A., Vilani, F., Caciotti, A., Tegli, S., Surico, G., Fani, R. (2003) Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Research in Microbiology*, 154:105-114.
- Morgan, J.M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35:299-319.
- Mott, K.A. (1990) Sensing of atmospheric CO₂ by plants. *Plant Cell and Environmental*, 13:731-737.
- Mouget, J., Tremblin, G. (2002) Suitability of the fluorescence monitoring system (FM, Hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. *Aquatic Botany*, 74:219-231.
- Netto, A.T., Campostrini, E., Oliveira, G.J., Bressan-Smith, R. (2005) Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae*, 104:199-209.
- Neves, M.C.P., Rumjanek, N.G. (1998) Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds.) *Ecologia Microbiana*, Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 15-60.

- Olivares, F.L. (1997) *Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (Saccharum sp.Híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero Herbaspirillum*. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, 328p.
- Oliveira, A.L.M., Urquiaga, S., Döbereiner, J., Baldani, J.I. (2002) The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242:205-215.
- Ort, D.R., Melandri, B.A. (1982) Mechanism of ATP synthesis. *In: Govindjee (ed.) Photosynthetic energy conversion by plants and bacteria*. New York: Academic Press, p. 537-587.
- Páez, A., Gonzales, M.E., Yrausquin, O.X. (1995) Water stress and clipping management effects on guineagrass: I. Growth and biomass allocation. *Agronomy Journal*, 87:698-706.
- Patten, C.L., Glick, B.R. (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:3795-3801.
- Patten, C.L., Glick, B.R. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42:207-220.
- Peixoto Neto, P.A.S., Azevedo, J.L., Araújo, W.L. (2002) Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 29:62-76.
- Pelczar, Jr., M.J., Chan, E.C.S., Krieg, N. R. (1997) *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2.ed. São Paulo: Makron Books.

- Petrini, O. (1991) Fungal endophytes of tree leaves. *In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (eds.) Microbial Ecology of Leaves*, New York: Springer Verlag, v. 9, p. 179-197.
- Petry, C. (1991) *Adaptação de cultivares de soja à deficiência hídrica no solo*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Santa Maria – RS, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, 106p.
- Pillay, V.K., Nowak, J. (1997) Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:354-361.
- Pimentel, C., Rossiello, R.O.P. (1995) Entendimento sobre relações hídricas. *Simpósio Internacional sobre Estresse Ambiental: O Milho em Perspectiva*, Belo Horizonte: EMBRAPA/CNPMS, p. 131-146.
- Pohl, M.E.D., Piperno, D.R., Pope, K.O., Jones, J.G. (2007) Microfossil evidence for pre-columbian maize dispersals in the neotropics from San Andrés. Tabasco, Mexico. *PNAS, USA*, 104 (16):6870-6875.
- Quadt-Hallmann, A., Hallmann, J., Kloepper, J.W. (1997b) Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:254-259.
- Quadt-Hallmann, A., Benhamou, N., Kloepper, J.W. (1997a) Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:577-582.
- Radwan, T.El-S.El-D., Mohamed, Z.K., Reis, V.M. (2004) Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 39 (10):987-994.

- Radwan, T.El-S.El-D., Mohamed, Z.K., Reis V.M. (2002) Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. *Symbiosis*, 32:39-54.
- Ramamoorthy, V., Viwanathan, R., Raguchander, T., Prakasan, V., Samiyappan, R. (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20:1-11.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (1998) Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Science*, 17:29-54.
- Reiter, B., Pfeifer, U., Schwab, H., Sessitsch, A. (2002) Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* sbsp. *atrosptica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:2261-2268.
- Ribeiro, R.V., Machado, E.C., Oliveira, R.F. (2004) Growth and leaf temperature effects on photosynthesis of sweet orange seedlings infected with *Xylella fastidiosa*. *Plant Pathology*, 53:334-340.
- Ribeiro, R.V., Machado, E.C., Oliveira, R.F. (2003a) Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62:167-173.
- Roesch, L.F., Camargo, F.O., Selbach, P.A., Sa, E.S. (2005) Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. *Ciência Rural*, Santa Maria, 35 (5):1201-1204.
- Rodrigues Neto, J., Malavolta Júnior, V.A., Victor, O. (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xhantomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopatologica*, 12:16.

- Rolfe, B.G. (and 13 others) (1998) Round table: agriculture 2020: 8 billion people. *In: Elmerich, C., Kondorosi, A., Newton, W.E. (eds.) Biological nitrogen fixation for the 21st century*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 685–692.
- Romano, M.B. (2001) *Análise de crescimento, produção de biomassa, fotossíntese e biossíntese de aminoácidos em plantas transgênicas de tabaco (Nicotiana tabacum L.) que expressam o gene Lhcb1*2 de ervilha*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 66p.
- Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. (1994) Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *In: Schulze, E.D., Caldwell, M.M. (eds.) Ecophysiology of photosynthesis*. New York: Springer Verlag, p. 49-70.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10 (1):51-62.
- Shishido, M., Breuil, C., Chanway, C.P. (1999) Endophytic colonization of spruce by growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 29:191-196.
- Silva, M.M.P., Vasquez, H.M., Bressan-Smith, R., Silva, J.F.C., Erbesdobler, E.D., Andrade Júnior, P.S.C. (2006) Eficiência fotoquímica de gramíneas forrageiras tropicais submetidas à deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35 (1): 67-74.
- Silva, C.J. (2005) *Influência de estresses abióticos na fase reprodutiva do milho*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Jaboticabal – SP, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 60p.

- Silva, S., Soares, A.M., Oliveira, L.E.M., Magalhães, P.C. (2001) Respostas fisiológicas de gramíneas promissoras para revegetação ciliar de reservatórios hidrelétricos, submetidos à deficiência hídrica. *Ciência e Agrotecnologia*, 25 (1):124-133.
- Smith, S. (1985) Maize (*Zea mays* L.): Historical development, breeding, and utilization. *Journal of Plant Food*, 6:3-17.
- Souza, R.P., Machado, E.C., Silva, J.A.B., Lagôa, A.M.M.A., Silveira, J.A.G. (2004) Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany*, 51:45-56.
- Stalker, H.T., Harlan, J.R., Wet, J.M.J. (1977) Cytology and morphology of maize-*Tripsacum* introgression. *Crop Science*, 17:745-748.
- Stoltzfus, J.R., So, R., Malarvithi, P.P., Ladha, J.K., Bruijn, F.J. (1997) Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil*, 194:25-36.
- Streit, N.M., Canterle, L.P., Canto, M.W., Hecktheuer, L.H.H. (2005) As clorofilas. *Ciência Rural*, 35 (3):748-755.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., Nowak, J. (2000) Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19:1-30.
- Sturz, A.V., Matheson, B.G. (1996) Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant and Soil*, 184:265-271.
- Summer, M.E. (1990) Crop responses to *Azospirillum* inoculation. *Advances in Soil Sciences*, New York, 12:54-123.

- Taiz, L., Zeiger, E. (2004) *Fisiologia vegetal*. Tradução de Eliane Romanato Santarém et al. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.
- Teixeira, M.R.O. (1998) A cultura do milho e sua importância nos sistemas de produção de Mato Grosso do Sul. *Anais do Workshop sobre qualidade do milho*, Dourados: Embrapa-CPAO, p. 12-14.
- Thakuria, D., Talukdar, N.C., Goswami, C., Hazarika, S., Boro, R.C., Khan, M.R. (2004) Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science*, 86:978-985.
- Tuberosa, R., Sanguineti, M.C., Landi, P. (1994) Abscisic acid concentration in leaf and xylem sap, leaf water potential, and stomatal conductance in maize. *Crop Science*, 34:1537-1563.
- Von Caemmerer, S., Farquhar, G.D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas-exchange of leaves. *Planta*, 153 (4):376-387.
- Xu, Z.Z., Zhou, G.S. (2006) Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta*, 224:1080-1090.
- Wolfe, D.W., Henderson, D.W., Hsiao, T.C., Alvino, A. (1988) Interactive water and nitrogen effects on senescence of maize. I: Leaf area duration, nitrogen distribution, and yield. *Agronomy Journal*, 80:859-864.
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G., Vidaver, A.K. (2002) Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:2198-2208.

APÉNDICE

APÊNDICE A

QUADRO 1A - Resumo das análises de variância para variáveis de trocas gasosas, ao longo do período de seca

FV	GL	Quadrados médios			
		A	gs	E	Ci
Genótipo	2	1013,95*	881,72*	829,17*	6521,70*
Inoculação	1	1599,22*	37,34 ^{ns}	220,50*	969,22 ^{ns}
Estresse	1	124985,19*	110029,46*	91332,50*	127204,47*
Tempo	4	13403,23*	11281,09*	10578,27*	23550,53*
Genótipo*Inoculação	2	3037,82*	1122,15*	2356,44*	23215,55*
Genótipo*Estresse	2	1010,64*	881,59*	828,63*	6448,80*
Genótipo*Tempo	8	307,93*	184,62*	196,59*	964,19*
Inoculação*Estresse	1	1556,83*	36,35 ^{ns}	214,66*	943,52 ^{ns}
Inoculação*Tempo	4	951,97*	731,25*	783,68*	1448,81*
Estresse*Tempo	4	13391,87*	11269,76*	10565,37*	23516,28*
Genótipo*Inoculação*Estresse	2	2978,66*	1111,74*	2325,19*	22672,44*
Genótipo*Inoculação*Tempo	8	629,80*	235,35*	507,85*	3121,92*
Inoculação*Estresse*Tempo	4	962,83*	737,63*	792,59*	1455,64*
Genótipo*Inoculação*Estresse*Tempo	14	535,84*	239,98*	402,54*	2334,92*

* e ** = F significativo a 5 e 1%, respectivamente.

ns = F não-significativo a 5%.

A = Taxa de assimilação líquida de CO₂ (% do controle).

gs = Condutância estomática (% do controle).

E = Taxa de transpiração (% do controle).

Ci = Concentração intracelular de CO₂ (% do controle).

QUADRO 2A - Resumo das análises de variância para variáveis de fluorescência da clorofila a, ao longo do período de seca

FV	GL	Quadrados médios			
		F_v/F_m	Φ PSII	qP	NPQ
Genótipo	2	22,04 ^{ns}	93,67*	140,70*	7708,64 ^{ns}
Inoculação	1	13,77 ^{ns}	70,04*	10,89 ^{ns}	3364,61 ^{ns}
Estresse	1	4300,78*	9077,76*	0,14 ^{ns}	2532822,95*
Tempo	5	332,44*	713,16*	31,36*	188953,67*
Genótipo*Inoculação	2	73,67*	109,38*	141,71*	12102,17*
Genótipo*Estresse	2	22,04 ^{ns}	93,67*	140,70*	7708,64 ^{ns}
Genótipo*Tempo	10	9,78 ^{ns}	80,10*	130,33*	8658,63*
Inoculação*Estresse	1	13,77 ^{ns}	70,04*	10,89 ^{ns}	3364,61 ^{ns}
Inoculação*Tempo	5	5,63 ^{ns}	152,30*	34,35*	39489,84*
Estresse*Tempo	5	332,44*	713,16*	31,36*	188953,67*
Genótipo*Inoculação*Estresse	2	73,67*	109,38*	141,71*	12102,17*
Genótipo*Inoculação*Tempo	10	12,88 ^{ns}	68,28*	46,01*	24115,59*
Inoculação*Estresse*Tempo	5	5,63 ^{ns}	152,30*	34,35*	39489,84*
Genótipo*Inoculação*Estresse*Tempo	20	11,36 ^{ns}	74,79*	88,81*	16139,52*

* e ** = F significativo a 5 e 1%, respectivamente.

ns = F não-significativo a 5%.

F_v/F_m = Rendimento quântico máximo (% do controle).

Φ PSII = Rendimento quântico efetivo (% do controle).

qP = *Quenching* fotoquímico (% do controle).

NPQ = *Quenching* não-fotoquímico (% do controle).

QUADRO 3A - Resumo das análises de variância para altura da planta e diâmetro do caule, ao longo do período de seca

FV	GL	Quadrados médios	
		Altura da planta	Diâmetro do caule
Genótipo	2	1456,15*	152,96*
Inoculação	1	204,98 ^{ns}	6,09 ^{ns}
Estresse	1	28906,94*	72269,50*
Tempo	4	3819,72*	7655,55*
Genótipo*Inoculação	2	49,66 ^{ns}	25,53 ^{ns}
Genótipo*Estresse	2	1456,15*	152,95*
Genótipo*Tempo	8	98,37 ^{ns}	15,64 ^{ns}
Inoculação*Estresse	1	204,98 ^{ns}	6,09 ^{ns}
Inoculação*Tempo	4	15,85 ^{ns}	5,55 ^{ns}
Estresse*Tempo	4	3819,72*	7655,55*
Genótipo*Inoculação*Estresse	2	49,66 ^{ns}	25,53 ^{ns}
Genótipo*Inoculação*Tempo	8	17,12 ^{ns}	6,17 ^{ns}
Inoculação*Estresse*Tempo	4	15,85 ^{ns}	5,55 ^{ns}
Genótipo*Inoculação*Estresse*Tempo	16	57,75 ^{ns}	10,90 ^{ns}

* e ** = F significativo a 5 e 1%, respectivamente.

ns = F não-significativo a 5%.

QUADRO 4A - Resumo das análises de variância para variáveis agronômicas, ao longo do período de seca.

FV	GL	Quadrados médios				
		MFPA	MFR	MSPA	MSR	AF
Genótipo	2	10061,58*	45,09 ^{ns}	1952,58*	0,44 ^{ns}	3020077,51*
Inoculação	1	73,79 ^{ns}	194,40*	57,86 ^{ns}	1,54*	194369,28 ^{ns}
Estresse	1	156255,90*	3773,41*	18128,03*	15,33*	69585681,18*
Genótipo*Inoculação	2	335,85 ^{ns}	8,41 ^{ns}	186,12 ^{ns}	0,12 ^{ns}	29648,22 ^{ns}
Genótipo*Estresse	2	6408,78*	14,81 ^{ns}	1425,13*	0,25 ^{ns}	2199305,01*
Inoculação*Estresse	1	2,06 ^{ns}	123,61*	92,90 ^{ns}	0,80*	31975,50 ^{ns}
Genótipo*Inoculação*Estresse	2	306,70 ^{ns}	3,90 ^{ns}	162,26 ^{ns}	0,00 ^{ns}	5860,65 ^{ns}

* e ** = F significativo a 5 e 1%, respectivamente.

ns = F não-significativo a 5%.

MFPA = Massa fresca da parte aérea (g).

MFR = Massa fresca da raiz (g).

MSPA = Massa seca da parte aérea (g).

MSR = Massa seca da raiz (g).

AF = Área foliar (mm²).

QUADRO 5A - Resumo das análises de variância para potencial hídrico, ao longo do período de seca

FV	GL	Quadrados médios
		Potencial hídrico
Genótipo	2	0,02 ^{ns}
Inoculação	1	0,01 ^{ns}
Estresse	1	17,73 [*]
Tempo	1	17,09 [*]
Genótipo*Inoculação	2	0,01 ^{ns}
Genótipo*Estresse	2	0,01 ^{ns}
Genótipo*Tempo	2	0,02 ^{ns}
Inoculação*Estresse	1	0,05 [*]
Inoculação*Tempo	1	0,04 ^{ns}
Estresse*Tempo	1	17,73 [*]
Genótipo*Inoculação*Estresse	2	0,02 ^{ns}
Genótipo*Inoculação*Tempo	2	0,00 ^{ns}
Genótipo*Estresse*Tempo	2	0,00 ^{ns}
Inoculação*Estresse*Tempo	1	0,04 ^{ns}
Genótipo*Inoculação*Estresse*Tempo	2	0,01 ^{ns}

* e ** = F significativo a 5 e 1%, respectivamente.

ns = F não-significativo a 5%.

QUADRO 6A - Equações ajustadas das variáveis de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e variáveis morfoagronômicas do genótipo Composto Braquítico Caboclo, em função da inoculação bacteriana e do tempo (em dias) sob seca

Variáveis	Equações	
	Inoculado	Não-inoculado
A	$Y = 107,57 - 15,03x + 0,48x^2; R^2 = 0,94$	$Y = 92,32 - 1,29x - 0,50x^2; R^2 = 0,77$
Gs	$Y = 106,70 - 15,83x + 0,63x^2; R^2 = 0,92$	$Y = 100,93 - 2,67x - 0,34x^2; R^2 = 0,90$
E	$Y = 107,07 - 14,72x + 0,54x^2; R^2 = 0,92$	$Y = 100,54 - 1,42x - 0,40x^2; R^2 = 0,90$
Ci	$Y = 99,12 + 5,13x + 0,59x^2; R^2 = 0,93$	$Y = 101,52 - 9,70x + 1,08x^2; R^2 = 0,90$
F _v /F _m	$Y = 99,79 - 1,58x + 0,01x^2; R^2 = 0,99$	$Y = 98,93 + 0,05x - 0,06x^2; R^2 = 0,92$
ΦPSII	$Y = 99,77 - 1,55x - 0,03x^2; R^2 = 0,95$	$Y = 100,07 + 1,10x - 0,71x^2; R^2 = 0,75$
qP	Y = 103,44	Y = 98,48
NPQ	$Y = 75,59 + 79,42x - 4,33x^2; R^2 = 0,90$	$Y = 119,53 + 16,26x + 0,41x^2; R^2 = 0,77$
Altura da planta	$Y = 101,29 - 1,22x - 0,14x^2; R^2 = 0,98$	$Y = 100,91 - 1,49x - 0,09x^2; R^2 = 0,98$
Diâmetro do caule	$Y = 99,10 - 4,81x + 0,03x^2; R^2 = 0,99$	$Y = 99,16 - 4,97x + 0,04x^2; R^2 = 1$

- A = Taxa de assimilação líquida de CO₂ (% do controle).
gs = Condutância estomática (% do controle).
E = Taxa de transpiração (% do controle).
Ci = Concentração intracelular de CO₂ (% do controle).
F_v/F_m = Rendimento quântico máximo (% do controle).
ΦPSII = Rendimento quântico efetivo (% do controle).
qP = *Quenching* fotoquímico (% do controle).
NPQ = *Quenching* não-fotoquímico (% do controle).

QUADRO 7A - Equações ajustadas das variáveis de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e variáveis morfoagronômicas do genótipo Composto Tripsacóide, em função da inoculação bacteriana e do tempo (em dias) sob seca

Variáveis	Equações	
	Inoculado	Não-inoculado
A	$Y = 109,59 - 18,38x + 0,75x^2; R^2 = 0,88$	$Y = 93,16 - 19,72x + 1,03x^2; R^2 = 0,94$
Gs	$Y = 107,82 - 17,07x + 0,71x^2; R^2 = 0,88$	$Y = 92,09 - 18,14x + 1,01x^2; R^2 = 0,88$
E	$Y = 110,25 - 14,51x + 0,50x^2; R^2 = 0,81$	$Y = 90,44 - 16,32x + 0,87x^2; R^2 = 0,83$
Ci	$Y = 92,24 + 17,68x - 0,20x^2; R^2 = 0,98$	$Y = 107,79 - 9,39x + 1,52x^2; R^2 = 0,95$
F _v /F _m	$Y = 98,56 - 1,11x; R^2 = 0,94$	$Y = 99,91 - 2,64x + 0,11x^2; R^2 = 0,81$
ΦPSII	$Y = 96,25 - 1,55x; R^2 = 0,70$	$Y = 105,82 - 4,41x + 0,15x^2; R^2 = 0,70$
qP	$Y = 99,04$	$Y = 105,27$
NPQ	$Y = 63,56 + 94,00x - 5,66x^2 = 0,67$	$Y = 26,17 + 69,59x - 2,20x^2; R^2 = 0,62$
Altura da planta	$Y = 98,61 - 5,84x + 0,13x^2; R^2 = 0,99$	$Y = 98,92 - 4,82x + 0,06x^2; R^2 = 0,99$
Diâmetro do caule	$Y = 100,20 - 6,51x + 0,12x^2; R^2 = 1$	$Y = 99,54 - 7,27x + 0,20x^2; R^2 = 1$

- A = Taxa de assimilação líquida de CO₂ (% do controle).
gs = Condutância estomática (% do controle).
E = Taxa de transpiração (% do controle).
Ci = Concentração intracelular de CO₂ (% do controle).
F_v/F_m = Rendimento quântico máximo (% do controle).
ΦPSII = Rendimento quântico efetivo (% do controle).
qP = *Quenching* fotoquímico (% do controle).
NPQ = *Quenching* não-fotoquímico (% do controle).

QUADRO 8A - Equações ajustadas das variáveis de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a e variáveis morfoagronômicas do genótipo UENF 506-8, em função da inoculação bacteriana e do tempo (em dias) sob seca

Variáveis	Equações	
	Inoculado	Não-inoculado
A	$Y = 100,27 + 0,51x - 0,65x^2; R^2 = 1$	$Y = 99,18 - 22,47x + 1,19x^2; R^2 = 0,99$
gs	$Y = 99,13 - 13,03x + 0,50x^2; R^2 = 0,98$	$Y = 99,01 - 16,83x + 0,63x^2; R^2 = 0,98$
E	$Y = 101,58 - 1,84x - 0,47x^2; R^2 = 0,94$	$Y = 99,89 - 17,07x + 0,82x^2; R^2 = 1$
Ci	$Y = 103,05 - 17,70x + 2,43x^2; R^2 = 0,93$	$Y = 105,80 + 39,79x - 2,26x^2; R^2 = 0,84$
F _v /F _m	$Y = 100,74 - 1,18x + 0,01x^2; R^2 = 0,88$	$Y = 100,58 - 1,87x + 0,05x^2; R^2 = 0,92$
ΦPSII	$Y = 96,39 + 0,51x - 0,16x^2; R^2 = 0,88$	$Y = 101,67 - 8,62x + 1,20x^2 - 0,05x^3; R^2 = 0,75$
qP	$Y = 96,42$	$Y = 102,98 - 0,74x; R^2 = 0,41$
NPQ	$Y = 105,33 + 31,82x - 0,36x^2; R^2 = 0,99$	$Y = 59,75 + 67,48x - 2,78x^2; R^2 = 0,87$
Altura da planta	$Y = 98,78 - 3,71x + 0,05x^2; R^2 = 0,98$	$Y = 100,47 - 0,26x - 0,24x^2; R^2 = 1$
Diâmetro do caule	$Y = 99,66 - 7,25x + 0,19x^2; R^2 = 1$	$Y = 98,97 - 5,81x + 0,09x^2; R^2 = 0,99$

- A = Taxa de assimilação líquida de CO₂ (% do controle).
gs = Condutância estomática (% do controle).
E = Taxa de transpiração (% do controle).
Ci = Concentração intracelular de CO₂ (% do controle).
F_v/F_m = Rendimento quântico máximo (% do controle).
ΦPSII = Rendimento quântico efetivo (% do controle).
qP = *Quenching* fotoquímico (% do controle).
NPQ = *Quenching* não fotoquímico (% do controle).