

Caracterização da resposta de híbridos de milho a inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas sob condição controlada⁽¹⁾

André Luís Martins Maia⁽²⁾, João Vitor Silveira Alves de Avelar⁽³⁾, Vitória Palhares Ribeiro⁽⁴⁾, Rafaela Ferreira de Ávila Souza⁽⁵⁾, Roberto dos Santos Trindade⁽⁶⁾, Ivanildo Evódio Marriel⁽⁶⁾ e Sylvia Moraes de Sousa Tinôco⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Trabalho financiado pelo Embrapa/Finep/CNPq. ⁽²⁾ Estudante de graduação, Centro Universitário de Sete Lagoas, bolsista Pibic na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. ⁽³⁾ Estudante de mestrado, Universidade Federal de São João del-Rei, bolsista Capes na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. ⁽⁴⁾ Bolsista na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. ⁽⁵⁾ Estudante de graduação, Centro Universitário de Sete Lagoas, bolsista Pibic na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. ⁽⁶⁾ Pesquisador(a), Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

Resumo – As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) são uma alternativa sustentável para aumentar o crescimento vegetal e a produtividade. No entanto, a interação entre plantas e BPCPs pode variar dependendo das espécies e dos genótipos envolvidos, tornando crucial o estudo das características das estirpes bacterianas e a resposta dos genótipos de milho à inoculação. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de híbridos de milho à inoculação com duas cepas de *Azospirillum* sp. em condições controladas. Para isso, 36 híbridos de milho em pré-lançamento ou comerciais foram crescidos em solução nutritiva após a inoculação ou não na semente. As plântulas foram analisadas quanto a morfologia radicular e peso seco. A análise de variância das características morfológicas do sistema radicular e do peso seco para os híbridos de milho revelou variabilidade significativa para genótipo, experimento e inoculação para a maioria das características. Foram observadas respostas variadas à inoculação com as cepas de *Azospirillum* sp. O genótipo 1R2546 mostrou resposta positiva para a maioria das características analisadas. No entanto, é fundamental considerar o genótipo da planta para aumentar a eficácia da colonização pelas BPCPs.

Termos para indexação: *Zea mays*, *Azospirillum*, bioinoculante, fenotipagem, raiz.

Characterization of the response of maize hybrids to inoculation with plant growth-promoting bacteria under controlled conditions

Abstract – Plant growth-promoting bacteria (PGPBs) are a sustainable alternative to enhance plant growth and productivity. However, the interaction between plants and PGPBs can vary depending on the species and genotypes involved, making it crucial to study the characteristics of bacterial strains and the response of maize genotypes to inoculation. This study aimed to evaluate the response of maize hybrids to inoculation with two strains of *Azospirillum* sp. under controlled conditions. To achieve this, 36 pre-commercial or commercial maize hybrids were grown in nutrient solution after seed inoculation or non-inoculation. The seedlings were analyzed for root morphology and dry weight. The variance analysis of the morphological characteristics of the root system and dry weight for the maize hybrids revealed significant variability for genotype, experiment, and inoculation in most of the traits. Varied responses to inoculation with *Azospirillum* sp. strains were observed. The 1R2546 genotype showed a positive response in most of the characteristics analyzed. Thus, it is essential to consider the plant genotype to enhance the effectiveness of colonization by PGPBs.

Index terms: *Zea mays*, *Azospirillum*, bioinoculant, phenotyping, root.

Introdução

O milho é um dos cereais mais consumidos e produzidos atualmente, com o Brasil figurando entre os maiores produtores e exportadores desse grão. Para manter a alta produtividade do milho, o uso de fertilizantes é amplamente empregado. No entanto, o uso excessivo de fertilizantes não só aumenta os custos de produção, mas também pode ter efeitos negativos no meio ambiente. Diante disso, a busca por alternativas que minimizem o impacto ambiental e promovam a sustentabilidade é de extrema importância. Os microrganismos promotores de crescimento surgem como uma alternativa atrativa e viável nesse contexto. Entre os diversos microrganismos utilizados na produção de bioinoculantes, destacam-se as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) (Parnell et al., 2016).

Um dos gêneros de bactérias frequentemente utilizados na produção de inoculantes é o *Azospirillum* sp. Esse gênero é amplamente reconhecido por suas características multifuncionais na promoção do crescimento vegetal, atribuídas a mecanismos como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de nutrientes e produção de fitormônios, especialmente ácido indol-3-acético (AIA) e outros reguladores de crescimento vegetal (Cassán et al., 2014).

Embora os bioinoculantes tenham alcançado grande sucesso, diversos fatores podem influenciar a interação entre plantas e microrganismos. As características moduladas pelas bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) variam conforme a interação com diferentes espécies e genótipos inoculados (Vidotti et al., 2019; Velloso et al., 2020). Por isso é essencial compreender as características das estirpes e a resposta à inoculação com BPCPs em diferentes genótipos de milho. O objetivo deste trabalho, portanto, foi avaliar híbridos de milho em pré-lançamento e comerciais quanto à sua responsividade à inoculação por bactérias promotoras de crescimento de plantas em condições controladas.

Por incentivar o uso de bioinoculantes como alternativa sustentável aos fertilizantes químicos, promovendo a eficiência no uso de recursos naturais e a redução de impactos ambientais, este trabalho contribui para o atendimento do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável – ODS 12 da Agenda 2030, proposto pela Organização das Nações Unidas (ONU): “Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis”, mais especificamente para com a meta 12.2, que estabelece “até 2030, alcançar a gestão sustentável e o uso eficiente dos recursos naturais” (Nações Unidas, 2024), ao demonstrar o potencial de bactérias promotoras de crescimento de plantas (*Azospirillum* sp.) em favorecer sistemas agrícolas mais sustentáveis e de menor impacto ambiental.

Material e métodos

Foram avaliados 36 híbridos e comerciais de milho (Tabela 1) inoculados com duas estirpes *Azospirillum* sp. (Ribeiro et al., 2022) da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições com três plântulas cada, sendo dividido em três experimentos com quatro testemunhas.

Tabela 1. Híbridos de milho avaliados em condições controladas.

Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
1 1Q2366	11 1R2529	23 1Q2359
2 1Q2403	12 3R2593	24 1R2629
3 1P2215	13 1R2526	25 1Q2425
4 3P2200	14 1R2546	26 BRS1055
5 1Q2370	15 1R2631	27 1R2540
6 1Q2473	16 1R2530	28 1R2620
7 1P2206	17 2R2642	29 1R2539
8 1Q2461	18 1F640PRO2	30 1R2622
9 1R2628	19 1P2181	31 1R2521
10 1Q2423	20 1Q2400	32 1Q2427
	21 2R2643	
	22 1N1958	
T1 DKB390VTPRO2	T1 DKB390VTPRO2	T1 DKB390VTPRO2
T2 BRS3042VTPRO2	T2 BRS3042VTPRO2	T2 BRS3042VTPRO2
T3 SHS7930VTPRO2	T3 SHS7930VTPRO2	T3 SHS7930VTPRO2
T4 AG8088VTPRO2	T4 AG8088VTPRO2	T4 AG8088VTPRO2

*T1-T4: Testemunhas experimentais.

As estirpes de *Azospirillum* foram crescidas separadamente em TSB, por 3 dias a 28 ± 2 °C, sob agitação constante de 120 rpm. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos, a 6.000 rpm e ressuspensas em solução salina [0,85% (m/v) NaCl] e ajustadas à absorbância igual a 1, a 540 nm, equivalentes a 4×10^9 UFCmL⁻¹.

A inoculação foi feita nas sementes de milho, na dose de 150 mL ha⁻¹, utilizando solução com *Azospirillum* (0,125 mL) e Biomafix (0,01 g) para cada 50 sementes. As sementes foram secas em temperatura ambiente e colocadas em papel de germinação. Posteriormente foram germinadas por 24 horas e transferidas para câmara de crescimento por 72 horas. Após este período, plântulas uniformes foram transplantadas para um sistema *floating*, formado por bandejas contendo oito litros de solução nutritiva Hoagland meia força pH 5,65 (Liu et al., 1998), em copos de polietileno, dispostos em placas plásticas. A cada três dias, a solução nutritiva foi substituída. As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento sob condições controladas, com temperatura diurna de 27 °C e noturna de 20 °C, fotoperíodo de 12 horas e aeração contínua, onde permaneceram por 16 dias.

O sistema radicular foi separado da parte aérea e avaliado com o software Winrhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), acoplado ao escâner Epson XL 10000 equipado com unidade de luz adicional (TPU), a fim de analisar parâmetros da morfologia radicular, de acordo com Sousa et al. (2012). Posteriormente, a parte aérea e raízes foram secas em estufa com circulação de ar a 65 °C até atingirem peso constante, e em seguida o peso seco foi aferido em balança de precisão.

Todas as diferenças entre as médias ajustadas dos tratamentos foram comparadas para cada característica utilizando o teste de Tukey com nível de significância 5% do programa R (versão 3.6.1), utilizando o pacote Agricolae (Mendiburu, 2015).

Resultados e discussão

A análise de variância das características morfológicas do sistema radicular e do peso seco para os 36 híbridos de milho avaliados com e sem inoculação com duas estirpes de BPCPs mostrou que há variabilidade para genótipo e experimento para todas as características e para inoculação para todas as características, com exceção de AS, AS1 e PSR. Diversas interações entre genótipo, inoculação e experimento foram significativas (Tabela 2). O coeficiente de variação foi de médio a alto.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para as médias das características radiculares e de peso seco para 36 genótipos de milho inoculados com duas cepas de BPCPs.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio							
		C (cm)	AS (cm ²)	AS1 (cm ²)	AS2 (cm ²)	AS3 (cm ²)	PST (g)	PSPA (g)	PSR (g)
Genótipo	35	92457***	1547,36***	3011,6***	77,804***	120,91***	53,997***	0,18027***	0,4585***
Experimento	1	64690.	2193,76*	11482,7***	127,898**	499,23***	514029***	1,04638***	3,3665***
Inoculação	2	84716.	145,78	67,3	194,684**	124,29.	2549*	0,02626.	0,0124
Genótipo*Inoculação	35	27237	688,64	192,2	53,534***	77,27***	1145***	0,02793***	0,0114*
Genótipo*Experimento	6	66505**	1801,20***	257,6.	101,801***	59,86.	2207***	0,02543***	0,0267**
Experimento*Inoculação	2	58548*	850,34	438,2*	99,305**	25,91	240	0,03329**	0,0003
Genótipo*Experimento*Inoculação	6	65864**	1792,10***	391,2**	119,858***	75,91*	6988***	0,01184.	0,0168*
Erro	190	22516	422,63	130,9	19,054	31,57	475	0,00638	0,0070
Total	277	482533	9441,81	15971,7	793,938	1014,95	527686,997	1,35778	3,8996
Coeficiente de variação (%)		19,33	18,69	22,22	24,38	36,01	30,73	19,86	25,06

Grau de liberdade (GL), comprimento radicular total (C) (cm), área de superfície radicular total (AS) (cm²), área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 e 1,0 mm (AS1), 1,0 a 2,0 mm (AS2) e maior do que 2 mm (AS3) (cm²), peso seco de parte aérea (PSPA) (g), peso seco de raiz (PSR) (g), peso seco total (g), coeficiente de variação (CV%), ns – não significativo, * = significativo a 5%, ** = significativo a 1%, *** = significativo a 0,1% de probabilidade pelo Teste LSD.

Foram observadas respostas variáveis para a inoculação com as cepas de *Azospirillum* sp. O genótipo 1R2546 apresentou resposta positiva para as características analisadas, exceto para a AS3 (Figura 1), indicando que houve uma predominância de raízes finas e superfinais, que podem auxiliar na absorção de nutrientes do solo. Os genótipos na parte inferior do mapa de calor apresentaram respostas negativas e/ou para todas as características analisadas (Figura 1).

Na associação planta-bactéria, embora exista um custo inicial para planta, as bactérias podem contribuir significativamente nos estágios posteriores do desenvolvimento radicular, promovendo uma maior absorção de nutrientes e compensando esse custo inicial. A variabilidade genética desempenha um papel fundamental nessa associação, pois a eficácia da colonização pelas BPCPs varia de acordo com os genótipos (Vidotti et al., 2019).

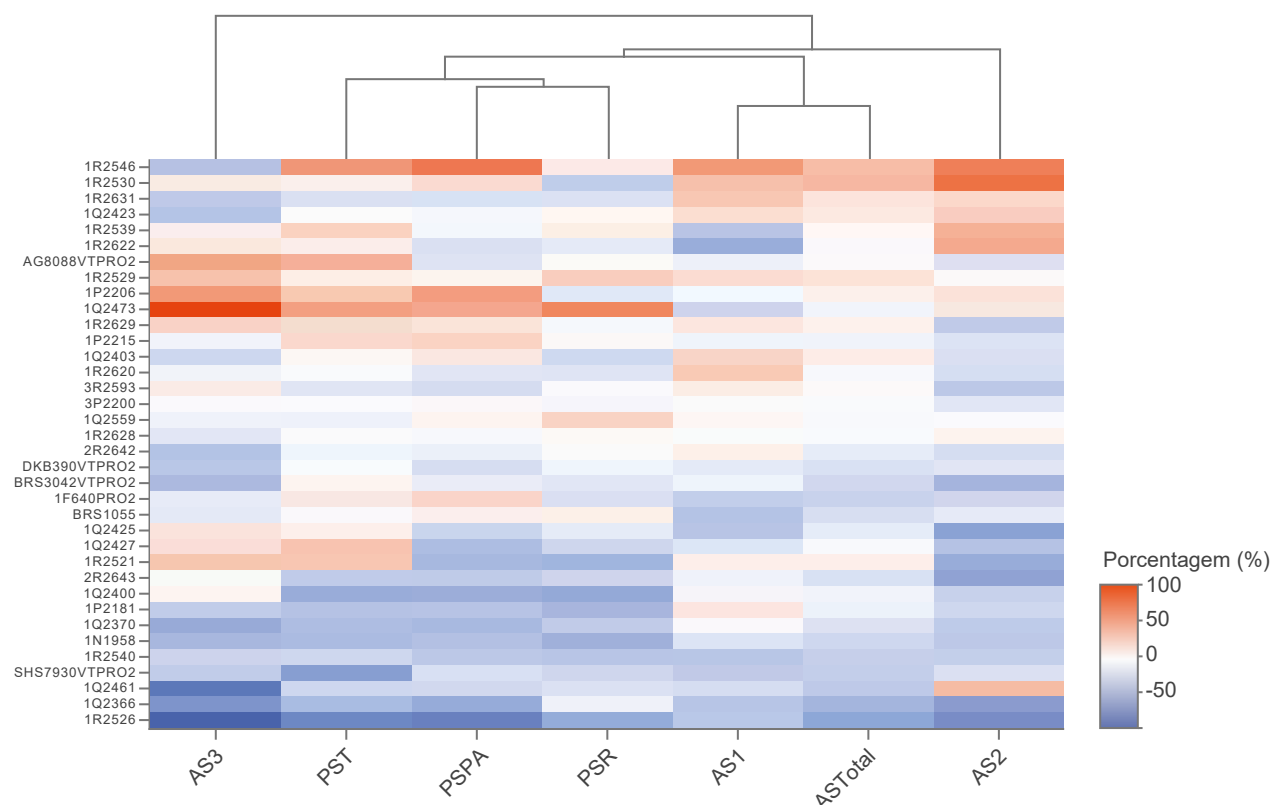


Figura 1. Mapa de calor de genótipos de milho inoculados com duas cepas de BPCPs comparados com controle não inoculado. C: comprimento total de raiz (cm); AS_{total}: área de superfície total de raiz (cm²); AS1, AS2 e AS3 (cm²): área de superfície de raízes de 0 a 1, 1 a 2 e maior do que 2 mm (cm²); PSR, PSPA e PST: peso seco de raiz, parte aérea e total (g).

Conclusões

Para uma interação eficiente entre planta-bactéria, é de extrema importância a análise do *background* genético da planta, já que a magnitude da resposta da inoculação é dependente do genótipo da planta. O genótipo 1R2546 apresentou maior sistema radicular e peso seco quando inoculado com BPCP.

Para compreender melhor as respostas genéticas, fisiológicas e morfológicas das cultivares de milho à inoculação, bem como as possíveis interações entre plantas e estirpes de BPCPs, é necessário realizar ensaios complementares, incluindo testes de campo.

Referências

- CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440-459, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>.
- LIU, C.; MUCHHAL, U. S.; UTHAPPA, M.; KONONOWICZ, A. K.; RAHOTHAMA, K. G. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 91-99, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.116.1.91>.

MENDIBURU, F. de. **agricolae**: statistical procedures for agricultural research. 2015. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html>. Acesso em: 22 maio 2024.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 12**: consumo e produção responsáveis: garantir padrões de consumo e produção sustentáveis. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/12>. Acesso em: 13 maio 2024.

PARNELL, J. J.; RANDY, B.; YOUNG, H. A.; STURINO, J. M.; KANG, Y.; BARNHART, D. M.; DILEO, M. V. From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 1110, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01110>.

RIBEIRO, V. P.; GOMES, E. A.; SOUSA, S. M. de; LANA, U. G. de P.; COELHO, A. M.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A. Co-inoculation with tropical strains of *Azospirillum* and *Bacillus* is more efficient than single inoculation for improving plant growth and nutrient uptake in maize. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 2, article 143, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02759-3>.

SOUSA, S. M. de; CLARK, R. T.; MENDES, F. F.; OLIVEIRA, A. C. de; VASCONCELOS, M. J. V. de; PARENTONI, S. N.; KOCHIAN, L. V.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 11, p. 925-935, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1071/fp12022>.

VELLOSO, C. C. V.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. de P.; CARVALHO, C. G. de; GUIMARÃES, L. J. M.; PASTINA, M. M.; SOUSA, S. M. de. Genome-guided insights of tropical *Bacillus* strains efficient in maize growth promotion. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 9, f157, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsec/f157>.

VIDOTTI, M. S.; MATIAS, F. I.; ALVES, F. C.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, P.; BELTRAN, G. A.; BURGUEÑO, J.; CROSSA, J.; FRITSCHÉ-NETO, R. Maize responsiveness to *Azospirillum brasilense*: Insights into genetic control, heterosis and genomic prediction. **PloS One**, v. 14, n. 6, e0217571, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217571>.