

EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* NO ARROZ VERMELHO, EM FUNÇÃO DO MANEJO DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA NA FASE VEGETATIVA

Bruna Cavalcante dos Santos (1); Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses (2)

(1) Departamento de Biologia, CCBS - Universidade Estadual da Paraíba, brunacavalcantes23@gmail.com; (2) Departamento de Biologia, CCBS e Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Universidade Estadual da Paraíba, chmeneses@gmail.com.

INTRODUÇÃO

O arroz vermelho espontâneo, o arroz vermelho cultivado e o arroz branco pertencem à mesma espécie, *Oryza sativa* L. A planta do arroz é do tipo herbácea pertencente à família *Poaceae*, classe *Liliopsida* (monocotiledônea) como tal caracteriza-se por apresentar caules ocos, flores reduzidas de cor verde e fruto do tipo cariopse. É uma cultura anual, adaptada a solos alagados, sendo considerada uma espécie hidrófila, contudo, devido ao processo evolutivo da espécie, o arroz adquiriu ampla adaptabilidade às diferentes condições de solo e clima, desenvolvendo-se bem também em áreas com baixa disponibilidade hídrica (GUIMARÃES et al., 2002; MENEZES et al. 2012). Desse modo, dois sistemas de produção de arroz são considerados no Brasil, o de várzea, arroz alagado irrigado por inundação, e o de terras altas, cultivado em condições de sequeiro dependente da água das chuvas ou irrigado por aspersão, tendo este último, o déficit hídrico como principal fator limitante no desenvolvimento da cultura (GUIMARÃES et al., 2006). O déficit hídrico afeta praticamente qualquer aspecto do crescimento das plantas, inclusive a anatomia, a morfologia a fisiologia e a bioquímica; a absorção e a translocação de água e nutrientes, induzindo, nas plantas, diversas modificações bioquímicas (frequentemente em acúmulo de açúcares e aminoácidos), alterando o metabolismo celular (BENINCASA, 2004).

Uma estratégia empregada pelas plantas para sobreviver aos estresses abióticos, se dá por meio de interações com microrganismos, onde as plantas podem desenvolver mecanismos de adaptação às adversidades ambientais (PEIXOTO NETO et al., 2004). Dentre essas interações encontram-se aquelas relacionadas com os microrganismos denominados endofíticos, tais como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que podem produzir produtos de potencial interesse biotecnológico (AZEVEDO, 1998). Esses microrganismos utilizam diferentes mecanismos para promover o crescimento vegetal, como a produção de hormônios de crescimento vegetal, solubilização de nutrientes do solo, proteção contra patógenos e estresses abióticos, fixação de nitrogênio atmosférico, entre outros (HAYAT et al., 2010).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos tratamentos de inoculação com *G. diazotrophicus* no arroz vermelho, em função do manejo de deficiência hídrica, na fase vegetativa de desenvolvimento, por meio da fotossíntese líquida e da quantificação de clorofila.

METODOLOGIA

Caracterização da área experimental

O experimento foi realizado no horto florestal e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, ambos localizados no Campus I da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB.

Fatores em estudo e tratamentos

O experimento foi realizado em condições controladas com o cultivo do arroz vermelho (*O. sativa* L.), genótipo 405 Embrapa Meio Norte, constando de duas condições de inoculação com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus* (I1= sementes não inoculadas e I2= sementes inoculadas), e plantas submetidas a quatro diferentes condições de restrição hídrica, sendo U1= 30%; U2= 50%; U3= 70% e U4= 100% da capacidade de campo, o ciclo da restrição hídrica foi mantido durante os estádios de desenvolvimento vegetativo, V3 à V5, após esse período as plantas de todos os tratamentos foram irrigadas normalmente. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2x4, sendo oito tratamentos com quatro repetições, totalizando 32 parcelas, onde cada parcela foi constituída de um lisímetro de drenagem, no qual foram semeadas 70 sementes, que depois de germinadas foi realizado um desbaste, totalizando 60 plântulas por parcela.

Variáveis em estudo

Foram avaliadas trocas gasosas, como a fotossíntese líquida (A) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), utilizando-se o analisador de gás infravermelho, IRGA (ACD, modelo LCPro, Hoddesdon, UK), com fluxo de ar de $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e fonte de luz acoplada de $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para as avaliações. Após análises fisiológicas, foram coletadas amostras foliares para verificação de pigmentos fotossintéticos, acondicionadas imediatamente ao gelo, esse material foi utilizado na quantificação da clorofila. Os teores de clorofila foram determinados segundo o método proposto por Hiscox e Israelstam (1979).

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e comparando-se as médias por meio do teste de Tukey a 5% de significância, para as condições de inoculação, e analisando-se por regressão linear os níveis de restrição hídrica, utilizando-se do programa SIGMAPLOT (2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da estimativa do número mais provável (NMP) da bactéria diazotrófica presente em raízes e folhas de plantas de arroz vermelho, avaliadas sob estresse hídrico durante o estágio vegetativo, revelou que em todas as amostras de tecidos que receberam o tratamento com a estipe PAL5 foi detectado o crescimento bacteriano, o que não foi verificado nos tratamentos controle (Tabela 1). Os valores da densidade bacteriana obtidos na avaliação foram satisfatórios, com concentrações maiores que 10^4 unidades formadoras de colônia de *G. diazotrophicus* por grama de tecido vegetal (10^4 UFC g^{-1}).

Tabla 1. Estimativa do número mais provável (Log do n° células g^{-1}) de *G. diazotrophicus* PAL5 presente nas raízes e folhas de plantas de arroz vermelho.

Tratamento	Meio de Cultura	Reprodutivo	
		Raízes	Folhas
Não inoculado	LGI-P**	N.D.	N.D.
PAL5	LGI-P**	$4.65 \pm 0.11^*$	$4.01 \pm 0.39^*$

*Média \pm desvio padrão (n=3), **Meio LGI-P (semi seletivo para *Gluconacetobacter* spp.). N.D. (Não detectada).

A partir desses resultados podemos inferir que o microrganismo obteve êxito no processo de colonização, Kuss (2006) em seus estudos afirma que o sucesso da associação entre microrganismos endofíticos e plantas hospedeiras, está em os microrganismos superarem os impedimentos físicos e químicos estabelecidos pelos vegetais, e assim, estarem ocupando e se multiplicando dentro dos tecidos do hospedeiro, promovendo os benefícios esperados de promoção do crescimento vegetal.

Por meio da análise dos resultados observou-se uma diferença na população de bactérias, onde a proporção estimada de diazotróficos presente nas raízes das plantas foi maior que a estimativa presente nas folhas (Tabela 1), possivelmente devido ao fato de maior concentração de exsudatos das raízes, os quais as bactérias utilizam para sobrevivência. Tais resultados podem ser explicados devido ao fato de a região radicular ser um ambiente rico em nutrientes, o que favorece a atividade e o crescimento dos microrganismos, que utilizam os exsudatos radiculares como fonte de energia e carbono (DOBBELAERE et al., 2003).

Para a variável fotossíntese líquida (A) em plantas de arroz vermelho sob diferentes tratamentos dentro de cada nível de porcentagem de água no solo, os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos ao nível de 100% da CC, o que não ocorreu para os demais (70, 50 e 30 % da CC), onde foram verificadas médias diferentes entre si (Figura 1A).

Os diferentes níveis de restrição hídrica influenciou negativamente a fotossíntese líquida de plantas de arroz vermelho inoculadas e não inoculadas, onde a partir da análise do gráfico (Figura 1B) pode-se contatar esse efeito significativo. O que também pode ser observado é que as plantas inoculadas obtiveram menores decréscimos de A, 3x menos, em relação ao não inoculado. Com taxas máximas de A a 100 % da CC e mínimas à 30 % da CC. As plantas que foram submetidas a hidratação após o período de estresse hídrico, referente aos tratamentos não inoculado hidratado e inoculado hidratado, ao serem avaliadas as médias de fotossíntese líquida, não foram observados efeitos significativos em função da porcentagem de água no solo, uma vez que as mesmas não estavam mais sob a influência das restrições hídricas (Figura 1B).

A deficiência hídrica leva invariavelmente a redução da fotossíntese e um dos principais motivos, está em haver um decréscimo da difusão de CO₂ da atmosfera até o sítio de carboxilação nas células das folhas (CHAVES et al., 2009; PINHEIRO e CHAVES, 2011), provocado por meio da resistência estomática. Além da resistência estomática, outros fatores não estomáticos, podem ser atribuídos à inibição da fotossíntese, tais como problemas relacionados às alterações na maquinaria fotoquímica, como degradação de clorofilas, redução da atividade e concentração da Rubisco (Ribulose 1-5 bifosfato carboxilase oxigenase), fotoinibição, taxa de transferência de elétrons e redução da eficiência fotoquímica do FSII (FLEXAS e MENDRANO, 2002; LAWLOR e CORNIC, 2002). Diversas enzimas do metabolismo C3 e C4 têm redução da atividade sob déficit hídrico (ALFONSO e BRÜGGEMANN, 2012). Sendo esses os possíveis motivos para os resultados obtidos nesta avaliação.

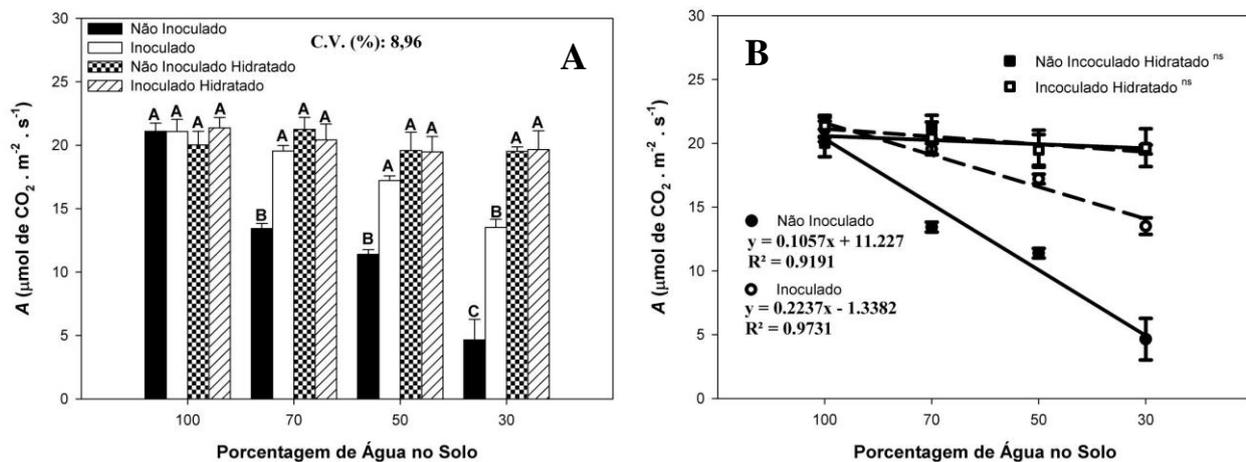


Figura 1. A) Efeito de diferentes tratamentos, na fotossíntese líquida (A) em plantas de arroz vermelho, dentro de cada nível de restrição hídrica. **B)** Fotossíntese líquida (A) de plantas de arroz vermelho, não inoculadas, inoculadas, não inoculadas hidratadas e inoculadas hidratadas, em função de diferentes níveis de porcentagem de água no solo.

Os efeitos de inoculação com *G. diazotrophicus* em plantas de arroz vermelho promoveram efeitos significativos entre todos os níveis de porcentagem de água no solo para os teores de clorofila a e clorofila b (Figura 2). O mesmo comportamento não foi observado para as plantas não inoculadas. As plantas de arroz vermelho que cresceram sem restrição hídrica, ou seja, a 100% CC obtiveram maior produção de clorofila a e b, enquanto que ao diminuir as porcentagens de água no solo para 70%, 50% e 30% foram verificadas menores concentrações de clorofila a e b, esse comportamento tanto para plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* como para as plantas não inoculadas.

A clorofila é o principal pigmento responsável pela captação da energia luminosa utilizada no processo de fotossíntese e, dessa forma, a concentração de pigmentos tem sido frequentemente utilizada como um indicador do efeito dos estresses ambientais sobre as plantas (TAIZ e ZEIGER, 2013). Sob condições de estresse, pode haver uma inibição da síntese do ácido 5-amino levulínico, molécula precursora da clorofila, ou aumentar a atividade da enzima clorofilase que degrada a clorofila, bem como, devido à inibição de enzimas necessárias para a sua biossíntese (SHENG et al., 2008; MURKUTE et al., 2006) e também por captação limitada de nutrientes. As plantas também podem sofrer alterações no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos devido à mudança na translocação do carbono e do nitrogênio (LIONETTI et al., 2012).

Segundo estudos relatados por Campestrini et al. (2014), com relação a eficiência de genótipos de arroz no uso de nitrogênio em sistemas de terras altas, verificaram que as cultivares de arroz, BRS-Bouanã e BRS-primavera, com alto teor de nitrogênio apresentaram maiores médias de clorofila a e b. Assim, de acordo com Barbieri Junior (2009), o índice de clorofila nas folhas das plantas apresenta uma alta correlação com o teor de N da planta, diante disso, é considerado um método eficiente para a avaliação do estado nutricional das plantas.

Algumas bactérias endofíticas, estimulam a produção de citocininas e a síntese de pigmentos de clorofila (JELIĆ e BOGDANOVIĆ, 1989), o aumento do conteúdo de clorofila em plantas tratadas com estirpes endofíticas seria devido à absorção de elementos essenciais especialmente o nitrogênio (N₂), sugerindo, nesses casos uma menor interferência do estresse hídrico na biossíntese de clorofila.

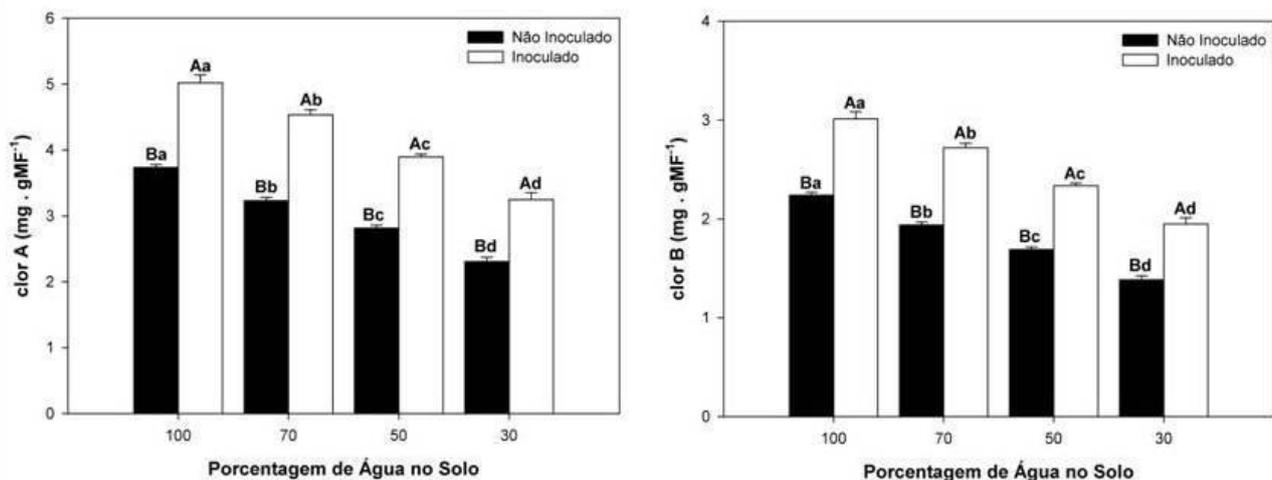


Figura 2. Teores de clorofila *a* e *b* em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação.

CONCLUSÃO

Foram verificadas alterações fisiológicas e bioquímicas nas plantas de arroz vermelho em função dos níveis de restrição hídrica, ao qual foram submetidas. No entanto, sob condições de inoculação com *G. diazotrophicus* as condições de deficiência hídrica foram mitigadas, com incrementos nos teores de clorofila *a* e *b*, bem como na taxa de fotossíntese líquida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFONSO, S.U.; BRÜGGEMANN, W. Photosynthetic responses of a C3 and three different metabolic subtypes to drought stress. **Photosynthesis Research**, v.112, p.175-191, 2012.
- AZEVEDO, J. L. Microorganismos endofíticos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Ecologia microbiana**. Jaguariuna: Embrapa-CNPMA, 486p, 1998.
- BARBIERI JUNIOR, E. **Características estruturais, teores de clorofila e suas relações com o nitrogênio foliar e a biomassa em capim-Tifton 85**. Seropédica, 2009. 64p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. 2. Ed. Jaboticabal: FUNEP, 41p. 2003.
- CAMPESTRINI, R. C.; PRATES, R. G.; SOUSA, S. A.; OLIVEIRA, T. C.; SILVA, J.; FIDELIS, R. R. Eficiência de genótipos de arroz no uso de nitrogênio em solos de terras altas. **Pesquisa agropecuária pernambucana**, Recife, v. 19, n. 1, p. 25-32, 2014.
- CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, p. 1-10, 2009.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Crit. Rev. Plant. Sci.** v. 22, p. 107-149, 2003.
- FLEXAS, J., MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Ann. Bot.** v. 89, p. 183–189, 2002.
- GUIMARÃES, C. M.; FAGERIA, N. K.; BARBOSA FILHO, M. P. Como a planta de arroz se desenvolve. **Arquivo do Agrônomo**, Campinas, n.13, p.1-12, 2002.

- GUIMARÃES, C. M.; SANTOS, A. B.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; STONE, L. F. Sistemas de cultivo. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, p. 53-96, 2006.
- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v.60, p.579-598, 2010.
- HISCOX, J. D.; ISRAELTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian journal of botany**, Canadá, v. 57, n.12, p. 1332-1334, 1979.
- JÉLIC, G.; BOGDANOVIC, M. Antagonism between abscísic acid and cytokinin in chlorophyll synthesis in pine seedlings. **Plant Science**, Yugoslávia, v. 61, n. 2, p. 197-202, 1989.
- KUSS, A.V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. Santa Maria - RS, Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria – UFRB, 109p. 2006.
- LAWLOR D.W; CORNIC G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 275-294, 2002.
- LIONETTI, V.; CERVONE, F.; BELLINCAMPI, D. Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. **Journal of Plant Physiology**, Roma, v. 169, n. 16, p. 1623-1630, 2012.
- MENEZES, B. R. S.; MOREIRA, L. B.; PEREIRA, M. B.; LOPES, H. M.; COSTA, E. M.; CURTI, A. T. M. Características morfoagronômicas de dois genótipos de arroz vermelho em cultivo inundado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Recife, v.7, n.3, p. 394-401, 2012.
- MURKUTE, A. A.; SHARMA, S.; SINGH, S. K. Studies on salt stress tolerance of citrus rootstock genotypes with arbuscular mycorrhizal fungi. **Horticultural Science**, Prague, v. 33, n. 2, p. 70–76, 2006.
- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.3, n.4, p.69-72, 2004.
- PINHEIRO, C.; CHAVES, M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.869-882, 2011.
- SHENG, M.; TANG, M.; CHEN, H.; YANG, B.; ZHANG, F.; HUANG, Y. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. **Mycorrhiza**, Bethesda, v. 18, n. 6-7, p. 287–296, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 918 p. 2013.