

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

TAUANE SANTOS BRITO

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E SUA INFLUÊNCIA NA
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO MILHO**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ
2019**

TAUANE SANTOS BRITO

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E SUA INFLUÊNCIA NA
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador: Dr. Vandeir Francisco Guimarães
Coorientador: Dr^a. Elisiane Inês Dall'Oglio Chaves
Coorientador: Dr. Gilberto Costa Braga

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Brito, Tauane Santos

Métodos de inoculação de *Azospirillum brasilense* e sua influência na promoção de crescimento do milho / Tauane Santos Brito; orientador(a), Vandeir Francisco Guimarães; coorientador(a), Elisiane Inês Dall'Oglio Chaves, coorientador(a)II, Gilberto Costa Braga, 2019. 78 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.

1. Agronomia . 2. *Azospirillum brasilense*. 3. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal . 4. Métodos de inoculação. I. Guimarães, Vandeir Francisco . II. Dall'Oglio Chaves, Elisiane Inês . III. Braga, Gilberto Costa . IV. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



TAUANE SANTOS BRITO

Métodos de inoculação de *Azospirillum brasilense* e sua influência na promoção de crescimento do milho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Manejo de Culturas, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Vandeir Francisco Guimarães

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon
(UNIOESTE)

Viviane Ruppenthal

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon
(UNIOESTE)

Márcia de Holanda Nozaki

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Marechal Cândido Rondon, 25 de fevereiro de 2019

A minha mãe, Eloane.
A meu pai, Joaquim (*in memoriam*).

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos de um trabalho são sempre a parte mais importante, afinal um sábio disse uma vez: “*Grandes batalhas não foram vencidas por apenas um soldado*”.

Inicialmente, agradeço a força superior, por me guiar na direção correta e não me deixar fraquejar ao longo destes dois anos, mesmo quando eu duvidei.

A minha mãe, Eloane de Fatima Santos, por todo o apoio e compreensão. Obrigada por me ensinar a lutar pelos meus desejos mais profundos. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu pai, Joaquim Brito (*in memoriam*), obrigada por durante quase 20 anos me estimular cientificamente nos momentos mais simples e fraternais. Obrigada por me amar mesmo quando estive errada. Obrigada por todos os nossos dias.

Ao meu companheiro de todas as horas, Renan Pan, por estar sempre disponível, por ouvir, auxiliar, apoiar, por não reclamar das longas horas ouvindo SOAD em um volume muito além do aceitável e, como pessoas fiéis a pesquisa, por todos os vasos enchidos e anéis volumétricos coletados. Obrigada por me ensinar a amar o mundo.

Ao meu orientador, Vandeir Francisco Guimarães, por sua orientação, paciência e principalmente compreensão. Por ter me orientado a crescer não só como profissional, mas também como ser humano. E, principalmente, por me ensinar que errar faz parte do processo de aprendizado.

A professora Elisiane Inês Dall’Oglio Chaves, pela coorientação, conselhos, amizade e por sempre acreditar no meu potencial, até mais do que eu acreditei. E ao meu coorientador, professor Gilberto Costa Braga, pela paciência em me ensinar e auxiliar na etapa de cromatografia.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia, por toda a sabedoria compartilhada.

Aos amigos da vida toda Ana Carolina Bellon, Ana Paula Linos de Sousa e Weuller Fernandes Pini, pela distância que jamais vai nos separar.

Ao melhor grupo de leitores do mundo, obrigada por todas as risadas, lágrimas, conselhos, puxões de orelhas e pelos “*you need to read this book/ watch this movie*”, por serem as *traças* mais fenomenais da galáxia. A distância é só um detalhe.

Aos amigos da pós-graduação, em especial Daniele Cristina Schons, Giovana Ritter, Leila Alves Netto e Tatiane Eberling, obrigada pelo sofrimento coletivo, porque sofrer sozinha nunca seria tão divertido.

Ao Grupo de Estudos em Fixação Biológica de Nitrogênio, por me acolherem e me ajudarem em todos os momentos. Em especial aos alunos de iniciação científica Alexandre Wegner Lerner, Adriele Dierings e Emanoele Fernanda Pappen Poleze, essenciais ao longo do projeto, sempre disponíveis quando precisei. E ao sempre parceiro Adriano Mitio Inagaki, por sua paciência imensa para me ensinar a trabalhar com o IRGA e pelas longas horas de análise que enfrentamos juntos.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) pela possibilidade de aperfeiçoamento profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), pela disponibilidade da estrutura e a receptividade por parte da equipe laboratorial.

Por fim, aos demais que direta e indiretamente auxiliaram para que este trabalho acontecesse, são muitas pessoas, e assim como os anteriormente citados, vocês foram essenciais.

“E havia uma sensação de segurança na aldeia que nenhuma cidade que conheci me transmitiu: a segurança que se revela quando o solo e as gerações que o trabalham se tornam intercambiáveis; quando as identidades dos seres humanos e da natureza do lugar se tornam uma coisa só. As cidades são centro de mudanças constantes e irreversíveis. O som que define uma cidade é o chacoalhar de cascavel de uma britadeira – o aviso que se ouve quando o réptil dos negócios ataca. Mas a mudança na aldeia é incessante. O que muda na natureza é restaurado pela roda das estações. O que vem da terra sempre retorna. O que floresce morre para renascer.”

(Gregory David Roberts)

RESUMO

BRITO, Tauane Santos, M.S., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Fevereiro – 2019. **Métodos de inoculação de *Azospirillum brasilense* e sua influência na promoção de crescimento do milho.** Orientador: Dr. Vandeir Francisco Guimarães. Coorientador: Dr^a. Elisiane Inês Dall'Oglio Chaves. Dr. Gilberto Costa Braga.

O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal em milho destaca-se como alternativa para aumento de produtividade, redução de uso de químicos e preservação ambiental. Contudo, se busca-se métodos mais eficientes para uso do inoculante, em especial na etapa de manejo por parte do produtor, visando preservar a viabilidade do microrganismo. O objetivo do estudo foi avaliar a influência de métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense* no metabolismo e promoção de crescimento vegetal em milho híbrido Formula VT[®]. Em casa de vegetação, utilizando como unidade experimental vasos de polietileno com capacidade para 25 L, preenchidos com LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico, foram cultivadas plantas de milho em função de diferentes métodos de inoculação com as estirpes Abv5 e Abv6 da bactéria promotora de crescimento vegetal *A. brasilense*. Os métodos de inoculação consistiram em ausência de inoculação (controle), inoculação via semente (no momento da semeadura), inoculação via foliar (no estágio fenológico V4) e inoculação via semente associada a foliar (no momento da semeadura e no estágio fenológico V4, respectivamente). Quinzenalmente as plantas foram avaliadas quando ao teor relativo de clorofila. Nos estádios fenológicos V8, VT e R6 foram realizadas as leituras de taxa de assimilação líquida de CO₂ em função de diferentes densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos. Destes dados determinou-se o ponto de compensação de CO₂, a eficiência quântica e a taxa de assimilação líquida de CO₂ máxima. Ainda, nos estádios fenológicos V8, VT e R6, foram mensurados número de folhas, altura de parte aérea, diâmetro basal de colmo, volume de raiz, massa seca de folha, colmo+bainha, raiz e total, área foliar e teores foliares de nitrogênio, fósforo e potássio. Por fim, no estágio fenológico R6 avaliou-se diâmetro de espiga, comprimento de espiga, número de fileiras, número de grãos por fileira, massa seca de estrutura reprodutiva, massa de 100 grãos, massa total de grãos e teor de nitrogênio, fósforo e potássio dos grãos. Plantas inoculadas via semente e via semente associado a foliar destacaram-se quanto a diâmetro basal de colmo, massa seca foliar, volume de raiz, e aos teores de nitrogênio, fósforo e potássio. Ainda, plantas inoculadas apresentaram capacidade diferenciada de transporte de elétrons e eficiência de assimilação líquida de CO₂, em relação ao controle, em todos os estádios analisados. O método de inoculação via foliar influenciou na

demanda adaptativa das plantas, reduzindo a velocidade de desenvolvimento no estágio inicial. Os métodos de inoculação influenciaram em parâmetros fisiológicos, morfométricos e nutricionais do desenvolvimento do milho, contudo, não influenciaram na produtividade final. O desenvolvimento vegetal relacionado a promoção de crescimento foi influenciado positivamente pela inoculação, variando de acordo com o método utilizado.

Palavras-chave: Bactéria promotora de crescimento vegetal. Eficiência quântica. Ponto de Compensação de CO₂. Inoculação via foliar.

ABSTRACT

BRITO, Tauane Santos, M.S., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, February – 2018. **Inoculation methods of *Azospirillum brasilense* and its influence in the growth promotion of maize.** Advisor: Dr. Vandeir Francisco Guimarães. Co-Advisors: Dr^a. Elisiane Inês Dall'Oglio Chaves. Dr. Gilberto Costa Braga.

The use of plant growth promoting bacteria in maize stands out as an alternative to increase productivity, reduce the use of chemicals and preserve the environment. However, more efficient methods for the use of inoculant are sought, especially in the stage of management by the producer, seeking to preserve the microorganism's viability. The objective of this study was to evaluate the influence of inoculation methods with *Azospirillum brasilense* in the metabolism and the plant growth promotion in maize hybrid Formula VT®. In greenhouse, using as experimental unit polyethylene pots with 25 liter capacity, filled with Oxisol, were cultivated maize plants in function of different inoculation methods with the strains Abv5 and Abv% from the plant growth promoting bacteria *A. brasilense*. The inoculation methods consisted in the absence of inoculation (control), seed inoculation (during the seeding moment), foliar inoculation (in the phenological stage V4) and seed inoculation associated to foliar inoculation (during the seeding moment and in the phenological stage V4, respectively). The plant's chlorophyll relative content was fortnightly evaluated. In the phenological stages V8, VT and R6 was measured the readings of the CO₂ liquid assimilation rate in function of different flux densities of photosynthetically active photons. From these data it was determined the CO₂ compensation point, the quantum yield and the maximum CO₂ liquid assimilation. Still in the phenological stages V8, VT and R6, it was measured the number of leaves, aerial height, basal stem diameter, root volume, dry mass of leaves, stem+leaf sheath, roots and total dry mass, foliar area and foliar contents of nitrogen, phosphorus and potassium. Finally, in the phenological stage R6 it was evaluated the ear diameter, ear length, number of rows, number of kernels per row, dry mass of the reproductive structure, 100 grain mass, total grain mass and the grain content of nitrogen, phosphorus and potassium. Plants with inoculation via seed and seed inoculation associated to foliar inoculation stood out as to basal stem diameter, leaves dry mass, root volume and the contents of nitrogen, phosphorus and potassium. Still, the inoculated plants showed a differentiated capacity of transport of electrons and efficiency of CO₂ liquid assimilation rate in relation to the control in all evaluated stages. The inoculation method via foliar influenced in the adaptative demand of the plants, reducing their development speed in the initial stage. The inoculation methods influenced in physiological,

morphometric and nutritional parameters of the development of maize, however, they did not had any influence in the final yield. The plant development related to the growth promotion was positively influenced by the inoculation, varying according to the utilized method.

Keywords: Plant growth promoting bacteria. Quantum yield. CO₂ compensation point. Foliar inoculation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1 – Condições de umidade relativa do ar, temperatura do ponto de orvalho e temperatura média em ambiente de cultivo protegido, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, nos anos de 2017 e 2018..... 47
- Figura 2 – Análise quinzenal do teor relativo de clorofila, do terço foliar apical (A), mediano (B) e basal (C), de plantas de milho híbrido Formula VT[®] submetidas a diferentes métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense* 48

CAPÍTULO III

- Figura 1 – Condições de umidade relativa do ar, temperatura do ponto de orvalho e temperatura média em ambiente de cultivo protegido, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, nos anos de 2017 e 2018 69
- Figura 2 – Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) de acordo com a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (Q), ponto de compensação luminosa (Γ), eficiência quântica aparente (Φ) e taxa máxima de assimilação líquida de CO₂ ($A_{m\acute{a}x}$), em plantas de milho híbrido Formula VT[®] na fase fenológica V8 em função dos métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense* 70
- Figura 3 – Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) de acordo com a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (Q), junto ao ponto de compensação luminosa (Γ), eficiência quântica aparente (Φ) e taxa máxima de assimilação líquida de CO₂ ($A_{m\acute{a}x}$), em plantas de milho híbrido Formula VT[®] na fase fenológica VT em função dos métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense* 71
- Figura 4 – Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) de acordo com a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (Q), junto ao ponto de compensação luminosa (Γ), eficiência quântica aparente (Φ) e taxa máxima de assimilação líquida de CO₂ ($A_{m\acute{a}x}$), em plantas de milho híbrido Formula VT[®] na fase fenológica R6 em função dos métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense* 72
- Figura 5 – Produção de massa seca total de plantas de milho híbrido Formula VT[®], nos estádios fenológicos V8, VT e R6, submetidas aos diferentes métodos de inoculação (ausência de inoculação, semente, foliar, semente associado a foliar) com *Azospirillum brasilense* 73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Análise dos componente morfometricos número de folhas (NF), altura de parte aérea (APA), volume de raiz (VR), diâmetro de colmo (DC), massa seca de folha (MSF), massa seca de colmo e bainha (MSC+B), massa seca total (MST), área foliar (AF), teor de nitrogênio foliar (N _f), teor de fósforo foliar (P _f) e teor de potássio foliar (K _f) em de plantas de milho hibrido Formula VT [®] submetidas a diferentes métodos de inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> analisadas nos estádios V8, VT e R6 de desenvolvimento	49
Tabela 2 – Análise dos componentes da produção diâmetro de espiga (DE), comprimento de espiga, número de fileiras (NF), número de grãos por fileira (NGF), massa seca de estrutura reprodutiva (MSER), massa de 100 grãos (M100), massa total de grãos (MTG), teor de nitrogênio no grão (N _g), teor de fósforo no grão (P _g) e teor de potássio no grão (K _g) em de plantas de milho hibrido Formula VT [®] submetidas a diferentes métodos de inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i>	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	A CULTURA DO MILHO.....	15
2.1.1	Metabolismos das plantas C ₄	15
2.1.2	Trocas gasosas e desenvolvimento vegetal	16
2.2	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	17
2.2.1	Estratégias de promoção de crescimento vegetal	18
2.2.1.1	Fixação biológica de nitrogênio	18
2.2.1.2	Produção de fitohormônios.....	18
2.2.1.3	Solubilização de fosfatos minerais	19
2.2.1.4	Controle biológico	19
2.2.1.5	Indução de resistência.....	20
2.2.1.6	Tolerância a estresse e fitorremediações	21
2.2.1.7	ACC deaminase e o etileno	21
2.2.2	A espécie <i>Azospirillum brasilense</i>	22
2.2.3	A promoção de crescimento vegetal no milho	22
2.3	MÉTODOS DE INOCULAÇÃO	23
2.4	REFERÊNCIAS	24
3	CAPITULO II: MORFOMETRIA E PRODUÇÃO DE MILHO	
	INOCULADO COM <i>Azospirillum brasilense</i>.....	29
	INTRODUÇÃO.....	30
	MATERIAL E MÉTODOS	32
	<i>LOCAL DO EXPERIMENTO</i>	32
	<i>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</i>.....	33
	<i>IMPLANTAÇÃO E TRATOS CULTURAIS</i>.....	33
	<i>AVALIAÇÕES REALIZADAS</i>	34
	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>.....	36
	RESULTADOS	36
	DISCUSSÃO	38
	CONCLUSÃO.....	43
	REFERENCIAS.....	44
	FIGURAS E TABELAS	47

4	CAPITULO III: <i>Azospirillum brasilense</i> E SUA INFLUÊNCIA EM PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS DO MILHO	51
	INTRODUÇÃO	52
	MATERIAL E MÉTODOS	55
	<i>LOCAL DO EXPERIMENTO</i>	55
	<i>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</i>	56
	<i>IMPLANTAÇÃO E TRATOS CULTURAIS</i>	56
	<i>AVALIAÇÕES REALIZADAS</i>	57
	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	58
	RESULTADOS	58
	DISCUSSÃO	60
	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	FIGURAS	69
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas atuais buscam tecnologias que possibilitem o aumento da produção sem necessariamente aumentar a área cultivada, visando técnicas que supram a necessidade alimentar da população e ainda assim preservem o meio ambiente.

O milho (*Zea mays* L.) está entre os cereais mais cultivados na atualidade, utilizado em processos diversos da agroindústria. É uma espécie de grande importância na linha de pesquisa de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), cuja associação com esses microrganismos recebe diferentes focos de estudo, buscando as melhores maneiras de se atingir altos patamares produtivos, em especial quando associado ao *Azospirillum brasilense*.

O uso de BPCV em poáceas cultivadas em solos brasileiros é fonte de pesquisa desde a década de 1950 e, desde então, muito se foi descoberto. A fixação biológica de nitrogênio, foco inicial das pesquisas, abriu caminho para uma ampla diversidade de atuações, como por exemplo a produção de fitohormônios, a solubilização de fosfatos e a indução de resistência.

A colonização bacteriana se dá preferencialmente na rizosfera, mas o *A. brasilense* por se tratar de uma bactéria associativa tem a capacidade de colonizar qualquer tecido vegetal. Os métodos de inoculação utilizados comumente variam entre inoculação via semente ou no sulco de plantio, contudo, pesquisas recentes têm demonstrado que a inoculação via foliar, após a emergência da planta, pode resultar em ganhos significativos para a cultura. Esse terceiro método, destaca-se como uma alternativa para contornar o efeito deletério do tratamento de semente ao microrganismo inoculado, além disso, visa aumentar a eficiência do processo de promoção de crescimento vegetal.

Diante do exposto, a hipótese do estudo é de que o método utilizado para a inoculação de plantas com a bactéria *A. brasilense* influenciaria no metabolismo vegetal, atuando nas taxas fotossintéticas e na promoção de crescimento em plantas de milho. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar a influência da inoculação com *Azospirillum brasilense* no metabolismo e na promoção de crescimento vegetal em milho, em função de diferentes métodos de inoculação

2 CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO MILHO

Originário das regiões andinas da América do Sul, o milho (*Zea mays* L.) é um cereal de destaque da produção brasileira. De alto potencial produtivo, fruto de extensos trabalhos na área de melhoramento, é o terceiro cereal mais produzido no mundo, perdendo apenas para trigo e arroz, e é o principal cereal produzido no Brasil. De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a estimativa da área brasileira plantada em 2018/19 é de 16.524 milhões ha⁻¹, com produtividade total estimada em mais de 91 mil toneladas (CONAB, 2019).

O milho é uma Poaceae anual, com metabolismo C₄ e ampla adaptação a diferentes condições ambientais. A cultura é responsiva a altas temperaturas, variando entre 24 e 30°C, influenciando no acúmulo de graus-dias, além de elevada exigência hídrica (média 600 mm), principalmente no estágio de florescimento, essencial para seu desenvolvimento pleno (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

Essencial para as atividades agropecuárias, o milho é fonte para diversas áreas desde a alimentação humana e animal até a produção de combustível. O milho é a base da alimentação para aves, suínos e bovinos, sendo empregado extensamente na formulação de rações, devido ao potencial energético.

A cultura é fundamental no processo de sucessão de culturas, sendo semeado logo após a soja, produzindo grande volume de palhada, que auxiliam em processos de conservação do solo e disponibilizam nutrientes a partir da matéria orgânica.

2.1.1 Metabolismos das plantas C₄

Visando a redução das perdas de carbono via fotorrespiração, algumas plantas desenvolveram adaptações em seu metabolismo, permitindo minimizar a atividade da RUBISCO. Plantas com metabolismo C₄ tem suas reações fisicamente separadas. Reações que dependem da luz acontecem nas células do mesófilo, enquanto as do ciclo de Calvin nas células da bainha do feixe vascular (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Desta forma, ao fixar CO₂, forma-se um ácido orgânico chamado malato ou aspartato, que é transportado para a bainha do feixe vascular. Na bainha, a molécula é quebrada, liberando o CO₂, para então fixá-lo pela RUBISCO, transformando em açúcar via Ciclo de Calvin, como ocorre normalmente em plantas de metabolismo C₃ (KERBAUY, 2008; TAIZ et al., 2017).

Essa adaptação permite manter sempre alta concentração de CO₂ no interior das células em relação ao O₂ na RUBISCO, minimizando a fotorrespiração. O gasto de ATP para mover CO₂ do mesófilo para a bainha do feixe vascular é compensado pela redução das perdas com a fotorrespiração. Esse metabolismo é comum em apenas 3% das plantas vasculares, em especial o milho e a cana de açúcar. São plantas mais adaptadas a climas tropicais (EHLERINGER; BJORKMAN, 1977; KERBAUY, 2008; TAIZ et al., 2017).

2.1.2 Trocas gasosas e desenvolvimento vegetal

Da semente a colheita, o desenvolvimento de uma planta ocorre em função de reações metabólicas que acontecem por meio de estímulos, como a entrada de água, a interceptação de luz e as trocas gasosas. Essas reações não seguem um padrão, mas sim, variam ao longo de todo o período de desenvolvimento, devido a fatores intrínsecos e extrínsecos, influenciando desde a abscisão de folhas mais antigas e/ou doentes à expansão radicular do organismo vegetal em situação de estresse hídrico (TAIZ et al., 2017). Doenças e déficits (nutricional, água, luminosidade, entre outros) levam o organismo vegetal a reduzir a produção de compostos, visando a sobrevivência.

Plantas não possuem órgãos exclusivamente responsáveis pela realização de trocas gasosas, apesar da maior parte delas acontecer nas folhas. Os estômatos são os principais responsáveis pelas reações de trocas gasosas vegetais, regulando a abertura e fechamento do ostíolo de acordo com a situação ambiental do momento (LARCHER, 1986). Além da luz, o substrato básico para a realização da fotossíntese é o CO₂, desta forma, a abertura e fechamentos estomático são fatores de suma importância para que as reações luminosas aconteçam de forma satisfatória, permitindo o desenvolvimento pleno do organismo vegetal (LARCHER, 1986).

Na maturidade fisiológica, as plantas estabilizam suas taxas respiratórias, que diminuem de acordo com a proximidade da senescência vegetal, devido a produção endógena de etileno. A redução das taxas respiratórias estaria associada a uma rota alternativa, cujo papel ainda não está totalmente definido, ou ainda, a partir da aplicação exógena de etileno, buscando uma maturidade precoce, como ocorre em frutíferas (LARCHER, 1986; TAIZ et al., 2017).

Do mesmo modo, a taxa de respiração vegetal é diretamente influenciada pela concentração de dióxido de carbono (CO₂) no ambiente, tendo a atividade do CO₂ reduzida quando em altas concentrações do etileno. Levando em consideração que o CO₂ inibe a produção do etileno, o aumento na taxa de respiração vegetal, resultante desta

competição, pode estar relacionado ao atraso do ponto de maturação, devido a redução da concentração de etileno, que tem sua produção inversamente proporcional à concentração de CO₂ (CALBO; MORETTI; HENZ, 2007).

2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) no Brasil tem enfoque desde a década de 50, quando a Dr^a Johanna Döbereiner isolou de solos ácidos da “Baixada Fluminense” amostras da *Azotobacter*. Esses estudos ganharam evidência com a descoberta de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas à rizosfera de poáceas, que abriu um leque de diferentes linhas de pesquisa na área (DOBEREINER, 1966). Desde então muito se foi descoberto quanto as características adicionais desses microrganismos, demonstrando que a fixação biológica de nitrogênio é apenas uma das muitas aplicações agrícolas resultantes da pesquisa com BPCV (BALDANI; BALDANI, 2005).

A interação positiva entre planta e microrganismos ocorre quando a planta é capaz de tolerar a ação bacteriana, ou mesmo, quando a bactéria é capaz de contornar os mecanismos de defesa da planta. Ainda assim, para que a colonização seja bem-sucedida, a bactéria precisa ser capaz de penetrar o tecido dessa planta e se multiplicar, suprimindo os sistemas de defesa se utilizando de hormônios e toxinas (ANJOS, 2008).

Residentes epifíticas ou endofíticas, as BPCV podem atuar de maneira direta ou indireta no desenvolvimento de plantas, alterando características morfológicas, fisiológicas ou bioquímicas. Aumento de área foliar, diâmetro de caule, número de folhas, massa seca, maiores condições de adaptação, maior sobrevivência de mudas, biocontrole de doenças, aumento de produtividade, produção de fitohormônios, solubilização de fosfatos minerais, são, entre outros fatores, confirmações do potencial dessas bactérias e de como é prático optar por usá-las (MARIANO et al., 2004).

A rizosfera é uma das portas de entrada para essa associação, e é diretamente influenciada pela liberação de exsudatos radiculares, assim como a disponibilidade de material orgânico, sendo que, a atividade metabólica dessas bactérias torna disponível para as plantas, de maneira simplificada, importantes nutrientes como nitrogênio e potássio (ANJOS, 2008; MOREIRA et al., 2010).

2.2.1 Estratégias de promoção de crescimento vegetal

A promoção de crescimento vegetal nada mais é do que a maneira como as bactérias atuam no organismo vegetal influenciando fatores relacionados ao desenvolvimento vegetal e elevando o potencial produtivo destes vegetais.

2.2.1.1 Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica é uma área bastante explorada na cultura da soja, cuja a planta associa-se ao microrganismo, produzindo nódulos onde a bactéria realiza a quebra da ligação tripla no N_2 , tornando o nutriente, na forma possível de absorção, disponível para a planta (BALDANI; BALDANI, 2005; HUNGRIA et al., 2010).

Contudo, essa associação não é possível entre as BPCV e as poáceas. Esses microrganismos possuem o gene da nitrogenase, necessários para que ocorra a fixação biológica de nitrogênio, contudo a não formação do nódulo faz com que a fixação ocorra com menor intensidade (GLICK, 2012). Esse complexo sistema, em que não ocorre a formação de nódulos fixadores, não fornece a mesma eficiência obtida na cultura da soja, mas, ainda apresenta resultados satisfatórios quanto a promoção de crescimento vegetal (SANTOYO et al., 2016).

Avaliando características agronômicas e produtividade de híbridos de milho a campo quando inoculado com três espécies de *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum* e *A. oryzae*), Quadros et al. (2014) relatam que plantas inoculadas apresentaram melhor desenvolvimento no período vegetativo, em especial maior teor de clorofila nas folhas.

Testando duas formas de inoculação com *A. brasilense* (semente e sulco) na cultura do milho associado a adubação nitrogenada, Oliveira et al. (2018) relatam que o uso da inoculação, independente da adubação nitrogenada, reflete em aumento da produção de grãos.

2.2.1.2 Produção de fitohormônios

Ao longo do seu desenvolvimento as plantas ajustam a produção endógena de fitohormônios, visando adaptar-se as fases de desenvolvimento e a situações de estresse. Por ser uma estratégia de sucesso, alguns microrganismos utilizam a mesma abordagem, induzindo a produção e influenciando os níveis e o equilíbrio hormonal da planta, principalmente em situações de estresse (GLICK, 2012).

Visando identificar o potencial bacteriano para produção de citocinina e giberelina, Nascimento et al. (2018) isolaram 20 bactérias endofíticas associativas de

plantas de maracujá amarelo, e identificaram que todos os isolados eram capazes de produzir os dois hormônios com diferentes níveis de eficiência.

Florentino et al. (2017) inicialmente avaliaram o potencial *in vitro* de 19 estirpes bacterianas para produção de auxina junto a presença e ausência de triptofano, para em seguida avaliarem o efeito da inoculação destes organismos na cultura da alface. Eles concluíram que a presença do triptofano no meio estimula o aumento da produção de auxina pela maioria das estirpes. E que, a inoculação dessas estirpes em plantas de alface, promoveu aumento da taxa de germinação de sementes, comprimento radicular e peso de matéria seca.

2.2.1.3 Solubilização de fosfatos minerais

A biodisponibilidade limitada de fósforo no solo, nutriente essencial para o crescimento, resulta em incapacidade das plantas de obter fósforo o suficiente, de forma natural, limitando seu desenvolvimento (MOREIRA et al., 2010; SANTOYO et al., 2016).

A solubilização e mineralização de fosfatos via BPCV ocorre devido a ação de ácidos orgânicos que são sintetizados por esses organismos no solo, resultando em uma sequência de processos de quebra que resultam na disponibilidade de nutriente para o organismo vegetal (GLICK, 2012).

Devido aos preparos dos microrganismos em escala comercial, muito dessa característica tem sido limitada, se manifestando efetivamente quando as bactérias são co-inoculadas com outros microrganismos, como as micorrizas (GLICK, 2012; MOREIRA et al., 2010).

Avaliando a capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos e fixação biológica de nitrogênio de 30 estirpes bacterianas isoladas de raízes de cana-de-açúcar (15 endofíticos e 15 colonizadores de rizosfera), Santos et al. (2012) relatam que 90% dos isolados apresentaram capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, sendo que estirpes colonizadoras de rizosfera apresentam maior índice de solubilização.

2.2.1.4 Controle biológico

O controle biológico é uma ação indireta da inoculação com BPCV. Pesquisas indicam que, a inoculação com esses microrganismos, possibilitam uma rápida colonização bacteriana da rizosfera, competindo por sítios de infecção com microrganismos patogênicos (GLICK, 2012).

Além disso, outros fatores podem indicar o controle biológico resultante do uso destes organismos. A produção de fitohormônios, em especial a auxina, influencia no desenvolvimento da cultura, fazendo com que a mesma apresente maior resistência a danos mecânicos e bioquímicos. Ainda, esses organismos podem produzir sideróforos, metabolitos antimicrobianos, enzimas líticas, além de competir por nutrientes com os demais organismos (GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015).

Ao microbiolizar sementes de arroz com rizobactérias, Souza Júnior et al. (2010) relatam que plantas inoculadas apresentaram menor incidência de *Rhizoctonia solani* e *Meloidogyne graminicola*, além de características relacionadas a promoção de crescimento. Ludwig e colaboradores (2013) também relatam eficiência no controle de *Meloidogyne graminicola*.

Usando *Pseudomonas synxantha*, *P. fluorescens*, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, e *Stenotrophomonas maltophilia*, que também atuam no controle biológico para doenças fúngicas do arroz, pesquisadores relatam que todas as rizobactérias produziram algum composto responsável pelo controle de nematoides *Meloidogyne graminicola*, além de plantas inoculadas apresentarem menor número de galhas e ovos, com redução de até 35% do fator de reprodução dos nematoides (LUDWIG; MOURA; GOMES, 2013).

2.2.1.5 Indução de resistência

A inoculação com BPCV pode desencadear em algumas plantas um fenômeno conhecido como resistência sistêmica induzida, onde as plantas ativam seus mecanismos de defesa em resposta a infecção de um agente não infeccioso que é reconhecido como patogênico. Essas plantas preparam seu organismo para as abordagens geralmente realizadas para um patógeno, desta forma, quando um patógeno realmente infecta o organismo vegetal, este já está preparado para se atrasar ou evitar sua entrada e consequentemente sua infecção nos tecidos (GLICK, 2012; STANGARLIN et al., 2011).

Silva e Romeiro (2004) testando estirpes de bactérias colonizadoras de rizosfera em mudas de tomate visando o biocontrole da mancha-bacteriana-pequena do tomateiro, obtiveram 28 isolados com capacidade de biocontrole do patógeno. Já Medeiros et al. (2005) conduziram estudo, visando redução da sobrevivência de larvas da traça das crucíferas, usando plantas inoculadas ou não com *Bacillus thuringiensis*, e relatam que, em comparação as plantas não inoculadas, o uso de inoculadas como base alimentar resultou em mortalidade larval de até 60%, com controle não inoculado apresentando apenas 1,7% de mortalidade.

2.2.1.6 Tolerância a estresse e fitorremediações

O metabolismo vegetal é adaptado para lidar com algumas situações de estresse em função do local onde a planta se encontra, fazendo com que a mesma adapte-se visando a sobrevivência. O uso de BPCV pode influenciar, de forma indireta, aumentando a tolerância da planta a situações que comumente resultariam em menor rendimento final de produção, ou mesmo, a morte da planta. Ainda, podem atuar em processos de fitorremediações devido a sua capacidade de absorver quantidades significativas de metais pesados (LUO et al., 2011; MIRANSARI; SMITH, 2014).

Plantas de girassol inoculadas por microbiolização com *Bacillus sp.* e *Enterobacter cloacae*, quando cultivadas em déficit hídrico, apresentaram aumento nos teores de nitrogênio e potássio foliar, bem como de solutos orgânicos. O uso da inoculação aumentou a capacidade de ajuste osmótico das plantas cultivadas em déficit hídrico, resultando em maior acúmulo de solutos orgânicos (FERNANDES; LIMA, 2014).

O uso de *Bacillus sp.* em plantas adultas de meloeiro infectadas com *Meloidogyne incognita* resultou em redução da reprodução do nematoide e do número de galhas. Além disso, em plantas inoculadas, a redução do acúmulo de biomassa devido a estresse hídrico foi menos severa, assim como houve redução do teor de proteína solúvel nas plantas (PEREIRA et al., 2016).

Uma estirpe bacteriana isolada de *Solanum nigrum* L, planta hiperacumuladora de cádmio, apresentou resistência aos efeitos tóxicos de metais pesados, solubilizando fosfatos e produzindo ácido indolacético e sideróforos. Em 72 horas em meio de cultura, a bactéria ligou a suas células 65% do cádmio e 35% do zinco presente da solução (LUO et al., 2011).

2.2.1.7 ACC deaminase e o etileno

Outro dos destaques para as BCPV é a capacidade de sequestrarem o precursor da síntese de etileno, o ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano), e utilizá-lo em seu organismo para a obtenção de energia, alterando assim a produção de etileno na planta e conseqüentemente afetando o tempo de vida de órgãos vegetais, retardando a senescência (GLICK, 2014).

Esses microrganismos são capazes de atuar na síntese do hormônio vegetal etileno, a que se dá em fases variadas, atuando como modulador de crescimento das

plantas, participando na germinação de sementes, formação de nódulos no caso de rizóbios, desenvolvimento radicular e também na ramificação de plantas (GLICK, 2014), e ainda, na abscisão foliar e senescência floral, no amadurecimento de frutos, no caso de lesões ou infecções por patógenos e por estresse fisiológico (TAIZ et al., 2017). Além disso, a síntese sofre efeitos de fatores como temperatura, luz, gravidade, nutrição, outros estresses bióticos, presença de metais, produtos químicos (orgânicos ou inorgânicos), água em excesso ou falta e ferimentos mecânicos (GLICK, 2014; GLICK, 2012).

2.2.2 A espécie *Azospirillum brasilense*

O gênero *Azospirillum* engloba bactérias associativas presentes em diversas espécies vegetais. Das BPCV, são as mais estudadas na atualidade quando associadas às poáceas, devido ao potencial de promoção de crescimento oriundo de diversas fontes, como a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios, aumento disponibilidade de nutrientes e indução a resistência de plantas a patógenos (FUKAMI et al., 2016; LÓPEZ; HERRERA, 2017).

A associação da *Azospirillum brasilense* com a rizosfera de pastagens e cereais de clima tropical vem sendo a principal fonte de estudo para a espécie, em especial sua associação com a cultura do milho (LÓPEZ; HERRERA, 2017). Devido a característica de colonizar tanto a parte interna quanto externa da raiz, além de outros órgãos vegetais, essa bactéria tem se destacado devido a eficiente promoção de crescimento, em especial em situações de estresse, nos estudos realizados (BARASSI et al., 2006; BULEGON et al., 2017; OFFEMANN et al., 2015; RADWAN; KAMEL; MASSENA, 2004; SHELUD et al., 2010).

2.2.3 A promoção de crescimento vegetal no milho

O milho tem alta adaptabilidade em diversos ambientes, para atingir o ápice do seu potencial, o cultivo é subsidiado por preparo de solo, métodos de plantio, adubações, irrigação, controle de pragas e patógenos, plantas daninhas, métodos de melhoramento genético, entre outras técnicas que foram sendo aperfeiçoadas ao longo de anos de pesquisa (BATISTA, 2012).

Tem como característica a capacidade de se associar a BPCV, que podem colonizar das raízes até folhas das plantas, promovendo ganhos para ambos (ALVES et al., 2014). Muito se conhece sobre a capacidade de fixação biológica de nitrogênio das BPCV, mas, além disso, como citado anteriormente, esses microrganismos são capazes

de promover a produção fitohormônios, produzir enzimas, como a ACC deaminase, solubilizar fosfatos minerais, atuar no controle biológico de microrganismos patogênicos, induzir resistência, promover maior absorção pelas raízes, contribuir para sobrevivência em condições pouco favoráveis, reduzir danos por estresse, auxiliar em fitorremediações, entre outras características destacáveis (COELHO et al., 2007; DEY; PAL; TILAK, 2012; DOORNBOS; VAN LOON; BAKKER, 2012; MARIANO; et al., 2004).

Estudos realizados com a cultura do milho destacam que as plantas inoculadas demonstram melhores características de interesse agrônomo, como diâmetro de colmo, altura de parte aérea, massa seca, massa radicular, produtividade (DARTORA et al., 2013; DE QUADROS et al., 2014; KAPPES et al., 2013; NOVAKOWISKI et al., 2011; REIS et al., 2008), aumento da eficiência da utilização de nitrogênio e fósforo, maior atividade da nitrato redutase, da glutamina sintetase, e aumento nos teores de açúcares solúveis totais (MORAIS et al., 2016; REIS et al., 2008), e maiores índices de clorofila foliar (DARTORA et al., 2013; DE QUADROS et al., 2014; KAPPES et al., 2013).

2.3 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal na agricultura teve destaque com o processo de inoculação via semente, contudo, atualmente outros métodos vêm sendo testados, buscando otimização dos resultados obtidos. Os métodos hoje variam em inoculação via semente, via foliar, associação semente e foliar, sulco de plantio, imersão em solução de bactérias, este último para testes de enraizamento de estacas (SILVA et al., 2017).

Estudos tem relatado que o uso da inoculação via semente pode reduzir a eficiência do processo de inoculação devido a influência dos tratamentos de semente geralmente utilizados no momento de semeadura, em especial fungicidas (BULEGON et al., 2017; PEREIRA et al., 2010; VOGEL; FEY, 2016).

Devido à incompatibilidade com alguns produtos químicos, como tiofanil, tolylfluanid (CAMPO et al., 2010), carbendazin e thiram (CAMPO; ARAUJO; HUNGRIA, 2009; COSTA et al., 2013), vem-se testando o uso da inoculação no sulco, via pulverização na semeadura, ou pulverização foliar, após a emergência das plantas.

Fukami et al. (2016) relatam que, em experimento em estufa, plantas de milho inoculadas via pulverização foliar apresentaram 27% a mais de acúmulo de massa seca de parte aérea com 75% da dose de nitrogênio recomendada, em relação ao controle não inoculado com 100% da dose de nitrogenada. Já em trigo, o uso do inoculante junto a

100% da dose de nitrogênio recomendado resultou em aumento nos teores de nitrogênio foliar em relação as plantas não inoculadas com a mesma dose de adubação nitrogenada.

Visando determinar a viabilidade do uso de *A. brasilense* via semente e via pulverização foliar em milho, Fukami et al. (2017) relatam que metabolitos produzidos pelas bactérias podem ser os maiores responsáveis pelos efeitos obtidos na inoculação, como ácido indol-3-acético, indol-3-etanol, ácido indol-3-láctico e ácido salicílico. Ainda, relatam que a regulação dos genes do estresse oxidativo nas folhas e infra regulação nas raízes foi afetado pela inoculação bacteriana, indicando relação entre os métodos de inoculação, a produção de fitohormônios e a elicitação de genes relacionados a indução de resistência.

Em contrapartida, Pereira et al. (2017) relatam que, ao testar três métodos de inoculação de *A. brasilense* na cultura do trigo (via semente, via foliar e associação dos dois anteriores) a inoculação via semente foi a que melhor apresentou incremento na produtividade final de grãos, indicando que a cultura utilizada também pode influenciar no melhor método de inoculação a ser utilizado.

2.4 REFERÊNCIAS

ALVES, G. C. et al. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, n. 1–2, 2014.

ANJOS, É. C. T. **Rizobactérias promovidas de crescimento e fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de mudas micropropagadas de bananeira**. 2008. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005.

BARASSI, C. A. et al. Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. **Scientia Horticulturae**, v. 109, n. 1, p. 8–14, 2006.

BATISTA, B. D. **Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**. 2012. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BULEGON, L. G. et al. Phytotoxicity of mesotriona in corn with *Azospirillum brasilense* associated nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 12, n. 3, p. 325–331, 2017.

CALBO, A. G.; MORETTI, C. L.; HENZ, G. P. **Respiração de Frutas e Hortaliças**. **Comunicado Técnico**, v. 46, p. 1–10, 2007.

CAMPO, R. et al. In-furrow inoculation of soybean as alternative to fungicide and micronutrient seed treatment. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1103-1112, 2010.

CAMPO, R. J.; ARAUJO, R.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v. 48, n. 1-3, p. 154-163, 2009.

COELHO, L. F. et al. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus spp.* com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 6, p. 1413–1420, 2007.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira 2018/2019**. 2019. p. 126. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf>

COSTA, M. R. et al. Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação e a produtividade da cultura. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.3, p.186-192, 2013.

DARTORA, J. et al. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1023–1029, 2013.

DEY, R.; PAL, K. K.; TILAK, K. V. B. R. Influence of soil and plant types on diversity of rhizobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 82, n. 3, p. 341–352, 2012.

DOBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, p. 357–365, 1966.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 1, p. 227–243, 2012.

EHLERINGER, J.; BJORKMAN, O. Quantum Yields for CO₂ Uptake in C₃ and C₄ Plants: Dependence on Temperature, CO₂, and O₂ Concentration. **Plant Physiology**, v. 59, n. 1, p. 86–90, 1977.

FERNANDES, J.; LIMA, B. Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 2, p. 142–150, 2014.

FLORENTINO, L. A. et al. Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indol acético em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas**, v. 11, n. 1, p. 89–96, 2017.

FUKAMI, J. et al. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites

promote maize growth. **AMB Express**, v.7, n. 1, p. 1–13, 2017.

FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2016.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1–9, 2015.

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

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 30–9, 2014.

HUNGRIA, M. et al. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 143–154, 2010.

KAPPES, C. et al. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 527–538, 2013.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2 nd ed. Rio de Janeiro: Guarnabara Koogan, 2008.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. 4. ed. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda, 1986.

LÓPEZ, L. V.; HERRERA, A. M. *Azospirillum*: habitante de la gramíneas. **La Ciencia y el Hombre**, v. 27, p. 2–5, 2017.

LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o controle de nematoide das galhas. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 2, p. 343–350, 2013.

LUO, S. et al. Isolation and characterization of endophytic bacterium LRE07 from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and its potential for remediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1637–1644, 2011.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. Circular Técnica 76 - Fisiologia da Produção de Milho. In: BARBOSA, T. M. A. (Ed.). **Circulares Técnicas Embrapa**. 1. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. v. 1p. 10.

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

MEDEIROS, F. H. V. et al. Effect of bacteria on the biology of Diamondback moth (*Plutella xylostella*) on cabbage (*Brassica oleraceae* VAR. *capitata*) cv. Midori. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 2, p. 204–212, 2005.

- MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 110–121, 2014.
- MORAIS, T. P. et al. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. **Revista de Ciências Agrônômica**, v. 47, n. 2, p. 290–298, 2016.
- MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74–99, 2010.
- NASCIMENTO, M. S. et al. Detection of cytokins and gibberelins by endophytic bacteria associated with passionfruit plants (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa*). **Revista Craibeiras de Agroecologia**, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2018.
- NOVAKOWISKI, J. H. et al. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. January 2016, p. 1687–1698, 2011.
- OFFEMANN, L. C. et al. Interação entre bactérias *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* com adubação nitrogenada, visando o fornecimento de nitrogênio para o milho. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. sup, p. 276–280, 2015.
- OLIVEIRA, R. P. et al. *Azospirillum brasilense* inoculation and management of fertilizer nitrogen in maize. **Brazilian Journal of Agriculture**, v. 93, n. 3, p. 347–361, 2018.
- PEREIRA, C. E. et al. Tratamentos inseticida, peliculização e inoculação de sementes de soja com rizóbio. **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p. 653–658, 2010.
- PEREIRA, C. C. M. S. et al. Componentes bioquímicos e crescimento de meloeiro sob estresse hídrico associado à *Meloidogyne incognita* e *Bacillus spp.* **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 10, n. 4, p. 739–749, 2016.
- PEREIRA, L. C. et al. Rendimento do trigo (*Triticum aestivum*) em resposta a diferentes modos de inoculação com *Azospirillum brasilense*. **Revista Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 106–114, 2017.
- QUADROS, P. D. et al. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014.
- RADWAN, T. E. E.; KAMEL, Z.; MASSENA, V. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 987–994, 2004.
- REIS, F. B. et al. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1139–1146, 2008.
- SANTOS, I. B. et al. Diazotrophic bacteria associated to roots of sugarcane: inorganic phosphate solubilization and the salinity tolerance. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 142–149, 2012.

SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016.

SHELUD, A. V et al. Wheat Root Colonization by *Azospirillum brasilense* Strains with Different Motility. **Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 688–695, 2010.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S. Isolamento e seleção massal de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica à mancha-bacteriana-pequena do tomateiro. **Revista Ceres**, v. 51, n. 295, p. 345-354, 2004.

SILVA, T. F. et al. Non-symbiotic diazotrophic bacteria and the rooting of olive semi-hardwood cuttings (*Olea europaea* L.). **Ciência Florestal**, v. 27, n. 1, p. 61–71, 2017.

SOUZA JÚNIOR, I. T. et al. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1259–1267, 2010.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6 th ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VOGEL, G. F.; FEY, R. Stimulation of germination and physiological potential of rye and triticale by *Azospirillum brasilense*, submitted to chemical seed treatment. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 4, p. 493–498, 2016.

3 CAPITULO II: MORFOMETRIA E PRODUÇÃO DE MILHO INOCULADO
COM *Azospirillum brasilense*

Morfometria e produção de milho inoculado com *Azospirillum brasilense*

O objetivo do estudo foi analisar a influência de métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense* em parâmetros morfométricos da cultura do milho. Foram cultivadas plantas de milho híbrido Formula VT[®] sob diferentes formas de inoculação: ausência de inoculação; inoculação via semente; inoculação via foliar; inoculação via semente associada a foliar. Nos estádios fenológicos V8 e VT foram mensurados número de folhas, altura de parte aérea, volume de raiz, diâmetro de colmo, massa seca de folha, colmo e bainha, raiz e total, além dos teores de nitrogênio, fósforo e potássio foliar. No estágio R6, junto as análises anteriores, analisou-se diâmetro e comprimento de espiga, número de fileiras, número de grãos por fileira, massa de estrutura reprodutiva e de mil grãos e número total de grãos, e os teores de nitrogênio, fósforo e potássio dos grãos. Quinzenalmente, foi mensurado o índice SPAD dos terços apical, mediano e basal foliar. Os métodos de inoculação pouco influenciaram em parâmetros morfométricos e nutricionais do desenvolvimento do milho, não influenciando na produção. A inoculação via semente e via foliar associado a semente influenciou positivamente nas plantas quanto ao diâmetro de colmo, massa seca foliar, volume de raiz, e aos teores de nitrogênio, fósforo e potássio.

Palavras-chave: Promoção de crescimento vegetal; teor relativo de clorofila; *Zea mays* L

Introdução

O processo de desenvolvimento vegetal abrange etapas de produção, consumo e acúmulo de energia, visando-se obter descendentes ao fim do ciclo que propagem a espécie. Esses processos têm início na absorção de água, luz e nutrientes, com reflexo direto sobre um produto, a massa.

A massa representa o quanto foi absorvido e convertido de metabólitos, que resultaram nas reservas do descendente. No milho (*Zea mays* L.), o acompanhamento do acúmulo de massa ao longo do ciclo é importante para definição da demanda hídrica, nutricional e luminosa de acordo com a fase fenológica. Concomitante à demanda

evapotranspirativa imposta pela atmosfera acontecem os processos de absorção, transporte e transpiração dos organismos vegetais, os quais visam suprir as necessidades fisiológicas e nutricionais da cultura, estando intimamente ligados a fotossíntese, limitando a assimilação de carbono e a conversão de metabolitos em matéria seca (Taiz et al., 2017).

A associação de poáceas com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) destacou-se nas pesquisas devido ao potencial desses microrganismos associativos de fixação biológica de nitrogênio, mas na atualidade têm-se buscado descobrir e compreender outros potenciais desses microrganismos, em especial relacionados a capacidade de produção de fitohormônios, influência na tolerância a situações de déficit, solubilização de fosfatos minerais, controle biológico, entre outros (Glick, 2012; Guimarães et al., 2017).

O gênero *Azospirillum* é amplamente utilizado em pesquisas com a cultura do milho (Bulegon et al., 2017; Morais et al., 2017; Sangoi et al., 2015). Estudos têm buscado entender como a promoção de crescimento estimulada por esses microrganismos pode reduzir custos e aumentar a produtividade. Contudo, BPCV possuem ampla gama de atuação resultando em diferentes efeitos no desenvolvimento vegetal. Essa versatilidade é influenciada inclusive em relação ao local de inoculação dos microrganismos na planta, refletindo nas respostas obtidas.

Estudos de Morais et al. (2016), visando avaliar o efeito de doses de inoculante a base de *Azospirillum brasilense* no sulco de semeadura combinado com doses de adubação nitrogenada, revelam que o uso da inoculação influencia na produção de grãos, e que a técnica de aplicação no sulco se mostra eficiente em regiões do Cerrado brasileiro.

Visando reduzir custos de produção, associando microrganismos a redução de doses de fertilizante inorgânico, Garcia et al. (2017) que ao usar *A. brasilense* junto a

variações, para mais e para menos, da dose ideal de nitrogênio, a metade da dose associada ao inoculante proporciona desempenho agrônômico superior no milho, em especial no rendimento de grãos, massa de mil grãos e matéria seca de parte aérea e raízes.

Avaliando o efeito da inoculação com *A. brasilense* no milho segunda safra, Costa et al (2015) ao testar três métodos de inoculação (ausência de inoculante, inoculação via semente e inoculação via foliar) associado a doses de adubação, relatam que plantas inoculadas apresentaram desempenho superior quanto à altura de plantas, acúmulo de biomassa, tamanho de espiga, teor de clorofila e produção de grãos, quando comparadas ao controle não inoculado, independente do método utilizado.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi analisar a influência de métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense* em parâmetros morfométricos da cultura do milho.

Material e métodos

Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação modelo “em duas águas” coberta com placas de policarbonato alveolar com espessura de 10,00 mm e tratamento contra raios ultravioleta. O sistema de resfriamento utilizado foi o de painéis evaporativos “Humid Cool”, com temperatura, umidade do ar e temperatura do ponto de orvalho monitorados de hora em hora utilizando o datalogger Easy Log (modelo EL-USB-2-LCD) (Figura 1).

A estrutura está localizada na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido “Prof. Dr. Mário César Lopes” pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus Marechal Cândido Rondon, município localizado na região Oeste do Paraná, com o clima classificado como

Cfa mesotérmico úmido (Peel, Finlayson & McMahon, 2007), altitude média de 420 m e coordenadas geográficas 54° 22' W e 24° 46' S.

Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados (DBC), composto de quatro tratamentos e seis repetições. Os tratamentos consistiram em quatro métodos de inoculação: ausência de inoculação; inoculação via semente no momento do plantio; inoculação via foliar no estágio V4 (50% das plantas com 4 folhas completamente expandidas); e inoculação via semente associada a via foliar (no momento do plantio e no estágio V4, respectivamente).

Implantação e tratos culturais

Como unidades experimentais foram utilizados vasos de polietileno com capacidade para 25 dm³ (35 cm de altura, 34 cm de diâmetro) preenchidos com solo da área experimental. O solo, classificado como LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef) de textura muito argilosa, retirado do horizonte A (Santos et al., 2013), apresentava as seguintes características químicas: pH (CaCl₂): 5,32; matéria orgânica: 10,25 g dm⁻³; P disponível (Mehlich⁻¹): 112,06 mg dm⁻³; K (Mehlich⁻¹): 0,45 cmol_c dm⁻³; Ca²⁺ (KCl 1 mol L⁻¹): 5,51 cmol_c dm⁻³; Mg²⁺ (KCl 1 mol L⁻¹): 1,03 cmol_c dm⁻³; Al³⁺ (KCl 1 mol L⁻¹): 0,00 cmol_c dm⁻³; H+Al (pH SMP 7,5): 3,73 cmol_c dm⁻³; soma de bases (SB): 7,00 cmol_c dm⁻³; saturação de bases (V): 65,23%. Este foi adubado com 1900 mg dm⁻³ de N na forma de ureia, 590 mg dm⁻³ de K na forma de KCl, e ainda, 162 mg dm⁻³ de Zn na forma de sulfato de zinco, como recomendado por Novaes et al. (1991) para cultivos em vaso.

Sementes de milho híbrido Fórmula Viptera®, de ciclo superprecoce e alta produtividade, foram inoculadas com as estirpes Abv5 e Abv6 da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense*, 30 minutos antes da semeadura (a escolha

do híbrido foi baseada em sua alta utilização pelos produtores locais além de sua boa adaptabilidade as condições climáticas da região). Foi utilizado inoculante comercial Nitro 1000 Gramíneas, da empresa Nitro 1000, na concentração de $2,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, na dose de 100 mL do inoculante para 60.000 sementes. Para a aplicação via foliar, o mesmo inoculante foi utilizado, na dosagem de 600 mL ha⁻¹ em 100 L de água, aplicado via pulverização, com auxílio de pulverizador costal, com pressão constante 40 kgf cm⁻², mantido por CO₂.

A semeadura foi realizada de forma manual ao final da tarde do dia 10/10/2017 sob condições de temperaturas médias de 25 °C e umidade relativa do ar em torno de 55% (Figura 1). Foram semeadas seis sementes por vaso com posterior raleio para a condução de duas plantas por vaso. Aos 16 dias após a semeadura (DAS), novamente ao final da tarde com temperatura média de 25 °C e umidade relativa do ar média próxima a 50% (Figura 1), foi realizada a inoculação via foliar, no estágio V4 da cultura. Os tratos culturais e regas foram realizados conforme a necessidade da cultura ao longo do ciclo.

Avaliações realizadas

Aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a emergência (DAE), as plantas foram analisadas quanto ao teor relativo de clorofila (índice SPAD) do terço apical, mediano e basal (três, dois e um terço do comprimento da folha, respectivamente a partir da base) utilizando o medidor portátil SPAD 502 plus Konica Minolta.

Nos estádios V8, VT e R6 de desenvolvimento da cultura do milho, as plantas foram avaliadas morfometricamente quanto às variáveis destrutivas e não destrutivas. Foram mensurados o número de folhas; a altura de parte aérea, com auxílio de trena graduada, expresso em cm; diâmetro de colmo, com auxílio de paquímetro digital, expresso em mm.

Para determinação da área foliar, foi utilizando a metodologia de Benincasa (2003), onde secções de tamanho conhecido em cm² foram retiradas da lamina foliar, evitando-se a nervura central, e consideradas como área foliar da amostra (AF amostra). Essas amostras foram acondicionadas em sacos de papel kraft e secas em estufa de circulação forçada a 65 °C ± 3 °C durante 72 horas. Após, foi mensurado a massa seca da amostra em balança analítica de precisão, obtendo-se a massa seca da amostra em g (MS amostra). Por fim, foi mensurada a área foliar total de acordo com a seguinte fórmula:

$$AF \text{ Total} = \frac{AF \text{ amostra} \times MSF}{MS \text{ amostra}}$$

onde MSF representa a massa seca total das folhas da planta em g. AFTotal foi expressa em cm².

Para determinação do volume radicular foi utilizado o método de deslocamento de volumes. As raízes foram lavadas e o excesso de umidade foi retirado com papel toalha. Em seguida, procedeu-se a mensuração via método de deslocamento de líquidos em proveta graduada de vidro de 500 mL, onde foi adicionado 250 mL de solução composta por 90% de água e 10% de álcool etílico 70%, usado na quebra da tensão superficial da água, visando eliminar a formação de bolhas de ar. As raízes foram depositadas na solução até estarem completamente submersas, e então foi realizada a leitura, determinando o volume em cm³.

As plantas foram seccionadas em folha, colmo e bainha, raiz e em estrutura reprodutiva (avaliada apenas no estágio R6), armazenadas em sacos de papel kraft e acondicionadas para secagem em estufa de circulação de ar forçada a 65 °C ± 2 °C durante 72 horas, para obtenção da massa seca de folha, colmo e bainha, raiz, estrutura reprodutiva e total, expressa em g.

No estágio R6, foram determinados os componentes da produção: diâmetro de espiga, com auxílio de paquímetro digital, expresso em mm; comprimento de espiga, com

auxílio de trena graduada, expressa em cm; número de fileiras; número de grãos por fileira; e, após secagem em estufa até atingir 13% de umidade, massa de estrutura reprodutiva, massa de 100 grãos e massa total de grãos, expressas em g.

O material resultante da secagem, folhas e grãos, passou por moagem em moinho de facas tipo Willey em peneira de malha mesh 20. Em seguida, foi realizada a digestão sulfúrica do material vegetal em bloco de aquecimento até 375 °C (Lana et al., 2016). Da amostra resultante foram determinados os teores de nitrogênio, via arraste de gases Kjeldahl; fósforo, via espectrofotometria por colorimetria; e potássio, via espectrofotometria de absorção atômica (Lana et al., 2016). O valor determinado de cada nutriente foi expresso em g kg^{-1} de matéria seca.

Análise estatística

Os dados foram tabulados e submetidos à análise de variância pelo teste F de Fisher-Snedecor e, se significativos, comparados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro com o auxílio do software estatístico SISVAR (Ferreira, 2014).

Resultados

Na figura 2 são apresentados os teores relativos de clorofila nos terços apical, mediano e basal foliar, mensurados quinzenalmente ao longo do ciclo de cultivo da cultura do milho, em resposta aos métodos de inoculação, em casa de vegetação.

Apenas aos 45 dias após a emergência (DAE) houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) no terço foliar apical (Figura 2A) entre os métodos de aplicação. No terço mediano (Figura 2B), não houve diferença estatística entre os métodos de inoculação em nenhum dos tempos avaliados. Aos 15 DAE, no terço basal (Figura 2C), houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os métodos testados, onde o índice SPAD em plantas controle foi superior ao das plantas que receberam aplicação via semente.

Aos 45 DAE (Figura 2A), o terço foliar apical apresentou elevado teor relativo de clorofila. Plantas submetidas ao método de inoculação via semente apresentaram médias maiores às plantas submetidas aos demais métodos de inoculação. Entretanto, no terço basal (Figura 2C), houve drástica redução do teor relativo de clorofila. Neste período de avaliação foi constatada temperaturas elevadas, variando em temperaturas médias de 24°C a 30°C e umidade relativa média entre 60 e 85%. Posteriormente a estes dois períodos destacados, os terços analisados das plantas não apresentaram diferença estatística nos valores de índice SPAD em relação aos métodos inoculação testados.

Na tabela 1 estão apresentadas as variáveis morfométricas analisadas em três estádios fenológicos do milho. No estágio V8, o diâmetro basal de colmo e massa seca de parte aérea diferiram estatisticamente em função dos métodos de inoculação. Para o diâmetro basal de colmo destaca-se que plantas inoculadas via foliar podem ter apresentado maior custo metabólico, gastando energia com outros parâmetros de desenvolvimento, reduzindo o acúmulo de fotoassimilados no colmo e, conseqüentemente, reduzindo o diâmetro.

A resposta para o acúmulo de massa seca foliar no estágio fenológico V8 foi semelhante à do diâmetro basal de colmo. Plantas inoculadas via foliar converteram menor quantidade de biomassa seca, contudo, não diferiram das plantas controle e das que receberam inoculação via semente. Plantas inoculadas associando via semente e foliar apresentaram maiores médias de acúmulo de massa seca.

No estágio VT (Tabela 1), os parâmetros massa seca de folhas, massa seca total e teores foliares de nitrogênio e potássio diferiram estaticamente em função dos métodos de inoculação. A massa seca foliar e a massa seca total apresentaram a mesma resposta observada no estágio V8, onde plantas inoculadas associando os métodos via semente e

foliar apresentaram maiores médias, aproximadamente 30% superiores às obtidas em plantas inoculadas apenas via foliar.

Quanto aos teores de nitrogênio, fósforo e potássio obtidos em folhas no estágio fenológico VT (Tabela 1), plantas inoculadas via semente apresentaram maiores teores de nitrogênio foliar, com médias estatisticamente semelhantes às plantas inoculadas via foliar. Contudo, quanto ao teor de potássio, as maiores médias foram obtidas em plantas controle, que não diferiram estatisticamente de plantas inoculadas com associação via semente e foliar, mas foram estatisticamente superiores as plantas submetidas aos demais métodos de inoculação testados.

No estágio fenológico R6 (Tabela 1), as variáveis volume de raiz e teores foliares de fósforo e potássio diferiram estatisticamente em função dos métodos de inoculação. O volume de raiz das plantas controle foi estatisticamente superior às plantas inoculadas via foliar e via semente, mas não diferiu do obtido para plantas inoculadas associando via semente e foliar. Essa diferença não foi significativa nos estádios fenológicos anteriores.

O teor foliar de fósforo foi estatisticamente superior em plantas que receberam inoculação via semente. O teor de potássio foi estatisticamente superior em plantas que receberam inoculação via foliar. Quanto aos componentes da produção do milho (Tabela 2), houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) apenas para o diâmetro de espiga, cujas plantas inoculadas via semente apresentaram médias maiores às plantas controle e as inoculadas pelos demais métodos de inoculação.

Discussão

Os dados obtidos para o índice SPAD (Figura 2) no início do desenvolvimento (entre 15 e 45 DAE) foram inferiores ao encontrado na literatura em todas as fases de desenvolvimento da cultura (Argenta et al. 2001; Costa et al. 2015; Sangoi et al. 2015; Mortate et al. 2018), considerando-se plantas com aparato fotossintético em plena

atividade e com o fornecimento recomendado de nitrogênio.

Os estudos do fornecimento de nitrogênio via fixação biológica de nitrogênio por bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) tiveram seu espaço reduzido ao longo da evolução das pesquisas quando descobriu-se outras funções que podem ser a elas atribuídas, em especial a produção de fitohormônios (Glick, 2012). Os fitohormônios, em especial a auxina, atuam no desenvolvimento vegetal, promovendo crescimento (Guimarães et al., 2017; Leyser, 2010). Desta forma, no estágio de desenvolvimento inicial da cultura do milho, a grande demanda por energia e nutrientes, estimulada pela promoção de crescimento via colonização bacteriana, pode ter influenciado na distribuição de clorofila para a planta, reduzindo os teores foliares pela redistribuição.

No terço apical foliar (Figura 2A), os teores relativos de clorofila para o estágio fenológico V8 foram reduzidos, independentemente do método de inoculação testado. Durante este estágio fenológico (V8) são altas as taxas de desenvolvimento vegetal, influenciando na distribuição dos componentes assimilados aos órgãos em desenvolvimento na planta, elevando a demanda nutricional.

As variáveis destrutivas analisadas demonstram que plantas inoculadas via semente e via semente associada a foliar apresentaram diâmetro basal de colmo e matéria seca foliar estatisticamente superiores, com elevado teor de nitrogênio foliar. Esta resposta de aumento de colmo já foi constatada em outros estudos, assim como elevação da matéria seca foliar. Guimarães et al. (2014), analisando o desenvolvimento da cultura do milho em diferentes tipos de solo, em função da inoculação com *A. brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, destacam que plantas inoculadas apresentaram desenvolvimento superior às não inoculadas em solos com característica de Latossolos

Eutroféricos, Argissolos Distroféricos e Argissolos Eutroféricos, em especial quanto ao acúmulo de matéria seca.

Calvo et al. (2016) analisaram como inoculantes a base de *Bacillus* spp. afetam o desenvolvimento vegetal e os teores nutricionais, em diferentes estádios fenológicos do milho junto a diferentes fontes de nitrogênio (Ureia; nitrato de amônia e cálcio; e nitrato de amônia e ureia), destacam que houve promoção de crescimento em plantas inoculadas e que o uso de microrganismo, junto a adubação nitrogenada, resultou em índice SPAD estatisticamente superior às plantas controle, assim como altura de planta, massa seca e diâmetro de colmo.

Neste sentido, Battistus et al. (2014) citam que a inoculação com microrganismos promotores de crescimento pode atuar positivamente no desenvolvimento fisiológico das plantas. Testando como o resultado da inoculação é afetado em sementes submetidas a dosagens de Thiametoxam, os autores concluíram que o composto é tóxico à população de *A. brasilense*, contudo, associando-se o microrganismo com o tratamento de sementes, pode ocorrer ganhos quanto a qualidade fisiológica das plantas, aumento em variáveis morfológicas, assim como, na velocidade de emergência de plântulas.

Durante o estágio fenológico V12 (aproximadamente 50 DAS), a alta sensibilidade a variações edafoclimáticas bruscas pode justificar a redução registrada no teor relativo de clorofila no terço inferior foliar (Figura 1; Figura 2B). Ao analisar a inoculação com *Rhizobium phaseoli* e *Mesorhizobium ciceri* no milho em dois locais, Baqir Hussain et al. (2016) relatam aumento no teor de clorofila foliar em relação ao controle para plantas inoculadas com *Mesorhizobium ciceri* RS-8 e RS-12 e *Rhizobium phaseoli* RS-3, em dois locais a campo, em relação ao controle. Usado para diagnose em café, a metodologia do teor indireto de clorofila foliar destaca-se como um avançado

método não destrutivo para estudar processos específicos da planta, em especial ligados a fotossíntese (Netto et al., 2005).

Durante a fase de pendramento (VT) é elevada a taxa de desenvolvimento da planta, visando a produção de grãos de pólen viáveis, sendo assim, maior sua demanda por água, nutrientes e luz (Taiz et al., 2017). Plantas inoculadas via semente associada a foliar, que apresentaram o maior acúmulo de massa, apresentaram menores concentrações dos teores nutricionais de nitrogênio e potássio. Ao crescer, a planta consome os nutrientes necessários e distribui o armazenado em diferentes locais de seu organismo, dessa forma, essas plantas com maior massa, podem ter redistribuído seus nutrientes em mais locais do que as menores, reduzindo assim a concentração dos mesmos.

Durante o florescimento (R1, aproximadamente 70 DAS) a estabilidade encontrada nas leituras de SPAD pode estar relacionada ao fato de a planta direcionar metabolitos visando obter um índice de fecundação adequado, assim, mantendo a produção, mas sem direcioná-los prioritariamente ao acúmulo de massa.

Quando em fase reprodutiva, as plantas visam garantir a sobrevivência dos descendentes em todas as situações (Souza et al., 2010), portanto na fecundação, qualquer necessidade biológica (hídrica, nutricional ou biológica) não direcionada a produção de embrião viável, é considerada secundária, sem destacar-se.

O mesmo acontece no restante do período de enchimento de grãos, onde as plantas mantêm suas funções básicas de desenvolvimento, direcionando a maior concentração de metabolitos produzidos para o grão, garantindo que situações de estresse sejam contornadas, como ocorre com o índice SPAD, que se mantêm constante, garantindo a produção fotossintética necessária para a sobrevivência.

No estágio de desenvolvimento R6 (Tabela 1), os resultados encontrados para volume de raiz, onde o tratamento controle foi superior aos demais, se adequa ao

encontrado na literatura utilizando nitrato de amônia como fonte de adubação (Calvo et al., 2016). Estes autores relatam que, para diferentes fontes nitrogenadas, houve variação no comportamento do desenvolvimento radicular. Ainda, na ausência de adubação nitrogenada, os autores obtiveram médias 40% maiores em plantas inoculadas do que no tratamento controle.

O acúmulo de nutrientes na parte aérea no estágio fenológico R6 foi superior em plantas inoculadas (Tabela 1). Além da fixação biológica de nitrogênio e produção de fitohormônios, bactérias do gênero *Azospirillum* são citadas como solubilizadoras de fontes de fósforo no solo, aumentando sua disponibilidade na forma utilizável para a planta (Castillo et al., 2015; Glick, 2012).

O acompanhamento do teor relativo de clorofila ao longo do tempo é uma ferramenta imprescindível para a compreensão da evolução vegetal ao longo do ciclo. Diretamente relacionado ao teor de nitrogênio vegetal e, conseqüentemente a produtividade (Argenta et al., 2001), no estudo foi possível notar como os índices se mantêm constantes, independentemente do método de inoculação, após o início da fase reprodutiva da planta, onde o crescimento vegetal se torna secundário em função da produtividade.

Neste sentido, plantas inoculadas sempre apresentaram índices menores de SPAD a partir dos 60 DAS, reduzindo gradativamente em relação ao controle até a análise final aos 90 DAS. Estudos têm afirmado que o processo de senescência vegetal na cultura do milho se inicia no estágio VT da cultura (Lafarge and Hammer, 2002; Sadras et al., 2000; Sangoi et al., 2014), baseando-se no equilíbrio entre a redução da produção de auxina e aumento da produção de etileno, que estimula a formação de enzimas de quebra, que atuam degradando paredes, levando a abscisão foliar (Taiz et al., 2017).

De acordo com o afirmado, a partir do estágio VT as folhas deveriam iniciar seu processo de envelhecimento, ativando uma série de processos bioquímicos. Entre esses processos existe a degradação da clorofila foliar que resulta no amarelecimento foliar no final do ciclo das culturas (Taiz et al., 2017). Contudo, as plantas inoculadas, diferente do controle, não apresentaram pequenos sinais de redução do teor de clorofila foliar nas análises do final do ciclo, apresentando até pequenos aumentos, como no terço superior.

Entre as ações bacterianas relacionadas ao processo de senescência, a influência na produção de etileno é o destaque principal, onde a bactéria usa o precursor do hormônio, ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) como fonte de energia, impedindo a formação do etileno pela planta (Glick, 2014). Junto a isso, existe o fato da bactéria agir na produção de auxina, que, quando em altas concentrações, também inibe a produção de etileno (Spaepen and Vanderleyden, 2011; Woodward and Bartel, 2005).

A maior concentração nutricional de plantas inoculadas também pode estar aliada a essa característica, onde plantas verdes ainda produzem e assimilam nutrientes para então translocar para os órgãos de reserva. Desta maneira, a inoculação pode ter influenciado no “período verde” da planta refletindo no tempo pré-senescência do milho cultivado.

Conclusão

Os métodos de inoculação com *A. brasilense* pouco influenciaram em parâmetros morfométricos e nutricionais do desenvolvimento do milho, não influenciando na produção.

Plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*, via semente e via semente associado à pulverização foliar, destacaram-se positivamente quando a diâmetro de colmo, massa seca foliar, volume de raiz, e aos teores de nitrogênio, fósforo e potássio.

Referencias

- Argenta G, Silva PRF da, Bortolini GC. 2001. Leaf Chlorophyll As an Index of Nitrogen Status in Cereals. *Ciência Rural*. 31: 715–722.
- Baqir Hussain M, Mehmood S, Ahmad Zahir Z, Naveed M, Imran M, Ahmad I, Ahmed N, Nawaz H. 2016. Modulating Nutrition, Physiology and Production of Maize Through *Rhizobium phaseoli* and *Mesorhizobium ciceri* Inoculation under Drought Stress Conditions. *Int. Conf. Water Resour. Arid Environ*. 7: 549–559.
- Battistus AG, Hachmann TL, Mioranza TM, Müller MA, Madalosso T, Favorito PA, Guimarães VF, Klein J, Kestring, D, Inagaki AM, Bulegon LG. 2014. Synergistic action of *Azospirillum brasilense* combined with thiamethoxan on the physiological quality of maize seedlings. *African J. Agric. Res*. 13: 4501–4507.
- Benincasa MMP. 2003. Análise de crescimento de plantas: noções básicas. FUNEP, São Paulo.
- Bulegon LG, Inagaki AM, Moratelli G, Da Costa NV, Guimarães VF. 2017. Phytotoxicity of mesotriona in corn with *Azospirillum brasilense* associated nitrogen fertilization. *Rev. Bras. Ciências Agrar*. 12: 325–331.
- Calvo P, Watts DB, Kloepper JW, Torbert HA. 2016. Effect of microbial-based inoculants on nutrient concentrations and early root morphology of corn (*Zea mays*). *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 000: 1–15.
- Castillo P, Molina R, Andrade A, Vigliocco A, Alemano S, Cassán FD. 2015. Phytohormones and Other Plant Growth Regulators Produced by PGPR: The Genus *Azospirillum*, in: Cassán, F.D., Okon, Y., Creus, C.M. (Eds.), *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols*. Springer, pp. 115–138.
- Costa RRGF, Quirino G da SF, Naves DC de F, Santos CB, Rocha AF de S. 2015. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. *Pesqui Agropecuária Trop*. 45:304–311.
- Ferreira DF. 2014. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Cienc. e Agrotecnologia* 38: 109–112.
- Garcia MM, Pereira LC, Braccini AL, Angelotti P, Suzukawa AK, Marteli DCV, Felber PH, Bianchessi PA, Dametto IB. 2017. Effects of *Azospirillum brasilense* on growth and yield compounds of maize grown at nitrogen limiting conditions. *Rev Ciências*

- Agrárias. 40:353–362.
- Glick BR. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169: 30–9.
- Glick BR. 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica (Cairo). 2012: 1–15.
- Guimarães VF, Battistus AG, Souza AKP, Bulegon LG, Offemann LC, Inagaki AM. 2017. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal: da FBN à regulação hormonal, possibilitando novas aplicações, in: Zambom MA, Kuhn OJ, Silva NLS da, Stangarlin JR, Nunes RV, Fulber VM, Eyng C (Eds.). *Ciências Agrárias: Ética Do Cuidado, Legislação e Tecnologia Na Agropecuária*. Centro de Ciências Agrárias/Unioeste, Marechal Candido Rondon, pp. 193–212.
- Guimarães VF, Menegus EA, Silva ASL, Pinto Jr AS, Klein J, Rampim L, Schwantes D, Rodrigues ACPC, Kestring D, Inagaki AM, Battistus AG, Offemann LC, Bulegon LG, Souza AKP. 2014. Morphophysiological characteristics of maize inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* as seed treatment , cultivated in different types of soil. *African J. Agric. Res.* 9: 2919–2924.
- Lafarge TA, Hammer GL. 2002. Predicting plant leaf area production: Shoot assimilate accumulation and partitioning, and leaf area ratio, are stable for a wide range of sorghum population densities. *F. Crop. Res.* 77: 137–151.
- Lana MC, Frandoloso JF, Fey R, Richardt A, Fontaniva S. 2016. *Análise química de solo e de tecido vegetal: metodologias analíticas*. 2. ed. Cascavel: EDUNIOESTE, 155 p.
- Leyser O. 2010. The Power of Auxin in Plants. *Plant Physiol.* 154: 501–505.
- Morais GP, Gomes VFF, Mendes Filho PF, Almeida AMM de, Silva Júnior JMT da. 2017. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Rev. Agropecuária Técnica* 38: 109–116.
- Morais TP de, Brito CH de, Brandão AM, Rezende WS. 2016. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. *Rev Ciência Agronômica.* 47:290–298.
- Mortate RK, Nascimento EF, Souza EG De, Wendell M, Lima DP. 2018. Resposta do milho (*Zea mays* L.) à adubação foliar e via solo de nitrogênio. *Rev Agric Neotrop.* 5:1–6.

- Netto AT, Campostrini E, Oliveira JG de, Bressan-Smith RE. 2005. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 104: 199–209.
- Novaes RF de, Neves JCL, Barros NF de. 1991. Ensaio em ambiente controlado, in: Oliveira, A.J. de, Garrido, W.E., Araujo, J.D. de, Lourenço, S. (Eds.), *Métodos de Pesquisa Em Fertilidade Do Solo*. Embrapa-SE, Brasília, pp. 189–253.
- Peel MC, Finlayson BL, McMahon, TA. 2007. Mapa mundial actualizado da classificação climática de Köppen-Geiger, *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 11, 1633-1644.
- Sadras VO, Echarte L, Andrade FH. 2000. Profiles of leaf senescence during reproductive growth of sunflower and maize. *Ann. Bot.* 85: 187–195.
- Sangoi L, da Silva LMM, Mota MR, Panison F, Schmitt A, de Souza NM, Giordani W, Schenatto DE. 2015. Desempenho agrônômico do milho em razão do tratamento de sementes com *Azospirillum* sp. e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 39: 1141–1150.
- Sangoi L, Junior GJP, Vargas VP, Vieira J, Schmitt A, Zoldan SR, Siega E, Carniel G. 2014. Cobertura nitrogenada como estratégia para reduzir os prejuízos da desfolha em diferentes estádios fenológicos do milho. *Semin. Agrar.* 35: 671–682.
- Santos HG dos, Jacomine PKT, Anjos LHC dos, Oliveira VÁ de, Lumbreras JF, Coelho MR, Almeida JA de, Cunha TJF, Oliveira JB de. 2013. *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*, 3rd ed. Embrapa, Brasília.
- Souza GS, Santos AR, Silva JS. 2010. *Manual de Fisiologia Vegetal*, 1st ed. Edufma, São Luiz.
- Spaepen S, Vanderleyden J. 2011. Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: 1–13.
- Taiz L, Zeiger E, Max I, Angus M. 2017. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*, 6 th. ed. Artmed, Porto Alegre.
- Woodward AW, Bartel B. 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95: 707–735.

Figuras e Tabelas

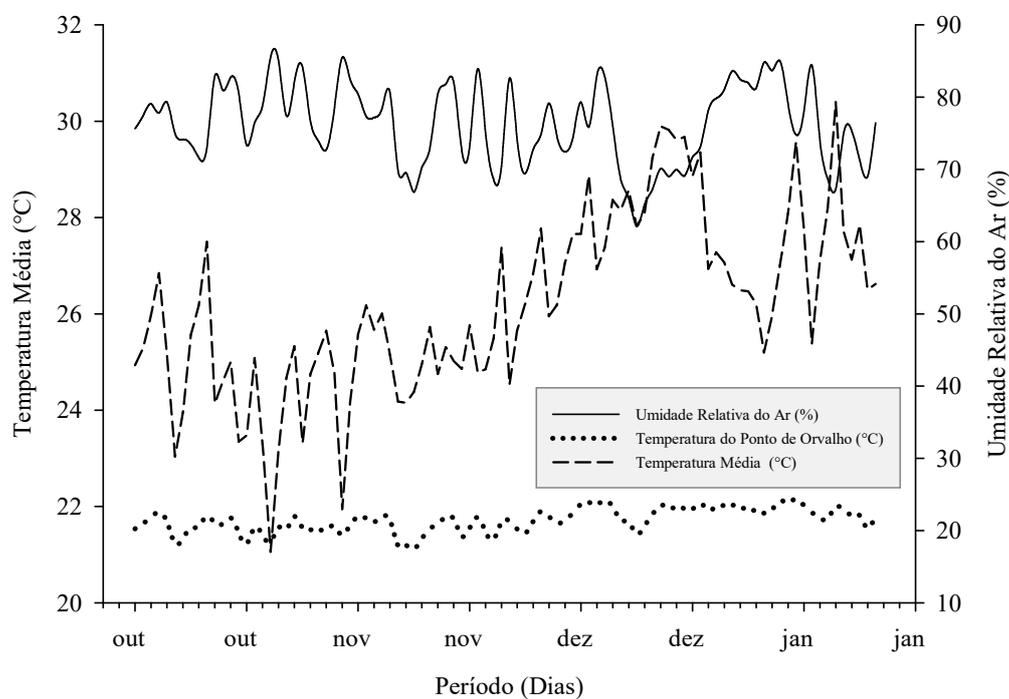


Figura 1. Condições de umidade relativa do ar, temperatura do ponto de orvalho e temperatura média em ambiente de cultivo protegido, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, nos anos de 2017 e 2018 (A autora, 2018).

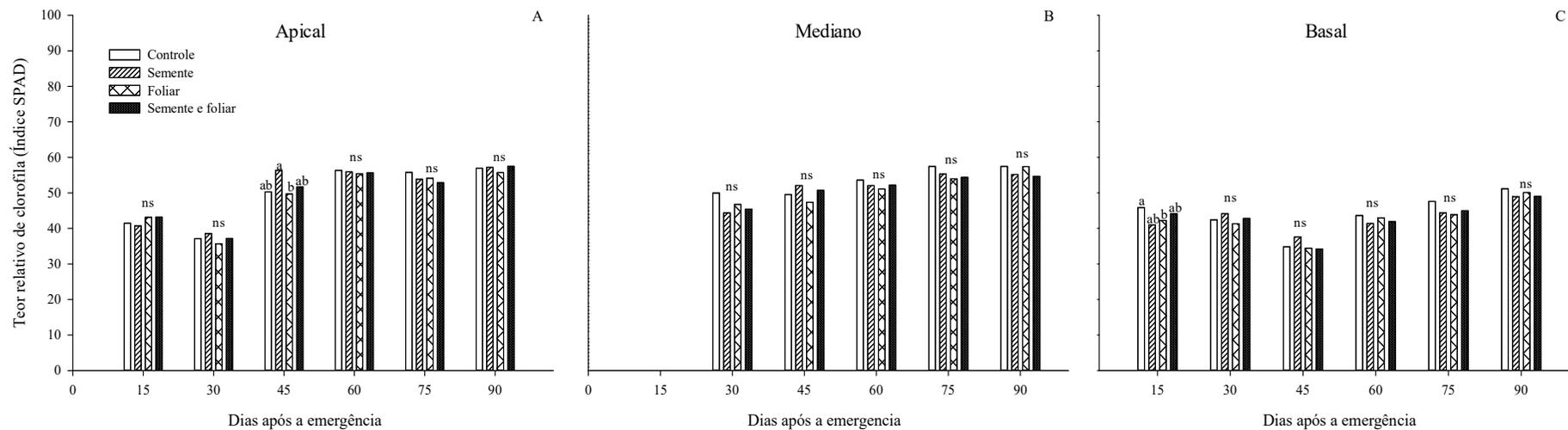


Figura 2. Análise quinzenal do teor relativo de clorofila, do terço foliar apical (A), mediano (B) e basal (C), de plantas de milho híbrido Formula VT[®] submetidas a diferentes métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense*. *letras minúsculas diferentes entre si apresentam diferença entre os métodos de inoculação a 5% de probabilidade de erro de acordo com o teste de Tukey, comparando os tratamentos isoladamente no dia da análise. ns – não significativo a 5% de probabilidade de erro de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 1. Análise dos componente morfometricos número de folhas (NF), altura de parte aérea (APA), volume de raiz (VR), diâmetro de colmo (DC), massa seca de folha (MSF), massa seca de colmo e bainha (MSC+B), massa seca total (MST), área foliar (AF), teor de nitrogênio foliar (N_f), teor de fósforo foliar (P_f) e teor de potássio foliar (K_f) em de plantas de milho hibrido Formula VT[®] submetidas a diferentes métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense* analisadas nos estádios V8, VT e R6 de desenvolvimento.

Inoculação	NF	APA -- cm --	VR -- cm ³ --	DC -- mm --	MSF	MSC+B	MSR	MST	AF -- cm ² --	N _f	P _f ----- g kg ⁻¹ -----	K _f
	----- g -----											
V8												
Controle	10,10	135,30	98,00	19,27 a	14,76 ab	2,11	5,15	22,11	2023,64	31,15	1,40	44,79
Semente	11,30	136,35	68,50	18,01 a	13,14 ab	1,62	4,58	17,69	1587,60	46,90	1,31	40,14
Foliar	9,10	118,40	48,00	14,75 b	8,94 b	1,36	2,05	12,43	1279,40	41,65	1,58	49,97
Semente e Foliar	9,40	140,20	69,00	18,37 a	15,98 a	2,22	3,10	23,10	2184,81	47,43	1,42	40,40
DMS	2,81	39,73	51,57	3,22	6,54	1,47	3,48	11,25	1077,77	16,71	0,30	14,91
CV (%)	15,00	15,96	38,74	9,75	26,35	42,98	49,76	31,81	32,44	21,30	11,25	18,12
VT												
Controle	12,00	250,83	200,00	15,54	23,93 ab	36,98	26,23	103,94 ab	9954,53	22,75 bc	1,18	23,64 a
Semente	12,33	242,67	197,50	17,02	24,21 ab	44,28	27,38	116,82 ab	10249,30	37,98 a	1,23	13,65 b
Foliar	12,42	245,08	144,17	15,29	21,27 b	33,30	16,95	87,05 b	9211,63	29,23 ab	1,21	15,10 b
Semente e Foliar	12,08	253,92	189,17	16,74	25,85 a	45,06	25,23	123,64 a	12259,84	17,85 c	1,36	19,37 ab
DMS	0,76	33,16	60,95	2,19	3,34	14,42	11,78	35,17	3867,83	11,07	0,25	6,09
CV (%)	3,76	8,03	20,04	8,14	8,420	21,66	29,55	19,59	22,30	21,86	10,62	18,08
R6												
Controle	11,42	262,00	283,75 a*	15,94	26,96	49,57	28,71	105,42	3303,83	12,25	0,75 b	7,09 c
Semente	11,42	268,75	183,33 b	15,03	26,84	50,58	33,65	111,25	3623,33	12,43	1,09 a	11,38 ab
Foliar	11,33	267,17	181,67 b	15,46	26,06	47,66	22,48	96,39	3059,38	16,45	0,88 b	13,04 a
Semente e Foliar	11,50	270,17	201,67 ab	15,28	25,97	46,82	21,67	94,64	2991,17	19,25	0,81 b	9,46 bc
DMS	0,84	22,39	99,21	2,74	3,31	10,31	13,92	20,19	671,83	11,25	0,15	2,60
CV (%)	4,40	5,04	28,04	10,67	7,53	12,72	31,41	11,90	12,44	39,68	9,23	13,51

*letras minúsculas diferentes entre si apresentam diferença entre os métodos de inoculação a 5% de probabilidade de erro de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 2. Análise dos componentes da produção diâmetro de espiga (DE), comprimento de espiga, número de fileiras (NF), número de grãos por fileira (NGF), massa seca de estrutura reprodutiva (MSER), massa de 100 grãos (M100), massa total de grãos (MTG), teor de nitrogênio no grão (N_g), teor de fósforo no grão (P_g) e teor de potássio no grão (K_g) em de plantas de milho híbrido Formula VT[®] submetidas a diferentes métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense*.

Inoculação	DE	CE	NF	NGF	MSER	M100	MTG	N _g	P _g	K _g	
	-- mm --	-- cm --									----- g -----
Controle	39,64	ab*	17,00	15,79	32,92	279,00	20,10	186,40	9,63	1,89	4,76
Semente	39,69	a	17,14	15,96	32,90	272,60	19,25	184,62	10,00	1,51	6,35
Foliar	39,39	ab	16,80	16,21	30,51	266,88	19,31	180,98	7,38	1,62	6,06
Semente e Foliar	36,90	b	17,11	15,70	32,56	266,07	19,12	165,25	9,63	1,69	5,95
DMS	2,79		1,40	1,31	5,45	34,04	1,30	32,44	3,79	0,39	1,61
CV (%)	4,30		4,96	4,93	10,17	7,54	4,01	10,87	27,42	15,55	18,46

*letras minúsculas diferentes entre si apresentam diferença entre os métodos de inoculação a 5% de probabilidade de erro de acordo com o teste de Tukey.

**4 CAPÍTULO III: *Azospirillum brasilense* E SUA INFLUÊNCIA EM
PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS DO MILHO**

***Azospirillum brasilense* e sua influência em parâmetros fotossintéticos do milho**

O estudo objetivou avaliar a influência de métodos de inoculação com a bactéria promotora de crescimento *Azospirillum brasilense* em parâmetros fotossintéticos da cultura do milho e sua relação com o metabolismo vegetal. Em casa de vegetação, cultivou-se plantas de milho híbrido Fórmula Viptera® submetidos aos tratamentos: ausência de inoculação, inoculação via semente, inoculação via foliar, e inoculação via semente associada a foliar. Nos estádios fenológicos V8, VT e R6 foram realizadas leituras de taxa de assimilação líquida de CO₂ em função a diferentes densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos. A partir desses dados, determinou-se a taxa de assimilação líquida de CO₂ máxima, a eficiência quântica, o ponto de compensação de CO₂ e a exigência quântica em função dos tratamentos. Plantas inoculadas apresentaram aumento de transporte de elétrons e taxa de assimilação líquida de CO₂, em relação ao controle, em todas as fases analisadas. A inoculação via foliar resultou em maior demanda adaptativa por parte das plantas avaliadas no estágio inicial de desenvolvimento. Métodos de inoculação com *A. brasilense* via semente ou via semente associada a foliar resultaram em elevadas taxas de assimilação líquida CO₂ máxima nos estádios V8 e VT do milho. A inoculação associando via semente e via foliar refletiu no acúmulo de massa seca total no estágio fenológico VT e em maior eficiência quântica nos estádios fenológicos VT e R6.

Palavras-chave: Eficiência quântica; Ponto de compensação de CO₂; Taxa máxima de assimilação líquida de CO₂; Métodos de inoculação

Introdução

Ao longo do ciclo biológico as plantas realizam processos metabólicos conforme o estágio de desenvolvimento em que se encontram. O milho (*Zea mays* L.) é uma Poaceae C₄, cujo metabolismo fotossintético é classificado como de alta eficiência, com fotorrespiração praticamente nula e alta eficiência fotossintética quando em alta

densidade de fótons luminosos (Magalhães & Durães 2006; Taiz et al. 2017). Desta forma, seu aproveitamento energético resulta em elevada eficiência de processos refletindo positivamente na produtividade final.

No organismo vegetal a promoção de crescimento influencia parâmetros morfológicos e bioquímicos. Em função da luminosidade, a planta realiza os processos fotossintéticos essenciais para o seu desenvolvimento, em especial as trocas gasosas, que representam as taxas de conversão energética que refletem diretamente na conversão de massa seca final (Kerbaui 2008; Salisbury & Ross 2012; Taiz et al. 2017). Desta forma, a compreensão de como esses processos ocorrem se tornam essenciais para o entendimento do desenvolvimento vegetal.

A descoberta do potencial de microrganismos capazes de promover crescimento vegetal em poáceas desencadeou a busca por microrganismos com a mesma eficiência encontrada na relação *Rhizobium*/soja, situação esta em que toda a necessidade de nitrogênio da cultura é suprida pelo uso do microrganismo. Contudo, a relação poáceas/microrganismo é ainda mais complexa, atuando em fatores e fenofases variadas do desenvolvimento vegetal, influenciando muito além da fixação biológica do nitrogênio (Baldani & Baldani 2005; Glick 2015; Guimarães et al. 2017).

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) do gênero *Azospirillum* são fontes de estudo no Brasil desde 1950, quando a pesquisadora Joanna Doberheinner observou o potencial fixador de nitrogênio destes organismos em poáceas no município de Seropédica no Rio de Janeiro (Baldani & Baldani 2005). Desde então, o potencial deste grupo se expandiu, diversificando o estudo de fixação biológica de nitrogênio para enfoques diversos como a produção de fitohormônios, solubilização de fosfatos minerais,

controle biológico, indução de resistência, entre outros, englobando a promoção de crescimento vegetal (Glick 2012; Castillo et al., 2015).

A forma como o microrganismo coloniza a planta vem sendo fonte de estudo visando entender se o local de inoculação afeta, e como afeta, a eficiência da associação microrganismo/planta. Fukami et al. (2016) testaram inoculação via semente, sulco de plantio e pulverização nas culturas do milho e do trigo, e concluíram que métodos alternativos de inoculação, visando evitar o contato do inoculante com o tratamento químico de sementes, são viáveis para ambas as culturas, auxiliando na redução dos custos e estimulando o uso de inoculante nas culturas.

Testando os métodos via semente e via pulverização foliar de inoculação com *A. brasilense* Fukami et al. (2017) relatam que os efeitos resultantes da inoculação estão relacionados aos metabólitos produzidos pelas bactérias, como ácido indol-3-acético, indol-3-etanol, ácido indol-3-láctico e ácido salicílico. Ainda, que o uso da inoculação resultou em supra regulação dos genes do estresse oxidativo nas folhas e infra regulação nas raízes, indicando que os métodos de inoculação estão relacionados a produção de fitohormônios e a elicitação de genes relacionados a indução de resistência.

Investigando os efeitos da exsudação de carboxilatos de raízes de plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*, D'Angioli et al. (2017) relatam que o uso da inoculação aumentou o comprimento e área radicular, e que a taxa de exsudação está correlacionada positivamente com a arquitetura radicular, provavelmente influenciando no efeito dos carboxilatos de raízes na comunidade bacteriana da rizosfera. Por fim, relatam que o comprimento radicular está positivamente correlacionado com o aumento no suprimento de fósforo devido a solubilização de fosfato via ação bacteriana, indicando que o nutriente

afeta positivamente a população microbiana radicular, modulando a interação planta-bactéria.

Apesar do grande investimento em pesquisas quanto a influência dos métodos de inoculação em parâmetros bioquímicos do desenvolvimento vegetal, ainda é pouco explorado como o método de inoculação influencia no metabolismo fotossintético de plantas de interesse. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar a influência de formas de inoculação com a bactéria promotora de crescimento *Azospirillum brasilense* nos parâmetros fotossintéticos da cultura do milho e sua relação com o metabolismo vegetal.

Material e métodos

Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação modelo “em duas águas”, coberta com placas de policarbonato alveolar com espessura de 10,00 mm e tratamento contra raios ultravioleta. Com umidade relativa média de 75% e temperatura média de 25°C (Figura 1). A estrutura foi refrigerada via sistema “Humid Cool”. Localizada na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido “Prof. Dr. Mário César Lopes”, pertence ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus Marechal Cândido Rondon. O município, localizado na região Oeste do Paraná, com altitude média de 420 m e coordenadas geográficas 54° 22’ W e 24° 46’ S, tem o clima classificado como Cfa mesotérmico úmido (Peel, Finlayson & McMahon, 2007).

Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi de blocos casualizados, com quatro tratamentos e seis repetições. Os tratamentos utilizados consistiram em: ausência de inoculação; inoculação via semente no momento do plantio; inoculação via foliar no estágio V4 (quando 50% das plantas apresentaram 4 folhas completamente expandidas); e inoculação via semente associada à via foliar (no momento da semeadura e no estágio fenológico V4, respectivamente).

Implantação e tratamentos culturais

As unidades experimentais consistiram em vasos de polietileno com capacidade para 25 dm³ (35 cm de altura, 34 cm de diâmetro), preenchidos com substrato peneirado e homogêneo, classificado como horizonte A de um LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef) de textura muito argilosa (Santos et al. 2013).

O substrato utilizado não passou por esterilização e apresentava as seguintes características químicas: pH (CaCl₂): 5,32; matéria orgânica: 10,25 g dm⁻³; P disponível (Mehlich⁻¹): 112,06 mg dm⁻³; K (Mehlich⁻¹): 0,45 cmol_c dm⁻³; Ca²⁺ (KCl 1 mol L⁻¹): 5,51 cmol_c dm⁻³; Mg²⁺ (KCl 1 mol L⁻¹): 1,03 cmol_c dm⁻³; Al³⁺ (KCl 1 mol L⁻¹): 0,00 cmol_c dm⁻³; H+Al (pH SMP 7,5): 3,73 cmol_c dm⁻³; soma de bases (SB): 7,00 cmol_c dm⁻³; saturação de bases (V): 65,23%.

Para a adubação, utilizou-se 190 g dm⁻³ de N na forma de uréia, 59 g dm⁻³ de K na forma de KCl, e ainda, 16,2 g dm⁻³ de Zn na forma de sulfato de zinco, de acordo com o recomendado por Novaes et al. (1991) para cultivos em ambiente protegido. As sementes utilizadas foram do milho híbrido Fórmula Viptera®, com ciclo superprecoce, alto potencial produtivo e estabilidade.

A inoculação ocorreu 30 minutos antes da sementeira. Utilizou-se a dose de 100 mL para cada 60.000 sementes de inoculante Nitro 1000 Gramíneas, da empresa Nitro 1000, a base das estirpes Abv5 e Abv6 da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense*, na concentração de $2,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Igualmente, o inoculante foi utilizado para aplicação via foliar, no estágio fenológico V4 da cultura, na dosagem correspondente a 600 mL ha⁻¹ em 100 L de água e aplicado com o auxílio de pulverizador costal, mantido à pressão constante por CO₂ a 40 kgf cm⁻².

A sementeira foi realizada na primeira quinzena de outubro de 2017 de forma manual, sendo depositadas seis sementes por vaso, com posterior desbaste, mantendo duas plantas por vaso. A inoculação via foliar ocorreu quando as plantas atingiram o estágio fenológico V4, 16 dias após a sementeira (DAS), novamente no final do dia, com temperatura em torno de 25°C e umidade relativa do ar de 85% (Figura 1). Os vasos foram irrigados diariamente conforme a necessidade da cultura ao longo do ciclo de cultivo.

Avaliações realizadas

Nos estádios fenológicos V8, VT e R6, correspondentes a 41, 59 e 92 DAS, utilizando o analisador portátil de fotossíntese por radiação infravermelha (IRGA) (Li-6400XT, LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA), realizou-se as análises de curvas de respostas dos índices de trocas gasosas para diferentes densidades de fluxos de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), com o auxílio de um diodo emissor de luz artificial (LED) controlado por sensor dentro da câmara foliar, obtendo-se curvas de luz pela variação decrescente de 2500, 2000, 1500, 1200, 800, 500, 200, 100, 50, 25 e 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com fluxo de ar padronizado a 500 mL por minuto e 400 μmol de CO₂ de referência, no período de 8h00 e 12h00 .

Análise estatística

As médias das taxas de assimilação líquida de CO₂ obtidas nas curvas de resposta do DFFFA foram ajustadas com o auxílio do programa Sigma Plot 12.0 (Systat Software, Inc., San Jose California USA). Testou-se inicialmente a normalidade por Shapiro-Wilk e, em seguida, foi realizada análise de regressão não linear utilizando o modelo de hipérbole retangular com a equação:

$$f = y_0 + a * \frac{Q}{(b + Q)}$$

onde (a) e (b) representam parâmetros estimados, (f) representa o parâmetro avaliado, (Q) a intensidade luminosa utilizada e (y₀) as formas de inoculação testadas. Em função desta curva, determinou-se a taxa máxima de assimilação líquida de CO₂ (A_{máx})

Os dados de 0 a 200 μmol m⁻² s⁻¹ foram utilizados para a determinação de uma equação linear da reta. Com estes dados, calculou-se o ponto de compensação de CO₂ (Γ), eficiência quântica aparente (Φ) e a exigência quântica, de acordo com Machado et al. (2005).

Resultados

Durante o estágio fenológico V8, em função dos métodos de inoculação, a taxa de assimilação líquida de CO₂ máxima (A_{máx}) observada variou entre 34,44 e 43,92 μmol m⁻² s⁻¹ (Figura 2), indicando que plantas inoculadas via foliar apresentaram capacidade inferior de transporte de elétrons e eficiência de assimilação de CO₂ (A) em comparação aos demais métodos de inoculação. O ponto de compensação de CO₂ (Γ) variou entre 5,16 e 17,75 μmol m⁻² s⁻¹, e a eficiência quântica aparentemente (Φ), entre 4,43 e 11,75 μmol

fótons ($\mu\text{mol CO}_2$)⁻¹ (Figura 2).

Plantas submetidas ao método de inoculação via foliar apresentaram o menor $A_{\text{máx}}$ neste estágio fenológico, $34,44 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2C). No entanto, plantas inoculadas via semente apresentaram maiores Γ , Φ e $A_{\text{máx}}$, $17,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $11,75 \mu\text{mol fótons } (\mu\text{mol CO}_2)^{-1}$ e $43,92 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente.

A partir do inverso do quociente da eficiência quântica obtida calculou-se a exigência quântica, ou seja, para fixar 1 mol de CO_2 foram necessários 0,2112, 0,0850, 0,1970, e 0,2259 mol fótons, para o controle, inoculação via semente, via foliar, e via semente associada a foliar, respectivamente.

No estágio fenológico VT, em função dos métodos de inoculação, a $A_{\text{máx}}$ observada variou entre 29,32 e 35,11 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3), com resultado inverso ao obtido no estágio fenológico anterior, onde o transporte de elétrons e eficiência de assimilação de CO_2 de plantas inoculadas via foliar foi superior aos demais métodos de inoculação. O Γ variou entre 0,13 e 10,58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e o Φ entre 9,87 e 15,10 $\mu\text{mol fótons } (\mu\text{mol CO}_2)^{-1}$.

Plantas inoculadas via semente associada a foliar, no presente trabalho apresentaram o menor $A_{\text{máx}}$, mas as maiores Γ e Φ . O ponto de compensação obtido em plantas inoculadas via semente ($0,13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) apresentou valores indicados na literatura para plantas cultivadas em condições ideais, que demonstrou uma baixa necessidade de CO_2 para a iniciar o processo fotossintético (Sage 2004).

A exigência quântica obtida foi 0,0880, 0,1013, 0,0992 e 0,0662 mol fótons, para os tratamentos controle, inoculação via semente, via foliar e via semente associada a foliar, respectivamente. Plantas inoculadas via semente associada a foliar resultaram em menores valores de exigência quântica para a fixação de 1 mol de CO_2 .

Por fim, no estágio fenológico R6, a taxa de assimilação líquida de CO₂ máxima ($A_{máx}$) variou entre 33,49 e 42,32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 4), confirmando a diferença entre o transporte de elétrons e eficiência de assimilação líquida de CO₂ em função dos métodos de inoculação. O ponto de compensação luminoso variou entre 1,32 e 10,53 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e a eficiência quântica entre 2,72 e 9,17 $\mu\text{mol fótons} (\mu\text{mol CO}_2)^{-1}$.

Plantas que se desenvolveram sob influência da inoculação via semente associada a foliar apresentaram menor $A_{máx}$ (33,49 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e maior eficiência quântica (9,17 $\mu\text{mol fótons} (\mu\text{mol CO}_2)^{-1}$). Plantas inoculadas via foliar apresentaram maior $A_{máx}$ e Γ (42,32 e 10,53 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente), e menor Φ (2,71 $\mu\text{mol fótons} (\mu\text{mol CO}_2)^{-1}$). O menor ponto de compensação de CO₂ foi obtido em plantas inoculadas via semente.

A exigência quântica em função dos tratamentos foi 0,1306, 0,3136, 0,3678 e 0,1091 mol fótons, respectivamente para controle, inoculação via semente, via foliar e via semente associada a foliar. Plantas inoculadas via semente e via foliar apresentaram menor eficiência, liberando mais CO₂ por fóton absorvido.

O acúmulo de massa total destaca-se entre os principais fatores resultantes da promoção de crescimento. Plantas inoculadas via semente associada a foliar apresentaram acúmulo de massa estatisticamente superior aos demais tratamentos na fase fenológica VT (Figura 5).

Discussão

Tratando-se do estudo em poacéas com metabolismo C₄, não ficou evidente o ponto de saturação de luz nas plantas em resposta aos tratamentos testados. A variação da taxa de assimilação líquida de CO₂ junto aos valores obtidos no ponto de compensação, indicam que a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) (Taiz et al. 2017) ocorre de

forma distinta de acordo com o método de inoculação utilizado, sendo que plantas inoculadas via foliar apresentaram efeitos negativos a inoculação, como baixa taxa de assimilação líquida máxima ($A_{máx}$) e elevado ponto de compensação de CO_2 (Γ), no estágio fenológico V8, podendo indicar uma adaptação do organismo vegetal a colonização bacteriana (Figura 2C).

Os valores obtidos para a exigência quântica em plantas inoculadas via semente, no estágio fenológico V8 (Figura 2), e inoculadas via semente e foliar, nos estádios fenológicos VT e R6 (Figuras 3 e 4), indicam que estas gastam menor quantidade de fótons para a fixação de 1 mol de CO_2 , resultando em maior eficiência de utilização de ATP e NADPH no ciclo de Calvin (Ehleringer & Bjorkman 1977; Taiz et al. 2017).

A eficiência quântica obtida em experimento comparando mutantes de milho em diferentes concentrações de CO_2 indicou que, em concentrações atmosféricas de CO_2 , plantas heterozigotas apresentam taxa de assimilação líquida de CO_2 entre 21,3 e 24,7 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ enquanto plantas não modificadas geneticamente variam entre 26,3 e 28,7 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$. Já em atmosfera modificada com altas concentrações de CO_2 no ambiente, a eficiência das duas plantas é semelhante (Studer et al. 2014).

Isto indica que plantas não modificadas geneticamente são mais eficientes na assimilação de carbono em concentração de CO_2 atmosférico, fazendo com que as plantas que passaram por seleção ao longo do tempo necessitem de mecanismos auxiliares para a maior eficiência na conversão de carbono, como as BPCV, onde, neste trabalho, as taxas de assimilação de carbono em plantas inoculadas via semente, em concentração atmosférica de CO_2 , atingiu até 43,9 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$, 2 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ maior que o controle.

Plantas inoculadas via pulverização foliar apresentaram reduzida taxa de assimilação líquida de CO_2 em comparação aos demais métodos testados (Figura 2).

Durante os estádios iniciais de desenvolvimento, a cultura se mostra sensível a variações endógenas e exógenas, refletindo em parâmetros mensuráveis de interesse. Desta forma, as respostas iniciais (estádio V8) podem refletir uma condição de adaptação da planta à colonização do *A. brasilense*, induzindo o fechamento estomático como resposta física, devido a identificação da bactéria como um possível patógeno (Stangarlin & Leite 2008). Ainda, neste estágio, temperaturas mais amenas e alta umidade relativa (médias de 25°C e 75% de umidade) podem ter influenciado no aparato fotossintético da cultura, fator esse que não se repetiu nos estádios seguintes (VT e R6), onde as temperaturas médias variaram entre 28 e 30°C com umidade relativa acima de 80%, condições de elevado desenvolvimento para a cultura (Figura 1).

Neste experimento plantas inoculadas via semente com *A. brasilense*, no estágio fenológico VT, apresentaram ponto de compensação de $0,13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3), diferente dos demais métodos testados em que os pontos de compensação variaram entre $9,48$ e $10,59 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Desta forma os demais métodos de inoculação apresentaram maior necessidade de energia para o início do processo fotossintético em relação a inoculação via semente. Moss et al. (1971) relatam que o ponto de compensação obtido ao se testar 54 genótipos de milho variou entre 0 e $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em contrapartida, Xu et al. (2016) relatam que, avaliando o efeito de micorrizas arbusculares no ajuste osmótico e na fisiologia fotossintética do milho, o ponto de compensação de luz variou entre 8 e $16 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A característica de baixo $A_{\text{máx}}$, mas as maiores Γ e Φ , apresentado por plantas que receberam inoculação via semente no estágio fenológico VT (Figura 3), indica que plantas inoculadas via semente apresentaram metabolismo menos eficiente para o início do processo fotossintético, aumentando assim o ponto de compensação, devido a maior

limitação da RUBISCO. Com o aumento do ponto de compensação, aumenta a relação da quantidade de luz necessária a fixação de 1 mol de CO₂, reduzindo o valor da eficiência quântica.

Cunha et al. (2016) relatam que os resultados obtidos em relação ao uso da inoculação com *A. brasilense* podem variar em função híbrido utilizado, mas que a maior eficiência de absorção do nitrogênio promovido pela inoculação bacteriana influencia positivamente no metabolismo, resultando em plantas com maior desempenho fotossintético.

Ao analisar a eficiência quântica em milho cultivado sob estresse salino, quando inoculado com fungos micorrízicos arbusculares, Sheng et al. (2008) relatam que plantas colonizadas apresentaram maior eficiência quântica em comparação ao controle (acima de 0,7 μmol fótons ($\mu\text{mol CO}_2$)⁻¹) em níveis de salinidade de 2 g kg⁻¹ de NaCl, indicando que o uso do inoculante alivia os danos resultantes da salinidade. Tais resultados estão abaixo do obtido no estágio fenológico V8 (Figura 2), cuja eficiência quântica variou entre 4 e 11 μmol fótons ($\mu\text{mol CO}_2$)⁻¹, com a inoculação via semente de *A. brasilense* registrando 11,75 μmol fótons ($\mu\text{mol CO}_2$)⁻¹.

Ao cultivar milho inoculado com *A. brasilense* e *Bacillus spp.* com ausência e presença da dose ideal de nitrogênio, Calzavara et al. (2018) relatam que os mecanismos que regulam a atividade fotossintética são acionados em função a mudanças ambientais, e este influencia diretamente na fixação de carbono e produção de energia, atuando indiretamente em vias biosintéticas das plantas relacionadas ao metabolismos do carbono e o consumo de energia.

A associação com ambas BPCV em estudos realizados por Tikkanen & Aro (2014) e Calzavara et al. (2018) resultou em aumento na taxa de assimilação líquida de

CO₂, modificando o processo usual de produção e consumo de carbono e energia, refletindo em uma atividade funcional mais alta do aparelho fotossintético, mas sem influenciar no acúmulo de biomassa, diferente do obtido no presente trabalho, onde o acúmulo de biomassa seca aumentou nos estádios iniciais de desenvolvimento (Figura 5).

Pesquisas tem indicado que o uso da inoculação com *Azospirillum* influencia em alterações estruturais relevantes no desenvolvimento do milho, induzindo no número e tamanho de xilemas. Essa alteração é atribuída ao desequilíbrio endógeno de auxina, resultante da inoculação (Pereyra et al. 2012; Romero et al. 2014; Calzavara et al. 2018).

Ao colonizar a planta, as BPCV produzem metabolitos que podem auxiliar no desenvolvimento (Glick 2012; Guimarães et al. 2017). Entre eles, a auxina é a principal responsável pelo crescimento vegetal (Davies 2010; Taiz et al. 2017), contudo a ocorrência do crescimento é nula na ausência de fotossíntese, com ou sem estímulo hormonal, devido a necessidade de energia. Neste sentido, a promoção de crescimento desde a inoculação inicial, pouco significativa até um estabelecimento pleno da relação entre microrganismos e planta, aumenta gradualmente, podendo atingir um patamar significativo no desenvolvimento vegetal em fases posteriores, a ponto de estar diretamente ligada ao aumento de fotossíntese no intervalo entre estádios fenológicos.

Conclusão

Plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* apresentaram aumento de transporte de elétrons e taxa de assimilação líquida de CO₂, em relação ao controle, em todos os estádios analisados. A inoculação via pulverização foliar de *A. brasilense* no milho resultou em maior demanda adaptativa por parte das plantas avaliadas no estágio inicial de desenvolvimento.

Métodos de inoculação com *A. brasilense* via semente ou via semente associada a foliar resultaram em elevadas taxas de assimilação líquida CO₂ máxima nos estádios V8 e VT do milho. Contudo, apenas a inoculação associando via semente e via foliar refletiu no acúmulo de massa seca total no estágio fenológico VT e em maior eficiência quântica nos estádios fenológicos VT e R6.

Referências

- Baldani JI, Baldani VLD. 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants : special emphasis on the Brazilian experience. *An Acad Bras Cienc.* 77:549–579.
- Calzavara AK, Paiva PHG, Gabriel LC, Oliveira ALM, Milani K, Oliveira HC, Bianchini E, Pimenta JA, de Oliveira MCN, Dias-Pereira J, Stolf-Moreira R. 2018. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. *Plant Biol.* 20:870–878.
- Castillo P, Molina R, Andrade A, Vigliocco A, Alemano S, Cassán FD, Abstract. 2015. Phytohormones and Other Plant Growth Regulators Produced by PGPR: The Genus *Azospirillum*. In: Cassán FD, Okon Y, Creus CM, editors. *Handb Azospirillum Tech Issues Protoc.* 1st ed. Springer; p. 115–138.
- Cunha FN, Silva NF da, Rodrigues CR, Morais WA, Gomes FHF, Filho LCL, Cabra LB dos S, Teixeira MB, Vieira G da S, Costa CTS, Federal. 2016. Performance of different genotypes of maize subjected to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *African J Agric Res.* 11:3853–3862.
- D'Angioli AM, Viani RAG, Lambers H, Sawaya ACHF, Oliveira RS. 2017. Inoculation with *Azospirillum brasilense* (Ab-V4, Ab-V5) increases *Zea mays* root carboxylate-exudation rates, dependent on soil phosphorus supply. *Plant Soil.* 410:499–507.
- Davies PJ. 2010. *Plant Hormones.* 3rd ed. Davies PJ, editor. Dordrecht: Springer Netherlands.

- Ehleringer J, Bjorkman O. 1977. Quantum Yields for CO₂ Uptake in C₃ and C₄ Plants: Dependence on Temperature, CO₂, and O₂ Concentration. *Plant Physiol.* 59:86–90.
- Fukami J, Ollero FJ, Megías M, Hungria M. 2017. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express.* 7:1–13.
- Fukami J, Nogueira MA, Araujo RS, Hungria M. 2016. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express.* 6:1–13.
- Glick BR. 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications.* Scientifica (Cairo). 2012:1–15.
- Glick BR. 2015. *Beneficial Plant - Bacterial Interactions.* Cham: Springer International Publishing.
- Guimarães VF, Battistus AG, Souza AKP de, Bulegon LG, Offemann LC, Inagaki AM. 2017. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal: da FBN à regulação hormonal, possibilitando novas aplicações. In: Zambom MA, Kuhn OJ, Silva NLS da, Stangarlin JR, Nunes RV, Fulber VM, Eyng C, editors. *Ciências agrárias Ética do Cuid Legis e Tecnol na agropecuária.* 1st ed. Marechal Candido Rondon: Centro de Ciências Agrárias/ Unioeste; p. 193–212.
- Kerbaui GB. 2008. *Fisiologia Vegetal.* 2 nd. Rio de Janeiro: Guarnabara Koogan.
- Machado EC, Schmidt PT, Medina CL, Ribeiro RV. 2005. Respostas da fotossíntese de tres especies de citros a fatores ambientais. *Pesq agropec bras.* 40:1161–1170.
- Magalhães PC, Durães FOM. 2006. Circular Técnica 76 - Fisiologia da Produção de Milho. In: Barbosa TMA, editor. *Circ Técnicas Embrapa.* Vol. 1. 1st ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo; p. 10.
- Moss DN, Willmer CM, Crookston ARK. 1971. CO₂ Compensation Concentration in Maize (*Zea mays* L.) Genotypes. *Plant Physiol.* 47:847–848.
- Novaes RF de, Neves JCL, Barros NF de. 1991. Ensaio em ambiente controlado. In: Oliveira AJ de, Garrido WE, Araujo JD de, Lourenço S, editors. *Métodos Pesqui em Fertil do solo.* Brasilia: Embrapa-SE; p. 189–253.

- Peel MC, Finlayson BL, McMahon, TA. 2007. Mapa mundial actualizado da classificação climática de Köppen-Geiger, Hydrol. Earth Syst. Sci., 11, 1633-1644.
- Pereyra MA, García P, Colabelli MN, Barassi CA, Creus CM. 2012. A better water status in wheat seedlings induced by *Azospirillum* under osmotic stress is related to morphological changes in xylem vessels of the coleoptile. Appl Soil Ecol. 53:94-97.
- Romero AM, Vega D, Correa OS. 2014. *Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. Appl Soil Ecol. 82:38-43.
- Sage RF. 2004. The evolution of C₄ photosynthesis. New Phytol. 161:341-370.
- Salisbury FB, Ross CW. 2012. Fisiologia de plantas. 4th ed. São Paulo: Cengage Learning.
- Santos HG dos, Jacomine PKT, Anjos LHC dos, Oliveira VÁ de, Lumbreras JF, Coelho MR, Almeida JA de, Cunha TJF, Oliveira JB de. 2013. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3rd ed. Santos HG dos, Jacomine PKT, Anjos LHC dos, Oliveira VÁ de, Lumbreras JF, Coelho MR, Almeida JA de, Cunha TJF, Oliveira JB de, editors. Brasília: Embrapa.
- Sheng M, Tang M, Chen H, Yang B, Zhang F, Huang Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. Mycorrhiza. 18:287-296.
- Stangarlin JR, Leite B. 2008. Alterações fisiológicas na suscetibilidade. In: Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P, editors. Interação planta-patógeno Fisiol bioquímica e Biol Mol. 1st ed. Piracicaba: FEALQ; p. 177-225.
- Studer AJ, Gandin A, Kolbe AR, Wang L, Cousins AB, Brutnell TP. 2014. A Limited Role for Carbonic Anhydrase in C₄ Photosynthesis as Revealed by a calca2 Double Mutant in Maize. Plant Physiol. 165:608-617. Taiz L, Zeiger E, Max I, Angus M. 2017. Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal. 6 th. Porto Alegre: Artmed.
- Tikkanen M, Aro EM. 2014. Integrative regulatory network of plant thylakoid energy transduction. Trends Plant Sci. 19:10-17.

Xu H, Lu Y, Zhu X. 2016. Effects of Arbuscular Mycorrhiza on Osmotic Adjustment and Photosynthetic Physiology of Maize Seedlings in Black Soils Region of Northeast China. *Brazilian Arch Biol Technol.* 59:1–9.

Figuras

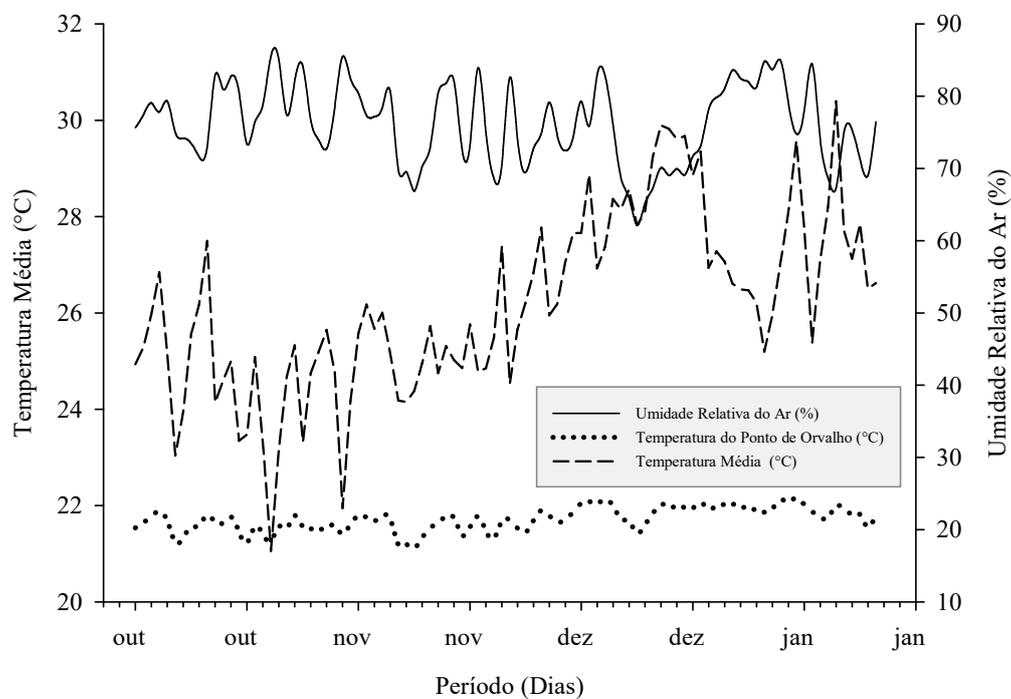


Figura 1. Condições de umidade relativa do ar, temperatura do ponto de orvalho e temperatura média em ambiente de cultivo protegido, em Marechal Cândido Rondon, Paraná, nos anos de 2017 e 2018 (A autora, 2018).

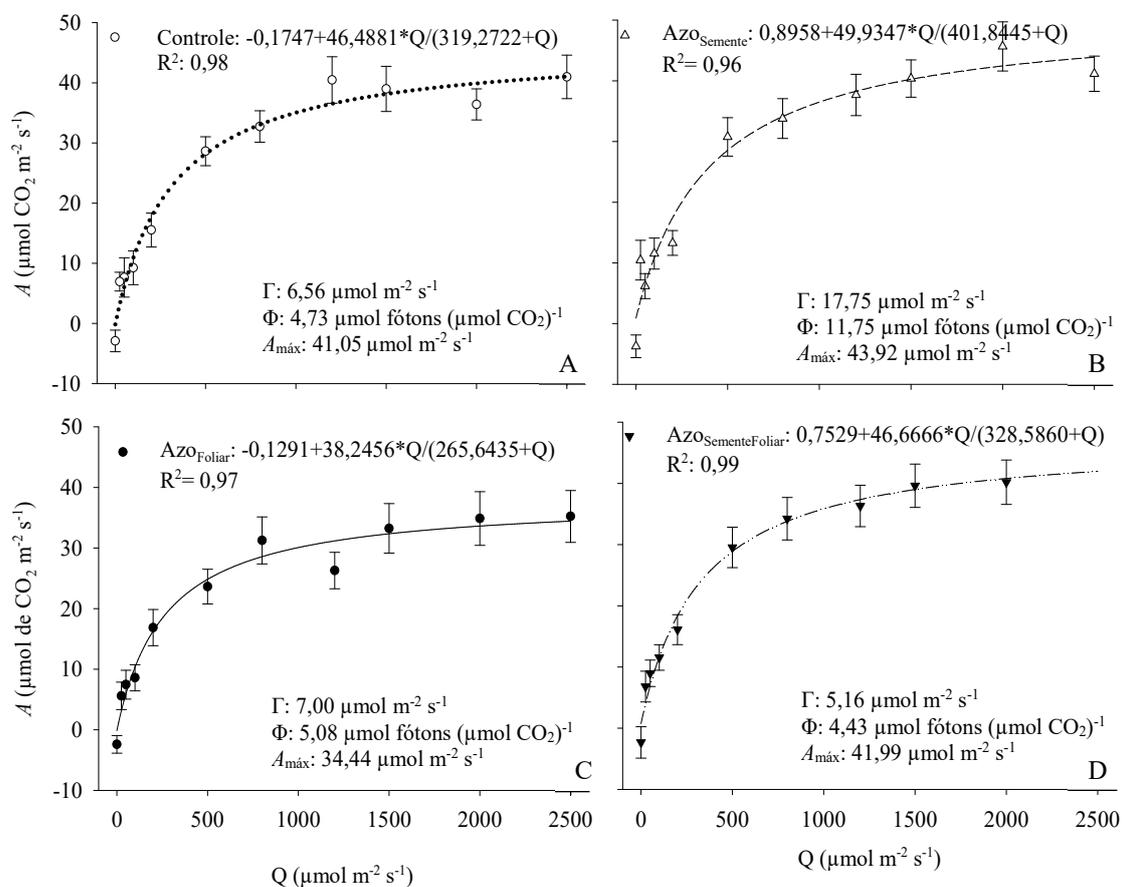


Figura 2. Taxa de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida de CO₂ (A) de acordo com a densidade de fluxo de f\u00f3tons fotossinteticamente ativos (Q), ponto de compensa\u00e7\u00e3o luminosa (Γ), efici\u00eancia qu\u00e2ntica aparente (Φ) e taxa m\u00e1xima de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida de CO₂ ($A_{\text{m\u00e1x}}$), em plantas de milho h\u00edbrido Formula VT[®] na fase fenol\u00f3gica V8 em fun\u00e7\u00e3o dos m\u00e9todos de inocula\u00e7\u00e3o com *Azospirillum brasilense*. A – Controle; B – Semente; C – Foliar; D – Semente e Foliar.

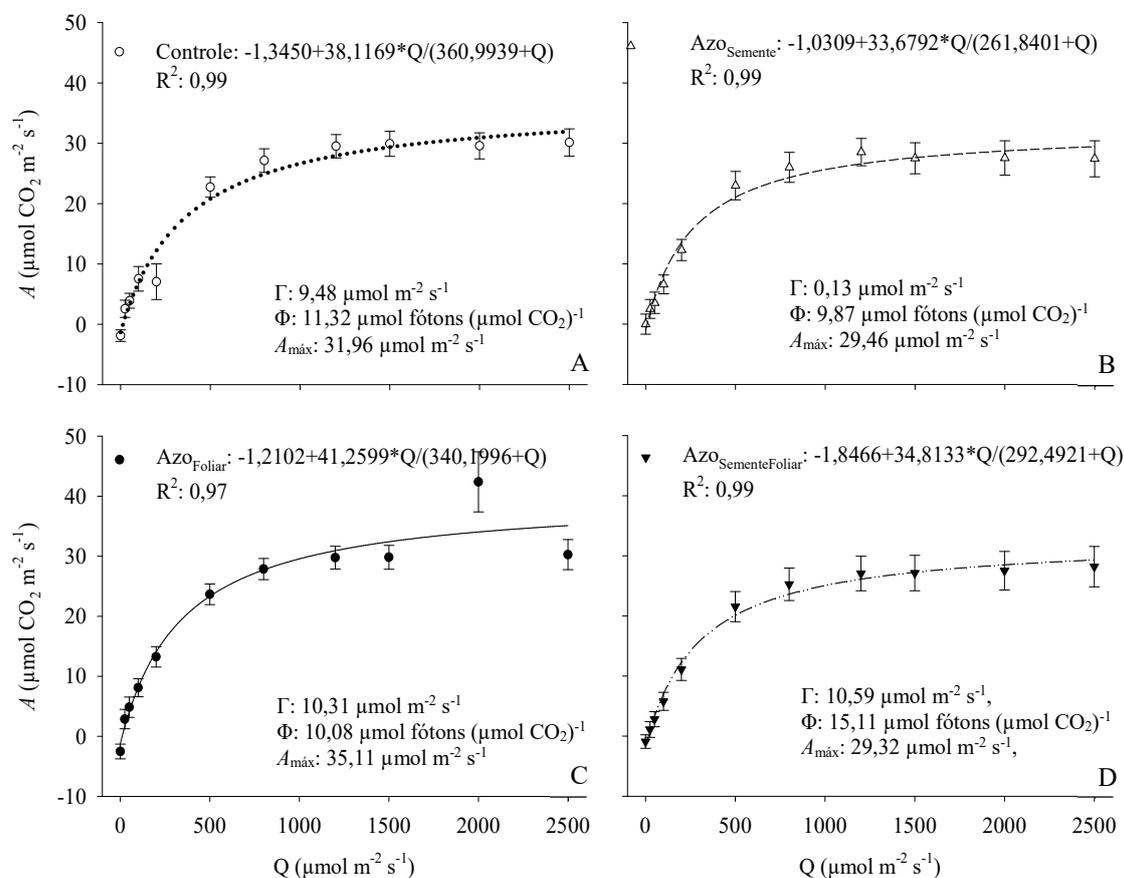


Figura 3. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) de acordo com a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (Q), ponto de compensação luminosa (Γ), eficiência quântica aparente (Φ) e taxa máxima de assimilação líquida de CO₂ ($A_{\text{máx}}$), em plantas de milho híbrido Formula VT[®] na fase fenológica VT em função dos métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense*. A – Controle; B – Semente; C – Foliar; D – Semente e Foliar.

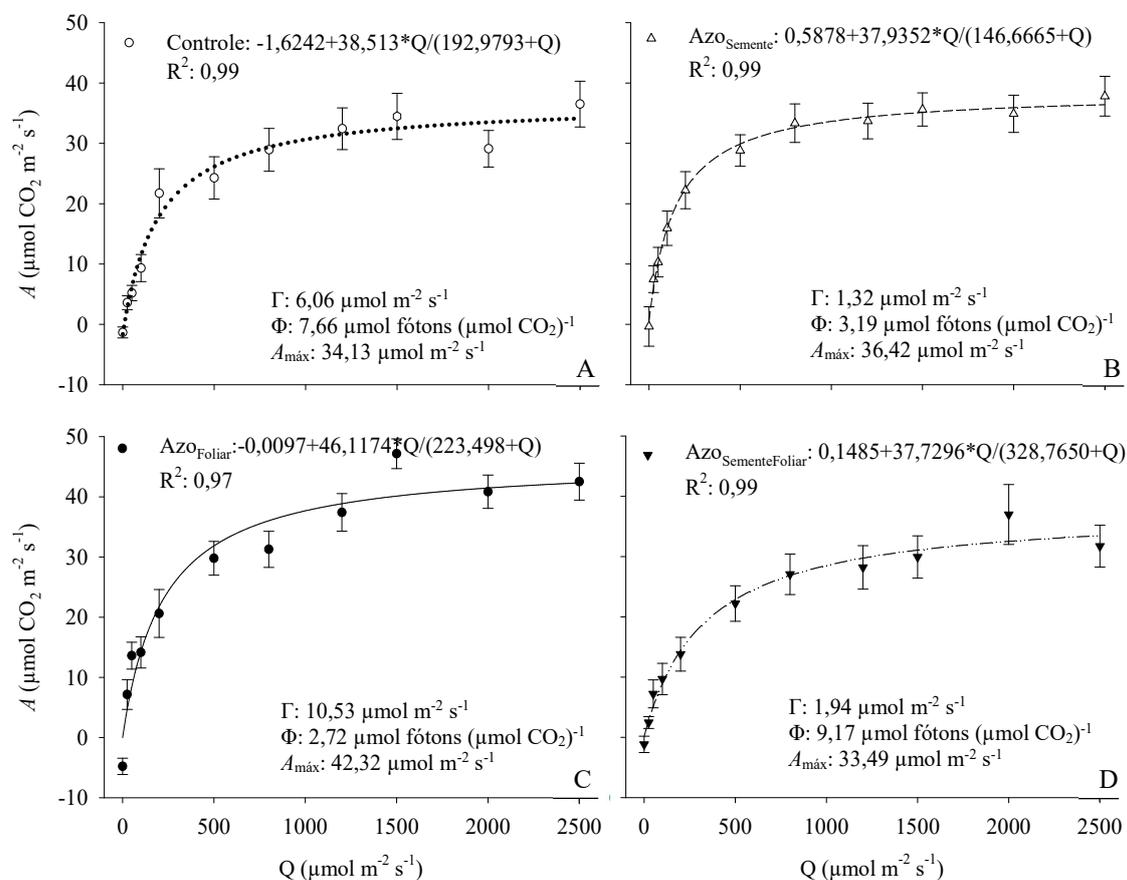


Figura 4. Taxa de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida de CO₂ (A) de acordo com a densidade de fluxo de f\u00f3tons fotossinteticamente ativos (Q), ponto de compensa\u00e7\u00e3o luminosa (Γ), efici\u00eancia qu\u00e2ntica aparente (Φ) e taxa m\u00e1xima de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida de CO₂ ($A_{\text{m\u00e1x}}$), em plantas de milho h\u00edbrido Formula VT[®] na fase fenol\u00f3gica R6 em fun\u00e7\u00e3o dos m\u00e9todos de inocula\u00e7\u00e3o com *Azospirillum brasilense*. A – Controle; B – Semente; C – Foliar; D – Semente e Foliar.

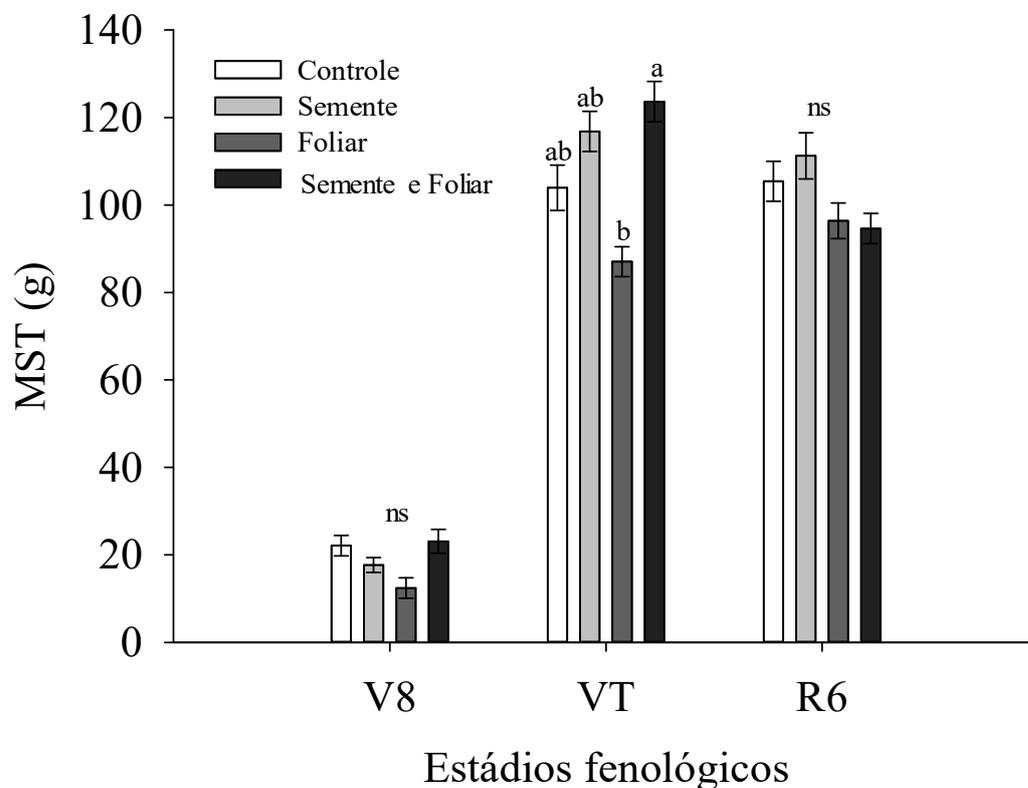


Figura 5. Produção de massa seca total de plantas de milho híbrido Formula VT[®], nos estádios fenológicos V8, VT e R6, submetidas aos diferentes métodos de inoculação (ausência de inoculação, semente, foliar, semente associado a foliar) com *Azospirillum brasilense*. *letras minúsculas diferentes entre si apresentam diferença entre os métodos de inoculação a 5% de probabilidade de erro de acordo com o teste de Tukey, comparando os tratamentos isoladamente no dia da análise. *ns* – não significativo a 5% de probabilidade de erro de acordo com o teste de Tukey.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de inoculação influenciaram em parâmetros fisiológicos, morfométricos e nutricionais do desenvolvimento do milho, sem influenciar na produtividade final. O desenvolvimento vegetal em função da promoção de crescimento foi influenciado positivamente pela inoculação, variando de acordo com o método de inoculação utilizado.

Plantas de milho híbrido Fórmula Viptera® inoculadas via pulverização foliar apresentam redução em parâmetros fotossintéticos no estágio fenológico V8, mas destacaram-se positivamente dos demais métodos nas etapas seguintes analisadas. Enquanto plantas inoculadas via semente ou via semente associada a foliar tiveram destaque no período inicial de desenvolvimento. Estes resultados indicam que a interação planta-bactéria é influenciada pela fase de desenvolvimento em que a cultura se encontra.

Contudo, é importante destacar que, apesar da ausência de variação estatística para alguns parâmetros morfométricos, plantas inoculadas apresentaram visualmente desenvolvimento inicial superior, independentemente do método de inoculação utilizado. E que, no final do ciclo de desenvolvimento, por meio de análise visual, estas se apresentavam mais verdes que as plantas controle, indicando um prolongamento na fase final de enchimento de grãos.

O uso de produtos biológicos na cultura do milho tem ganhado destaque desde a descoberta das BPCV. A associação *Azospirillum brasilense* e milho vem sendo bem-sucedida, entretanto várias das particularidades dessa associação não estão completamente elucidadas. Entre essas particularidades, a busca pelo método de inoculação mais eficiente destaca-se devido a necessidade de potencializar a associação da cultura com o microrganismo. Ainda há muito a se explorar, especialmente quanto a como o método de inoculação via foliar realmente coloniza as folhas, sendo que, mesmo por aberturas naturais, esse método teria um período reduzido para completar o processo de colonização.

Por fim, formas alternativas de inoculação que demonstrem eficiência semelhante ou superior à obtida na inoculação via semente são de suma importância para pesquisas utilizando produtos microbiológicos. Pois, além de possibilitar outras técnicas de uso para culturas cuja o uso de inoculante já está consolidado, abre oportunidade para o uso desses

produtos em culturas onde o uso do inoculante não desperta interesse devido a necessidade da inoculação via semente.