

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

ADRIANO MITIO INAGAKI

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS NA CULTURA
DO MILHO SUBMETIDO A DIFERENTES NÍVEIS DE pH DO SOLO**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ADRIANO MITIO INAGAKI

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS NA CULTURA
DO MILHO SUBMETIDO A DIFERENTES NÍVEIS DE pH DO SOLO**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães
Co-orientadores: Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Lana
Prof. Dr. Jeferson Klein

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

I35b	Inagaki, Adriano Mitio Bactérias promotoras de crescimento de plantas na cultura do milho submetido a diferentes níveis de pH do solo / Adriano Mitio Inagaki. – Marechal Cândido Rondon, 2014. 79 p. Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães Coorientadores: Prof. Dr. Maria do Carmo Lana Prof. Dr. Jeferson Klein Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2014. 1. Milho. 2. Milho – Solos. 3. Solos – Acidez. I. Guimarães, Vandeir Francisco. II. Lana, Maria do Carmo. III. Klein, Jeferson. IV. Título. CDD 22.ed. 633.15 CIP-NBR 12899
------	---

Ficha catalográfica elaborado por Marcia Elisa Sbaraini Leitzke CRB-9/539



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.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação do Engenheiro Agrônomo **ADRIANO MITIO INAGAKI**. Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de 2014, às 14h, sob a presidência do Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Julgadora da Defesa da Dissertação do Engenheiro Agrônomo Adriano Mitio Inagaki, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agronomia - Nível Mestrado e Doutorado com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof.^a Dr.^a Andreia Cristina Peres Rodrigues da Costa (UEM), Prof. Dr. Eurides Küster Macedo Júnior (Unioeste), Prof. Dr. Jeferson Klein (PUC) e Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador).

Iniciados os trabalhos, o candidato apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua Dissertação, intitulada: **"Bactérias promotoras de crescimento de plantas na cultura do milho submetido a diferentes níveis de pH do solo"**.

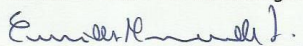
Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

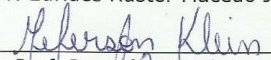
Prof.^a Dr.^a Andreia Cristina Peres Rodrigues da Costa.....Aprovado
Prof. Dr. Eurides Küster Macedo Júnior.....Aprovado
Prof. Dr. Jeferson Klein.....Aprovado
Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador).....Aprovado

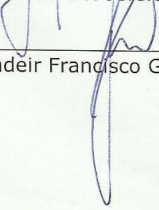
Apurados os resultados, verificou-se que o candidato foi habilitado, fazendo jus, portanto, ao título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 28 de fevereiro de 2014.


Prof.^a Dr.^a Andreia Cristina Peres Rodrigues da Costa


Prof. Dr. Eurides Küster Macedo Júnior


Prof. Dr. Jeferson Klein


Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador)

Aos meus amados pais, José Haryoshi Inagaki e Ana Kiyoko Umeda Inagaki, pela dedicação em meu estudo e caráter. Mesmo sob diversas crises, sempre priorizaram o melhor a mim e meus irmãos.

Aos meus irmãos Alex e Meire, pelo carinho e apoio moral.

À minha irmã Marla pelo companheirismo e mesmo sob diversas dificuldades sempre contribuiu à minha formação.

E Principalmente à Deus...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me acordar todos os dias. Por me fornecer saúde, proporcionando oportunidades como esta, de me provar merecedor de um título que jamais acreditei obter. Agradeço pela proteção a minha Família, que mesmo morando distantes, o Senhor sempre me fez senti-los por perto. A minha gratidão sempre será ETERNA e IMENSURÁVEL pelo bem que me proporcionas.

Minha amada Família que me faz sentir muita falta. Meu ídolo, José H. Inagaki, por sempre exigir o meu melhor em absolutamente tudo que faço, sempre me dando exemplo de caráter e principalmente humildade. Minha linda mãe Ana K. Umeda Inagaki que me criou com infinito amor e carinho, pelas lições de vida e moral, por me ensinar sobre a importância da união em Família e a ter mais paciência. Ambos, me instruíram sobre a magnífica importância da agricultura em nossa Família.

Meus irmãos, Alex T. Inagaki que sempre honrou seu caráter através de suas conquistas pessoais, sendo um exemplo de irmão e companheiro. Meire A. Inagaki mesmo com seu jeito sistemático sempre me amou e sempre diz me amar.

Ao meu Professor Orientador, Dr. Vandeir F. Guimarães, que através de seus conhecimentos e suas experiências, me orientou durante estes dois anos mostrando a importância do meu trabalho.

Co-orientadores, Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Lana e Prof. Dr. Jeferson Klein, que também sempre contribuíram através de críticas e sugestões.

Aos meus amigos do GEFBN: Luan F. O. S. Rodrigues, Luiz C. Offemann, Artur S. Pinto Junior, Andréia C. P. R. da Costa, André G. Battistus e Alexandre L. Müller.

Sou grato também pela fiel amizade dos amigos: Marla Diamante, Leirson Inagaki, Mônica Bartira, Leandro Rampim, Marcos Sarto e Jaqueline Sarto, Jucenei F. Frandoloso, Danilo Offemann e Santina Offemann, Graciela Dalastra, Heloísa F. Mendonça, Juliana Casarin, Poliana F. da Costa, Emanuele Dal'maso, Ricardo Braga, Tiago Hachmann, Thaísa M. Mioranza, Mônica Anghinoni, Martios Ecco, Jean Rosset, Paulo R. Lima e Augustinho Borsoi.

Ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia - PPGA, pertencente a Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste. À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsas de estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), aos INCT – Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas e à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA).

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTAS DE TABELAS.....	8
LISTAS DE FIGURAS.....	9
CAPÍTULO I - BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS NA CULTURA DO MILHO SUBMETIDO A DIFERENTES NÍVEIS DE pH DO SOLO	10
RESUMO GERAL	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	14
2.1. A cultura do milho.....	14
2.2. Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas – BPCPs	16
2.3. Influência do pH nas BPCPs	18
3. REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE MILHO NA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS E NÍVEIS DE ACIDEZ DO SOLO	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÕES	34
AGRADECIMENTOS	34
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO III - POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE MILHO SUBMETIDOS AO pH ÁCIDO DO SOLO E INOCULAÇÃO DE <i>A. brasilense</i> e <i>H. seropedicae</i>.....	43
RESUMO	43
ABSTRACT	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAL E MÉTODOS.....	45

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÕES	50
AGRADECIMENTOS	50
REFERÊNCIAS	51

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE MILHO NA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS E NÍVEIS DE ACIDEZ DO SOLO

- Tabela 1.** Altura de plantas (ALT) em diferentes épocas do desenvolvimento inicial do milho submetido à inoculação de BPCP associadas a três níveis de pH do solo. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012 41
- Tabela 2.** Massa de matéria seca de raiz, colmo, folha e total de plantas de milho submetido à inoculação de BPCP associadas a três níveis de pH do solo, aos 41 DAS. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012 41
- Tabela 3.** Área foliar, diâmetro de colmo e teor relativo de clorofila (SPAD) em diferentes folhas de plantas de milho sob diferentes inoculações de BPCP associadas a três níveis de pH do solo aos 41 DAS. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012 42
- Tabela 4.** Teor de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) no tecido foliar de plantas milho submetido à inoculação de BPCP associadas a três níveis de pH do solo aos 41 DAS. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012 43
- Tabela 5.** Taxa de assimilação de $\text{CO}_2(A)$, condutância estomática (g_s), transpiração foliar (E) e relação da taxa de assimilação de CO_2 /transpiração foliar (EUA) de plantas de milho sob diferentes inoculações de BPCP associadas a três níveis de pH do solo aos 41 DAS. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012 44

CAPÍTULO III - POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE MILHO SUBMETIDOS AO PHÁCIDO DO SOLO E INOCULAÇÃO DE *A. brasilense* e *H. seropedicae*

- Tabela 1.** População de bactérias diazotróficas, crescidas em meios de cultura NFb Lactato e Malato, provenientes de coletas de solo e raízes de plantas de milho, realizadas aos 15 e 41 dias após semeadura, em função da inoculação de sementes com estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1) e níveis de pH do solo. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012.....40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Valores médios do logaritmo do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por g raiz fresca de milho, em função da época de coleta das amostras (ECA) e das combinações entre inoculações de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, e níveis de pH do solo (AI), considerando as médias de dois meios de cultura (NFb Lactato e NFb Malato), de acordo com a tabela de McCrady. Médias semelhantes para AI dentro de ECA e entre ECA dentro de cada AI, não diferindo pelo teste de Scott-Knott a 5%. 58
- Figura 2.** Valores médios do logaritmo do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por 10g solo, em função da época de coleta das amostras (ECA) e das combinações entre inoculações de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, e níveis de pH do solo (AI), considerando as médias de dois meios de cultura (NFb Lactato e NFb Malato), de acordo com a tabela de McCrady. Médias seguidas da mesma letra minúscula comparando os AI dentro de cada ECA e maiúsculas comparando ECA dentro de cada AI, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%. 58
- Figura 3.** Valores médios do logaritmo do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por g raiz fresca de milho, em função de dois meios de cultura (MC) e das combinações entre inoculações de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, e níveis de pH do solo (AI), considerando as médias de duas épocas de coletas (15 e 41 DAS), de acordo com a tabela de McCrady. Médias semelhantes para os AI dentro de MC e entre os MC dentro de cada AI, não diferindo pelo teste de Scott-Knott a 5%. 59
- Figura 4.** Valores médios do logaritmo do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por 10g solo seco, em função de dois meios de cultura (MC) e das combinações entre inoculações de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, e níveis de pH do solo (AI), considerando as médias de duas épocas de coletas (15 e 41 DAS), de acordo com a tabela de McCrady. Médias semelhantes para os AI dentro de MC e entre MC dentro de cada AI, não diferindo pelo teste de Scott-Knott a 5%. 59
- Figura 5.** Valores médios do logaritmo do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por 10g de solo seco e 1 g raiz fresca de milho, em função da época de coleta das amostras (ECA) e de dois meios de cultura (MC), considerando as médias das 12 combinações entre inoculações de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, e níveis de pH do solo (AI), de acordo com a tabela de McCrady. Médias seguidas da mesma letra minúsculas comparando MC dentro de ECA e maiúsculas comparando ECA dentro de MC, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%. 60

CAPÍTULO 1

BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS NA CULTURA DO MILHO SUBMETIDO A DIFERENTES NÍVEIS DE pH DO SOLO

RESUMO GERAL: O objetivo do trabalho foi verificar a população de bactérias diazotróficas nas raízes de plantas de milho, bem como no solo de cultivo destas plantas, além de avaliar o desenvolvimento inicial das plantas em função da inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* e níveis de pH ácido do solo, sem adição fertilizante nitrogenado. Foi realizado experimento em casa de vegetação, em vasos de 13 dm³ de solo, com o híbrido de milho 30F53H. Para a avaliação do desenvolvimento inicial das plantas utilizou-se delineamento de blocos ao acaso em esquema fatorial 3x4, sendo um fator os níveis de acidez do solo [pH (CaCl₂) de 4,5; 5,0 e 5,5] e outro a inoculação das sementes: sem inoculação; *A. brasilense* (Ab-V5), *H. seropedicae* (SmR1) e associação das estirpes Ab-V5+SmR1. Para a mensuração da população de bactérias diazotróficas expressa em unidades formadoras de colônias (UFC), o delineamento utilizando foi de blocos casualizados em esquema fatorial 12 x 2 x 2 e quatro blocos, totalizando 48 parcelas experimentais. O primeiro fator foi formado por doze combinações utilizando inoculações com *A. brasilense* e *H. seropedicae* e diferentes níveis de pH do solo; O segundo fator, a época de coleta de amostras, aos 15 e 41 dias após a semeadura (DAS). E o terceiro fator, os meios de cultura, NFB Lactato e Malato utilizado o crescimento das bactérias e a contagem das UFC. A inoculação foi realizada via sementes, 12 horas antes da semeadura, com volume de 4 mL na concentração de 10⁷ UFC mL⁻¹ para mil sementes. As avaliações foram realizadas aos 15 e 41 DAS, e utilizou-se o método do número mais provável (NMP) para a estimativa da população bacteriana, além da avaliação de altura de plantas, massa seca de raiz, colmo, folha e total, área foliar, diâmetro de colmo, índice de SPAD, teor foliar de N, P, e K, e medidas de trocas gasosas *A*, *g_s*, *E* e *EUA*. A acidez do solo influenciou negativamente a altura das plantas, matéria seca de raiz, diâmetro de colmo, índice SPAD, teor de P foliar, taxa de assimilação líquida de CO₂, condutância estomática, transpiração e eficiência no uso da água. Plantas de milho cultivadas em solo com pH 4,5 apresentaram maior teor de P foliar independente da inoculação, indicando provável solubilização de fósforo. A inoculação das bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) no milho (30F53H) promoveu maior o acúmulo de N foliar, independente do pH do solo, incremento em área foliar, índice SPAD e diâmetro de colmo, e não influenciaram no acúmulo de matéria seca das plantas. A população de bactérias encontradas no solo e nas raízes de milho, independente da inoculação das sementes e níveis de pH do solo, apresentaram valores elevados. A inoculação das estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* não apresentaram preferência de colonização no solo ou nas raízes de plantas de milho. Coletas realizadas aos 41 DAS resultaram em maior população de bactérias diazotróficas quando compara à coleta realizada aos 15 DAS. Os diferentes níveis de pH do solo e as BPCPs isoladas ou em associação, não influenciaram na população de colônias de bactérias detectadas nos meios NFB Lactato e Malato utilizados. As BPCPs se mostraram promissoras quando comparadas ao tratamento controle e submetidas em condições de estresse de acidez do solo e deficiência de nitrogênio, indicando possível fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fósforo. Apesar do número de UFC de bactérias apresentarem-se elevados nas raízes e solo, as medidas momentâneas de trocas gasosas registradas, não demonstraram diferenças entre os tratamentos, tanto para inoculação de sementes quanto ao pH do solo.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense*, trocas gasosas, diazotróficos, acidez do solo, *Zea mays* L.

ABSTRACT: The aim of this study was to determine the population of diazotrophic bacteria in the roots of corn plants, and soil cultivation of these plants, as well as evaluating the initial development as a function of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* and levels of acidic pH of the soil, no added nitrogen fertilizer. Experiment was conducted in a greenhouse in pots of 13 dm³ of soil, with the hybrid corn 30F53H. For the evaluation of the initial development we used a randomized block design in a 3x4 factorial design, with one factor levels of soil acidity [pH (CaCl₂) of 4,5; 5,0 and 5,5] and another the seed inoculation : no inoculation; *A. brasilense* (Ab-V5), *H. seropedicae* (SmR1) and the association of strains Ab-V5+SmR1. To measure the population of diazotrophs expressed in colony forming units (CFU), using the design was randomized blocks in a factorial 12 x 2 x 2 and four blocks, totaling 48 experimental plots. The first factor was composed of twelve combinations using inoculation with *A. brasilense* and *H. seropedicae* and different levels of soil pH; The second factor, the time of sampling at 15 and 41 days after sowing (DAS). And the third factor, the culture media, and NFB Lactate and Malate used the growth of bacteria and enumeration of CFU. Inoculation was performed via seed 12 hours before sowing, with a volume of 4 mL concentration of 10⁷ CFU mL⁻¹ for a thousand seeds. The evaluations were done at 15 and 41 DAS, and used the method of the most probable number (MPN) for the estimation of bacterial population, in addition to evaluation of plant height, dry weight of root, stem, leaf and total area leaf, stem diameter, SPAD index, foliar N, P, and K, and measurements of gas exchange *A*, *g_s*, *E* and *EUA*. Soil acidity negatively influenced plant height, root dry matter, stem diameter, SPAD index, leaf P concentration, rate of net CO₂ assimilation, stomatal conductance, transpiration and water use efficiency. Maize plants grown in soil with pH 4,5 had higher leaf P content regardless of inoculation, indicating probable solubilization of phosphorus. Inoculation of growth promoting bacteria from plants (GPBPs) in maize (30F53H), showed higher accumulation of leaf N, regardless of soil pH, increase in leaf area, SPAD index and stem diameter, and did not influence the accumulation of matter dried plants. The population of bacteria found in soil and roots of maize, regardless of seed inoculation and soil pH levels, showed elevated levels. The inoculation with strains of *A. brasilense* and *H. seropedicae* showed no preference for colonization in the soil or in the roots of corn plants. Samples taken at 41 DAS resulted in greater population of diazotrophs when comparing the collection held at 15 DAS. The different levels of soil pH and isolated or in combination, GPBPs did not influence the population of colonies of bacteria detected in the media NFB Lactate and Malate used. The BPCPs proved promising when compared to the control treatment and subjected to stress conditions of soil acidity and nitrogen deficiency, indicating possible biological nitrogen fixation and solubilization of phosphorus. Although the number of CFU of bacteria present is higher in roots and soil, momentary gas exchange measurements recorded, showed no difference between treatments for both inoculation of seeds on the soil pH.

Key words: *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense*, gas-exchange, diazotrophics, soil acidity, *Zea mays* L.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do milho (*Zea mays* L.) caracteriza-se pelo elevado potencial produtivo, sendo apto ao cultivo em todo o território agrícola brasileiro. No ano agrícola de 2011/12 a produção deste cereal atingiu 71 milhões de toneladas, sendo o estado do Paraná um dos maiores produtores, responsável por 16 milhões de toneladas do grão (IBGE, 2013).

O milho pertencente à família Poaceae, sendo produzido em diversas regiões do país. É cultivado desde a agricultura familiar até grandes propriedades agrícolas associadas às indústrias deste grãos. Para o aumento da produtividade o uso de fertilizantes torna-se uma prática onerosa, porém existem outras formas que possam diminuir o uso exacerbado de fertilizantes. A utilização e o incremento da matéria orgânica do solo por intermédio do sistema de plantio direto, consorciação e rotação de cultura, resultam em aumento da atividade microbiológica do solo. Os microrganismos que atuam na decomposição da matéria orgânica do solo, contribuem diretamente para a disponibilidade de nutrientes às plantas. Solos com baixo teor de nutrientes disponíveis, baixo pH e textura arenosa, como ocorrem em regiões de cerrado, estão associados à baixa taxa de diversidade de bactérias promotoras de crescimento de plantas – BPCPs (GOMES, 2009), assim como no Arenito Caiuá no Paraná.

A fixação biológica de nitrogênio (NFB) em não leguminosas (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987) é uma das características mais discutidas em relação aos benefícios proporcionado pelas BPCPs. Por outro lado, a produção associada a estes microrganismos, de hormônios promotores de crescimento vegetal como auxinas, giberelinas (STRZELCZYK & POKOJSKA-BURDZIEJ, 1984) e etileno (STRZELCZYK et al., 1994) também já foram constatados.

Atualmente, a inoculação de BPCPs em espécies da família Poaceae, vem sendo estudada obtendo resultados promissores com o ganho de matéria seca da parte aérea (RODRIGUES et al., 2014) e aumento de 7% da produtividade, em condições de acidez do solo (DARTORA et al., 2013).

Algumas espécies tornaram-se importantes pelo comportamento associativo às raízes de gramíneas (REIS et al., 2000). De acordo com BALDANI et al., 1986, as bactérias do gênero *H. seropedicae* são endofíticas obrigatórias e *A. brasilense*, são consideradas endofíticas facultativas (DÖBEREINER & DAY, 1975). Desta forma, estas, colonizam tanto o interior como a superfície das raízes de sorgo (BERGAMASCHI, 2006). No entanto, ambas espécies exigem condições propícias para o seu desenvolvimento, como por exemplo a concentração de

oxigênio, temperatura e inclusive pH do meio (BALDANI et al., 1986; DÖBEREINER et al., 1995).

No Brasil, as áreas do cerrado possuem variações nas características química do solo incluindo principalmente a acidez nas camadas superficiais, levando a toxidez de elementos como Al e Fe, e principalmente a adsorção de fósforo, prejudicando o desenvolvimento das raízes e consequentemente da planta (MALAVOLTA, 1979), sendo adequada avaliar a necessidade de correção do pH do solo para cada sistema de cultivo.

Ainda são escassos os trabalhos que envolvam interação entre o pH do solo e a atividade das BPCPs. Face ao exposto, este estudo possui o objetivo de verificar a presença de UFC de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas – PBCPs e seu desempenho nas plantas de milho submetidas a diferentes níveis de pH do solo, sem a adição de adubo nitrogenado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

2. 1. A cultura do milho

As primeiras características descritas de milho (*Zea mays* L.) no Brasil, foram feitas a partir do leste do país indicando grãos branco e duro que haviam variações menos frequentes de cor amarelo claro, preto e vermelho, em meados do ano de 1500 (HOEHNE, 1937). No entanto, a cultura do milho já vinha sendo domesticada pelos povos indígenas. As qualidades adaptativas do milho foram resultantes do trabalho desenvolvido pelos indígenas americanos. Entretanto, a domesticação do primitivo milho tornou-o extremamente dependente do homem. Seus órgãos vegetativos são tipicamente anuais, suas sementes germinam logo após serem formadas sob condições favoráveis, como também não se desprendem naturalmente das espigas, de maneira que emergem, formando um aglomerado de plântulas onde é muito grande a concorrência mútua (BRIEGER & BLUMENSCHIN, 1966).

Na região central da América do Sul, que se estende desde a base dos Andes no Oeste do Chaco no Paraguai até Mato Grosso no Brasil, foram encontradas plantas de milho que possuíam características primitivas como espigas finas com ráquis flexíveis, grãos que se separam muito facilmente do sabugo e cor marrom. Nesta região ainda existiam *Tripsacum australe*. Assim parece possível que esta seja a região mais exata na qual aconteceu o primeiro

cruzamento entre o milho selvagem e *Tripsacum* que deu origem ao milho doméstico (BRIEGER, 1944).

A posição botânica do milho, de acordo com Doebley (1990), pode ser caracterizada da seguinte forma: reino: *Plantae*; divisão *Anthophta*; classe *Monocotiledonae*; Ordem *Polaes*; família *Poaceae*; gênero *Zea*; espécie *Zea mays* L.

A produção mundial da cultura do milho na safra de 2011/2012 chegou a 885 milhões de toneladas. O Estados Unidos é o maior produtor e exportador mundial do grão com produção de 313 milhões de toneladas, exportando 12% da sua produção total. A China com produção de 192 milhões de toneladas, exportaram menos de 0,05% da produção safra 2011/2012 (USDA, 2014).

No ano de 2001 o milho no Brasil, foi cultivado em 3,6 milhões de propriedades rurais, abrangendo na safra 2000/2001, uma área de 13 milhões de hectares, e apresentou, respectivamente, produção e produtividade de 41 milhões de toneladas e 3272 kg ha⁻¹ (IBGE, 2001). Após 11 anos de cultivo, no ano de 2012 o Brasil é o segundo maior exportador (24 milhões de toneladas) mundial de grãos de milho (USDA, 2014). Atualmente no Brasil, é cultivada uma área de 14 milhões de hectares e produtividade de 5012 kg ha⁻¹. Desta forma o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, com produção de 71 milhões de toneladas. Apenas no estado do Paraná durante a 1ª e 2ª safra produziu aproximadamente 16 milhões de toneladas (t), alcançado maior produção na safra 2012, seguido por Mato Grosso (15 milhões de t) e Goiás (8 milhões de t) (IBGE, 2013).

O alto potencial produtivo desta cultura se deve à eficiência de conversão do carbono CO₂ apresentada pela espécie. Possuem características fisiológicas muito favoráveis no que se refere em produção de compostos orgânicos, mediante a utilização de energia gerada pela captação da luz. Essa eficiência se deve ao processo fotossintético tipo C₄, no qual o CO₂ é continuamente concentrado em células dispostas em forma de anel que circundam os feixes vasculares. As plantas C₄ distinguem-se por baixa perda de CO₂ na luz pela fotorrespiração e baixo consumo de água por unidade de matéria seca produzida (TAIZ & ZEIGER, 2006). Além disso, vale destacar que existe grande eficiência no transporte de materiais produzidos e acumulados nas folhas, em direção aos grãos em formação, devido principalmente à maior proximidade dos feixes vasculares das células produtoras de carboidratos, da bainha vascular das folhas (PATERNIANI & VIÉGAS, 1987).

Os grãos de *Zea mays* L. são ricos em carboidratos, e, além de serem amplamente utilizados na alimentação humana também são empregados na fabricação de ração e silagem.

Em função destas características, o milho é uma das principais culturas do país, sendo submetida a diversas pesquisas com o intuito de aprimorar o sistema de produção, como o plantio direto (SILVA et al., 2006), consorciação de culturas (CHIODEROLI, et al., 2012), melhoramento genético (OLIVEIRA et al., 2013) e a inoculação de sementes por bactérias promotoras de crescimento vegetal (SALA et al., 2005; BALDANI & BALDANI, 2005).

Nos últimos anos o cultivo do milho vem sofrendo várias mudanças de manejo, dentre elas se destacam a densidade espacial de plantas assim como a adubação nitrogenada (LANA et al., 2009). O fornecimento de fertilizantes para essa cultura eleva os custos de produção, no que se refere à exportação dos nutrientes, o fósforo é quase todo translocado para os grãos (77 a 86 %), seguido pelo nitrogênio (70 a 77 %), enxofre (60%), magnésio (47 a 69 %), potássio (26 a 43 %) e cálcio (3 a 7 %) (COELHO, 2007).

2. 2. Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas – BPCPs

A utilização de bactérias diazotróficas tem sido uma alternativa de nutrição nitrogenada em diversas Poáceas (milho, trigo, arroz), podendo obter grandes contribuições para essas culturas, suprimindo até a metade do uso de fertilizantes nitrogenados (DÖBEREINER, 1997).

As BPCPs geralmente endofíticas, são classificadas como não patógenas às plantas. São microrganismos que vivem em associação ou no interior de uma planta, sem causar injúrias como ocorre no caso de infecção por patógenos. Existem populações bacterianas que podem flutuar entre a colonização endofítica e epifítica (HALLMANN, et al., 1997).

Alguns autores classificam as BPCPs em associativas obrigatórias e/ou facultativas, sendo que as bactérias do gênero *H. seropedicae* são endofíticas obrigatórias (BALDANI et al., 1986) e *A. brasilense*, são endofíticas facultativas com predominância na região rizosférica (DÖBEREINER & DAY, 1975).

O *H. seropedicae*, endofítico obrigatório, foi isolado a partir de plantas de cana-de-açúcar, e com a descoberta dos diazotrófos endofíticos, que colonizam em número elevado as raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar e outras gramíneas, foi alterado o conceito de associações rizosféricas (MARIN et al., 1999).

Os microrganismos denominados bactérias promotoras de crescimento de plantas - BPCPs, podem estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras, sendo as mais relevantes: capacidade de fixação biológica de nitrogênio (DÖBEREINER, 1966); influência na atividade do nitrato redutase em folhas de diferentes linhagens de milho (BALDANI, et al.,

1979); produção de hormônios como auxinas, giberelinas (STRZELCZY & POKOJSKA-BURDZIEJ, 1984) e etileno (STRZELCZYK et al., 1994) e até a solubilização de fosfato (MOREIRA et al., 2010).

A denominação “Bactérias diazotróficas” é utilizada devido a uma das contribuições mais importantes proporcionada pelas BPCPs, a Fixação Biológica de Nitrogênio – FBN. No Brasil o estudo da FBN foi iniciada pela pesquisadora Joana Döbereiner. As primeiras características descritas em relação às bactérias diazotróficas no país, foram em solos ácidos da “baixada fluminense”, no estado do Rio de Janeiro (DÖBEREINER, 1953), o *Beijerinckia fluminensis* na cana-de-açúcar (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958) e *Azotobacter paspali* com grama (*Paspalum notatum* cv. Batatais) (DÖBEREINER, 1966).

A contribuição da FBN pelo gênero *Herbaspirillum* pode ser a associação mais eficiente dentre as endofíticas, especialmente na região aérea das plantas, diferentemente da associação rizosférica, como observada no caso do gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER et al., 1995).

A FBN pode ser uma alternativa para redução dos custos com fertilizantes nitrogenados. A prática da inoculação de sementes de gramíneas com a bactéria *Azospirillum brasilense* vem sendo difundida por este se tratar de um microrganismo que se localiza na região rizosférica e que geralmente encontra-se associado predominantemente ao trigo, segundo Döbereiner & Pedrosa (1987). Reis et al. (2006) afirma que cerca de 20% do total de N requerido pela cultura do trigo, pode ser assimilado por via da FBN.

O nitrogênio é absorvido em maior quantidade pelas plantas na forma de nitrato (NO_3^-) que, após absorvido, pode ser assimilado nas raízes, nos plastídeos ou nas folhas, nos cloroplastos. Existe uma forte correlação entre a taxa de assimilação de NO_3^- na parte aérea das plantas com a fotorrespiração. Em estudos realizados com trigo, observou-se que altas concentrações de CO_2 ou baixas de O_2 inibem a assimilação de NO_3^- (EPSTEIN & BLOOM, 2006).

O nitrogênio molecular N_2 representa cerca de 78% da atmosfera terrestre, porém indisponível para os organismos, pois as moléculas de nitrogênio possuem uma tripla ligação covalente altamente estável. A fixação natural de nitrogênio se dá a uma taxa de 190×10^{12} gramas de nitrogênio por ano. Desse total, a emissão de relâmpagos é responsável por cerca de 8% do N fixado, convertendo vapor de água e oxigênio em radicais hidroxilas livres altamente reativos, átomos livres de hidrogênio e átomos livres de oxigênio, que atacam a molécula de nitrogênio para formar ácido nítrico (HNO_3), o qual precipita juntamente com chuva e neve. A reação fotoquímica entre o óxido nítrico gasoso e o ozônio, que produz ácido nítrico é

responsável por 2% do nitrogênio fixado. Os restantes 90% restantes são provenientes da fixação biológica (EPSTEIN & BLOOM, 2006).

As bactérias fixadoras de nitrogênio realizam a redução de N_2 atmosférico em NH_3 . Esta reação é realizada por microrganismos que possuem o complexo enzimático da nitrogenase, conhecidos como diazotróficos (CANTARELLA, 2007). O complexo nitrogenase é formado por duas subunidades: um heterotetrâmero, a dinitrogenase $\alpha_2\beta_2$, e um homodímero, a dinitrogenase redutase γ_2 , em que a região α possui um sítio ativo para redução de N_2 , chamado de FeMo-co-fator (EPSTEIN & BLOOM, 2006; REIS, et al., 2006).

O nitrogênio é encontrado nos nucleotídeos de fosfato e nos aminoácidos que formam a estrutura dos ácidos nucléicos e das proteínas, respectivamente. O macronutriente presente nas plantas só não é mais abundante que o oxigênio, o carbono e o hidrogênio. Na agricultura, há um grande ganho de produtividade com a utilização de fertilizantes com nitrogenados, ficando implícita sua importância (TAIZ & ZEIGER, 2009).

A absorção de nitrogênio pelas raízes podem interferir no pH rizosférico. Para a entrada de amônio NH_4^+ nas células das raízes, ocorre a extrusão de prótons, assim como verificado na absorção de outros cátions. Com isso, há um aumento do potencial hidrogeniônico aumentando o pH do meio. Em experimento realizado por COSTA et al. (2008), estes observaram que, após três anos com contínuas adubações de sulfato de amônio, houve acidificação do solo elevando o teor de Al^{3+} do solo. De modo inverso, quando ocorre a absorção de NO_3^- , a tendência do pH rizosférico é se tornar mais básico, devido à grande quantidade de cargas negativas (NO_3^-) que tendem a ser absorvidas em simporte com H^+ .

O *Azospirillum brasilense* é um microrganismo do solo de vida livre capaz de fixar nitrogênio da atmosfera e produzir hormônios vegetais. Novakowski et al. (2011) avaliando o efeito residual da adubação nitrogenada na pastagem, a inoculação do *A. brasilense* em sementes de milho proporcionou produtividade superior ao tratamento sem inoculação mesmo sob o aumento das doses de N aplicada na pastagem. No desenvolvimento inicial do milho, o endofítico *Herbaspirillum seropedicae* proporcionou maior acúmulo dos macronutrientes NPK no tecido foliar, com destaque ao maior acúmulo em até 30% de fósforo (DALDOTTO, 2012). A associação das Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas – BPCPs *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, proporcionaram aumento de 7% na produtividade de milho (DARTORA et al., 2013).

2. 3. Influência do pH nas BPCPs

Diversos fatores podem influenciar no desenvolvimento das culturas em geral. A disponibilidade de nutrientes para as plantas é dependente no potencial hidrogeniônico (pH) do solo. Há maior disponibilidade dos macronutrientes no solo a partir do pH 5,5, sendo de forma inversa para os micronutrientes (MALAVOLTA, 1979).

A acidez do solo é um dos fatores limitantes ao desenvolvimento das bactérias, sendo que as respostas podem variar em função da estirpe em questão. Estes organismos crescem em uma faixa de pH ideal entre 6,0 e 7,0, e poucos crescem bem em pH menor que 5,0 (GRAHAM et al., 1994; RODRIGUES et al., 2006; ALI et al., 2009).

O gênero *Herbaspirillum* é microaerofílico, que toleram drásticas mudanças no pH (5,3 – 8,0) e uma concentração de oxigênio maior que as espécies de *Azospirillum* (BALDANI et al., 1986). Com exceção do *A. amazonense*, as demais espécies do gênero *Azospirillum* são hábeis para crescer em pH próximo à neutralidade (DÖBEREINER et al., 1995).

Rufini et al., (2011) estudaram o efeito do pH do meio de cultivo na eficiência simbiótica de estirpes de *Rhizobium* na cultura do feijoeiro-comum. Este estudo reafirmou que pH ideal para o meio de cultivo variou com as estirpes. As parcelas que receberam calagem apresentaram maior rendimento que as demais, além de promover rendimento de grãos equivalente aos tratamentos com adubação de 70 kg ha⁻¹ de N.

Os endofíticos são encontrados colonizando diferentes espécies vegetais, incluindo espécies da família *Poaceae*, tais como arroz, milho e cana-de-açúcar (MOREIRA et al., 2010). Suas contribuições são diversas, principalmente em solos do cerrado onde é comum a ocorrência de deficiência de nutrientes. Neste caso, a contribuição na absorção de NPK já foi observada no desenvolvimento inicial do milho, sob inoculação de plântulas ao terceiro dia após germinação (DALDOTTO, 2012).

No caso de pH mais ácido do solo, a utilização de estirpes do *A. amazonense* torna-se conveniente pela adaptabilidade a esta condição. Stamford et al. (2004), após o cultivo de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) observaram redução no pH e aumento no P disponível quando foram aplicados biofertilizantes a partir de rocha fosfatada de Gafsa (9% P₂O₅ solúvel), associado ao *Acidithiobacillus*, provavelmente devido à atuação do *Acidithiobacillus* que promoveram produção de ácido sulfúrico suficiente para solubilizar fósforo da rocha fosfatada. Walpola & Yoon (2013) no estudo com plantas de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) e bactérias promotoras da solubilização de fosfato no solo, observaram uma correlação proporcional à

acidez do solo e populações de *Pantoea agglomerans* e *Burkholderia anthina*, obtendo-se maior teor de P da parte aérea e raiz.

3. REFERÊNCIAS

- ALI, S. F.; RAWAT, L. S.; MEGHVANSI, M. K. & MAHNA, S. K. Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. *Journal of Agricultural and Biological Science*, v. 4, n. 1, p. 13-18, 2009.
- BALDANI J.I.; BLAÑA R.A.G.; & DÖBEREINER J. Efeito do genótipo do milho na atividade da nitrogenase e da nitrato redutase. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 14, n. 2, p. 165–173, 1979.
- 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*, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Baltimore, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Baltimore, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BERGAMASCHI, C. *Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas às raízes e colmos de cultivares de sorgo*. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BRIEGER, F. G. & BLUMENSCHNEIN, A. Botânica e origem do milho. In: INSTITUTO BRASILEIRO DE POTASSA, ed. *Cultura e adubação do milho*. São Paulo, p. 81-108, 1966.
- BRIEGER, F. G. Estudos experimentais sobre a origem do milho. *Anais de Escola Superior de Agricultura*. Luiz de Queiroz, v. 1, p. 225-277, 1944.
- CANTARELLA, L. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, R. L. F. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). *Fertilidade do solo*. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2007, p. 376-470.
- CHIODEROLI, C. A.; MELLO, L. M. M. de; HOLANDA, H. V. de; FURLANI, C. E. A.; GRIGOLLI, P. J.; SILVA, J. O. da R. & CESARIN, A. L. Consórcio de *Urochloas* com milho em sistema plantio direto. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 42, n. 10, p. 1804-1810, 2012.
- COSTA, K. A. de P.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA, I. P. de; ARAÚJO, J. L.; & RODRIGUES, R. B.; Doses e fontes de nitrogênio em pastagem de capim-marandu. II - nutrição nitrogenada da planta. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 1601-1607, 2008.

- DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D. & SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 17, n. 10, p. 1023–1029, 2013.
- DÖBEREINER, J. & DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J., ed. *Nitrogen fixation; proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Pullman: Washington State University, 1975. v. 2. p. 518-538.
- DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F. O. Nitrogen – *Fixing Bactéria in Nonleguminous Croup Plants*, E.U.A, Springer – Verlag, p. 120. 1987.
- DÖBEREINER, J. & RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 1, p. 261–272, 1958.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter* em solos ácidos. *Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícolas*. v. 11, p. 1–36, 1953.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp.n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.1, p.357-365, 1966.
- DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in tropics: Social and economic contribution. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. & BALDANI, V.L.D. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas*. Brasília, Embrapa-SPI. Itaguaí, Embrapa-CNPAB, 1995. 60p.
- EPSTEIN, E. & BLOOM, A. J. *Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas*. 2. ed. Tradução de Maria Edna Tenório Nunes. Londrina: Ed Planta, 2006. 403 p. Título original: Mineral nutrition of plants.
- GOMES, M. de L. *Bactérias diazotróficas endofíticas em cultivares de milho em áreas de cerrado e mata no Estado de Roraima*. (Dissertação) Boa Vista, RR, Universidade Federal de Roraima, p. 79, 2009.
- GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTINEZ, E.; NAARONS, S. R. & QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 40, p. 198-207, 1994.

- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F. & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HOEHNE, F. C. *Botânica e Agricultura no Brasil no Século XVI*. Companhia Editora Nacional. São Paulo, 1937, p. 410.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Levantamento sistemático da Produção Agrícola março de 2013*. Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 1-84, 2013.
- NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A. de; NOVAKOWISKI, J. H. & CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina, v. 32, n. 4, p. 1687-1698, 2011.
- LANA, M. do C.; WOYTICHOSKI JÚNIOR, P. P.; LUCCA E BRACCINI, A.; SCAPIM, C. A.; RIZZATTI, Á. M. & ALBRECHT, L. P. Arranjo espacial e adubação nitrogenada em cobertura na cultura do milho. *Acta Scientiarum. Agronomy*. Maringá, v. 31, n. 3, p. 433-438, 2009.
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. & GOMIDE, R. L. *Fisiologia da planta de milho*. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, p. 15-33, 1995 (Circular Técnica, 20).
- MALAVOLTA, E. *ABC da adubação*, 4.ed. São Paulo. Agronômica Ceres, 1979. 255p.
- MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S. & BALDANI, J. I. *Fixação biológica de nitrogênio de importância para a agricultura tropical*. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 1999 (Série Documentos).
- MOREIRA, F. M. de S.; SILVA, K. da; NÓBREGA, R. S. A. & CARVALHO, F. de. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, Bom Jesus, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.
- OLIVEIRA, L. R. de; MIRANDA, G. V.; LIMA, R. O. de; FRITSCHÉ, R. N. & GALVÃO, J. C. C. Eficiência na absorção e utilização de nitrogênio e atividade enzimática em genótipos de milho. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, v. 44, n. 3, p. 614-621, 2013.
- PATERNIANI, E. & VIÉGAS, G. P. *Melhoramento e produção de milho*. 2. ed. rev. aum. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, 1987, p. 409.
- REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. de M. de; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L. & BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2006. p. 153-174.

- RODRIGUES, C. S.; LARANJO, M.; OLIVEIRA, S. Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. *Current Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 1-7, 2006.
- RODRIGUES, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B. da; PINTO JUNIOR, A. S.; KLEIN, J. & COSTA, A. C. P. R. da. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 31-37, 2014.
- SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B. & SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de BPCP em genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 345-352, 2005.
- SILVA, E. C. da; MURAOKA, T.; BUZETTI, S. & TRIVELIN, P. C. O. Manejo de nitrogênio no milho sob plantio direto com diferentes plantas de cobertura, em Latossolo Vermelho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 3, 477-486, 2006.
- STAMFORD N. P.; SANTOS C. E. R. S.; STAMFORD JÚNIOR, W. P. & DIAS, S. L. Biofertilizantes de rocha fosfatada com *Acidithiobacillus* como adubação alternativa de caupi em solo com baixo P disponível. *Analytica*, São Paulo, v. 3, n. 9, p. 48-53, 2004.
- STRZELCZYK, E. & POKOJSKA-BURDZIEJ, A. Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Plant and soil*, Crawley, v. 81, n. 2, p. 185-194, 1984.
- STRZELCZYK, E. & POKOJSKA-BURDZIEJ, A. Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Plant and soil*, Crawley, v. 81, n. 2, p. 185-194, 1984.
- STRZELCZYK, E.; KAMPER, M. & LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research*, v. 149, p. 55-60, 1994.
- STRZELCZYK, E.; KAMPER, M. & LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research*, v. 149, p. 55-60, 1994.
- USDA – United States Department of Agriculture. *World Agricultural Supply and Demand Estimates*. 2014. Disponível em: <www.usda.gov/oce/commodity/wasde/index.htm>. Acesso em: 03/jan. 2014.

WALPOLA, B. C. & YOON, M. H. Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). *Chilean Journal of Agricultural Research*, v. 73, n. 3, p. 275-281, 2013.

CAPÍTULO II

Desenvolvimento inicial de plantas de milho na associação de bactérias promotoras de crescimento de plantas e níveis de acidez do solo

Early development of corn plants in association Plant Growth-Promoting Bacteria and levels of soil acidity

Resumo

Objetivou-se neste trabalho verificar o desempenho entre a inoculação de sementes com *A. brasilense* e *H. seropedicae* e níveis de pH ácido do solo no desenvolvimento inicial de plantas de milho desprovida da adubação nitrogenada. Foi realizado experimento em casa de vegetação, em vasos de 13 dm³, com o híbrido 30F53H. O delineamento foi de blocos ao acaso com esquema fatorial 3x4, sendo um fator os níveis de acidez do solo [pH (CaCl₂) de 4,5, 5,0 e 5,5] e outro a inoculação das sementes: sem inoculação; *Azospirillum brasilense* (Ab-V5), *Herbaspirillum seropedicae* (SmR1) e mistura das estirpes Ab-V5+SmR1. A inoculação foi realizada via sementes, antes da semeadura, utilizando volume de 4 mL na concentração de 10⁷ UFC mL⁻¹ para mil sementes. A acidez do solo influenciou nas variáveis de altura das plantas, matéria seca de raiz, diâmetro de colmo, índice SPAD, teor de P foliar, taxa de assimilação líquida de CO₂, condutância estomática, transpiração e uso eficiente da água. O pH 4,5 do solo apresentou média superior apenas para o teor de P foliar. A inoculação das bactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas de milho promoveu maior o acúmulo de N foliar, aumento da área foliar, índice SPAD e diâmetro de colmo, e não influenciaram no acúmulo de matéria seca das plantas.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense*, trocas gasosas.

Abstract

The aim of this work was to verify the influence of the association between diazotrophic bacteria and different soil acidity levels in the early development of corn plants. The experiment was conducted in a greenhouse, in pots of 13 dm³ with the hybrid 30F53H. The experimental design was randomized blocks in 3x4 factorial, which one factor was the soil acidity levels [pH (CaCl₂) de 4,5; 5,0 e 5,5] and the other was seeds inoculation: no inoculation; *Azospirillum brasilense* (Ab-V5), *Herbaspirillum seropedicae* (SmR1) and strain mixture Ab-V5 + SmR1. The inoculation was accomplished through seeds before sowing, using 4 mL with concentration of 10⁷ colony forming units mL⁻¹. The soil acidity decreased the plant height, stem diameter, SPAD index and P content. The inoculation of plant growth promoting bacteria in corn plants promoted N accumulation in the leaf, increased leaf area, SPAD index and stem diameter. However, did not influence the dry matter accumulation.

Key words: *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense*, gas-exchange.

Introdução

O Brasil, durante as safras de milho de 2012, atingiu produção de 71 milhões de toneladas de grãos. Apenas no estado do Paraná durante a 1ª e 2ª safra rendeu-se aproximadamente 16 milhões de toneladas, alcançado maior produção deste ano, seguido por Mato Grosso e Goiás (IBGE, 2013).

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas do país, sendo submetida a diversas pesquisas com o intuito de aprimorar o sistema de produção, como o plantio direto (SILVA et al., 2006), consorciação de culturas (CHIODEROLI, et al., 2012), melhoramento genético (OLIVEIRA et al., 2013) e a inoculação de sementes por bactérias promotoras de crescimento vegetal (SALA et al., 2005; BALDANI & BALDANI, 2005), sempre com o intuito de promover o aumento da produção e produtividade da cultura. O fornecimento de fertilizantes para essa cultura eleva o custo de produção, no que se refere à reposição dos nutrientes exportados pelo grão; cerca de 70 a 77 % do nitrogênio é translocado para os grãos (COELHO, 2007).

A matéria orgânica do solo não é diretamente aproveitada pelos vegetais, sendo necessário ocorrer mineralização para produzir NH_4^+ , o qual pode ser nitrificado posteriormente, gerando NO_3^- , ambos os íons disponíveis para as plantas (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000).

Em solos com deficiência de nutrientes e acidez acentuada como ocorrem em solos do Cerrado brasileiro, podem comprometer a cultura do milho, apresentando sintomas de deficiência. Folhas de cor verde amareladas uniforme, principalmente em folhas mais velhas e atrofiamento de raízes são os primeiros sintomas da deficiência do nitrogênio e solos de pH ácido (MALAVOLTA, 1979). A prática da calagem, neutraliza o alumínio tóxico e favorece o desenvolvimento radicular e a atividade microbiana, que tem papel relevante nas reações do nitrogênio no solo (QUAGGIO, 2000).

A utilização de “bactérias promotoras de crescimento de plantas” (BPCP) tem sido utilizada como uma alternativa de nutrição nitrogenada em diversas poáceas, como milho (DARTORA et al., 2013), trigo (RODRIGUES et al., 2014) e arroz (MATTOS et al., 2010), podendo contribuir com N para essas culturas; suprimindo, em algumas situações, até metade do uso de fertilizantes nitrogenados (DÖBEREINER, 1997; REIS JÚNIOR et al., 1998).

Quando as BPCP estão associadas às plantas, são denominadas associativas e são divididas em dois grupos: bactérias endofíticas obrigatórias (*Herbaspirillum*) e endofíticas facultativas (*Azospirillum*). As endofíticas obrigatórias colonizam o interior das raízes e também a parte aérea e, ocorrem preferencialmente em plantas não leguminosas. Já os microrganismos facultativos colonizam o interior, porém possui preferência quanto a região da rizosfera (DÖBEREINER & DE-POLLI, 1980; ROCHA et al., 1981; BALDANI et al., 1986a). As bactérias diazotróficas associativas podem contribuir para o crescimento vegetal não só pelo fornecimento de nitrogênio, mas também por outros mecanismos como produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, antagonismo a fitopatógeno, entre outros (MOREIRA et al., 2010).

As bactérias denominadas como BPCP, são organismos capazes de fixar nitrogênio da atmosfera, nos quais ocorre reação com redução do N_2 a NH_3 através da enzima nitrogenase, sendo conhecidos como fixadores de N_2 ou diazotrofos (BERGAMASCHI, 2006). Além de induzir a produção de reguladores de crescimento vegetal (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), também há aumento de área foliar, altura da planta,

diâmetro do caule, número de folhas e matéria seca, redução do tempo de aclimatização, maior sobrevivência de mudas, controle de doenças e aumento de produtividade (MARIANO et al., 2004).

A característica endofítica facultativa, contribui à variabilidade de reações por meio da associação com o meio rizosférico, pois nesta região ocorre intensa extrusão de prótons que interferem no potencial hidrogeniônico do meio. Desta forma, além da variação genotípica das plantas e dos grupos endofíticos promotores de crescimento, também há outros fatores que podem influenciar no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), como o pH do solo.

Souza et al. (2010), trabalhando com a cultura da soja, observaram que as mudanças do pH da rizosfera e no pH não rizosférico, são dependentes do pH inicial dos solos, e teores de micronutrientes B, Cu, Fe, Mn e Zn na parte aérea das plantas aumentaram com a acidificação da rizosfera, principalmente após a nodulação das raízes. O pH do solo influencia diretamente na disponibilidade de nutrientes para a planta, sendo que os solos do Cerrado brasileiro são geralmente ácidos (4,0 a 5,5 pH), causando toxidez por ferro (Fe) e alumínio (Al), que por sua vez fixam o fósforo (P), tornando-o indisponível pelas plantas (MALAVOLTA, 1979).

A acidez identificada em solos agrícolas varia de 4,0 a 7,0 em CaCl_2 (LOPES, 1989), proporcionando baixa CTC, que conseqüentemente ocasiona a lixiviação de cátions. No solo, o nitrogênio (N) é mais disponibilizado para as raízes em pH acima de 5,5 (MALAVOLTA, 1979). A assimilação de macronutrientes pelas plantas apresenta queda de 79,5% para 26,7%, ao reduzir o pH 6,0 para pH 4,5 (EMBRAPA, 1980).

Apesar da faixa considerada ideal para a máxima atividade microbiana no solo variar de 6,0 a 6,5 (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), sendo que estudos com pH abaixo deste nível foi verificado resultados promissores ao uso das BPCP em poáceas (DARTORA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014).

As bactérias do gênero *Azospirillum* requerem pH próximo a neutralidade em temperatura entre 32 e 37°C para o seu crescimento (BALDANI et al., 1986b), e para o gênero *Herbaspirillum* são microaerofílicos, se desenvolvem em mudanças extremas do pH entre 5,3 e 8,0 (DÖBEREINER et al., 1995).

Face ao exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar o desempenho entre a inoculação de sementes com *A. brasilense* e *H. seropedicae* e níveis de pH ácido do solo no desenvolvimento inicial de plantas de milho desprovida da adubação nitrogenada

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido “Prof. Dr. Mário César Lopes” pertencente à Universidade Estadual do oeste do Paraná - Unioeste, no município de Marechal Cândido Rondon/PR com as coordenadas geográficas de 54° 22' W e 24° 46' S, e altitude média de 420 m.

O solo utilizado foi um Argissolo Amarelo Distrófico coletado no município de Iporã/PR na camada 0-0,20 m de profundidade. De acordo com o laudo de análise química e física do solo, obtiveram-se os seguintes resultados: P = 4,21 mg dm⁻³; MO = 8,20 g dm⁻³; pH (CaCl₂) = 4,52; H+Al = 2,75; Al³⁺ = 0,35 cmol_c dm⁻³; K⁺ = 0,60 cmol_c dm⁻³; Ca²⁺ = 1,50 cmol_c dm⁻³; Mg²⁺ = 0,41 cmol_c dm⁻³; CTC = 5,26 cmol_c dm⁻³;

V% = 47,72; Cu = 2,5 mg dm⁻³; Zn = 1,30 mg dm⁻³; Mn = 11,00 mg dm⁻³; Fe = 48,40 mg dm⁻³; 201,50 g kg⁻¹ de argila, 105,70 g kg⁻¹ de silte e 692,80 g kg⁻¹ de areia.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), sendo os tratamentos arranjados em esquema fatorial 3x4 com três níveis de acidez dos solos (4,5, 5,0 e 5,5 pH) e o segundo fator, a inoculação das sementes (sem inoculação, sementes inoculadas com *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5, sementes inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 e associação das duas bactérias Ab-V5 e SmR1), com quatro repetições totalizando 48 parcelas.

Para se obter o pH (CaCl₂) desejado do solo, foi realizado a curva de incubação do solo com a neutralização de 0, 30, 60, 90 e 120% da acidez potencial, com a utilização de calcário dolomítico. Amostras de 0,250 dm³ de solo foram incubadas em sacos plásticos, por 21 dias, com teor de umidade de 80% da capacidade de campo. Após esse período foi aferido o pH e obtido os seguintes valores: pH₁= 4,39, pH₂= 5,75, pH₃= 6,90, pH₄= 7,51, pH₅= 7,66. Assim, os tratamentos de pH (CaCl₂) do solo 4,5; 5,0 e 5,5, foram obtidos através da equação: $pH = 4,779 + 3,706Ca - 1,162Ca^2$, determinando as doses 0, 0,789 e 2,705 g de calcário por vaso, respectivamente.

O solo foi secado em condições ambientes, adicionou-se as doses de calcário e uma solução de adubação utilizando 300 mg dm⁻³ de P, 100 mg dm⁻³ de K e 40 mg dm⁻³ de S conforme Alvarez (1974), ficando isenta da adubação nitrogenada e micronutrientes. Em seguida, foram homogeneizados e dispostos em vasos de 13 dm³, o qual submetidos em repouso por 30 dias com teor de umidade de 80% da capacidade de campo.

Houve mudança nas características química do solo, visto que após 41 DAS, houve alteração do pH do solo, conforme os níveis desejáveis com a aplicação do calcário. O aferimento do pH dos tratamentos, que foram adicionados 0, 0,789 e 2,705 g de calcário por vaso, apresentaram médias de 4,45; 5,13 e 5,59 pH (CaCl₂), respectivamente.

Foram semeadas seis sementes do híbrido de milho 30F53H *Pioneer*[®]. Três dias após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste mantendo três plantas por vaso, sendo considerada uma parcela experimental, que foram conduzidas até aos 41 dias após semeadura (DAS).

As estirpes *A. brasilense* e *H. seropedicae* foram fornecidas pelo laboratório de Bioquímica e Biologia molecular da UFPR de Curitiba. E foi seguido a recomendação do volume da solução inoculadora de 4 mL para 1000 sementes devido a concentração baixa que se encontrava o inoculante utilizado, tendo a solução de 10⁷ unidades formadoras de colônias ativas mL⁻¹ (UFC mL⁻¹).

Para a verificação da fase de desenvolvimento que identificou efeito dos tratamentos, foi avaliada a altura de plantas nos períodos de 14, 21 e 41 DAS, e aos 41 DAS: diâmetro do colmo, assim como o teor relativo do pigmento da clorofila efetuada com o auxílio do medidor portátil SPAD 502 plus *Daminolta*, nas folhas baixas (SPAD1), média (SPAD2) e superiores (SPAD3). Também foi mensurada aos 41 DAS a área foliar, volume de raiz e massa de matéria seca de folha, colmo, raiz e total.

Raízes, folhas e colmos foram colocados em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 horas, posteriormente moídas em moinho do tipo Willye, realizando-se a análise química da parte aérea total das plantas, para determinação dos teores de N, P e K (EMBRAPA, 2009).

Também foram medidas variáveis de trocas gasosas realizadas pelas plantas aos 41 DAS no período da manhã entre 9h00 e 11h00 com o medidor portátil de trocas gasosas (*Infra-Red Gas Analyzer* - IRGA Li-6400XT) na fase fenológica V4, em folhas intermediárias totalmente expandidas e expostas à luz solar direta foram determinadas: (*A*) – Taxa de assimilação líquida de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); (*E*) – Taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); *g_s* – Condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Será ainda calculada a relação: *EUA* (eficiência no uso da água) = *A/E*. Foi utilizada uma densidade de fluxo de fótons (PPFD) de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, com desvio padrão de 0,7313. A média apresentada de densidade de fótons do meio externo proporcionada pelo aparelho foi de $1142,35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e média da umidade relativa de 36,55%.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando houve efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5%, com o auxílio do software SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010).

Resultados e Discussão

Para as características biométricas e destrutivas altura de planta, massa de matéria seca de raiz, diâmetro de colmo e índice de clorofila (SPAD) foi observado diferença de comportamento para os pH do solo testados. Para os valores médios dos tratamentos de inoculação foram observadas diferenças na área foliar, diâmetro de colmo, índice de clorofila e teor de nitrogênio. As análises das trocas gasosas realizada nas plantas apresentaram influência somente nos diferentes níveis de acidez do solo, isto é, a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal inteferiu no desenvolvimento inicial das plantas de milho (Tabela 1 a 5).

A avaliação da altura de plantas durante diferentes épocas de desenvolvimento do milho auxilia na observação da fase fenológica que representa maior resposta à produção de massa. Os níveis de pH baixo do solo apresentaram efeito significativo apenas no último dia de avaliação (41 DAS) (Tabela 1). Independente da inoculação, as plantas de milho com pH do solo 4,5 apresentaram altura média de 56,90 cm, inferior às plantas em pH 5,0 (59,69 cm), o qual não diferiu do tratamento de pH 5,5 (58,22 cm). Logo, o pH mais ácido (4,5) prejudicou altura das plantas de milho aos 41 dias de desenvolvimento em relação ao pH 5,0.

A inoculação de BPCP não influenciou diretamente na altura de plantas aos 14, 21 e 41 DAS, em função aos diferentes níveis de pH do solo. Em condições de campo aberto, Dartora et al. (2013) utilizando o híbrido de milho 30F50H e inoculação de sementes por *A. brasilense* e *H. seropedicae*, também não encontraram diferenças de altura de plantas, tanto na fase vegetativa quanto reprodutiva.

A avaliação de altura de plantas de milho em diferentes épocas, demonstrou que aos 41 DAS iniciou-se as diferenças entre médias do fator pH do solo, isto é, para as condições do presente estudo, esta análise é ideal aos 41 dias após semeadura.

Na Tabela 2 pode ser observado que o pH de 4,5 apresentou uma média inferior com diferença de 18% da massa de matéria seca de raiz ($3,96 \text{ g planta}^{-1}$) em relação à média apresentada no pH 5,0 ($4,87 \text{ g planta}^{-1}$). Neste estudo, a inoculação de BPCP no desenvolvimento inicial do milho submetido em pH ácido do solo, não interferiu nas variáveis de massa de matéria seca de raiz, colmo, foliar e total; apesar de não

diferenciarem, as plantas inoculadas pela associação das duas estirpes Ab-V5 e SmR1 sempre apresentaram maiores médias de massa de matéria seca.

Rodrigues et al. (2014) em solo com pH 4,8 (CaCl_2), não encontraram influência quanto ao uso da estirpe Ab-V5+ácido húmico no acúmulo de massa de matéria colmo+bainha na cultura do trigo. Da mesma forma, ao testarem três isolados *Azospirillum brasiliense*, *Achromobacter insolitus* e *Herbaspirillum* em trigo, Sala et al. (2008) não observaram diferenças significativa na massa de matéria seca de colmo+folha quando submetido a doses de adubação nitrogenada.

Ao utilizarem *Azospirillum amazonense* (resistente ao pH ácido do meio) e com adição de adubação nitrogenada em solução nutritiva (pH 5,13), Reis Júnior, et al. (2008) encontraram maior rendimento em massa de matéria seca por plantas de milho inoculadas, provavelmente devido à produção de substâncias promotoras de crescimento pela bactéria (BERGAMASCHI, 2006) (BASHAN et al., 2004).

O mecanismo de promoção de crescimento vegetal por BPCP em pH ácido do solo ainda necessita de mais estudos para entender os fatores envolvidos, visto que a inoculação de BPCP não afetou no incremento de produção do feijoeiro em relação ao pH do solo. Em feijoeiro-comum, o aumento do pH do solo favoreceu a simbiose das bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas, porém variaram de acordo com diferentes estirpes (RUFINI, et al., 2011). Para Campanharo et al. (2010), os resultados encontrados a partir das características do feijoeiro-comum são efeitos benéficos e já conhecidos; provavelmente com a correção da acidez do solo favoreceu o crescimento das plantas (VERONESE et al., 2012).

A área foliar (AF) indica a dimensão do aparelho fotossintetizante; teoricamente, quanto maior área foliar mais eficiente é a taxa de assimilação de CO_2 devido ao aumento da captação da radiação solar. Para esta variável a associação das estirpes Ab-V5 + SmR1 proporcionaram maior área foliar com média de $31,71 \text{ dm}^2$ diferenciando da estirpe SmR1 ($24,73 \text{ dm}^2$), proporcionando acréscimo médio de 22% na área foliar (Tabela 3).

O aumento da AF intensifica a transpiração foliar, contudo, a diminuição da AF é uma estratégia para limitar a transpiração. Folhas jovens de cana-de-açúcar são capazes de se enrolar e reduzir a área foliar projetada e com isso reduzir a radiação recebida (MARCOS, 2012). O uso da estirpe SmR1 apresentou uma média inferior com uma diferença de 22% da AF quando comparado com a média ($31,71 \text{ dm}^2$) da associação das duas estirpes (Ab-V5 + SmR1). Neste caso, não é possível afirmar este mecanismo de defesa, pois, os tratamentos com inoculação de BPCP não apresentaram diferenças significativa nas medidas de transpiração (E), fornecidas pelo equipamento IRGA (Tabela 5).

O diâmetro do colmo apresentou diferenças para os níveis de pH e também para os tratamentos de diferentes bactérias; com o pH de 5,5 obteve $24,71 \text{ cm}$ de diâmetro, diferenciando dos demais níveis de pH. A associação das estirpes Ab-V5 + SmR1 proporcionaram maior diâmetro médio ($24,20 \text{ cm}$) quando comparado à ausência de inoculação ($22,35 \text{ cm}$), obtendo incremento em torno de 7%. Essas características mostraram que o pH 5,5 e *A. brasiliense* + *H. seropedicae* podem proporcionar melhor condicionamento para tolerar o acamamento de plantas, e também favorecer ao acúmulo de sólidos solúveis (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000) agregando à continuidade do desenvolvimento do milho, no entanto, não se pode afirmar que a associação dos fatores (pH 5,5, Ab-V5 e SmR1) podem proporcionar tal efeito, pois, não

houveram interação entre os dois fatores (pH x Inoculação). Semelhantemente, em trabalho a campo com pH do solo 5,5, Dartora et al. (2013) relatou que a combinação das estirpes Ab-V5 e SmR1 proporcionou maior diâmetro basal do colmo na fase vegetativa em relação à testemunha, proporcionando aumento de 15%.

Apesar de não ter avaliado a ocorrência e localização das bactérias na planta, o adensamento das raízes no vaso, pH ácido e ausência de adubo nitrogenado no solo, podem ter proporcionado condições de estresse, que pode ter estimulado a preferência de colonização de algum órgão da planta, ocorrendo assim um incremento no diâmetro de colmo, área foliar e o índice de clorofila (Tabela 3). Em estudo a fim de avaliar a ocorrência e a localização das BPCP no sorgo, detectou-se presença de bactérias no tecido das plantas, dentre elas, o *A. brasilense* e *H. seropedicae*, sendo que a sua localidade sofre influência do genótipo da planta e da adubação nitrogenada (BERGAMASCHI, 2006).

O teor relativo de clorofila das folhas baixas (SPAD 1), média (SPAD 2) e superiores (SPAD 3) possibilitou verificar que as folhas mais velhas apresentaram maior variação do índice SPAD, onde os três níveis de pH ácido se diferenciaram, portanto no pH de 4,5 houve inferioridade do índice de clorofila das folhas (14,34) enquanto ao pH 5,0 e 5,5 apresentaram médias de 15,89 e 17,19, respectivamente. As folhas velhas, intermediárias e novas com pH 5,5 apresentaram 17,19, 17,34 e 17,69, respectivamente, sendo superior aos demais níveis de acidez. Pode-se observar que o comportamento decrescente do índice de clorofila, das folhas novas para as mais velhas pode explicar a degradação da clorofila quando as folhas atingem a senescência. É importante ressaltar, que os valores encontrados em relação ao pH podem ter ocorrido com a elevação da acidez do solo, prejudicando o desenvolvimento das raízes.

A associação de Ab-V5 e SmR1 proporcionou maior índice relativo de clorofila (17,59) para SPAD 2, diferindo do tratamento sem inoculação (15,00). As folhas novas são consideradas como órgão de dreno metabólico, ou seja, não são capazes de suprir suas próprias demandas por carbono, sendo assim necessitam de assimilados providos de órgãos ou “tecidos fonte” para o seu desenvolvimento até que se tornem uma folha “auto-sustentável”, e ao iniciarem a senescência, ocorre uma remobilização de nutrientes (TAIZ & ZEIGER, 2006). Desta forma, a inoculação dos endofíticos *A. brasilense* e o *H. seropedicae*, predominantemente na rizosfera e região interna das raízes, respectivamente, proporcionou maior teor relativo de clorofila nas folhas média (fotossinteticamente ativas). Observou-se também que as folhas médias (SPAD2), são propícias à avaliação do teor relativo de clorofila, apresentando maiores médias do índice SPAD independente dos tratamentos.

As medidas observadas com o índice SPAD das folhas podem estar relacionada à assimilação de nitrogênio pelas plantas. Em estudo realizado durante o estágio vegetativo do milho inoculado com *A. brasilense*, foi obtido aumento de 7% no índice SPAD quando comparado ao tratamento sem inoculação (QUADROS, 2009); o mesmo autor também observou aumento proporcional quando submetido à adubação nitrogenada. O aumento de concentração de clorofila nas folhas com leituras por SPAD, também foi constatado tanto com acréscimo de doses de N em tomateiro (GUIMARÃES et al., 1999) quanto com o incremento do teor foliar de N em algodoeiro herbáceo (NEVES et al., 2005).

Observou-se maior média do teor N foliar nas plantas inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* (7,77 g kg⁻¹), sendo superior ao tratamento sem inoculação (6,78 g kg⁻¹) (Tabela 4). Pode ser verificado que no

tratamento com *H. seropedicae* proporcionou maior valor de N ($7,77 \text{ g kg}^{-1}$) e menor valor de área foliar (24,73). Para Roesch et al. (2006), as BPCP se tornam ineficientes quando submetidas a altas doses de N durante os primeiros estágios de crescimento. No entanto, na ausência total de adubação nitrogenada, como é o caso do presente estudo, pode ter estimulado a FBN da atmosfera. Apesar do baixo teor de MO ($8,20 \text{ g dm}^{-3}$) do solo, a inoculação combinada das estirpes (Ab-V5 e SmR1) e o isolado Ab-V5 elevaram o teor de N foliar quando comparado à testemunha, porém não diferindo significativamente. De fato, o *Azospirillum* sp. desempenha papel essencial na promoção do crescimento, excretando ácido indolacético (AIA) (BASHAN et al., 2004), que pode melhorar a absorção de nutrientes e elevar a eficiência do uso do nutriente disponível (HUNGRIA, et al., 2010).

O teor foliar de N não foi influenciado significativamente com a variação dos níveis de pH do solo no presente ensaio (Tabela 4). Porém, tem sido observado respostas diferenciadas entre cultivares de milho quanto a adubação nitrogenada por BPCP (HUNGRIA et al., 2010; DARTORA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2013;). Araújo et al. (2013), ao estudarem o acúmulo de N foliar em 35 genótipos de milho em função de inoculação das sementes com *H. seropedicae* sem adubação nitrogenada, verificaram que apenas nove híbridos obtiveram ganho significativo de N foliar.

Várias pesquisas foram realizadas para compreender a FBN promovida pelas BPCP, no entanto com base nos resultados deste estudo com as bactérias em pH ácido, é necessário realizar breve ressalva sobre os endofíticos estudados. O gênero *Herbaspirillum* são microaerofílicos, que toleram drásticas mudanças no pH (5,3 – 8,0) e uma concentração de oxigênio maior que as espécies de *Azospirillum* (BALDANI et al., 1986b). Com exceção do *A. amazonense*, as demais espécies do gênero *Azospirillum* são hábeis para crescer em pH perto do neutro (DÖBEREINER et al, 1995). O *H. seropedicae*, um endofítico obrigatório, foi isolado a partir de plantas de cana-de-açúcar, e com a descoberta dos diazotrófos endofíticos, que colonizam em número elevado as raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar e outras gramíneas, foi alterado o conceito de associações rizosféricas (MARIN et al., 1999). Döbereiner et al. (1995) presumem que a contribuição de fixação de N atmosférico realizada pelo gênero *Herbaspirillum* é a associação mais eficiente dentre as endofíticas, especialmente nos trópicos do que nas associações rizosféricas.

Nas condições do presente estudo a inoculação de BPCP não forneceram N (Tabela 4), como ocorre com a adubação nitrogenada na cultura de milho (DUETE et al., 2008). Sala et al. (2008) também não encontraram efeito na substituição das doses de N, contudo detectaram aumento no acumulado de N na espiga e incremento parcial da produtividade quando associaram as BPCP à adubação nitrogenada. É importante ressaltar que as condições de desenvolvimento da cultura eram atípicas à sua condição de desenvolvimento a campo, podendo haver efeito do vaso de 13 dm^3 no desenvolvimento das raízes, além da ausência de adubação nitrogenada. Além disso, o baixo teor de matéria orgânica e a textura média do solo utilizado, também pode ter promovido perda de nitrogênio (N) por volatilização (CANTARELLA & MONTEZANO, 2010). O N faz parte de componentes essenciais da célula vegetal sendo considerado o nutriente mais limitante para atingir elevada produtividade das culturas (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Quanto ao teor de P (Tabela 4), foi superior para as plantas cultivadas em pH 4,5 e 5,0. Stamford et al. (2004) após o cultivo de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) observaram redução no pH e aumento no

P disponível quando foi aplicado os biofertilizantes de P com *Acidithiobacillus*, provavelmente devido à atuação do *Acidithiobacillus* que promoveram produção de ácido sulfúrico suficiente para solubilizar fósforo da rocha fosfatada. Walpola & Yoon (2013) no estudo com plantas de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) e bactérias promotoras da solubilização de fosfato no solo, observaram uma correlação proporcional à acidez do solo e populações de *Pantoea agglomerans* e *Burkholderia anthina*, obtendo-se maior teor de P da parte aérea e raiz. Neste sentido, há necessidade de mais pesquisas em relação à utilização de BPCP com a finalidade de solubilizar o P em pH mais ácido, disponibilizando-o às raízes.

A concentração do teor de K da parte aérea do milho não diferiu significativamente para os diferentes pH do solo e para as bactérias utilizadas (Tabela 4). Campanharo et al. (2010) verificaram que a elevação do pH do solo em associação com a FBN em feijoeiro, elevou a disponibilidade de K, provavelmente porque a aplicação de CaCO_3 , possibilitou elevar a absorção e desenvolvimento das plantas de feijão, intensificada com o crescimento das raízes. Estes resultados são semelhantes ao presente estudo, porém não diferiram estatisticamente.

Apesar da inoculação das BPCP promoverem diferenças nas variáveis área foliar, índice SPAD e no teor de N foliar, não influenciou de forma significativa às variáveis de trocas gasosas estudadas (Tabela 5). Isso pode ter ocorrido devido à ausência total da adubação nitrogenada que limitou o desenvolvimento de folhas fotossinteticamente ativas. Além disso, o teor de N na planta foi baixo, relacionado com o baixo teor matéria orgânica no solo $8,20 \text{ g dm}^{-3}$, sem interferência das bactérias promotoras de crescimento vegetal e consequentemente nas trocas gasosas realizadas pelas plantas, explica a ausência de efeito no acúmulo de massa de matéria seca. Cerca de 90 % da produção da massa de matéria seca das plantas provêm da fotossíntese; visto que, as maiores produções de matéria seca obtidas por plantas inoculadas em relação às não inoculadas provêm da maior atividade fotossintética influenciada pela inoculação (DOBBELAERE et al., 2001) e (BASHAN et al., 2004).

O fator acidez do solo influenciou algumas variáveis no desenvolvimento inicial das plantas de milho, refletindo no comportamento das trocas gasosas foliares (Tabela 5). A taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), transpiração foliar (E), e relação da taxa de fotossíntese e transpiração foliar (EUA), foram menores no pH de 4,5, diferindo do pH 5,5.

As medidas observadas de A , g_s e E foram inferiores às encontradas em estudo com a cultura de milho em sistema de plantio direto e convencional, aos 36 dias após a emergência (LOPES, 2008). As plantas conduzidas até os 41 dias no presente estudo provavelmente não alcançariam elevada produção, pois a taxa de assimilação de CO_2 já apresentava médias ($18,3756 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) inferiores quando comparadas às condições de campo ($48 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (LOPES, 2008).

Os fatores limitantes como a menor disponibilidade de nutrientes proporcionado no pH 4,5 fez com que as plantas fechassem os estômatos (g_s) como mecanismo de defesa ao estresse, influenciando diretamente na A e por fim, na diminuição da transpiração foliar. As medidas de A podem ser explicadas pela g_s , pois quando ocorre o fechamento dos estômatos, a transpiração e entrada de CO_2 são bloqueadas e o fechamento dos estômatos pode ter ocorrido pelo estresse causado pela acidez do solo. No Brasil, principalmente em áreas do Cerrado, ocorrem solos com pH ácido, abaixo de 5,0, favorecendo a disponibilidade de Al no solo,

gerando toxidez deste elemento, redução no desenvolvimento e crescimento das raízes, consequentemente diminuição da absorção de nutrientes (HARTWIG et al., 2007).

As medidas de *E* ocorreram proporcionalmente a fotossíntese, inferiores no pH 4,5 do solo, fazendo com que o *EUA* também reduzisse, conforme o pH do solo foi reduzido. Em cana-de-açúcar, utilizando inóculo a partir de um semi-seletivo para *Herbaspirillum* promoveu a abertura estomática, tendo como consequência aumento da disponibilidade de CO₂, elevando a fotossíntese. O uso da bactéria endofítica pode promover o transporte aparente de elétrons gerando as moléculas energéticas, ATP e NADPH, que são usadas na assimilação de carbono (MARCOS, 2012). Porém, assim como encontrado no presente estudo, a fotossíntese não teve efeito proporcional à massa de matéria seca das plantas

As BPCP não se desenvolveram em pH ácido do solo a ponto de promover incremento significativo de massa de matéria seca, porém o N tornou-se mais disponível às raízes, ou seja, as bactérias promotoras de crescimento vegetal, principalmente o *H. seropedicae* foram capazes de facilitar a absorção de N em níveis de pH que apresentam baixa disponibilidade deste nutriente (MALAVOLTA, 1979).

Conclusões

A associação das estirpes Ab-V5 e SmR1 na inoculação de sementes de milho híbrido 30F53H, promoveu médias superiores em área foliar, diâmetro do colmo e teor relativo de clorofila, mas não promoveram incremento de massa de matéria seca, mesmo com variações do pH do solo;

A inoculação de sementes com *H. seropedicae* promoveu maior teor de N no tecido foliar de plantas de milho, em condições de acidez do solo, sem adubação nitrogenada, indicando fixação biológica de N;

A acidez do solo prejudicou as trocas gasosas e a inoculação de BPCP via sementes e não proporcionaram aumento da fixação de CO₂ nas plantas de milho.

O milho híbrido 30F53H submetido à inoculação de BPCP e pH ácido de um solo médio arenoso sem adubação nitrogenada, apresentou teor de P foliar superior em pH mais ácido. Neste sentido, há necessidade de estudos em relação a solubilização de fósforo e as BPCP.

Agradecimentos

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsas de estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), aos INCT – Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas e à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA).

Referências

ALVAREZ V., V. H. *Equilíbrio de formas disponíveis de fósforo e enxofre em dois latossolos de Minas Gerais*. (Dissertação) Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, p. 125, 1974.

ARAUJO, F. F. de; FOLONI, J. S. S.; WUTZKE, M.; MELEGARI, A. da S. & RACK, E. Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1043-1054, 2013.

ARAUJO, J. E. G. O alumínio trocável. Possível causa do crestamento do trigo. *Anais da Segunda Reunião Brasileira de Ciência do Solo*. Campinas, SP, 1949.

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*, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

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

BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M. A. de B.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 90, n. 1, p. 35-46, 1986.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. & DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.

BERGAMASCHI, C. *BPCP associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo*. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/7477>> Acesso em: 05/Jul. 2013.

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

CAMPANHARO, M.; LIRA JUNIOR, M. A.; NASCIMENTO, C. W. A.; STAMFORD, N. P.; FREIRE, F. J. & COSTA, J. V. T. Acidez do solo na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro comum. *Agrária, Recife*, v. 5, n. 3, p. 285-290, 2010.

CANTARELLA, H. & MONTEZANO, Z. F. Nitrogênio e enxofre. Em: Luís Ignácio Prochnow; Sílvia Regina Stipp. (Org.). *Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes*. 1ed. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute. 2010. v. 2, p. 1-65.

CHIODEROLI, C. A.; MELLO, L. M. M. de; HOLANDA, H. V. de; FURLANI, C. E. A.; GRIGOLLI, P. J.; SILVA, J. O. da R. & CESARIN, A. L. Consórcio de *Urochloas* com milho em sistema plantio direto. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 42, n. 10, p. 1804-1810, 2012.

COELHO, A. M. *Manejo da Adubação Nitrogenada na Cultura do Milho*. Embrapa Milho e Sorgo (Circular Técnica 96). Sete Lagoas-MG. 2007. p. 11.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D. & SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 17, n. 10, p. 1023-1029, 2013.

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

DÖBEREINER, J. & DE-POLLI, H. *Diazotrophic rhizocoenoses*. Stewart D. P. & Gallon, J. R., ed. Nitrogen fixation. London: Academic Press, 1980. p. 301-334.

DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in tropics: Social and economic contribution. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D. & BALDANI, J. I. *Como isolar e identificar BPCP de plantas não-leguminosas*. Itaguaí: Embrapa - CNPAB, 1995, 60p.

DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. da; TRIVELIN, P. C. O. & AMBROSANO, E. J. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do Nitrogênio (15N) pelo milho em Latossolo Vermelho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 161-171, 2008.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. 2.ed. Brasília, Informação Tecnológica, p.628, 2009.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Projeto “Racionalização do uso de insumos”*. Sub-Projeto “Pesquisa em racionalização de fertilizantes e corretivos na agricultura”. Brasília, 1980. 78p.

FANCELLI, A. L. & DOURADO NETO, D. *Produção de milho*. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p

FERREIRA, D. F. *Programa computacional Sisvar* - UFLA, versão 5.3, 2010.

GUIMARÃES, T. G.; FONTES, P. C. R.; PEREIRA, P. R. G.; ALVAREZ V. V. H. & MONNERAT, P. H. Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivados em dois tipos de solo. *Bragantia*, Campinas, v. 58, n. 1, p. 209-216, 1999.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; JOSÉ SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R. & REIS, C. E. R. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. *Semina: Ciencias Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M. S.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, Netherlands, v. 331, n. 1/2, p. 413-425, 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Levantamento sistemático da Produção Agrícola março de 2013*. Rio de Janeiro v. 26 n. 2 p. 1-84, 2013.

LOPES, A. S. *Manual de fertilidade do solo*. São Paulo. ANDA/POTAFOS. 1989. 153p.

LOPES, J. P. *Análise de crescimento e trocas gasosas em plantios direto e convencional de milho e soja*. 50f. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Concentração em Tecnologia de Produção Agrícola. Instituto Agrônomo, Campinas, 2008.

MALAVOLTA, E. *ABC da adubação*, 4a Ed. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres, 1979, 255p.

MARCOS, F. C. C. *Influência de bactérias endofíticas na fisiologia de plantas de cana-de-açúcar sob restrição hídrica*. 64f. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Agricultura Tropical e Subtropical. Instituto Agrônomo, Campinas, 2012.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. da; ASSIS, S. M. P. de; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P. & DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S. & BALDANI, J. I. *Fixação biológica de nitrogênio de importância para a agricultura tropical*. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 1999 (Série Documentos).

MATTOS, M. L. T.; FAGUNDES, P. R. R.; SANTOS, I. M. B. & ALMEIDA, B. M. *Fixação biológica de nitrogênio na cultura do arroz irrigado por inundação*. Parte I: bactérias endofíticas diazotróficas isoladas das cultivares BRS 7 Taim e BRS Pelota. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 22 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 303).

MOREIRA, F. M. de S.; SILVA, K. da; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. de. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, Bom Jesus, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: EDUFLA, 729 p. 2006.
- NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. G. de; MARTINS, F. A. D.; PÁDUA, T. R. P. de & PINHO, P. J. de. Uso do SPAD-502 na avaliação dos teores foliares de clorofila, nitrogênio, enxofre, ferro e manganês do algodoeiro herbáceo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 40, n. 5, p. 517-521, 2005.
- OLIVEIRA, L. R. de; MIRANDA, G. V.; LIMA, R. O. de; FRITSCH, R. N. & GALVÃO, J. C. C. Eficiência na absorção e utilização de nitrogênio e atividade enzimática em genótipos de milho. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, v. 44, n. 3, p. 614-621, 2013.
- QUADROS, P. D. de. *Inoculação de Azospirillum spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no rio grande do sul*. 74f. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Ciência do Solo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.
- QUAGGIO, J. A. *Acidez e calagem em colos tropicais*. Campinas, SP: Instituto Agronômico, 2000.
- REIS JÚNIOR, F. B.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. & MACHADO, A. T. *Seleção de genótipos de milho e arroz mais eficientes quanto ao ganho de N através de fixação biológica de N₂*. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, nov. 1998. 24 p. (Documento, n. 73).
- REIS JÚNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; BALDANI, A. T. & SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 1139-1146, 2008.
- ROCHA, R. E. M.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. *Specificity of infection by Azospirillum spp. in plant with C4 photosynthetic pathway*. Associative N₂ fixation. Boca Raton. 1981. p. 67-69.
- RODRIGUES, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B. da; PINTO JUNIOR, A. S.; KLEIN, J. & COSTA, A. C. P. R. da. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 31-37, 2014.
- ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L.; PASSAGLIA, L. P. M.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S de & CAMARGO, F. A. O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Dordrecht, v. 22, n. 9, p. 967-974, 2006.
- RUFINI, M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; OLIVEIRA, D. P.; ANDRADE, M. J. B. de & MOREIRA, F. M. de S. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (1977. Impressa), v. 46, p. 81-88, 2011.
- SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G. de & SILVEIRA, A. P. A. D. da. Novas BPCP endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 1099-1106, 2008.
- SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B. & SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de BPCP em genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 345-352, 2005.
- SILVA, E. C. da; MURAOKA, T.; BUZETTI, S. & TRIVELIN, P. C. O. Manejo de nitrogênio no milho sob plantio direto com diferentes plantas de cobertura, em Latossolo Vermelho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 3, 477-486, 2006.
- SOUZA, L. H.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. V. H. & VILLANI, E. M. de A. Efeito do pH do solo rizosférico e não rizosférico de plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* na absorção de boro, cobre, ferro, manganês e zinco. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 34, n. 5, p. 1641-1652, 2010.

STAMFORD N. P.; SANTOS C. E. R. S.; STAMFORD JÚNIOR, W. P. & DIAS, S. L. Biofertilizantes de rocha fosfatada com *Acidithiobacillus* como adubação alternativa de caupi em solo com baixo P disponível. *Analytica*, São Paulo, v. 3, n. 9, p. 48-53, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Assimilação de Nutrientes. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 286-298.

VERONESE, M.; FRANCISCO, E. A. B.; ZANCANARO, L. & ROSOLEM, C. A. Plantas de cobertura e calagem na implantação do sistema plantio direto. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 47, n. 8, p. 1158-1165, 2012.

WALPOLA, B. C. & YOON, M. H. Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). *Chilean Journal of Agricultural Research*, v. 73, n. 3, p. 275-281, 2013.

Tabela 1. Altura de plantas (ALT) em diferentes épocas do desenvolvimento inicial do milho submetido à inoculação de BPCP associadas a três níveis de pH do solo. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012

Tratamentos	ALT – 14 DAS (cm)				ALT – 21 DAS (cm)				ALT – 41 DAS (cm)			
	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	$\bar{x}$	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	$\bar{x}$	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	$\bar{x}$
Testemunha	22,79	23,42	21,67	22,62	34,17	33,89	30,46	32,84	56,75	59,87	56,75	57,79
AZ	22,74	22,75	22,17	22,55	32,21	32,54	30,25	31,67	56,37	60,12	61,37	59,29
HE	21,62	22,71	22,12	22,15	30,83	30,41	32,91	31,39	56,75	58,62	55,62	57,00
AZ+HE	22,08	22,08	22,54	22,23	31,33	32,00	30,62	31,32	57,75	60,12	59,12	59,00
$\bar{x}$	22,31	22,74	22,12		32,14	32,21	31,06		56,90b	59,69a	58,22ab	
F (IN)		0,434 ^{ns}				1,436 ^{ns}				1,909 ^{ns}		
F (pH)		1,052 ^{ns}				1,579 ^{ns}				4,325*		
F (IN) x (pH)		0,768 ^{ns}				2,042 ^{ns}				1,117 ^{ns}		
C.V. (%)		5,49				6,43				4,59		
D.M.S (IN)		1,3569				2,2606				2,9562		
D.M.S (pH)		1,0660				1,7760				2,3224		

Testemunha: Sem inoculação; **AZ:** Inoculação *Azospirillum brasilense*; **HE:** Inoculação *Herbaspirillum seropedicae*; **AZ+HE:** Inoculação *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*;

^{ns}Não significativo, * e ** Significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste Tukey.

Tabela 2. Massa de matéria seca de raiz, colmo, folha e total de plantas de milho submetido à inoculação de BPCP associadas a três níveis de pH do solo, aos 41 DAS. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012

Tratamentos	MSR				MSC				MSF				MST			
	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	$\bar{x}$	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	$\bar{x}$	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	$\bar{x}$	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	$\bar{x}$
Testemunha	3,81	4,80	4,64	4,42	4,41	4,18	4,50	4,36	4,21	3,65	4,00	3,95	12,43	12,63	13,14	12,73
AZ	3,65	4,96	4,73	4,45	3,88	4,72	4,50	4,37	3,83	4,11	4,05	4,00	11,36	13,80	13,29	12,82
HE	3,85	5,09	4,09	4,34	4,49	4,38	4,13	4,33	3,61	4,38	3,56	3,85	11,96	13,85	11,78	12,53
AZ+HE	4,52	4,64	4,89	4,68	4,32	4,73	4,64	4,40	4,19	4,53	4,29	4,34	13,03	13,41	13,83	13,42
$\bar{x}$	3,96b	4,87a	4,59a		4,28	4,38	4,44		3,96	4,17	3,97		12,20	13,42	13,01	
F (IN)		0,683ns				0,031ns				1,261ns				0,911ns		
F (pH)		9,223**				0,381ns				0,513ns				3,203ns		
F (IN) x (pH)		1,259ns				1,238ns				0,918ns				1,161ns		
C.V. (%)		13,78				12,46				16,14				10,84		
D.M.S (IN)		0,6812				0,6008				0,7195				1,5424		
D.M.S (pH)		0,5352				0,4720				0,5653				1,2117		

MSR: Massa de matéria seca da raiz; **MSC:** Massa de matéria seca do colmo; **MSF:** Massa de matéria seca foliar; **MST:** Massa de matéria seca total; **Testemunha:** Sem inoculação; **AZ:** Inoculação *Azospirillum brasilense*; **HE:** Inoculação *Herbaspirillum seropedicae*; **AZ+HE:** Inoculação *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*;

^{ns}Não significativo, * e ** Significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste Tukey.

Tabela 3. Área foliar, diâmetro de colmo e teor relativo de clorofila (SPAD) em diferentes folhas de plantas de milho sob diferentes inoculações de BPCP associadas a três níveis de pH do solo aos 41 DAS. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012

Tratamentos	Área foliar (dm ²)				Diâmetro de colmo (cm)				SPAD 1			SPAD 2			$\bar{x}$	SPAD 3			
	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	$\bar{x}$	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	$\bar{x}$	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	$\bar{x}$	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	$\bar{x}$
Testemunha	30,49	24,96	25,68	27,04AB	22,22	21,89	22,94	22,35B	14,42	15,42	16,35	14,15	15,40	15,45	15,00B	15,05	15,12	15,70	15,29A
AZ	26,99	27,07	26,68	26,91AB	20,74	22,50	24,82	22,69AB	14,35	15,72	16,65	15,30	16,40	16,22	15,97AB	13,22	14,57	17,55	15,12A
HE	22,42	27,07	24,71	24,73B	23,29	23,55	25,12	23,99AB	14,75	15,07	17,02	16,27	15,92	17,77	16,66AB	15,72	15,90	17,77	16,47A
AZ+HE	32,11	34,17	28,84	31,71A	23,81	22,81	25,94	24,20A	13,82	16,35	18,72	16,37	16,47	19,92	17,59A	15,82	16,25	19,75	17,27A
$\bar{x}$	28,00	28,32	26,47		22,51b	22,68b	24,71a		14,34c	15,89b	17,19a	15,52b	16,05ab	17,34a		14,96b	15,46b	17,69a	
F (IN)		3,023*				3,810*				1,039 ^{ns}			4,13*				2,99*		
F (pH)		0,454 ^{ns}				8,913**				18,59**			4,02*				8,15**		
F (IN) x (pH)		0,695 ^{ns}				1,043 ^{ns}				1,651 ^{ns}			0,93 ^{ns}				0,79 ^{ns}		
C.V. (%)		21,20				7,03				8,37			11,44				12,72		
D.M.S (IN)		5,0785				1,8110				1,4623			2,0613				2,2545		
D.M.S (pH)		6,4645				1,4227				1,1488			1,6194				1,7711		

SPAD 1: Índice de clorofila das folhas inferiores; **SPAD 2:** Índice de clorofila das folhas média **SPAD 3:** Índice de clorofila das folhas superiores; **Testemunha:** Sem inoculação; **AZ:** Inoculação *Azospirillum brasilense*; **HE:** Inoculação *Herbaspirillum seropedicae*; **AZ+HE:** Inoculação *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*;

^{ns}Não significativo, * e ** Significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste Tukey.

Tabela 4. Teor de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) no tecido foliar de plantas milho submetido à inoculação de BPCP associadas a três níveis de pH do solo aos 41 DAS. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012

Tratamentos	N (g kg ⁻¹)				$\bar{x}$	P (g kg ⁻¹)			K (g kg ⁻¹)				
	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5			pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5		
Testemunha	6,56	7,00	6,78	6,78B		2,04	2,10	1,98	2,04	23,98	23,16	24,48	23,87
AZ	7,00	6,86	7,29	7,05AB		2,24	1,90	1,41	1,85	25,38	23,41	23,48	24,09
HE	7,87	7,84	7,58	7,77A		2,18	2,09	1,66	1,98	25,14	24,02	25,07	24,74
AZ+HE	8,53	7,29	6,41	7,41AB		2,23	1,93	1,88	2,01	23,62	24,59	26,80	25,00
$\bar{x}$	7,49	7,25	7,01			2,17a	2,00a	1,73b		24,529	23,795	24,959	
F (IN)		3,532*					0,978 ^{ns}				1,644 ^{ns}		
F (pH)		1,408 ^{ns}					9,341**				2,668 ^{ns}		
F (IN) x (pH)		2,147 ^{ns}					1,455 ^{ns}				2,157 ^{ns}		
C.V. (%)		11,01					14,87				5,90		
D.M.S (IN)		0,6932					0,2544				1,2515		
D.M.S (pH)		0,8824					0,3239				1,5931		

Testemunha: Sem inoculação; **AZ:** Inoculação *Azospirillum brasilense*; **HE:** Inoculação *Herbaspirillum seropedicae*; **AZ+HE:** Inoculação *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*;

^{ns}Não significativo, * e ** Significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste Tukey.

Tabela 5. Taxa de assimilação de CO₂(A), condutância estomática (g_s), transpiração foliar (E) e relação da taxa de assimilação de CO₂/transpiração foliar (EUA) de plantas de milho sob diferentes inoculações de BPCP associadas a três níveis de pH do solo aos 41 DAS. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012

Tratamentos	A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)				g _s (mol m-2 s-1)				E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)				EUA (A/E)			
	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5		pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5		pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5		pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	
Testemunha	15,15	18,86	18,37	17,46	0,07	0,11	0,11	0,10	2,84	4,21	4,17	3,74	4,56	4,73	4,86	4,72
AZ	15,99	18,85	16,41	17,08	0,08	0,10	0,09	0,09	3,22	3,94	3,65	3,60	4,52	4,67	4,96	4,72
HE	17,15	18,06	19,62	18,28	0,10	0,10	0,11	0,10	3,85	3,98	4,14	3,99	4,74	4,69	4,92	4,78
AZ+HE	15,96	19,38	19,09	18,14	0,09	0,11	0,11	0,10	3,31	4,26	4,07	3,88	4,69	4,62	4,98	4,76
̄x	16,06 b	18,79 a	18,37 a		0,08 b	0,10 a	0,10 a		3,31 b	4,10 a	4,01 a		4,63 b	4,68 ab	4,93 a	
F (IN)		1,271 ^{ns}				1,948 ^{ns}				1,733 ^{ns}				0,136 ^{ns}		
F (pH)		11,477 ^{**}				9,288 ^{**}				14,877 ^{**}				4,735 [*]		
F (IN) x (pH)		1,323 ^{ns}				1,580 ^{ns}				1,713 ^{ns}				0,277 ^{ns}		
C.V. (%)		9,77				14,89				11,79				6,30		
D.M.S (IN)		1,9143				0,0173				0,4957				0,3482		
D.M.S (pH)		1,5039				0,0136				0,3894				0,2735		

A: Taxa de assimilação de CO₂; g_s : Condutância estomática; E: Transpiração foliar; EUA: Relação da taxa de fotossíntese/transpiração foliar; **Testemunha**: Sem inoculação; **AZ**: Inoculação *Azospirillum brasilense*; **HE**: Inoculação *Herbaspirillum seropedicae*; **AZ+HE**: Inoculação *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*;

^{ns}Não significativo, * e ** Significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste Tukey.

CAPÍTULO III

População de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas em diferentes épocas do desenvolvimento inicial de plantas de milho submetido ao pH ácido do solo e inoculações com *A. brasilense* e *H. seropedicae*

Population Growth Promoting Bacteria Plant at different times of the early development of maize plants subjected to acid soil pH and inoculation with *A. brasilense* and *H. seropedicae*

Resumo: Estudos voltados ao entendimento dos efeitos do pH do solo sobre a população de bactérias diazotróficas, no solo e associadas às raízes das plantas, ainda são escassos e necessários. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo verificar a população de bactérias crescidas em meio de cultura NFb semi-sólido, Lactato e Malato, provenientes de amostras de solo e raízes de plantas de milho conduzidas até 15 e 41 dias após semeadura, submetidas à inoculação por *A. brasilense* e *H. seropedicae*, de forma isolada e associada, combinado com diferentes níveis de acidez de solo, sem adição de fertilizante nitrogenado. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com esquema fatorial triplo 12 x 2 x 2 e quatro blocos, totalizando 48 parcelas experimentais. O primeiro resultou de doze combinações, utilizando inoculações com *A. brasilense* e *H. seropedicae*, de forma isolada e associada e diferentes níveis de pH do solo. O segundo fator foi formado pelas duas épocas de coletas de amostras, aos 15 e 41 DAS. E o terceiro fator, os meios de cultura NFb Lactato e Malato utilizado para contagem de UFC. Os inoculantes possuíam solução de 10^7 UFC mL⁻¹. As avaliações foram realizadas aos 15 e 41 dias após semeadura, utilizando 1 g de raiz e 10 g de solo. Utilizou-se o método do número mais provável para a estimativa UFC de bactérias. A população de bactérias encontradas no solo e nas raízes de milho, independente da inoculação das sementes e pH do solo, apresentaram valores elevados. A inoculação das estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* não apresentaram preferência de colonização no solo ou nas raízes de plantas de milho. A população total de bactérias aos 41 dias após a semeadura foi superior aos 15 dias após a semeadura, apresentando influência direta ao tempo em relação ao desenvolvimento inicial das plantas de milho híbrido 30F53H. Os diferentes níveis de pH do solo e as bactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas ou em associação, não influenciaram na população de colônias de bactérias detectadas nos meios NFb Lactato e Malato.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, diazotróficos, endofíticos, rizobactérias, acidez do solo, *Zea mays* L.

Abstract: Studies aimed at understanding the effect of soil pH on the population of diazotrophic bacteria in soil and associated plant roots, are still scarce and necessary. In this context, the present study aimed to determine the population of bacteria grown in semi-solid NFb, Lactate and Malate culture from samples of soil and roots of corn plants led to 15 and 41 days after sowing, submitted to inoculation by *A. brasilense* and *H. seropedicae* so isolated or associated, combined with different levels of soil acidity without nitrogen

fertilizers. The experimental design was a randomized block with triple factorial scheme 12 x 2 x 2 and four blocks, totaling 48 experimental plots. The first resulted twelve combinations, using inoculations with *A. brasilense* and *H. seropedicae*, in isolation and associated and different levels of soil pH. The second factor was formed by the two times of sample collection, at 15 and 41 DAS. And the third factor, the culture media NFB Lactate and Malate used for CFU counts. Inoculants solution had 10^7 CFU mL⁻¹. Evaluations were performed at 15 and 41 days after sowing, using 1 g of root and 10 g of soil. We used the most probable number method to estimate the CFU of bacteria. The population of bacteria found in soil and roots of maize, regardless of seed inoculation and soil pH, showed elevated levels. The inoculation with strains of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* showed no preference for colonization in the soil or in the roots of corn plants. The total population of bacteria after 41 days after sowing was higher at 15 days after sowing, with direct influence to time in relation to the initial development of hybrid maize 30F53H. The different levels of soil pH and growth promoting bacteria isolated plants or in combination, did not affect the population of colonies of bacteria detected in the media NFB Lactate and Malate.

Key words: *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, diazotrophics, endophytics, rhizobacterias, soil acidity, *Zea mays* L.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais produzidos no mundo. No Brasil, o estado do Paraná foi responsável por mais de 16 milhões de toneladas de grãos, seguido por Mato Grosso e Goiás em 2012 (IBGE, 2013). Este cereal é rico em carboidratos, sendo amplamente utilizado na alimentação humana e animal.

O milho, pertencente à família das Poáceas apresentam um sistema radicular fasciculado, tendo vantagens sobre o sistema pivotante das leguminosas para extrair água e nutrientes do solo. Neste sentido, a matéria orgânica presente no solo pode ser uma fonte amplamente explorada por estas raízes. Neste caso, apesar dos nutrientes não estarem prontamente disponíveis, a matéria orgânica funciona como armazém de nutrientes no solo para a planta. Estes nutrientes são liberados gradualmente para o uso da cultura, mediado por microrganismos vivos do solo (MALAVOLTA, 1979).

Bashan & Holguin (1997) relataram que a ocorrência e a atividade dessas bactérias no solo e na planta, ressaltando as condições de ambiente favoráveis, são fortemente influenciadas por estresses físicos (baixa umidade e alta temperatura), químicos (acidez e baixos teores de nutrientes) e biológicos (espécie vegetal não hospedeira).

As mudanças do pH da rizosfera e no pH não rizosférico, são dependentes do pH inicial dos solos e da, fixação biológica de nitrogênio. (SOUZA et al., 2010). Em solos mais ácidos, como é o caso dos solos do cerrado brasileiro, esta condição pode afetar a microbiota do solo, em especial os microrganismos Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCPs), os quais enfrentam dificuldades de sobrevivência, especialmente pela incapacidade em manter o pH intracelular, a fim de proteger os componentes internos das células (MACCIÓ et al., 2002). As BPCPs crescem em uma faixa de pH ideal entre 6,0 e 7,0 (CaCl₂), e

poucas tem crescido satisfatório em pH menor que 5,0 (CaCl_2) (GRAHAM et al., 1994; RODRIGUES et al., 2006; ALI et al., 2009).

Segundo Costa & Oliveira (1998) a faixa de pH ideal dos solos para a agricultura é entre 5,5 e 6,5 (CaCl_2). Porém, Malavolta (1979) destaca que em condições dos solos tropicais brasileiros, a situação é contraditória, apresentando pH menor que 5,5 (CaCl_2), baixo teor de nutrientes principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P), textura física do solo médio arenoso e consequentemente matéria orgânica escassa.

A diversidade das BPCPs varia com o tipo de cobertura vegetal, apresentando maior diversidade de bactérias em áreas de mata em relação ao cerrado. Em solos do cerrado, por sua vez, GOMES (2009) verificou uma forte correlação da adubação nitrogenada com a população das BPCPs, independente de cultivares de milho que foram testadas.

No entanto, ainda existem poucos estudos sobre o comportamento das BPCPs sob condições limitantes como a ausência de adubação nitrogenada, acidez do solo e baixo teor de matéria orgânica. A quantificação de bactérias promotoras de crescimento de plantas torna-se importante para que se possa comprovar sua contribuição no desenvolvimento de plantas de milho.

Face ao exposto, o presente estudo teve como objetivo verificar a população de bactérias crescidas em meio de cultura NFb semi-sólido, Lactato e Malato, provenientes de amostras de solo e raízes de plantas de milho conduzidas até 15 e 41 dias após semeadura, submetidas à inoculação por *A. brasilense* e *H. seropedicae*, de forma isolada e associada, combinado com diferentes níveis de acidez de solo, sem adição de fertilizante nitrogenado.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido “Prof. Dr. Mário César Lopes” no município de Marechal Cândido Rondon/PR, com as coordenadas geográficas de 54° 22' W e 24° 46' S, e altitude média de 420 m.

O solo utilizado foi classificado como Argissolo Amarelo distrófico coletado no município de Iporã/PR na camada 0-0,20 m de profundidade, com baixa fertilidade e textura física médio arenoso (EMBRAPA, 2013). De acordo com o laudo de análise química e física do solo, obtiveram-se os seguintes resultados: $\text{P} = 4,21 \text{ mg dm}^{-3}$; $\text{MO} = 8,20 \text{ g dm}^{-3}$; $\text{pH em CaCl}_2 = 4,52$; $\text{H}+\text{Al} = 2,75$; $\text{Al}^{3+} = 0,35 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $\text{K}^+ = 0,60 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $\text{Ca}^{2+} = 1,50 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $\text{Mg}^{2+} = 0,41 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $\text{CTC} = 5,26 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $\text{V}\% = 47,72$; $\text{Cu} = 2,5 \text{ mg dm}^{-3}$; $\text{Zn} = 1,30 \text{ mg dm}^{-3}$; $\text{Mn} = 11,00 \text{ mg dm}^{-3}$; $\text{Fe} = 48,40 \text{ mg dm}^{-3}$; 201 g kg^{-1} de argila, 106 g kg^{-1} de silte e 693 g kg^{-1} de areia.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental em blocos ao acaso (DBC) com 12 tratamentos com quatro blocos, totalizando 48 parcelas experimentais em casa de vegetação. Sobre tudo, a análise estatística foi realizado com os tratamentos arrançados em esquema fatorial triplo 12 x 2 x 2. O primeiro fator resultou da combinação de três níveis de acidez do solo 4,5; 5,0 e 5,5 pH (CaCl_2) com quatro inoculações de sementes: controle (sem inoculação); *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5; *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 e associação das duas estirpes Ab-V5+SmR1 (AI), totalizando 12 níveis a saber:

pH 4,5+testemunha; pH 4,5+AZ; pH 4,5+HE; pH 4,5+AZ+HE; pH 5,0+testemunha; pH 5,0+AZ; pH 5,0+HE; pH 5,0+AZ+HE; pH 5,5+testemunha; pH 5,5+AZ; pH 5,5+HE; pH 5,5+AZ+HE. O segundo fator foi formado por épocas de coletas de amostras (ECA) de solo e raiz de plantas de milho, sendo realizado aos 15 e 41 dias após semeadura (DAS). O terceiro fator constitui-se de dois meios de cultura, NFb Lactato e Malato (MC).

Para obter a correção de acidez do solo e a determinação das combinações com pH (CaCl_2) do solo 4,5; 5,0 e 5,5 foi realizada uma curva de incubação do solo para a neutralização de 0, 30, 60, 90 e 120% da acidez potencial utilizando calcário dolomítico com PRNT de 79,78%. Amostras de $0,250 \text{ dm}^3$ de solos foram incubadas em sacos plásticos, por 21 dias, com teor de umidade de 80% da capacidade de campo. Após esse período foi aferido o pH e obtido os seguintes valores: $\text{pH}_1 = 4,39$, $\text{pH}_2 = 5,75$, $\text{pH}_3 = 6,90$, $\text{pH}_4 = 7,51$, $\text{pH}_5 = 7,66$. Assim, as combinações de pH (CaCl_2) do solo 4,5; 5,0 e 5,5, foram obtidos através da equação: $\text{pH} = 4,779 + 3,706Ca - 1,162Ca^2$, determinando as doses 0, 0,789 e 2,705 g de calcário por vaso, respectivamente.

Em relação as estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, estas foram fornecidas pelo laboratório de Bioquímica e Biologia molecular da UFPR de Curitiba. Foi utilizado o volume da solução inoculadora de 4 mL para 1000 sementes, tendo a solução 10^7 unidades formadoras de colônias mL^{-1} (UFC mL^{-1}).

A inoculação foi realizada em sacos plásticos devidamente esterilizados com 1000 sementes do híbrido de milho 30F53H *Pioneer*[®] dentro de uma câmara de fluxo laminar, após ser submetida a 30 min de lâmpada germicida UV com o intuito da redução do número de microrganismos nas superfícies e no ar. Com o intuito de não ocorrer interferência na embebição das sementes em diferentes volumes de inoculação, foi mantido o mesmo volume do líquido de inoculante para cada tratamento. Neste caso, ao tratamento controle, sem inoculação, foi adicionada uma dose de 4 mL de água destilada. Na associação das duas estirpes foi utilizado 2 mL de cada inoculante das estirpes Ab-V5 e SmR1, mantendo a mesma densidade de bactérias comparada aos tratamentos isolados com Ab-V5 e SmR1. Com isso padronizou-se 4 mL de solução líquida para todos os tratamentos de sementes.

As sementes do milho híbrido 30F53H *Pionner*[®], após serem tratadas e homogeneizadas em sacos plásticos, foram mantidas em repouso por 12 horas à sombra e temperatura ambiente de 25°C. Em seguida, foram semeadas seis sementes em vasos de 13 dm^3 com solo, sendo desbastado o excesso de plântulas, três dias após a germinação, mantendo três plantas por vaso, ou seja, para cada parcela experimental em casa de vegetação.

Durante a condução do experimento optou-se por não adicionar adubo nitrogenado, afim de simular condições naturais de solos tipicamente encontrados no Cerrado brasileiro. Porém, foi adicionado 300 mg dm^{-3} de P, 100 mg dm^{-3} de K e 40 mg dm^{-3} de S (ALVAREZ, 1974), afim de não comprometer completamente o desenvolvimento das plantas de milho no vaso.

Aos 15 e 45 DAS, foram coletadas amostras de raízes das plantas e do solo do vaso. As raízes foram lavadas em água corrente e cortadas em frações de aproximadamente 10 cm. Destas frações, foi utilizada 1 g para a maceração em 9 mL de solução salina, sendo estas diluídas de forma seriada de 10^{-2} a 10^{-7} , utilizando-

se a mesma solução salina. Quanto às amostras de solo, utilizou-se 10 g, que foram suspensas em 90 mL de solução salina. Em seguida, procedeu-se a diluição seriada, como no caso das amostras de raízes.

Para a estimativa da população de bactérias, empregou-se a metodologia de estimativa da através de tabelas do número mais provável (NMP), descrita por Döbereiner et al. (1995). Para a contagem das BPCPs, alíquotas de 0,1 mL das suspensões entre 10^{-2} e 10^{-7} , foram inoculadas em frascos de vidro com 5 mL, contendo meios de cultura semi-sólidos, NFb Malato, considerado seletivo para *Herbaspirillum seropedicae*, e, NFb Lactato, considerado seletivo para *Azospirillum brasilense*. Os frascos tiveram triplicatas para os seis níveis de diluição, as 48 frações das amostras de raízes e de solo, o que totalizou 864 frascos para ambas frações (raiz e solo). Estas amostras foram incubadas em estufa a 30°C, por um período de sete dias.

As amostras submetidas a sete dias em câmara incubadora tipo BOD a 30°C, foram retiradas da câmara e imediatamente realizada a contagem dos frascos negativos e positivos, sendo considerados os frascos com crescimento positivo aqueles que apresentavam a película característica de crescimento de bactérias em condição microaerofílica. Assim, determinou-se o número mais provável de bactérias com auxílio das tabelas de McCrady descrita por Döbereiner et al. (1995), estimando a UFC de bactérias nas amostras de raízes de milho e solo do vaso onde procedeu-se o cultivo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando houve efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5%, com o auxílio do software SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010).

Resultados e Discussão

Na tabela 1, evidencia-se que não houve interação tripla entre os fatores em estudo: combinações de inoculação de bactérias e níveis de acidez do solo (AI), épocas de coleta de amostras (ECA) e meios de cultura NFb (MC), para a população de bactérias, expressa em unidades formadoras de colônias (UFC), provenientes de amostras de raízes de milho e de solo do vaso onde estes foram cultivados.

Houve interação dupla significativa entre os fatores AI e ECA apenas para as populações de bactérias provenientes das amostras de solo. Quanto à interação entre ECA e MC, esta foi significativa para as populações de bactérias das amostras de raízes e solo. A interação entre os fatores AI e MC não foi significativa para as duas variáveis em questão (Tabela 1).

As BPCPs foram detectadas em todas as amostras de solo e raízes de milho coletadas, referentes aos três fatores em questão AI, ECA e MC (Figuras 1 a 5). A média geral das populações de bactérias diazotróficas foi de $1,1 \times 10^7$ (log 7,06) para amostras de raízes de milho e 2×10^7 (log 7,31) para amostras de solo provenientes dos vasos onde o milho foi cultivado. Vale destacar que, mesmo nos tratamentos controle, onde não se inoculou as sementes com bactérias diazotróficas, estes apresentaram populações de bactérias em elevados valores e estatisticamente semelhantes aos tratamentos onde as sementes foram inoculadas. Segundo Baldani, (1996), em sistemas com solo, o tratamento controle, não-inoculado, apresentam bactérias diazotróficas naturais que atingem populações semelhantes às observadas nos tratamentos inoculados. A

presença das bactérias diazotróficas associadas à planta não significa, necessariamente, que a mesma seja beneficiada por quantidades significativas de N, proveniente da FBN (BODDEY et al., 1995).

De acordo com Viana, (2012), o crescimento de isolados bacterianos, nos meios semi-específicos utilizados (NFb Lactato e NFb Malato), não implica, que os isolados obtidos neste estudo sejam apenas dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, o que torna necessário que estes isolados também sejam caracterizados quanto às suas características fenotípicas, fisiológicas e genéticas, para confirmação das espécies.

Observa-se na tabela 1, que as populações de bactérias diazotróficas provenientes de amostras coletas aos 41 DAS foram superiores estatisticamente, tanto para o solo, quanto para as raízes de plantas de milho (log 6,89 e log 6,25, respectivamente), quando comparadas às populações provenientes de amostras coletadas aos 15 DAS (log 4,99 e log 5,61, respectivamente). Quando se compara as populações de bactérias em relação ao meio de cultura em que as amostras foram crescidas, verifica-se que no meio NFb Malato (seletivo para *H. seropedicae*) a população de bactérias diazotróficas em amostras de solo foi superior estatisticamente quando comparada ao meio NFb Lactato (seletivo para *A. brasilense*). No caso das amostras provenientes das raízes das plantas de milho, não houve diferença significativa entre as populações de bactérias.

Ainda na tabela 1, é possível constatar que a população de bactérias diazotróficas em amostras de solo e raízes de milho não sofreram influência significativa do pH do solo de cultivo e da inoculação de estirpes de bactérias de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, bem como da combinação das duas estirpes.

Observa-se na figura 1, a população de bactérias provenientes de amostras de raízes de milho, coletadas aos 15 e 41 DAS foram estatisticamente semelhantes, tanto para o contraste entre as épocas de coletas, quanto ao contraste entre as combinações de níveis de acidez do solo e inoculação de sementes. Contudo, vale destacar que houve uma tendência de superioridade para a população proveniente da coleta aos 41 DAS, com exceção da testemunha, não inoculado. Entretanto, tal resultado evidencia que a inoculação das sementes com as diferentes estirpes e os diferentes níveis de pH do solo não afetaram a população de bactérias presentes nas raízes de milho entre as duas épocas de avaliação. Döbereiner & Pedrosa (1987) relatam que as condições ideais de pH para o crescimento de *A. brasilense* está entre 6,0 e 7,8 e para *H. seropedicae* o pH ideal para seu crescimento é variável entre 5,3 a 8,0.

Quando se estuda a interação entre épocas de coletas de amostras (ECA) e o fator combinação de níveis de acidez com inoculação de sementes (AI), constata-se efeito significativo sobre a população total de bactérias diazotróficas encontradas no solo (Figura 2). A população de bactérias diazotróficas no solo de cultivo do milho, encontradas aos 15 DAS distinguiu-se em dois grupos distintos, sendo o grupo formado pelos tratamentos testemunha, nos níveis de pH 5,0 e 5,5; inoculação de sementes com Ab-V5, nos níveis pH 4,5 e 5,0; inoculação de sementes com SmR1, no pH 5,5 e a combinação de Ab-V5+SmR1 no pH 5,5; sendo este grupo superior ao segundo grupo (controle, pH 4,5; inoculação de sementes com Ab-V5, pH 5,5; inoculação de sementes com SmR1, nos níveis de pH 4,5 e 5,0; e a combinação de Ab-V5+SmR1 nos níveis de pH 4,5 e 5,0. Quando se compara as populações de bactérias diazotróficas dentro da coleta realizada aos 41 DAS, verifica-se que não foi observada diferença significativa para os 12 níveis do fator AI. Vale ainda

destacar que para todas os níveis dentro do fator AI, as populações de bactérias diazotróficas encontradas no solo foram superiores às populações provenientes de coletas realizadas aos 15 DAS. Neal Junior et al. (1970) e Chanway et al. (1988), relatam que a diversidade da população de diazotróficos é afetada pela quantidade e composição dos materiais orgânicos excretados pelas raízes das plantas, as quais variam durante o ciclo de desenvolvimento de diferentes cultivares, o que poderia explicar a maior população observada aos 41 DAS.

Bevivino et al. (1998), observaram que a população rizosférica de *Burkholderia cepacia* foi elevada no início do ciclo das plantas de milho, decresceu após o estágio vegetativo e tornou a aumentar quando a maturação da planta estava completa. Estes autores sugerem que seria mais vantajoso isolar bactérias para a utilização como inoculantes em milho nos estádios finais de desenvolvimento das plantas, pois os genótipos bacterianos seriam mais bem adaptados, já que estes foram capazes de colonizar e sobreviver até o final do ciclo de desenvolvimento das plantas.

Nas figuras 3 e 4 são apresentados resultados relativos à população de bactérias provenientes de amostras de raízes de plantas de milho e de amostras de solo onde as plantas foram cultivadas, respectivamente. Comparando as médias dentro da interação entre os fatores AI e MC, não são constatadas diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott. Com isso, mesmo que o meio NFb Lactato, seja considerado seletivos às estirpes de *A. brasilense* e o meio NFb Malato seja considerado seletivo às estirpes de *H. seropedicae*, esta preferência de crescimento das estirpes não foi verificada nestas condições, podendo estas respostas terem sofrido influência dos níveis de pH ácido do solo em questão. O mesmo pode ser relatado quando se considera o tipo de associação, sendo a estirpes de *A. brasilense* Ab-V5, considerada endofítico facultativo e a estirpe de *H. seropedicae* SmR1, considerada endofítico obrigatório. Neste estudo, independente de serem amostras provenientes de raízes de milho ou de solo onde estas plantas foram cultivadas, não é evidente o maior crescimento de uma ou outra estirpe em função da origem das amostras. Em trabalho desenvolvido por Brasil et al. (2005) estes encontram em braquiária, capim carona e capim mimoso maior número de bactérias diazotróficas nas raízes quando comparado no solo ou parte aérea.

Apesar de não apresentarem diferenças, os tratamentos com a inoculação das sementes com estirpe de *A. brasilense* de uma forma geral apresentaram maiores valores na população de bactérias em raiz no meio NFb Lactato, uma vez que esse meio é considerado seletivo para esse gênero (Figura 3). Baldani et al. (1997), consideram bactérias do gênero *Azospirillum* como diazotrófica facultativas, capazes de colonizar plantas não leguminosas internamente e na região da rizosfera.

Houve interação significativa na população média de bactérias entre os fatores época de coleta (ECA) e MC, tanto para a população de bactérias mensuradas nas raízes de milho quanto em amostras de solo (Figura 5). Observa-se que para a população presente nas raízes de milho, apenas houve diferença significativa em relação ao meio de cultura NFb Malato, onde aos 41 dias após a semeadura apresentou maior valor. Em relação a população de bactérias encontradas nas duas épocas de coleta e cultivadas em dois meios de cultura NFb diferentes, apenas para a primeira coleta que apresentou diferença, sendo que o meio de cultura NFb Malato apresentou menor população de bactérias nas raízes. Já para a população de bactérias presentes no solo, para os dois meios de cultura as populações foram maiores aos 41 dias após a semeadura. Para a

população encontrada em relação a DECA, na segunda época o meio de cultura NFb Malato apresentou maior crescimento de bactérias em amostras provenientes do solo onde o milho foi cultivado.

Segundo Catellan & Vidor (1990), a proliferação dos microrganismos é limitada pelo pH, riqueza mineral do solo, matéria orgânica, temperatura e umidade. Além disso, a acidez prejudica não apenas a sobrevivência das bactérias, como afeta também a simbiose, a qual é mais sensível ao estresse nutricional do que ao rendimento das plantas recebendo nitrogênio mineral (MUNNS & FRANCO, 1982).

Diversos fatores podem influenciar na contagem de bactérias diazotróficas ou promotoras de crescimento de plantas. Sendo que no presente estudo o principal fator que contribuiu à população destes microrganismos foi a época de desenvolvimento da cultura do milho. As plantas de milho quando submetido a condições de estresse como o pH ácido do solo e deficiência de nitrogênio, o fator tempo de desenvolvimento (ECA) do milho, demonstrou importância para a maior proliferação de números de colônias independente da estirpe utilizada. Este resultado indica maiores chances de contribuições das bactérias no sentido de que quanto maior número UFC de bactérias, maior será sua influência sobre a cultura do milho, principalmente até no final da fase vegetativa (BEVIVINO et al., 1998).

Apesar das bactérias do gênero *Herbaspirillum* serem consideradas endofíticas obrigatórias, que colonizam o interior de raízes ou outros órgão das plantas, foi observado maior número de UFC de bactérias no solo, quando realizado a contagem em meio NFb de Malato considerado seletivo ao *H. seropedicae*. Mesmo considerando o fato do baixo teor de matéria orgânica do solo em questão, o que poderia indicar menor interferência de outros microrganismos, mesmo assim, pode-se considerar que houve interferência de outras bactérias também seletivas a este meio de cultura NFb, inclusive no tratamento testemunha sem inoculação por bactérias.

Conclusões

A população de bactérias encontradas no solo e nas raízes de milho foi elevada, independente da inoculação das sementes e pH do solo;

Nas condições do presente estudo, a inoculação das estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* não apresentaram preferência de colonização no solo ou nas raízes de plantas de milho quando submetidas ao pH ácido do solo desprovido da adubação nitrogenada;

A população total de bactérias aos 41 dias após a semeadura foi superior aos 15 dias após a semeadura, apresentando influência direta do tempo em relação ao desenvolvimento inicial das plantas do híbrido de milho 30F53H.

Os diferentes níveis de pH do solo e as bactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas ou em associação, não influenciaram na população de colônias de bactérias detectadas nos meios NFb Malato e NFb Lactato.

Agradecimentos

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsas de estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), aos INCT – Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas e à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA).

Referências

- ALI, S. F.; RAWAT, L. S.; MEGHVANSI, M. K. & MAHNA, S. K. Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. *Journal of Agricultural and Biological Science*, v. 4, p. 13-18, 2009.
- ALVAREZ V. V. H. *Equilíbrio de formas disponíveis de fósforo e enxofre em dois latossolos de Minas Gerais*. (Dissertação) Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, p. 125, 1974.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Baltimore, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- J. I. BALDANI; L. CARUSO; V. L. D. BALDANI; S. R. GOE; & J. DÖBEREINER. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, Seropédica, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, V. L. D. *Efeito da inoculação de Herbaspirillum spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica*. Seropédica: UFRRJ, 1996. 234f. Tese (Doutorado - Ciência do Solo) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1996.
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996), *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BERGAMASCHI, C. *Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas às raízes e colmos de cultivares de sorgo*. 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BEVIVINO, A.; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTEALE, C. & CHIARINI, L. Characterization of a free-living Maizerhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 225-237, 1998.
- BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. de; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D. & DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 174, n. 1-2, p. 195-209, 1995.
- BODDEY, R. M. & DÖBEREINER, J. 1982. Association of *Azospirillum* and other diazotrophs with tropical gramineae. In: *International Congress of Soil Science*, 12, New Delhi, India. Non-symbiotic nitrogen fixation and organic matter in the tropics, p. 28-47.
- BRASIL, M. S.; BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. v. 29, n. 2, p. 179-190, 2005.
- CATELLAN, A. J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 14, n. 2, p. 133-142, 1990.
- CHANWAY, C. P.; NELSON, L. M.; HOLL F. B. Cultivar specific growth promotion of spring wheat by co-existent *Bacillus* species. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 34, p. 925-929, 1988.
- COSTA, J. M. & OLIVEIRA, E. F. *Fertilidade do solo e nutrição de plantas*. Campo Mourão: COAMO/CODETEC, 1998, p. 89.
- DÖBEREINER J. *Azotobacter paspali* sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 1, p. 357-365, 1966.

DÖBEREINER, J. & RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 1, p. 261–272, 1958.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. & BALDANI, V.L.D. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas*. Brasília, Embrapa-SPI. Itaguaí, Embrapa-CNPAB, 1995. 60p.

DÖBEREINER, J. & DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J., ed. *Nitrogen fixation; proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Pullman: Washington State University, 1975. v. 2. p. 518-538.

DÖBEREINER, J. & DE-POLLI, H. *Diazotrophic rhizocoenoses*. Stewart D.P.; Gallon, J.R., ed. *Nitrogen fixation*. London: Academic Press, p. 301-334, 1980.

DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F.O. *Nitrogen – Fixing Bactéria in Nonleguminous Croup Plants*, E.U.A, Springer – Verlag, p. 120, 1987.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. 3.ed. Brasília, Embrapa, 2013. 353p.

FERREIRA, D. F. *Programa computacional Sisvar* - UFLA, versão 5.3, 2010.

GOMES, M. de L. *Bactérias diazotróficas endofíticas em cultivaes de milho em áreas de cerrado e mata no Estado de Roraima*. 2009. p. 79. (Dissertação) Boa Vista, RR, Universidade Federal de Roraima.

GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTINEZ, E.; NAARONS, S. R. & QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 40, p. 198-207, 1994.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Levantamento sistemático da Produção Agrícola março de 2013*. Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 1-84, 2013.

MACCIÓ, D.; FABRA, A. & CASTRO, S. Acidity and calcium interaction affect the growth of *Bradyrhizobium* sp. and the attachment to peanut roots. *Soil Biology and Biochemistry*, Seropédica, v. 34, n. 2, p. 201-208, 2002.

MAGALHÃES, F. M. M.; PATRIQUIN, D. & DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Revista Brasileira de Biologia*. Rio de Janeiro, v. 39, p. 587-596, 1979.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. & GOMIDE, R. L. *Fisiologia da planta de milho*. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, p. 15-33, 1995 (Circular Técnica, 20).

MALAVOLTA, E. *ABC da adubação*, 4.ed. São Paulo. Agronômica Ceres, 1979. 255p.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. da; ASSIS, S. M. P. de; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P. & DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MOREIRA, F. M. de S.; SILVA, K. da; NÓBREGA, R. S. A. & CARVALHO, F. de. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, Bom Jesus, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MUNNS, D. N. & FRANCO, A. A. *Soil constraints to legume production*. In: GRAHAM, P.H., HARRIS, S.C. (eds.). *Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture*. Cali: CIAT, p. 133-152, 1982.

- NEAL JUNIOR, J. L.; ATKINSON, T. G. & LARSON, R. I. Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 16, p. 153-158, 1970.
- REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Critical Review in Plant Sciences*, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 227-247, 2000.
- ROCHA, R.E.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Specificity of infection by *Azospirillum* spp. in plant with C4 photosynthetic pathway. *Associative N₂ fixation*. Boca Raton. v. 2, p. 67-69, 1981.
- RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V. de; BARROS, B. G. de F. & FIGUEIREDO, M. do V. B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *bradyrhizobium* sp. em caupi. *Bioscience Journal*. v. 28, n. 1, p. 196-202, 2012.
- RODRIGUES, C.S.; LARANJO, M. & OLIVEIRA, S. Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. *Current Microbiology*, v. 53, p. 1-7, 2006.
- RODRIGUES, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B. da; PINTO JUNIOR, A. S.; KLEIN, J. & COSTA, A. C. P. R. da. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 31-37, 2014.
- SOUZA, L. H.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. V. H. & VILLANI, E. M. de A. Efeito do pH do solo rizosférico e não rizosférico de plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* na absorção de boro, cobre, ferro, manganês e zinco. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, Viçosa, v. 34, n. 5, p. 1641-1652, 2010.
- STRZELCZYK, E. & POKOJSKA-BURDZIEJ, A. Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Plant and soil*, Crawley, v. 81, n. 2, p. 185-194, 1984.

Tabela 1. População de bactérias diazotróficas, crescidas em meios de cultura NFb Lactato e Malato, provenientes de coletas de solo e raízes de plantas de milho, realizadas aos 15 e 41 dias após semeadura, em função da inoculação de sementes com estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1) e níveis de pH do solo. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012

Fonte de variação	UFC bactérias no Solo	UFC bactérias na Raiz
	Log do Número Mais Provável 10 g ⁻¹ solo	Log do Número Mais Provável g ⁻¹ raiz
Épocas de Coleta de Amostras (ECA)		
15 dias após semeadura	4,99 b	5,61 b
41 dias após semeadura	6,89 a	6,25 a
Meios de Cultura (MC)		
NFb Lactato (seletivo a <i>A. brasilense</i>)	5,68 b	6,07 a
NFb Malato (seletivo a <i>H. seropedicae</i>)	6,21 a	5,79 a
Combinações entre inoculações de <i>A. brasilense</i> e <i>H. seropedicae</i>, e níveis de pH do solo (AI)		
pH 4,5 Testemunha	5,69 a	5,52 a
pH 4,5 AZ	6,12 a	5,94 a
pH 4,5 HE	5,87 a	6,44 a
pH 4,5 AZ+HE	5,87 a	6,37 a
pH 5,0 Testemunha	6,06 a	5,69 a
pH 5,0 AZ	6,31 a	6,00 a
pH 5,0 HE	5,56 a	5,69 a
pH 5,0 AZ+HE	6,06 a	5,62 a
pH 5,5 Testemunha	5,62 a	5,94 a
pH 5,5 AZ	6,12 a	5,69 a
pH 5,5 HE	6,12 a	6,50 a
pH 5,5 AZ+HE	5,85 a	5,75 a
Valor de F		
ECA	228,01**	15,06**
MC	17,71**	2,95 ^{ns}
AI	1,21 ^{ns}	1,38 ^{ns}
AI X ECA	3,07**	0,75 ^{ns}
AI X MC	1,22 ^{ns}	0,59 ^{ns}
ECA X MC	13,79**	3,89*
AI X ECA X MC	1,19 ^{ns}	0,86 ^{ns}
CV _{• Solo} (%)		14,72
CV _{• Raiz} (%)		19,12

* e **: significativos em nível de 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F. ^{ns} não significativo em nível de 5% pelo teste F. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

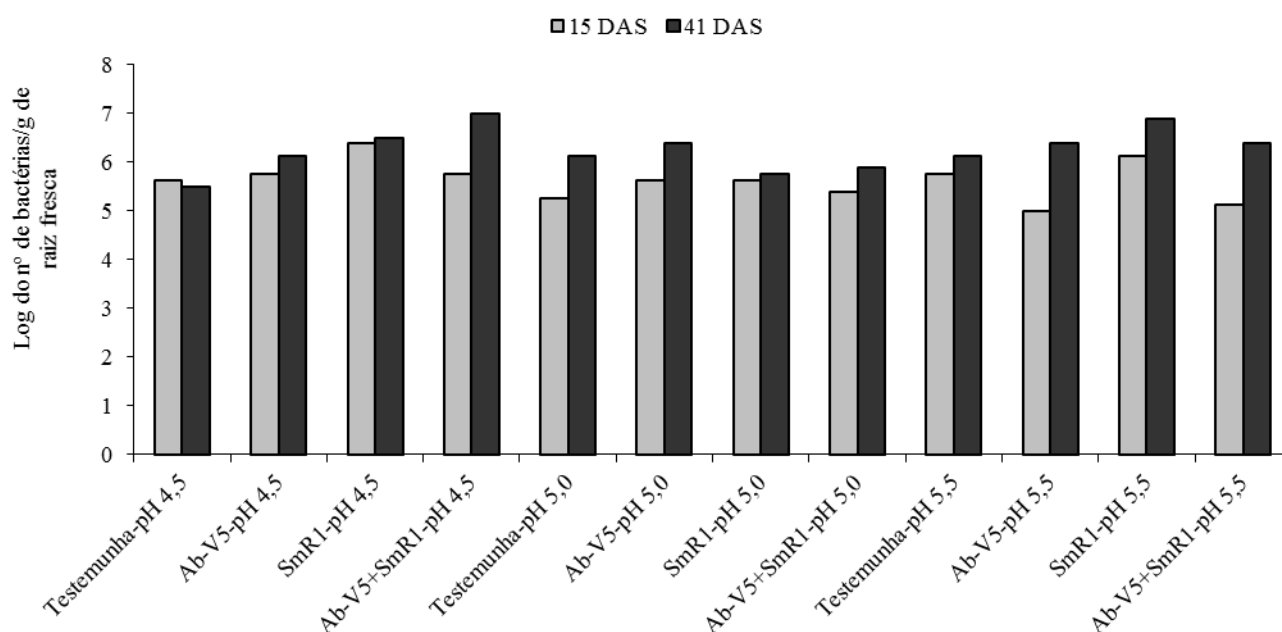


Figura 1. Valores médios do logaritmo do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por g raiz fresca de milho, em função da época de coleta das amostras (ECA) e das combinações entre inoculações de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, e níveis de pH do solo (AI), considerando as médias de dois meios de cultura (NFb Lactato e NFb Malato), de acordo com a tabela de McCrady. Médias semelhantes para AI dentro de ECA e entre ECA dentro de cada AI, não diferindo pelo teste de Scott-Knott a 5%.

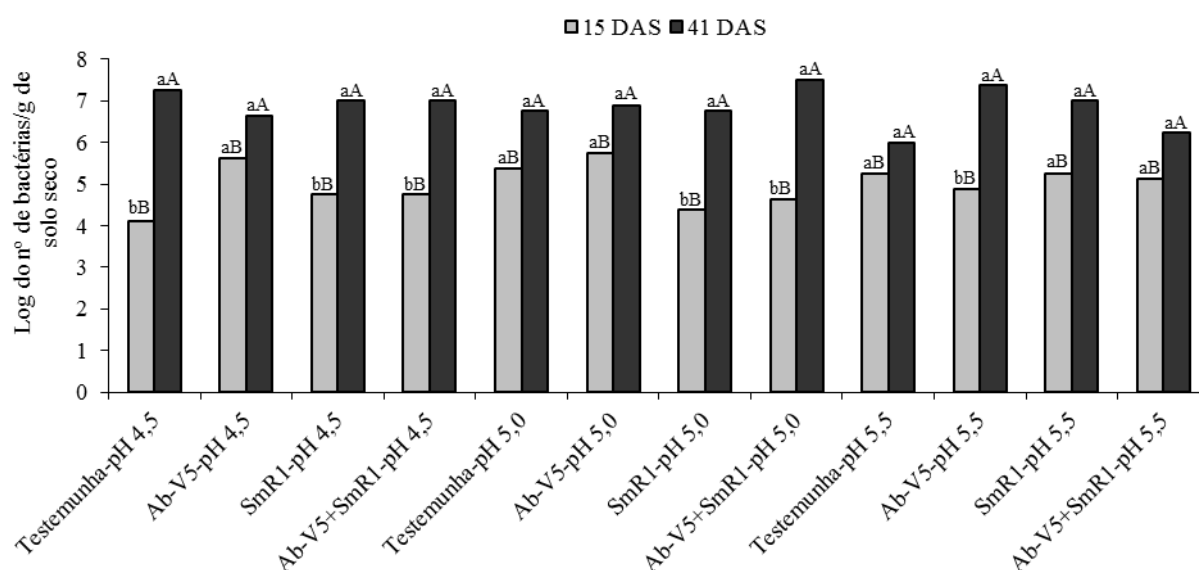


Figura 2. Valores médios do logaritmo do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por 10g solo, em função da época de coleta das amostras (ECA) e das combinações entre inoculações de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, e níveis de pH do solo (AI), considerando as médias de dois meios de cultura (NFb Lactato e NFb Malato), de acordo com a tabela de McCrady. Médias seguidas da mesma letra minúscula comparando os AI dentro de cada ECA e maiúsculas comparando ECA dentro de cada AI, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

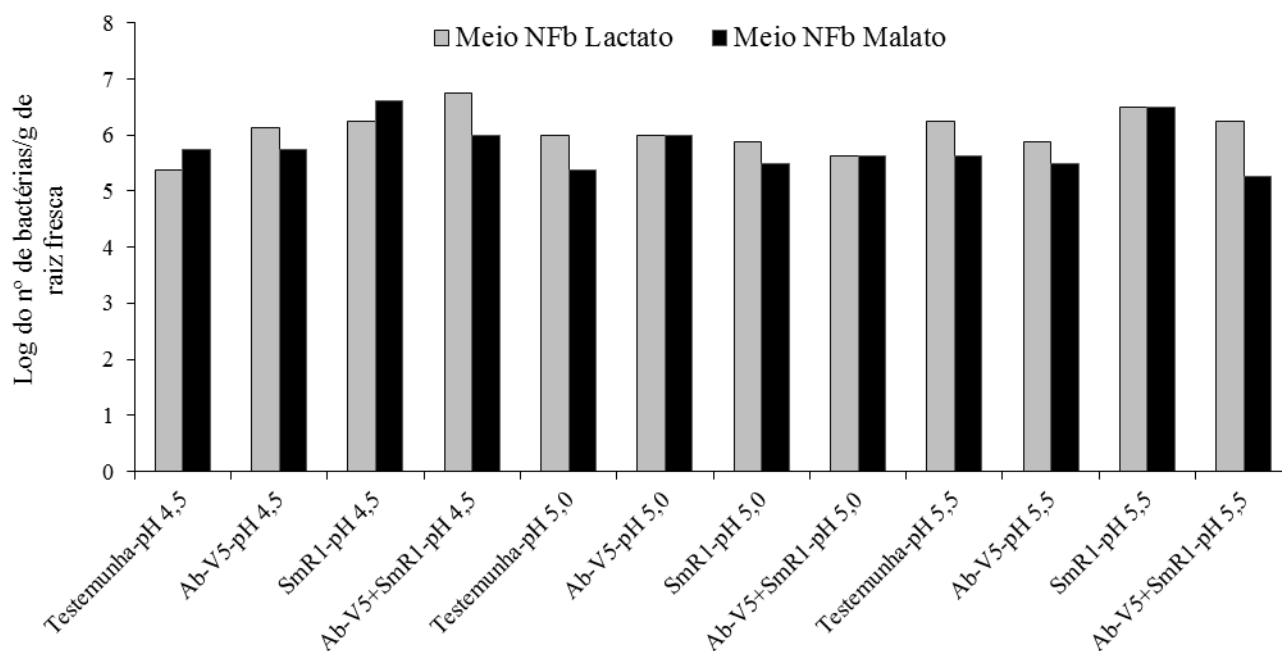


Figura 3. Valores médios do logaritmo do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por g raiz fresca de milho, em função de dois meios de cultura (MC) e das combinações entre inoculações de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, e níveis de pH do solo (AI), considerando as médias de duas épocas de coletas (15 e 41 DAS), de acordo com a tabela de McCrady. Médias semelhantes para os AI dentro de MC e entre os MC dentro de cada AI, não diferindo pelo teste de Scott-Knott a 5%.

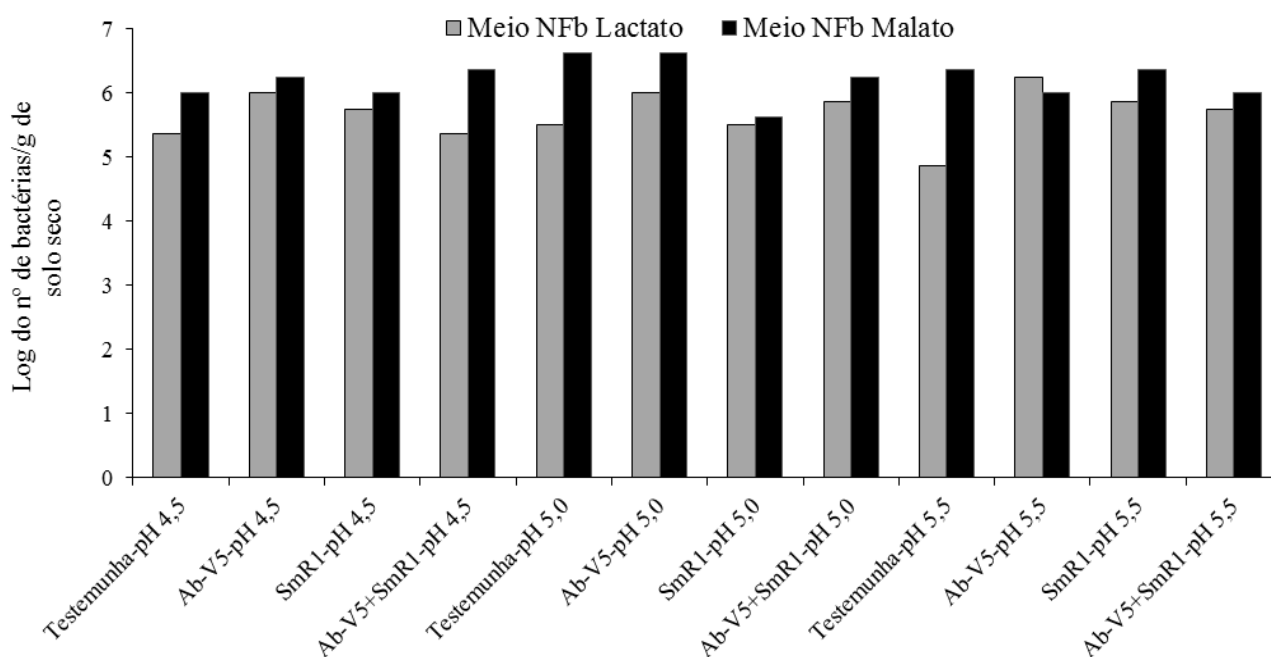


Figura 4. Valores médios do logaritmo do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por 10g solo seco, em função de dois meios de cultura (MC) e das combinações entre inoculações de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, e níveis de pH do solo (AI), considerando as médias de duas épocas de coletas (15 e 41 DAS), de acordo com a tabela de McCrady. Médias semelhantes para os AI dentro de MC e entre MC dentro de cada AI, não diferindo pelo teste de Scott-Knott a 5%.

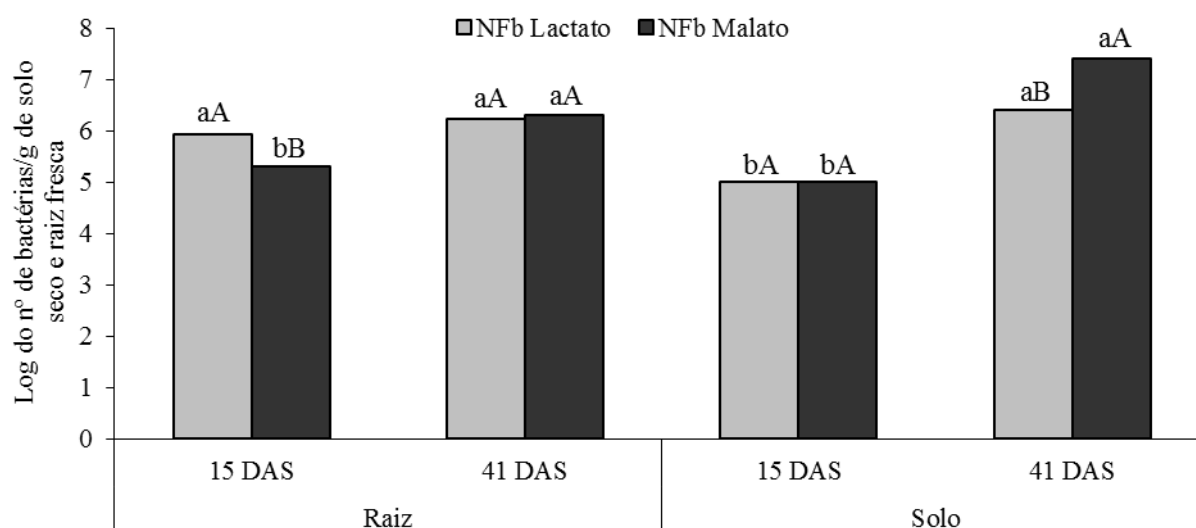


Figura 5. Valores médios do logaritmo do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por 10g de solo seco e 1 g raiz fresca de milho, em função da época de coleta das amostras (ECA) e de dois meios de cultura (MC), considerando as médias das 12 combinações entre inoculações de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, e níveis de pH do solo (AI), de acordo com a tabela de McCrady. Médias seguidas da mesma letra minúsculas comparando MC dentro de ECA e maiúsculas comparando ECA dentro de MC, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.