

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

ANDRE GUSTAVO BATTISTUS

**INOCULAÇÃO VIA SEMENTE E FOLIAR DE *Azospirillum brasilense* ASSOCIADO
AO TRATAMENTO DE SEMENTES COM BIOATIVADOR NA CULTURA DO
MILHO**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2015

ANDRE GUSTAVO BATTISTUS

**INOCULAÇÃO VIA SEMENTE E FOLIAR DE *Azospirillum brasilense* ASSOCIADO
À TRATAMENTO DE SEMENTES COM BIOATIVADOR NA CULTURA DO
MILHO**

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

Orientador: Dr. Vandeir Francisco Guimarães

Coorientador: Dr. Odair José Kuhn

Coorientador: Dr. Jeferson Klein

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2015

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

B336i	Battistus, Andre Gustavo Inoculação via semente e foliar de <i>Azospirillum brasilense</i> associado à tratamento de sementes com bioativador na cultura do milho / Andre Gustavo Battistus. - Marechal Cândido Rondon, 2015. 96 p.
	Orientador: Dr. Vandeir Francisco Guimarães Coorientador: Dr. Odair José Kuhn Coorientador: Dr. Jeferson Klein
	Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2015.
	1. Milho. 2. Hormônios vegetais. 3. <i>Azospirillum brasilense</i> . I. Guimarães, Vandeir Francisco. II. Kuhn, Odair José. III. Klein, Jeferson. IV. Título.
	CDD 22.ed. 633.15 CIP-NBR 12899

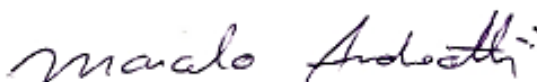
Ficha catalográfica elaborado por Marcia Elisa Sbaraini Leitzke CRB-9/539

ANDRE GUSTAVO BATTISTUS

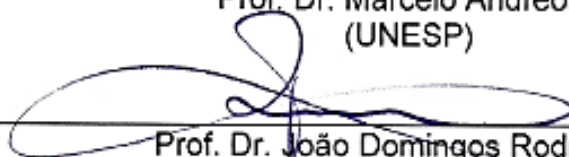
**INOCULAÇÃO VIA SEMENTE E FOLIAR DE *AZOSPIRILLUM BRASILIENSE*
ASSOCIADO A TRATAMENTO QUÍMICO DE SEMENTES NA CULTURA DO
MILHO**

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

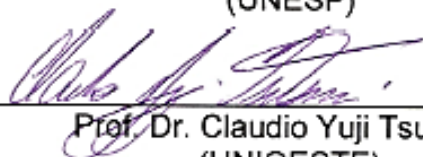
APROVADA: 24 de fevereiro de 2015



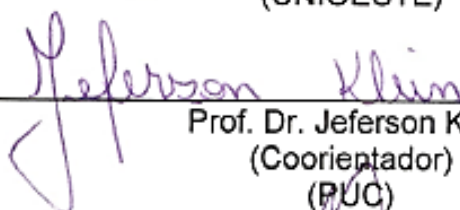
Prof. Dr. Marcelo Andreotti
(UNESP)



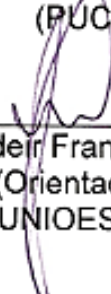
Prof. Dr. João Domingos Rodrigues
(UNESP)



Prof. Dr. Claudio Yuji Tsutsumi
(UNIOESTE)



Prof. Dr. Jeferson Klein
(Coorientador)
(PUC)



Prof. Dr. Vander Francisco Guimarães
(Orientador)
(UNIOESTE)

Aos meus pais, Eloi Battistus e Mirian Pedrolo Battistus, e aos demais familiares, servindo-me cada um com sua parcela como exemplo de educação, respeito, sabedoria, tolerância, incentivo, apoio e sucesso durante cada etapa percorrida até aqui e as que se seguirão.

AGRADECIMENTOS

À ciência, às suas dúvidas e às suas descobertas, a sua cobiça pelo desconhecido, e a inquietude que provoca pela insatisfação em não entendermos o mundo, formando mentes livres, pois a humanidade merece bem mais que apenas deus e diabo.

À pátria brasileira, do sonho intenso e do brado retumbante, pelo seu povo heroico amada e idolatrada, e de raio vívido que leva seus risonhos e lindos campos a ter mais flores.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade de batalhar por mais este título profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de pesquisa, e demais órgãos de fomento envolvidos nesta pesquisa.

À Fundação Araucária de suporte ao desenvolvimento científico e tecnológico do Paraná, afiliada a Secretária Estadual de Ciência, Tecnologia e Educação Superior – SETI, à CAPES/PNPD, ao INCT-FBN pelo suporte financeiro e ao CNPq pela bolsa produtividade concedida ao pesquisador Dr. Vandeir Francisco Guimarães.

À Nitro 1000 Inoculantes Biológicos pela parceria e fornecimento dos inoculantes que subsidiaram esta pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, em especial a oportunidade de conhecer mais sobre o ambiente acadêmico como membro de seu colegiado.

Em especial ao professor e meu orientador, Vandeir Francisco Guimarães, não por uma, mas por todas as orientações, sejam de caráter técnico, profissional e/ou pessoal. Pela liberdade, credibilidade e confiança que à mim foram depositados durante dois anos. Muito obrigado.

Aos professores Odair José Kuhn e Jeferson Klein, meus coorientadores, José Renato Stangarlin, Marlene de Matos Malavasi e Claudio Yuji Tsutsumi por todos os ensinamentos transmitidos, necessários à elaboração da presente obra, e de grande valia para a minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus familiares, principalmente aos meus pais, pela liberdade de escolha, apoio e incentivo dos passos que trilho e que um dia trilharei. Pelos ensinamentos, os quais por ter essa sorte, nunca tive necessidade de ter que buscar longe da sombra dessa edificação.

A todos os amigos, os quais construí relações de amizade ao longo da vida, muitos e poucos ao mesmo tempo, mas os quais me lembro com carinho de cada. A todos os momentos compartilhados e os risos exagerados. Frequentes ou raros, cada qual ao seu tempo, mas os mais certos nas horas mais incertas.

As amigos e colegas do Grupo de Estudos em Fixação Biológica de Nitrogênio, pelo engrandecimento pessoal e profissional. Pelos grãos de terra movimentados, pelas mãos sujas e lavadas por outras mãos, pelo conhecimento gerado e pelo direcionamento em conjunto elaborado

Ao ortopedista e traumatologista Alex Koch pela adaptação do tratamento de fratura de rádio e escafoide às minhas necessidades, que permitiu a finalização desta obra, e pelas boas conversas sobre o entendimento do mundo que as consultas corriqueiramente originam.

A todos os quais aqui citei, de forma direta ou indireta, espero de alguma forma honrá-los sendo um pouco de cada um, pois muito bem sei que pouco quando vindo de muitos se torna bastante, e sendo de vocês é capaz de formar um grande ser humano.

Por fim, um brinde a todas às discussões de natureza engrandecedora, as rodas de bar, as conversas fiadas, aos conselhos e advertências dadas e recebidas, aos momentos dedicados compartilhados com quem se escolhe, e principalmente ao respeito pelo livre pensamento do próximo.

“Um homem sábio deve sempre seguir os caminhos trilhados por grandes homens e imitar aqueles que têm sido supremos, para que, caso a habilidade não se iguale à deles, pelo menos você poderá chegar perto.”

BIOGRAFIA

Andre Gustavo Battistus, corintiano de sangue e coração, escolhido pelo clube, o qual não foi herdado de berço, pelo contrário, foi contraposto ao maior rival. Brasileiro, nascido cascavelense, crescido corbeliense e atualmente rondonense, sendo sempre habitante do belo estado do Paraná. Italiano por dupla ascensão, católico por não opinião, ateu pela razão. De vida afortunada devido à quem escolheu para cercá-lo, e também pela família de quem carrega o legado de repassar a velha pampa que desde que tenha memória foi apresentado. De início apenas um pequeno curioso, até tornar-se engenheiro de formação, pois nenhum brinquedo resistia o desejo de desvendar o mistério de seu mecanismo antes da diversão. Assim, derivada do ofício familiar, a engenharia agrônômica foi opção onde com o passar dos anos escolheu pesquisa pela paixão. Movido por um pensamento galopante e um tanto mutável, busca valorizar cada opinião, desde que raciocinada de forma elegante. Amante de uma boa discussão, não importe a circunstância, desde que objetive engrandecer o entendimento e valorizar o pensamento de cada envolvido. Fascinado por bons contos, adora uma boa história, que quanto menos previsível, respectivo é seu louvor. O andar da natureza lhe encanta, onde é apenas mais um entre tantos nessa dança, onde no fim somos a origem e a nossa origem é o final.

RESUMO

BATTISTUS, Andre Gustavo, Magister Scientiae, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Fevereiro- 2015. **Inoculação via semente e foliar de *Azospirillum brasilense* associado ao tratamento de sementes com bioativador na cultura do milho.** Orientador: Vandeir Francisco Guimarães. Coorientadores: Odair José Kuhn e Jeferson Klein.

O milho é um cereal de elevada importância econômica devido à sua magnitude de formas de utilização. Incrementando os níveis de produtividade, substâncias promotoras de desenvolvimento vegetal ganham papel de destaque na agricultura contemporânea, advindas de origem biológica ou química. Contudo, a escassez de resultados a respeito da utilização conjunta desses promotores leva à necessidade de informações sobre sua utilização simultânea. Neste contexto, esta obra buscou avaliar os efeitos da utilização conjunta de tiametoxam aliado à inoculação via semente e pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* na qualidade fisiológica de sementes de milho e seu desempenho agrônomo em dois ambientes de investimento em cultivo a campo. Inicialmente, testou-se o crescimento bacteriano em meio de cultura contendo concentrações crescentes de tiametoxam. Avaliou-se também o desenvolvimento inicial e qualidade fisiológica de plântulas por medidas morfométricas, índice de velocidade de emergência e índice SPAD, por meio de arranjo fatorial 2 x 3, com inoculação de sementes com *A. brasilense* (100 mL por cada 25 kg de sementes) e três doses de tiametoxam (0, 28 e 42 mg por 60.000 sementes). À campo, esquema fatorial 2 x 4 foi composto pela presença e ausência de tratamento químico de sementes com o bioativador de plantas tiametoxam (28 mg por 60.000 sementes), enquanto o segundo fator englobou sementes sem inoculação; inoculação de sementes com *A. brasilense* (100 mL por 60.000 sementes), pulverização foliar de inoculante a base de *A. brasilense* (300 mL ha⁻¹) e inoculação de sementes associado à pulverização foliar com *A. brasilense*, testados em ambientes de alta e média aplicação de tecnologia de produção. Os tratamentos foram avaliados por análises morfométricas, teor de nutrientes nos tecidos vegetais, componentes da produção e produtividade da cultura. A população bacteriana mostrou redução linear de acordo com o aumento das doses de tiametoxam. A dose de 42 mg de tiametoxam causou redução na velocidade de emergência, índice SPAD, comprimento de parte aérea e de raiz, volume de raiz, relação raiz/parte aérea e massa da matéria seca de parte aérea, enquanto que, a inoculação

evidenciou atividade positiva na qualidade fisiológica das plântulas. Deste modo, a inoculação combinada com dose de 28 mg de tiametoxam demonstra efeito sinérgico no início do desenvolvimento de plântulas de milho. À campo, o tiametoxam, assim como a inoculação via semente + pulverização foliar, promoveram incrementos no comprimento das plantas, diâmetro de colmo, acúmulo de massa e área foliar ao longo do ciclo vegetal em ambos os ambientes. Redução no teor de umidade, impurezas e descontos da massa de grãos, assim como incrementos nos níveis foliares de fósforo são resultados da inoculação, contudo sem apresentar alterações na produtividade do milho. Tiametoxam também reduziu a umidade da massa de grãos. A produtividade foi incrementada pela presença do tiametoxam em ambiente de média tecnologia produtiva.

Palavras-chave: *Zea mays*. Bioativador vegetal. Tiametoxam. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Hormônio vegetal. Regulador vegetal.

ABSTRACT

BATTISTUS, Andre Gustavo, Magister Scientiae, State University of Western Paraná, February - 2015. **Seed and leaf inoculation with *Azospirillum brasilense* associated with bioactivator seed treatment in maize.** Advisor: Vandeir Francisco Guimarães. Co-advisors: Odair José Kuhn and Jeferson Klein.

The maize is a cereal with high economic importance due to its magnitude forms of use. Increasing productivity levels, promoting substances plant development are highlighted role in contemporary agriculture, arising from biological or chemical origin. However, the lack of results regarding the joint use of these promoters leads to the need for information on their simultaneous use. In this context, this work aimed to evaluate the effects of joint use of thiamethoxam combined with seed inoculation and foliar spray *Azospirillum brasilense* on physiological quality of corn seeds and its agronomic performance in two environments in the growing field. Initially, we tested bacterial growth in culture medium containing increasing concentrations of thiamethoxam. It was also evaluated the initial development and physiological quality of seedlings by morphometric measurements, emergency speed index and SPAD index through factorial 2 x 3 with seed inoculation with *A. brasilense* (100 mL per 25 kg seeds) thiamethoxam and three doses (0, 28 and 42 mg per 60,000 seeds). In the field, factorial 2 x 4 was composed by the presence and absence of chemical seed treatment with bioactivator of thiamethoxam plants (28 mg per 60,000 seeds), while the second factor comprised seeds without inoculation; seed inoculation with *A. brasilense* (100 mL per 60,000 seeds), foliar spray inoculant base *A. brasilense* (300 mL ha⁻¹) and associated with the seed inoculated with *A. brasilense* foliar spray, tested in high ambient and applying average production technology. The treatments were evaluated by morphometric analysis, nutrient content in plant tissues, components production and crop yield. The bacterial population showed a linear decrease with increasing doses of thiamethoxam. The dose of 42 mg of thiamethoxam caused reduction in emergence speed, SPAD index, shoot length and root, root volume, root/shoot and dry matter of shoots, while inoculation showed activity positive physiological quality of seedlings. Thus, combined with inoculation dose of 28 mg thiamethoxam demonstrates synergistic effect in the early development of maize seedlings. In the field, thiamethoxam, as well as seed inoculation + foliar spray promote increase in plant

length, stem diameter, leaf and mass accumulation area throughout the plant cycle in both environments. Reduction in moisture content, impurities and discounts of grain mass, as well as increases in leaf phosphorus levels are the result of inoculation, yet without deterioration in corn yields. Thiamethoxam also reduced the moisture of the grain mass. Productivity was increased by the presence of thiamethoxam on average productive technology environment.

Keywords: *Zea mays*. Plant bioactivator, Thiamethoxam. Plant growth promotion bacteria. Plant hormone. Plant regulator.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1.1	A CULTURA DO MILHO	2
1.2	SUBSTÂNCIAS PROMOTORAS DE DESENVOLVIMENTO VEGETAL	3
1.3	BIOATIVADORES	3
1.4	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE DESENVOLVIMENTO VEGETAL.....	5
1.5	INTERAÇÃO TIAMETOXAM- <i>Azospirillum</i> -AMBIENTE	6
3	ARTIGO 1: Ação sinérgica de <i>Azospirillum brasilense</i> combinado com tiametoxam sobre a qualidade fisiológica de plântulas de milho	8
	Introdução	9
	Material e Métodos	10
	Resultados e Discussão	13
	Conclusões	18
	Referências.....	19
4	ARTIGO 2: Tiametoxam associado à <i>Azospirillum brasilense</i> via semente e foliar cultivado em dois ambientes de produção de milho	29
3.1	Introdução	30
3.2	Material e métodos.....	33
3.2.1	Delineamento Experimental	33
3.2.2	Aplicação dos tratamentos	34
3.2.3	Localização e caracterização das áreas experimentais	34
3.2.4	Ambiente 1: Sistema Plantio Direto.....	35
3.2.5	Ambiente 2: Sistema Plantio Convencional.....	36
3.2.6	Quantificação bactérias diazotróficas e <i>A. brasilense</i>	37
3.2.7	Avaliações	38
3.2.8	Condições climáticas.....	40
3.2.9	Análise Estatística	40
3.3	Resultados	40
3.3.1	Ambiente 1: Sistema plantio direto	40
3.3.2	Ambiente 2: Sistema Plantio Convencional.....	44
3.4	Discussões.....	46
3.5	Conclusões	57
3.6	Referências bibliográficas.....	58
5	CONCLUSÕES GERAIS	78
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) apresenta elevada importância econômica mundial, sendo cultivado em todos os continentes e tendo emprego em várias cadeias do setor do agronegócio. Neste cenário, o Brasil desponta como terceiro maior produtor e segundo maior exportador do grão (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014).

Devido ao seu elevado potencial produtivo, a pesquisa para desenvolvimento de tecnologias com potencial de emprego na produção da cultura é intensa, dentre as quais destacam-se produtos que visam abrandar efeitos derivados de estresses e incrementar a produtividade da cultura, com foco na redução de custos da produção.

Produtos com característica de controladores hormonais destacam-se em culturas de alta liquidez, como o milho, onde sua aplicação pode ser efetuada ao longo de todo o ciclo vegetativo, dependendo da natureza, atividade bioquímica, mecanismo e modo de ação.

Tanto no tratamento químico como na inoculação das sementes de milho com microrganismos encontram-se exemplos de aplicações de substâncias promotoras de crescimento da planta, com ampla atuação nos órgãos vegetais, tendo à aplicação via pulverização foliar destes compostos efeitos semelhantes à aplicação via semente.

Estas substâncias atuam como moduladoras do metabolismo vegetal por meio da ativação de reações fisiológicas que culminam em maior expressão hormonal, enzimática e proteica. Consequentemente há desenvolvimento de mecanismos bioquímicos e morfológicos que facilitam o transporte iônico e a nutrição mineral, permitindo maior exploração do solo devido ao crescimento radicular, e acionando mecanismos de defesa, que em conjunto possibilitam ao vegetal melhores condições para enfrentar adversidades bióticas e abióticas.

Apesar dos resultados da utilização isolada destes produtos demonstrarem seu efeito positivo em diversas culturas de interesse econômico, é evidente a falta de informações acerca da utilização conjunta de defensivos químicos e microrganismos. Desta forma, estudos de desempenho agrônomico são imprescindíveis para o desenvolvimento de informações a respeito da aplicabilidade das tecnologias em conjunto na cultura do milho, seja pela aplicação via semente ou pela pulverização via foliar.

Considerando o contexto explanado, esta obra objetivou avaliar efeitos da utilização conjunta de tiametoxam aliado à inoculação via semente e pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* na qualidade fisiológica de sementes e desempenho agrônomico da cultura do milho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de elevada importância econômica, cultivado em todos os continentes, pela sua relevância devido à magnitude de formas de utilização. Esta amplitude é alcançada pelo seu emprego em inúmeros produtos, variando desde a alimentação humana e animal, até a indústria de alta tecnologia (MIRANDA; DUARTE; GARCIA, 2012; PAES, 2008).

A estimativa temporal da origem do milho é de difícil determinação. Contudo, é uma cultura de antiga exploração juntamente ao arroz, feijão, milho, entre outras, com sua origem considerada entre cinco e dez mil anos, derivado do teosinto (MATSUOKA et al., 2002). Análises filogenéticas indicam que seu centro de origem se localiza na bacia do rio Balsas, na região centro-sul do atual México (ABBO; LEV-YADUN; GOPHER, 2010; HARLAN, 1971; MATSUOKA et al., 2002).

Dados recentes afirmam a elevada importância da cultura, atingindo o patamar de 981 milhões de toneladas produzidas mundialmente. Deste montante, o Brasil contribui com 80 milhões de toneladas do grão, tornando-o o terceiro produtor e segundo maior exportador do cereal na temporada 2013/2014 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014). Para a temporada 2014/2015 estima-se redução na área cultivada, contudo incrementos no nível tecnológico prometem incrementar a produtividade e manter a produção nacional estabilizada em relação à temporada anterior (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2015).

Estima-se que 70% de toda a produção mundial do milho é voltada para a cadeia produtiva de suínos e aves, atingindo até 80% no Brasil devido a característica exportadora de carne que o país possui. Deste modo, o sistema agroindustrial do milho é diretamente dependente do sucesso de outras cadeias produtivas (MIRANDA; DUARTE; GARCIA, 2012).

Por ser uma cultura de elevado potencial produtivo, diversas tecnologias despontam para utilização no sistema produtivo do milho, visando abrandar efeitos derivados de estresses e incrementar a produtividade da cultura, com foco na redução de custos da produção.

Estas tecnologias e incrementos nos patamares de produção são resultados de pesquisas iniciadas na década de 1990, que proporcionam ao sistema produtivo híbridos de elevado potencial genético e adição da transgenia na cultura, manipulação espacial das plantas melhorando o aproveitamento de nutrientes, água, luz e controle de plantas daninhas, melhoria

na qualidade das sementes, além de correções de fertilidade do solo e controle químico de doenças em sistemas de elevada tecnologia (CRUZ, 2012). Ainda segundo o mesmo autor, as produtividades médias obtidas pelos produtores são bastante variáveis devido à diferença de investimentos entre os sistemas de produção.

1.2 SUBSTÂNCIAS PROMOTORAS DE DESENVOLVIMENTO VEGETAL

Substâncias denominadas como controladores hormonais veem ganhando destaque na agricultura, acompanhando a evolução das técnicas de cultivo, sendo principalmente utilizadas em culturas de alto valor econômico agregado (BUSATO et al., 2010). Estas substâncias são agrupadas em bioreguladores, bioestimulantes, bioativadores e aminoácidos (CASTRO, 2006). A aplicação desses compostos nas plantas pode ser efetuada ao longo de todo o ciclo vegetativo, dependendo da natureza e atividade da substância, assim como seu mecanismo e modo de ação.

Tanto o tratamento químico, como a inoculação das sementes de milho com microrganismos são exemplos de aplicações de substâncias promotoras de crescimento de plantas (ALMEIDA et al., 2009; HUNGRIA et al., 2010; MACEDO et al., 2013; QUADROS et al., 2014). Contudo, a aplicação via pulverização foliar destes compostos também apresentam efeitos semelhantes à aplicação via semente, com ampla atuação nos órgãos vegetais (MARTINS et al., 2012; NETO et al., 2013), podendo, estes produtos, ser tanto de origem biológica quanto química.

1.3 BIOATIVADORES

De modo geral, substâncias denominadas bioativadoras atuam como modificadoras do metabolismo vegetal por meio da ativação de várias reações fisiológicas que culminam em maior expressão proteica. Por sua vez, estas proteínas interagem com vários mecanismos de defesa, possibilitando ao vegetal melhores condições para enfrentar adversidades, tanto bióticas como abióticas (ALMEIDA et al., 2009).

A alteração de fatores de transcrição no núcleo da célula vegetal ocasionada pelos bioativadores culmina em incrementos na expressão gênica de proteínas transportadoras das membranas e enzimas metabólicas. Isto resulta em alteração no metabolismo vegetal como um todo, por meio da síntese de aminoácidos precursores de proteínas, elevando a síntese de

hormonal e promovendo o desenvolvimento de mecanismos que facilitam o transporte iônico e a nutrição mineral (Figura 1) (CARVALHO; PERLIN; COSTA, 2011; CASTRO, 2006).

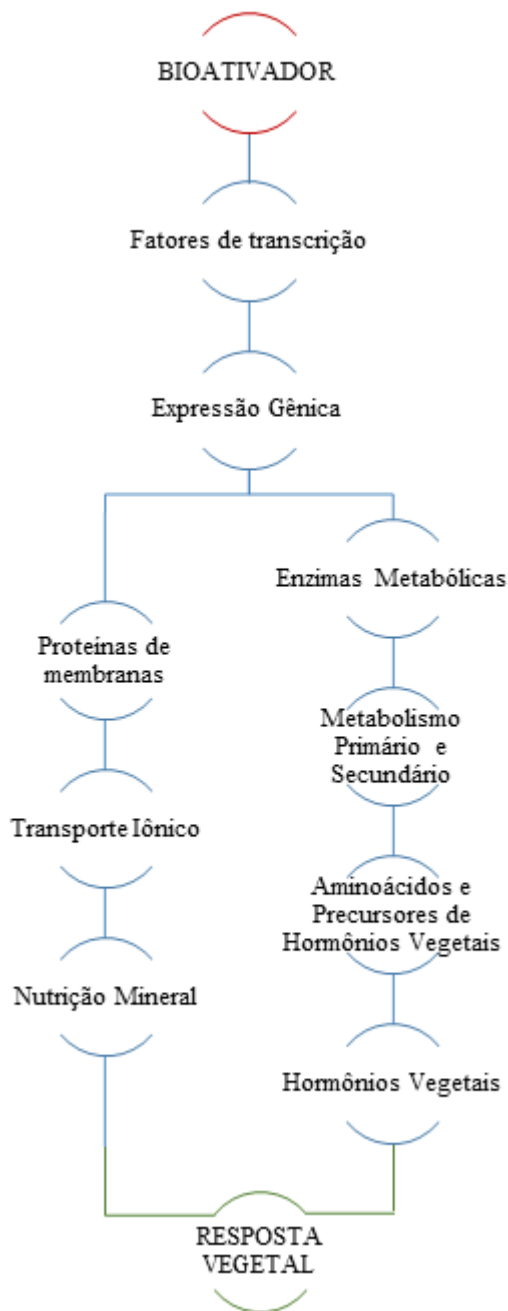


Figura 1 - Representação esquemática do modo de ação de bioativadores nos vegetais (CASTRO, 2006).

Apesar de apresentarem elevações nos níveis hormonais dos vegetais, bioativadores não devem demonstrar atividade reguladora direta. Os incrementos hormonais derivados de sua utilização normalmente são resultantes de estímulos na síntese endógena (CASTRO et al., 2007).

O tiametoxam ou 3-(2-cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5], molécula inseticida de efeito sistêmico, também possui como característica ser um composto bioativador de destaque devido ao seus efeitos secundários nos vegetais (CASTRO, 2006). Este composto é recomendado principalmente para utilização via tratamento de sementes para controle de pragas iniciais em diversas culturas de grande importância econômica.

Este bioativador estimula a atividade das enzimas peroxidase (SOARES et al., 2008) e fenilalanina amônia-liase (MACEDO; CASTRO, 2011), responsáveis por vários processos desencadeados pelo vegetal contra estresses bióticos e abióticos.

Sob condições adversas, como estresses hídricos e salinos, as plantas tornam-se mais tolerantes, devido ao

aumento no diâmetro dos vasos do xilema, assim como acréscimo no número de vasos xilemáticos nas raízes (MARTINS et al., 2012). Estas respostas permitem maior translocação de água e nutrientes, aliado ao maior volume radicular (ALMEIDA et al., 2012) e elevação da resistência estomática (CASTRO, 2006), permitindo a manutenção da turgidez e equilíbrio hídrico pela planta em situações de estresse. Conseqüentemente, maiores taxas fotossintéticas

são encontradas quando contrastadas plantas tratadas com tiametoxam frente a plantas controle (ALMEIDA et al., 2012).

Indiretamente, o tiametoxam afeta a expressão gênica e síntese de giberelinas, refletida em maiores níveis de α -amilases e β -amilases, e ao mesmo tempo reduzindo os níveis de ácido abscísico (AFIFI et al., 2014), devido a maior turgidez vegetal e redução de sua síntese no sistema radicular (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Ao se considerar todos os mecanismos de ação descritos anteriormente, agindo simultaneamente, o tiametoxam promove incrementos tanto na parte aérea como no sistema radicular do vegetal (GROHS et al., 2012; MACEDO; CASTRO, 2011; PEREIRA; FERNANDES; VELOSO, 2010). Estes efeitos são alavancados pela redução da expressão de alguns genes codificadores de nanismo em plantas, permitindo resultados mais evidenciados, quanto ao desenvolvimento das plantas, em condições adversas (AFIFI et al., 2014).

1.4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE DESENVOLVIMENTO VEGETAL

Substâncias promotoras de desenvolvimento vegetal também podem ter origem biológica. Esta promoção se dá em função de bioreguladores vegetais que podem ser produzidos por microrganismos associativos, ou pela produção destes compostos pelos vegetais em função da associação com estes microrganismos (BALDANI; BALDANI, 2005). Estes compostos bioreguladores são produzidos em uma célula, sendo capazes de modular processos em células vizinhas quando em baixa concentração, interagindo com proteínas específicas que funcionam como receptores para rotas de transdução de sinais (CASTRO, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Bactérias promotoras de desenvolvimento vegetal são pesquisadas desde a década de 1970, a partir da descoberta de gêneros bacterianos antecedentes ao *Azospirillum*. Este gênero apresenta ampla distribuição global sendo de ocorrência natural junto a culturas forrageiras e cereais (DOBEREINER; MARRIEL; NERY, 1976).

Estes microrganismos colonizam tanto a região rizosférica como tecidos internos da raiz (BALDANI; BALDANI, 2005; HUERGO et al., 2008), devido a sua característica motílica e quimiotáxica para ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e compostos aromáticos exsudados pelas raízes (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000), beneficiando-se dessas fontes de carbono e energia. O aumento da capacidade de absorção de água e nutrientes é resultado dessa interação bactéria-plantas devido ao estímulo bioregulador (PEDRAZA, 2008).

A atividade bioreguladora desses microrganismos é função da produção e excreção hormonal, destacando-se auxinas e giberelinas (BASHAN; HOLGUIN; LUZ, 2004; MASCIARELLI et al., 2013; TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979), redução dos níveis de etileno devido a ação da enzima ACC deaminase, desviando compostos de rotas metabólicas, que dariam origem ao hormônio gasoso no vegetal, para a bactéria (BLAHA et al., 2006) e produção de outros compostos, como poliaminas (CASSÁN et al., 2009; PERRIG et al., 2007).

Aliado à bioregulação vegetal, mecanismos como a fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2010), solubilização de fosfatos inorgânicos (RODRIGUEZ; GONZALEZ; GOIRE, 2004), e incrementos na atividade do óxido nítrico (ALEN'KINA; NIKITINA, 2010; CREUS et al., 2005) podem contribuir para o desenvolvimento vegetal e aumento da tolerância a condições de estresse (HAMDIA; SHADDAD; DOAA, 2004)

Desta forma, o sinergismo presente entre os mecanismos de ação do *Azospirillum* resulta em maior desenvolvimento radicular, melhor exploração do solo e absorção de nutrientes (HUNGRIA et al., 2010; RADWAN; MOHAMED; REIS, 2004). Como reflexo desse aporte no sistema radicular, são relatados incrementos na parte aérea do vegetal (KLEIN et al., 2012; OLIVEIRA; ARRUDA; BACH, 2004) até componentes de produção (QUADROS et al., 2014) e produtividade do milho (NOVAKOWISKI et al., 2011).

Porém, apesar das bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* serem usualmente descritas aliadas a diversas espécies poaceas, principalmente em sua rizosfera (REIS JUNIOR et al., 2004), as mesmas possuem a capacidade de se instalar em outros órgãos vegetais, como o filoplano e tecidos internos (DAVIDSON, 1988).

Levando em consideração a habilidade de ampla colonização no vegetal, a utilização do *Azospirillum* não fica restrita à inoculação via semente, sendo expandida, e podendo ser efetuada via pulverização foliar (PORTUGAL et al., 2012), promovendo aumento no acúmulo de biomassa (NETO et al., 2013) e incrementos na produtividade (PORTUGAL et al., 2013).

1.5 INTERAÇÃO TIAMETOXAM-*Azospirillum*-AMBIENTE

A interação de tiametoxam com *A. brasilense* remete-se a interação de produtos químicos com biológicos, apesar do bioativador em questão e rizobactérias desencadearem respostas semelhantes nos vegetais (SOARES et al., 2014).

O tiametoxam é considerado por alguns autores de baixa toxicidade para microrganismos como *Beauveria bassiana* e *Herbaspirillum seropedicae*, onde não afeta a

germinação, crescimento e nem produção de conídios do fungo (ANDALÓ et al., 2004) e o tempo de geração e fase log da bactéria (FERNANDES et al., 2012). Porém, esta interação é muito específica, visto que o *A. brasilense* é bastante suscetível a compostos como bromopropilato e metidationa (GOMEZ et al., 1998).

Contudo, a redução na população bacteriana é evidente devido ao acúmulo de diversos fatores nesta interação (FERNANDES et al., 2012; GOMEZ et al., 1998; OMAR; ABD-ALLA, 1992; PROCÓPIO et al., 2011). Isto resulta em respostas menos expressivas quanto à utilização da inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* (CONCEIÇÃO et al., 2009), visto que a população ideal é necessária para maior expressão dos mesmos, e estão diretamente ligados aos níveis de bioreguladores excretados (DOBBELAERE et al., 2002).

Adicionalmente aos empecilhos descritos, quando inoculadas ou pulverizadas, as células bacterianas são expostas a ambientes adversos e sujeitas à desidratação, como sementes, que em estado quiescente tendem a absorver água do meio (MARCOS FILHO, 2005). Quanto ao filoplano, no caso da pulverização foliar, este tende a perder água por transpiração e trocas gasosas (TAIZ; ZEIGER, 2013), acarretando em redução da população bacteriana.

A utilização de defensivos químicos, principalmente de ação sistêmica que atingem vários órgãos do vegetal promovem efeitos negativos sobre a população das bactérias promotoras de desenvolvimento vegetal. Podem-se destacar dentre estes efeitos o aumento no tempo de geração e redução da fase log (FERNANDES et al., 2012; GOMEZ et al., 1998), retardando e reduzindo a multiplicação pelas restrições na taxa respiratória das bactérias (OMAR; ABD-ALLA, 1992). Além disso, a atividade da enzima nitrogenase das bactérias também é reduzida, afetando diretamente a fixação biológica (PROCÓPIO et al., 2011).

É importante ainda ressaltar que a sobrevivência das bactérias associativas nos diversos órgãos dos vegetais é essencial para o sucesso da inoculação (BASHAN; HOLGUIN, 1995). Condições climáticas, tipo e manejo de solo, assim como condições e equipamentos utilizados no momento da aplicação afetam diretamente a adaptação das bactérias ao novo ambiente, podendo levar a variações nos resultados de promoção do crescimento e produtividade (QUADROS et al., 2014). Ao mesmo tempo, o melhor desempenho de ambas tecnologias é detectado principalmente em condições adversas, como em estresses salinos (HAMDIA; SHADDAD; DOAA, 2004; SOARES et al., 2008), restrições hídricas (CASSÁN et al., 2009; CASTRO, 2006) e mato competição intensa (AFIFI et al., 2014), servindo de base para detecção, estudos e compreensão dos mecanismos envolvidos para cada agente promotor de desenvolvimento vegetal.

3 ARTIGO 1: AÇÃO SINÉRGICA DE *Azospirillum brasilense* COMBINADO COM TIAMETOXAM SOBRE A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE PLÂNTULAS DE MILHO

BATTISTUS, A. G. et al. Synergistic action of *Azospirillum brasilense* combined with thiamethoxam on the physiological quality of maize seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 49, p. 4501–4507, 2014. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2014.14059>

Adaptado após Banca de Defesa para publicação da Dissertação

Resumo: Substâncias promotoras de crescimento de plantas, sejam de origem biológica ou química, são amplamente utilizados na agricultura moderna. Neste contexto, o presente estudo avaliou a qualidade fisiológica de plântulas de milho tratadas com tiametoxam e inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Inicialmente, testou-se o crescimento bacteriano em meio de cultura DYGS com concentrações crescentes de tiametoxam. Também avaliou-se a qualidade fisiológica de sementes através de medidas morfométricas, índice de velocidade de emergência e índice SPAD por meio de arranjo fatorial 2x3, com ou sem inoculação de plântulas com *A. brasilense* (100 mL por 25 kg de sementes) e três doses de tiametoxam (0, 28 e 42 mg por 60.000 sementes). A população bacteriana mostrou redução linear de acordo com o aumento das doses de tiametoxam. A dose de 42 mg de tiametoxam ocasionou redução na velocidade de emergência, índice SPAD, comprimento de parte aérea e de raiz, volume de raiz, relação raiz/parte aérea e massa da matéria seca de parte aérea, enquanto que, a inoculação evidenciou atividade positiva na qualidade fisiológica das plântulas. Desta forma, a inoculação com *A. brasilense* combinada com 28 mg de tiametoxam demonstram efeito sinérgico no início do desenvolvimento de plântulas de milho.

Palavras-chave: *Zea mays*, inoculante, bactérias promotoras de crescimento vegetal.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal cultivado em todos os continentes, com elevada importância econômica devido à variedade de formas de utilização (Fancelli e Dourado Neto, 2003). Isso é possível porque este cereal é utilizado em inúmeros produtos, que variam desde alimentos e rações até a indústria de alta tecnologia (Paes, 2008).

Dados recentes indicam a grande importância desta cultura no Brasil, pois apenas na temporada 2013/2014 o país produziu cerca de 75,18 milhões de toneladas do cereal, em uma área plantada de 15,12 milhões de hectares (Companhia Nacional de Abastecimento, 2014). Esses números são o resultado de anos de pesquisa, produção de cultivares melhoradas, insumos e técnicas de cultivo adequadas, juntamente com a expansão da área de cultivo (Cruz, 2012).

Substâncias promotoras de crescimento vegetal têm impulsionado os recentes aumentos de produtividade, sendo largamente utilizadas na agricultura moderna, tendo origem biológica ou química (Busato et al., 2010).

Uma das substâncias promotoras de crescimento mais frequentemente utilizada atualmente é a molécula tiametoxam: inseticida sintético com efeito na planta de bioativação vegetal, desencadeando diversas reações fisiológicas. Ela promove a ativação de proteínas transportadoras na membrana e ativação enzimática, aumentando a atividade metabólica da planta pela síntese de aminoácidos, precursores de proteínas, e síntese endógena de hormônios vegetais (Carvalho et al., 2011), contudo sem apresentar atividade hormonal direta (Castro et al., 2007).

Bioquimicamente, este inseticida estimula a atividade das peroxidases, cuja atividade se concentra na inibição das formas reativas de oxigênio, antes que danifiquem biomoléculas ocasionando a morte celular das plantas. Efeitos indiretos do mecanismo de ação do tiametoxam são observados no aumento da biomassa, taxa fotossintética e formação de raízes (Almeida et al., 2012).

Do mesmo modo, substâncias promotoras do desenvolvimento de plantas podem também ser de origem biológica, tais como bactérias promotoras de crescimento vegetal. Microrganismos do gênero *Azospirillum* são capazes de sobreviver tanto na rizosfera como em tecidos internos de plantas,

principalmente em vegetais pertencentes à família das Poaceae (Baldani e Baldani, 2005). Estes microrganismos estimulam o desenvolvimento da planta devido à fixação biológica de nitrogênio (Hungria, 2011), solubilização de fosfatos (Rodriguez et al., 2004), produção hormonal (Perrig et al., 2007) e redução da atividade de etileno pela ação da enzima ACC desaminase (Blaha et al., 2006).

No entanto, muitos pesquisadores combinam os efeitos de *Azospirillum*, principalmente na produção ou a estimulação da síntese hormonal, promovendo incrementos na parte aérea e radicular, como verificados por Rampim et al. (2012) e Dartora et al. (2013). Estes resultados estão associados principalmente ao ácido indol-3-acético (IAA) e giberelinas (Bashan et al, 2004; Perrig et al, 2007; Radwan, et al., 2004). De acordo com Hungria et al. (2010), este maior desenvolvimento da parte radicular também pode proporcionar melhor absorção de macro e micronutrientes pela planta.

Neste contexto, tendo em vista a utilização de produtos químicos e biológicos para promover o desenvolvimento vegetal, é necessário verificar se seus efeitos apresentam sinergismos quando aplicados em conjunto.

Deste modo, este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade fisiológica de plântulas de milho perante a associação de tratamento de sementes com tiametoxam e inoculação com *Azospirillum brasilense* estirpe AbV5, bem como o efeito do inseticida sobre a população bacteriana.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste, *Campus* Marechal Cândido Rondon, Paraná. A estirpe AbV5 de *A. brasilense* utilizada no estudo foi obtida a partir da coleção de bactérias promotoras crescimento vegetal da Universidade Federal do Paraná - *Campus* Curitiba, Paraná, Brasil. As células bacterianas foram cultivadas em enlarmeyers com 250 mL contendo 100 mL de meio de NFb (Dobereiner et al., 1976) à 30 °C com agitação constante à 80 rpm, até atingirem

fase de crescimento exponencial na densidade óptica (DO 450 nm) de 0,5, correspondendo a população de $6,67 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹.

Inicialmente, testou-se a toxicidade do inseticida tiametoxam sobre a população bacteriana. Para este fim, em meio sólido DYGS (Baldani, 1996) foram adicionadas as doses de tiametoxam correspondente à 0; 14; 28; 42; 56 e 70 mg por 60.000 sementes, proveniente do produto comercial Cruiser (350 mg tiametoxam mL⁻¹), enquanto o meio de cultura encontrava-se entre 45 e 55 °C, de modo a que o ingrediente ativo não fosse inativado. Previamente, o tiametoxam foi esterilizado por filtração através de filtro milipore (0,25 µm), homogeneizado ao meio de cultura em câmara de fluxo de ar contínuo, e distribuídos 20 mL em placas de Petri.

O inoculante contendo *A. brasilense* estirpe AbV5 foi diluído serialmente com adição de 100 µL de inoculante à 900 µL de solução salina (NaCl 0,85%), e assim por diante, compreendendo diluições entre 10⁻¹ à 10⁻⁸. Em seguida, as diluições foram distribuídas em placas de petri utilizando a técnica de microgota, com volume de 10 µL por gota, em três réplicas por diluição em cada placa. Com o emprego de relações matemáticas, cada microgota ocupava área determinada sobre o meio de cultura correspondente à proporção tiametoxam/*Azospirillum* que as bactérias encontrariam nas sementes. Foram efetuadas quatro repetições em delineamento experimental inteiramente casualizado, em um total de 24 placas. Subsequentemente, as placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h, quando então as colônias foram contadas e expressas em UFC mL⁻¹ de inoculante.

Para avaliar a influência da associação de tiametoxam com a inoculação com *Azospirillum brasilense* na qualidade fisiologia das plântulas adotou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3. No primeiro fator, alocou-se a inoculação de sementes com *A. brasilense* (sem e com inoculação na dose de 100 mL por 25 kg de sementes). No segundo fator, foram admitidas as doses de tiametoxam de 0; 28 e 42 mg por 60.000 sementes, tal como registro do produto. Os tratamentos foram adicionados às sementes por agitação em sacos de polietileno até homogeneização visual. O inoculante apresentava população bacteriana inicial de $6,67 \times 10^7$ UFC

mL⁻¹ de *A. brasilense* AbV5. Utilizou-se sementes comerciais do híbrido Dekalb 240 VT PRO como padrão para o teste.

Em papel germitest umedecido com água destilada em volume equivalente a 2,5 vezes a sua massa, quatro repetições experimentais foram realizadas com 100 sementes cada, alocadas em câmara de germinação BOD a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo 12:12. Quatro dias após a semeadura, determinou-se o número de sementes com protrusão da radícula maior que dois milímetros, coleótilo reto e bem desenvolvido, compondo a variável vigor. No sétimo dia, foi realizado o mesmo procedimento, determinando a viabilidade das sementes, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), ambos expressos em porcentagem.

Paralelamente, 25 sementes foram semeadas em bandejas de polietileno, com quatro repetições por tratamento. Utilizou-se como substrato areia esterilizada em autoclave durante 20 minutos à 121 ± 1 °C. As bandejas foram colocadas em câmara de germinação tipo BOD a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo 12:12. As bandejas foram pesadas diariamente e umedecidas com água até atingirem capacidade de campo. As plântulas emergidas foram contabilizadas diariamente durante sete dias, para determinação do índice de velocidade de emergência (ESI), como descrito por Maguire (1962). Ao fim de sete dias, foi determinado o índice SPAD com auxílio do medidor digital SPAD-502-Plus, com base na amostragem de dez plântulas por parcela, obtida a partir da média aritmética de três medições por planta, em folhas totalmente expandidas.

As mesmas plantas foram selecionadas para determinação de características morfométricas, contando-se o número de raízes, e mensurando o comprimento de raiz e da parte aérea com auxílio de régua graduada. O diâmetro do caule foi medido com paquímetro digital. Calculou-se a razão comprimento da parte aérea/colmo, dividindo-se o comprimento de parte aérea pelo diâmetro do caule, expressando a robustez da plântula. Com a ajuda de proveta graduada, determinou-se o volume do sistema de radicular pela técnica de deslocamento da coluna de água, com base na diferença de volume de água antes e após a completa imersão das raízes.

Após as medições morfométricas, as plantas foram separadas em parte aérea e radicular, conduzidas a secagem em estufa a 65 ± 2 °C durante 72 horas até atingirem massa constante, quando tiveram sua massa mensurada em balança analítica de precisão. Cada valor de massa seca e sistema radicular foi obtido dividindo-se a massa total do órgão pelo número de plântulas avaliadas. A soma do peso seco da parte aérea e raízes estimou a matéria seca total. A relação raiz/parte aérea foi obtido dividindo-se a matéria seca de raízes pela matéria seca da parte aérea. Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, e, em seguida, submetidos a análise de variância com auxílio do software Sisvar 5.1 build 72 (Ferreira, 2011). No caso do efeito significativo a 95% de significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Resultados e Discussão

A mortalidade ocasionada pelo tiametoxam à população bacteriana de *A. brasilense* (Figura 1) proporcionou ajuste linear decrescente de acordo com a elevação da dose do inseticida, ocasionando mortalidade de 35% e 50% para as doses de 28 e 42 mg por 60.000 sementes, respectivamente.

De acordo com Andaló et al. (2004), o tiametoxam apresenta baixa toxicidade sobre microrganismos, não afetando a germinação, crescimento e produção de conídios de *Beauveria bassiana*. Também, para organismos mais próximos filogeneticamente, como a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, a mesma molécula inseticida não apresentou efeito no tempo de geração e de fase log de crescimento, demonstrando comportamento semelhante à testemunha (Fernandes et al., 2012).

Contudo, Gomez et al. (1998) encontraram suscetibilidade de *A. brasilense* a compostos químicos como bromopropilato e metidationa, evidenciando o mesmo comportamento linear decrescente da população bacteriana, como observado no presente estudo. Desta forma, evidencia-se

que a sensibilidade de *A. brasilense* é dependente diretamente da interação microrganismo-composto químico à qual é submetida.

De acordo com a análise de variância (Tabela 1), houve interação entre as doses de tiametoxam e a inoculação para as variáveis IVE, diâmetro de coleto, volume de raiz, comprimento de parte aérea, relação parte aérea/colmo, índice SPAD, massa da matéria seca de parte aérea e relação raiz/parte aérea. As variáveis vigor, viabilidade e número de raízes não foram influenciadas pelos tratamentos com tiametoxam e nem pela inoculação com *A. brasilense*.

Em relação ao IVE (Tabela 2), quando realizada inoculação juntamente à dose mais elevada de tiametoxam, houve redução dos valores médios desta variável. Quando as sementes de milho foram inoculadas com *A. brasilense*, maiores índices de velocidade de emergência foram obtidos sem a presença do inseticida, indicando efeito deste sobre a população (Figura 1) e a capacidade de ação das bactérias. Quando não houve inoculação com *A. brasilense* o índice de velocidade de emergência foi mais elevado com o uso de tiametoxam.

Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Lauxen et al. (2010) onde observou-se aumento no IVE em sementes de algodoeiro quando tratadas com esse inseticida. Da mesma forma, Almeida et al. (2012) ao avaliarem a influência do tiametoxam no desempenho fisiológico de sementes de aveia preta, observaram que o produto é capaz de estimular o desempenho fisiológico de sementes, principalmente na dose de 105 mg de tiametoxam para 100 kg de sementes.

Ao comparar o efeito da inoculação dentro de cada dose de tiametoxam, mesmo não havendo diferença estatística, nota-se incremento no IVE quando as sementes foram inoculadas com as bactérias, nas doses de 0 e 28 mg do inseticida. Araújo et al. (2010) denotam que a inoculação com bactérias diazotróficas é capaz de promover aumento da velocidade de germinação em sementes de arroz, dependendo da espécie de bactéria utilizada.

Da mesma forma, Cassán et al. (2009) indicam que o inoculante à base de *A. brasilense*, estirpe Az39, é capaz de elevar a velocidade de germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plantas de milho. Além disso, essa bactéria promotora do crescimento vegetal é capaz de excretar

ácido indol-3-acético, ácido giberélico e zeatinina, hormônios que contribuem para aumento dos valores de índice de velocidade de emergência. Assim, bactérias fixadoras de nitrogênio podem contribuir para o crescimento vegetal pela produção de auxinas (Radwan, Mohamed, & Reis, 2004), levando ao aumento dos valores de índice de velocidade de emergência através do rápido alongamento do epicótilo.

Para o índice SPAD das plântulas (Tabela 2), quando não foi efetuada a inoculação, houve incremento no índice SPAD acompanhando a elevação das doses de tiametoxam, indicando efeito benéfico do inseticida para essa variável. O tiametoxam atua fisiologicamente ativando proteínas transportadoras das membranas e elevando a ativação enzimática, incrementando o metabolismo através da síntese de aminoácidos precursores de novas proteínas e síntese endógena de hormônios vegetais (Carvalho et al., 2011). Assim, com a elevação de sua dose, a indução para a produção de metabólitos secundários fortaleceu-se, desviando fotossintatos que seriam utilizados no crescimento, principalmente o nitrogênio, conseqüentemente reduzindo o porte e elevando a pigmentação da plântula. Quando foi realizada a inoculação, o índice SPAD foi mais elevado para as doses de 0 e 28 mg de tiametoxam.

Sendo o nitrogênio um elemento diretamente ligado a clorofila como componente essencial da estrutura química tanto de clorofilas *a* como clorofilas *b* (Streit et al., 2005), e a determinação do índice SPAD apresenta correlação com a concentração de clorofila (Argenta et al., 2001), o aumento da pigmentação indica mudança da utilização deste elemento. Dietrich et al. (2005) sugerem que quando a planta é submetida a qualquer processo de indução que envolva grandes custos metabólicos, se faz necessário a complementação da adubação com maiores doses de nitrogênio, afim de compensar o consumo extra do elemento pelo metabolismo secundário. Desta forma, os menores valores de índice SPAD são consequência da maior utilização de nitrogênio no metabolismo secundário, promovida pela aplicação de tiametoxam à 42 mg por 60.000 sementes quando associada a inoculação.

Para o comprimento da parte aérea (Tabela 3) foi observada interação entre as doses de tiametoxam e inoculação de *A. brasilense*. Quando as sementes não foram inoculadas com a bactéria, as plantas apresentaram maiores valores de comprimento na dose mais elevada de tiametoxam, sendo observado efeito inverso quando as plantas foram inoculadas, onde as plantas apresentaram maiores valores de comprimento na dose de 28 mg e na ausência do inseticida. Segundo Almeida et al. (2011), o aumento do comprimento da parte aérea com a utilização de tiametoxam, dependendo da dose aplicada, pode elevar a absorção e a resistência dos estômatos da planta à perda de água, favorecendo o metabolismo e incrementando a resistência a estresses ambientais. Além disso, pode também aumentar a eficiência na absorção, transporte e assimilação de nutrientes.

Em relação ao incremento no comprimento de parte aérea devido a inoculação, Cassán et al. (2009) denotam que inoculantes à base de *A. brasilense* são capazes de promover o desenvolvimento inicial de plântulas de milho, tendo como principais agentes a excreção de *ácido indol-3-acético*, *ácido giberélico* e *zeatinina* (citocinina), compostos pertencentes a grupos hormonais que podem contribuir para aumento no desenvolvimento vegetal quando em balanço adequado (Cato et al., 2013). Assim, bactérias promotoras de crescimento vegetal, quando em quantidade apropriada, podem contribuir para o crescimento vegetal principalmente pela ação de auxinas (Radwan et al., 2004), induzindo a síntese e ativando ATPases pré-existentes na membrana celular vegetal, reduzindo a rigidez da parede celular e favorecendo a entrada de água no protoplasma (Taiz e Zeiger, 2013), acarretando em incremento na parte aérea das plântulas.

Houve incremento para o diâmetro de coleto quando efetuada a inoculação com *A. brasilense* somente para a ausência de tiametoxam. Para as demais doses não houve diferença entre inoculação ou não inoculação. Vários trabalhos evidenciam o favorecimento de tiametoxam para a qualidade fisiológica na germinação de sementes de diversas culturas (Almeida et al., 2009; 2012; Lauxen et al., 2010), demonstrando incremento no enraizamento e desenvolvimento de parte aérea. Assim, maiores valores de diâmetro de coleto também são possíveis de serem encontrados, devido ao estímulo no crescimento das plântulas com uso do inseticida.

A relação parte aérea/colmo foi prejudicada na dose mais elevada de tiametoxam (42 mg) associado à inoculação. Esse dado é resultado da relação entre menor altura encontrada no mesmo tratamento, sem alteração do diâmetro do coleto.

O comprimento das raízes foi influenciado apenas pelas doses de tiametoxam, não sendo observada influência da inoculação com *Azospirillum*. Em números absolutos, as raízes foram maiores na dose de 28 mg de tiametoxam, porém essa dose não diferiu da dose controle. A dose de 42 mg reduziu o desenvolvimento das raízes. Resultados semelhantes foram obtidos por Corrêa Junior et al. (2013) ao trabalhar com diferentes produtos químicos na germinação de sementes de milho. Segundo os autores, esses resultados comprovam que a aplicação do inseticida tiametoxam em doses elevadas produziu efeito fitotóxico para o crescimento radicular em plântulas de milho.

Foi observada interação entre as doses de tiametoxam e a inoculação com *Azospirillum* para o volume de raízes. Para o controle (sem inoculação) não houve efeito das doses de tiametoxam. Assim como para comprimento de raiz, ocorreu efeito fitotóxico do inseticida quando aplicado em doses elevadas (Tabela 3). Tavares et al. (2007) ao avaliarem o efeito do tiametoxam na germinação de sementes de soja, obtiveram maior volume radicular e foliar quando realizada a aplicação do produto. De acordo com Almeida et al. (2011) essa diferença entre o controle e a dose de maior resposta pode ser explicada devido ao fato do tiametoxam possibilitar melhor expressão do potencial de germinação, área foliar, comprimento radicular e total da plântula. Com relação à inoculação com *Azospirillum* aliado a dose de 28 mg de tiametoxam, a inoculação proporcionou um aumento de 30% no volume de raízes. Nos demais tratamentos (0 e 42 mg) não foi observado efeito da inoculação. Quadros (2009) observou volume de raízes 60 a 80% superiores em plântulas cujas sementes foram inoculadas com *Azospirillum* em relação às plântulas não inoculadas.

Para a variável massa da matéria seca de parte aérea (Tabela 4), as menores doses de tiametoxam inoculados com *A. brasilense* foram melhores do que os tratamentos não inoculados. Da mesma forma, Dartora et al. (2013) encontraram aumento da produção de massa seca da parte aérea

para os tratamentos com inoculação de *Azospirillum* spp. A alta dose de tiametoxam aliado à inoculação foi o tratamento que apresentou o menor incremento de massa seca da parte aérea.

Em relação a massa da matéria seca de raiz e massa de matéria seca total, entre as três doses de tiametoxam, pode-se observar que menores valores foram encontrados na dose controle. Os tratamentos inoculados tiveram maior média que os tratamentos não inoculados, corroborando com os resultados obtidos por Santos et al. (2008) ao inocular bactérias promotoras de crescimento de plantas em melancia, e Dawwam et al. (2013) trabalhando com sete isolados em batata.

Pesquisas conduzidas por Bashan et al. (2004) explanam que em plantas inoculadas com *Azospirillum* ocorrem alterações na atividade das membranas celulares vegetais, acarretando em alterações da morfologia radicular, o que resulta em incremento na matéria seca do sistema radicular. Neto et al. (2013) descrevem maior desenvolvimento do sistema radicular como resultado do estímulo hormonal e do desvio de rotas metabólicas que fornecem as raízes aporte de mecanismos, nutrientes e água, que estimulam o crescimento e acúmulo de massa em seus tecidos (Puente et al., 2009).

Para a relação raiz/parte aérea, todos os tratamentos proporcionaram médias superiores a 1, apontando que as plântulas investiram mais em raiz do que parte aérea. Na dose mais elevada de tiametoxam (42 mg), o tratamento não inoculado com a bactéria apresentou a menor relação em comparação com o tratamento inoculado. Isso ocorre pois, quando inoculado, o *Azospirillum* afeta a atividade da membrana celular da planta, ocorrendo alterações na morfologia radicular, resultando em acréscimo no sistema radicular (Bashan et al., 2004).

Conclusões

O tiametoxam apresenta toxicidade a população de *A. brasilense*.

A inoculação de sementes com *A. brasilense* resulta em ganhos significativos sobre a qualidade fisiológica de plântulas de milho.

A dose de 28 mg tiametoxam por 60.000 sementes promove incrementos quando combinado com a inoculação das sementes com *A. brasilense*, atuando sinergicamente.

Referências

Almeida AS, Carvalho I, Deuner C, Tillmann MAA, Villela FA (2011). The role of bioactivators in the physiological performance of rice seeds. *Rev. Brasileira de Sementes* 33:501–510. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222011000300013>

Almeida AS, Tillmann MAA, Villela FA, Pinho MS (2009). Bioactivator in the physiological performance of carrot seeds. *Rev. Bras. Sementes* 31:87–95. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222009000300010>

Almeida AS, Villela FA, Meneghello GE, Lauxen LR, Deuner C (2012). Physiologic performance of oats seeds treated with thiamethoxam. *Semina: Ciências Agrárias* 33:1619–1628. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n5p1619>

Andaló V, Moino Junior A, Santa-Cecília LVC, Souza GC (2004). Compatibility of *Beauveria bassiana* with chemical pesticides for the control of the coffee root mealybug *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Neotrop. Entomol.* 33:463–467. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2004000400011>

Araújo AES, Rossetto CAV, Baldani VLD, Baldani JI (2010). Rice seed germination and vigour as affected by the inoculation with diazotrophic bacteria. *Ciênc. agrotec.* 34:932–939. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000400019>

Argenta G, Silva PRF, Bortolini CG, Forsthofer EL, Strieder ML (2001). Relationship of reading of portable chlorophyll meter with contents of extractable chlorophyll and leaf nitrogen in maize. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13:158–167. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-31312001000200005>

Baldani, JI, Baldani, VLD. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. An. Acad. Bras. Cienc. 77:549-579.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652005000300014>

Baldani VLD (1996). Effect of inoculation with *Herbaspirillum* spp. the colonization and infection of rice plants and the occurrence and partial characterization of a novel bacterium process diazotrophic. Master's thesis. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Bashan Y, Holguin G, Luz E (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can. J. Microbiol. 50: 521–577.

<http://dx.doi.org/10.1139/W04-035>

Brasil (2009). Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Rules for testing seeds / Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply 399 p. Brasília: Mapa/ACS.

Busato JG, Zandonadi DB, Dobbss LB, Façanha AR, Canellas LP (2010). Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.) 67:206–

212. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162010000200012>

Carvalho NL, Perlin RS, Costa EC (2011). Thiamethoxam Seed Treatment. REMOA 2:158–175.

Retrieved from <http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/remoa/article/view/2314/1597>

Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C, Luna V (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). Eur. J. Soil Biol.,

45:28–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005>

Castro PRC, Pitelle AMCM, Peres LEP, Aramaki PH (2007). Analysis of the regulatory activity of thiametoxan in plant growth by means of biotests. Publ.UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng. 13:25–

29. Retrieved from <http://www.revistas2.uepg.br/index.php/exatas/article/viewFile/892/774>

Cato SC, Macedo WR, Peres LEP, Castro PRC (2013) Sinergism among auxins, gibberellins and cytokinins in tomato cv. Micro-Tom. Hort. Bras 31:549–553. [http://dx.doi.org/10.1590/S0102-](http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362013000400007)

[05362013000400007](http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362013000400007)

Corrêa Junior ES, Hossen DDC, Guimarães S, Lima AM, Galon L, Nunes UR (2013). Physiological responses of maize seeds to chemical treatments. *Trop. Ci. Agr. Biol.* 7:58–65.

<http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/770/1163>

Cruz, JC (2012). Maize cultivation: Presentation. Production systems. 1.

Dartora J, Guimarães VF, Marini D, Pinto Júnior AS, Cruz LM, Mensh R (2013). Influence of seed treatment on the initial development of maize and wheat seedlings inoculated with *Azospirillum brasilense*. *SAP* 12:175–181. [http://e-](http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/download/5809/6455)

[revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/download/5809/6455](http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/download/5809/6455)

Dawwam GE, Elbeltagy A, Emara HM, Abbas IH, Hassan MM (2013). Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Sciences* 58:195–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aosas.2013.07.007>

Dietrich R, Ploss K, Heil M (2005). Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. *Plant Cell Environ.* 28:211–222. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01265.x>

Fancelli AL, Dourado Neto D (2003). Corn: Management strategies for high productivity. 1st ed. 208 p. Piracicaba: ESALQ-USP-LPV.

Fernandes MF, Procópio SDO, Teles DA, Sena Filho JG, Cargnelutti Filho A, Machado TN (2012). Toxicity of insecticides used in sugarcane crop to the diazotrophic bacteria *Herbaspirillum seropedicae*. *Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 55:318–326. <http://dx.doi.org/10.4322/rca.2012.077>

Ferreira DF (2011). SISVAR : A computer statistical analysis system. *Ciênc. agrotec.* 35:1039–1042. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

Gomez F, Salmeron V, Rodelas B, Martinez-Toledo MV, Gonzalez-Lopez J (1998). Response of *Azospirillum brasilense* to the pesticides bromopropylate and methidathion on chemically defined media and dialysed-soil media. *Ecotoxicology* 47:43–47.

<http://dx.doi.org/10.1023/A:1008807701523>

Hungria M (2011). Inoculation with *Azospirillum brasilense*: Innovation in yield at low cost. Documentos. 1st ed., vol. 325, 36 p. Londrina: Embrapa Soja.

<http://www.cnpso.embrapa.br/download/doc325.pdf>

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. Plant Soil 331:413–425. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>

Lauxen LR, Villela FA, Soares RC (2010). Physiological performance of cotton seeds treated with thiametoxam. Rev. Bras. Sementes 32:61–68. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222010000300007>

Maguire JD (1962). Speed of Germination-Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor1. Crop Science 2:176-177.

<http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

National Supply Company (2014). Monitoring of the Brazilian grain harvest 1:83.

Neto FJD, Yashimi FK, Garcia RD, et al (2013) Desenvolvimento e produtividade do milho verde safrinha em resposta à aplicação foliar com *Azospirillum brasilense*. Enciclopédia Biosf 9:1030–1040. <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20AGRARIAS/desenvolvimento%20e%20produtividade.pdf>

Paes MCD (2008). Aspectos físicos, químicos e tecnológico do grão de milho. In Cruz JC, Karam D, Monteiro MAR, Magalhães PC (Eds.) The Maize Culture. 1st ed. 517 p. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.

Puente ML, Garcia JE, Alejandro P (2009) *Azospirillum brasilense* in the inoculum and its plant growth regulator compounds on crop yield of corn (*Zea mays* L.) in the field. World J Agric Sci 5:604–608. [http://www.idosi.org/wjas/wjas5\(5\)/14.pdf](http://www.idosi.org/wjas/wjas5(5)/14.pdf)

Quadros PD (2009). Inoculation of *Azospirillum* spp. In seeds of maize cultivars cropped on south Brazil. Master's thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/17076/000705543.pdf?sequence=1>

Taiz L, Zeiger E (2013) Fisiologia Vegetal, 5th edn. 918.

Radwan TESED, Mohamed ZK, Reis VM (2004). Effect of inoculation with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* on production of indolic compounds and growth of wheat and rice seedlings. *Pesq. Agropec. bras.* 39:987–994. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004001000006>

Santos MM, França S, Conrado F, Peixoto AR, Domingos C (2008). Evaluation of watermelon (*Citrullus lanatus* L.) inoculated with plant growth-promoting bacteria in greenhouse. *Hortic. bras.* 26:1550–1553.

http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_2/A1109_T2730_Comp.pdf

Streit NM, Canterle LP, Canto MW, Hecktheuer LHH (2005). The Chlorophylls. *Cienc. Rural* 35:748–755. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000300043>

Tavares S, Castro PRC, Ribeiro RV, Aramaki PH (2007). Evaluation of physiological effects of thiametoxan on soybeans seed treatment. *Revista de Agricultura*, 82:47–54. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=19182721>

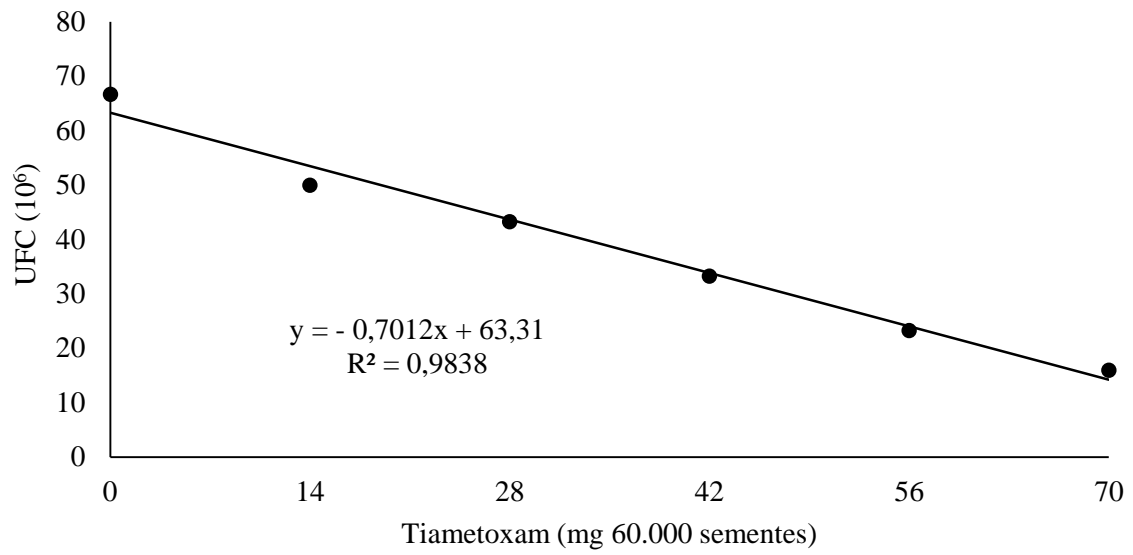


Figura 1. Unidades formadoras de colônia de *Azospirillum brasilense* (UFC) em função da elevação nas doses de tiametoxam

Tabela 1. Análise de variância baseada nos valores de F para as variáveis analisadas no ensaio.

Variável	Quadrado médio (QM)				Média	CV (%)
	Tiametoxam	Inoculação	Interação	Erro		
Vigor	1,16666	16,6666	7,16666	6,11111	96,1666	2,57
Viabilidade	2,66666	20,1666	2,66666	6,27777	96,4166	2,60
IVE	0,16255	0,00540	1,12718**	0,82072	4,9491	5,79
Índice SPAD	11,6168**	9,15135**	21,4975**	1,04220	32,8916	3,10
Comprimento de parte aérea	1,49708*	0,01815	7,96036**	0,31636	11,2150	5,02
Diâmetro de coleto	0,04167**	0,02535*	0,02821**	0,00349	2,5908	2,28
Número de raízes	0,01625	0,06000	0,00875	0,04861	3,9250	5,62
Comprimento de raiz	5,01290*	0,29703	2,41651	0,91163	18,9929	5,03
Volume de raiz	0,01162	0,00666	0,01652*	0,00444	0,4933	13,51
Relação parte aérea/colmo	0,46902**	0,10800	0,68707**	0,05493	4,3304	5,41
Massa da matéria seca de parte aérea	0,00001	0,00001	0,00007**	0,00001	0,0382	6,22
Massa da matéria seca de raiz	0,00099**	0,00053**	0,00011	0,00005	0,0603	12,56
Massa da matéria seca total	0,00104**	0,00071**	0,00011	0,00007	0,0984	8,66
Relação raiz/parte aérea	0,64214**	0,25184*	0,31669**	0,03478	1,5907	11,73

**significativo a 1% pelo teste F; *significativo a 5% pelo teste F; CV: coeficiente de variação.

Tabela 2. Índice de velocidade de emergência e índice SPAD de plântulas provenientes de sementes tratadas com tiametoxam (0; 28 e 42 mg por 60.000 sementes) e inoculadas com *A. brasilense* (0 e 100 mL por 25 kg sementes).

Dose Tiametoxam	IVE			Índice SPAD		
	NI	I	Média	NI	I	Média
0 mg	4,77 bA	5,41 aA	5,09	10,77 bB	12,06 aA	11,41
28 mg	4,82 aA	5,07 aA	4,94	11,07 bAB	11,96 aA	11,51
42 mg	5,21 aA	4,40 bB	4,81	11,89 aA	9,55 bB	10,72
Média	4,93	4,96	4,94	32,27	33,51	32,89

*Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si a de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey; NI: Não Inoculado; I: Inoculado.

Tabela 3. Comprimento de parte aérea (CPA), diâmetro de coleto (DC), relação parte aérea/colmo (RPAC), comprimento de raiz (CR) e volume de raiz (VR) de plântulas provenientes de sementes tratadas com tiametoxam (0; 28 e 42 mg por 60.000 sementes) e inoculadas com *A. brasilense* (0 e 100 mL por 25 kg sementes).

Dose tiametoxam	CPA (cm)			DC (mm)			RPAC		
	NI	I	Média	NI	I	Média	NI	I	Média
0 mg	10,77 bB	12,06 aA	11,41	2,42 bB	2,60 aA	2,51	4,46 aA	4,64 aA	4,55
28 mg	11,07 bAB	11,96 aA	11,51	2,60 aA	2,66 aA	2,63	4,26 aA	4,49 aA	4,37
42 mg	11,89 aA	9,55 bB	10,72	2,66 aA	2,61 aA	2,63	4,47 aA	3,66 bB	4,07
Média	11,24	11,19	11,21	2,56	2,62	2,59	4,4	4,26	4,33
	CR (cm)			VR (cm ³)					
	NI	I	Média	NI	I	Média			
0 mg	18,29	19,53	18,91 AB	0,50 aA	0,49 aAB	0,49			
28 mg	19,64	20,01	19,82 A	0,46 bA	0,60 aA	0,53			
42 mg	18,72	17,78	18,25 B	0,47 aA	0,44 aB	0,46			
Média	18,88	19,10	18,99	0,48	0,51	0,49			

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si a de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey; NI: Não Inoculado; I: Inoculado.

Tabela 4. Massa da matéria seca de parte aérea (MMSPA), massa da matéria seca de raiz (MMSR), massa da matéria seca total (MMST) e relação raiz/parte aérea (RRPA) de plântulas provenientes de sementes tratadas com tiametoxam (0; 28 e 42 mL 60.000 por sementes) e inoculadas com *Azospirillum brasilense* (0 e 100 mL por 25 kg sementes).

Dose tiametoxam	MMSPA (g plântula ⁻¹)			MMSR (g plântula ⁻¹)		
	NI	I	Média	NI	I	Média
0 mg	0,0360 bA	0,0410 aA	0,0384	0,0476	0,0483	0,048 B
28 mg	0,0370 bA	0,0420 aA	0,0394	0,0622	0,0772	0,070 A
42 mg	0,0400 aA	0,0340 bB	0,0367	0,0568	0,0695	0,063 A
Média	0,0374	0,0389	0,0382	0,056 b	0,065 a	0,0603
	MMST (g plântula ⁻¹)			RRPA		
	NI	I	Média	NI	I	Média
0 mL	0,0832	0,0893	0,0863 B	1,35 aA	1,18 aB	1,26
28 mL	0,0992	0,1188	0,1090 A	1,68 aA	1,85 aA	1,76
42 mL	0,0963	0,1033	0,0998 A	1,44 bA	2,05 aA	1,74
Média	0,0929 b	0,1038 a	0,0984	1,49	1,69	1,59

*Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si a de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey; NI: Não Inoculado; I: Inoculado.

4 ARTIGO 2: TIAMETOXAM ASSOCIADO À *Azospirillum brasilense* VIA SEMENTE E FOLIAR CULTIVADO EM DOIS AMBIENTES DE PRODUÇÃO DE MILHO

BATTISTUS, A. G. et al. Thiamethoxam associated with *Azospirillum brasilense* seed and foliar grown in two environments in maize production. **Agriculture, ecosystems and environment**, v.

XX, n. XX, p. XXXX–XXXX, XXXX.

RESUMO: Substâncias promotoras de crescimento vegetal possuem papel de destaque na agricultura contemporânea, provindas de origem biológica ou química. Contudo, a escassez de resultados a respeito da utilização conjunta desses promotores leva à necessidade de informações sobre sua utilização simultânea. Desta forma, objetivou-se avaliar os efeitos da utilização do bioativador tiametoxam aliado à inoculação via semente e pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. O experimento foi conduzido sob delineamento de blocos casualizados em esquema fatorial 2x4, composto pela presença e ausência de tratamento químico de sementes com o bioativador de plantas tiametoxam, enquanto o segundo fator englobou sementes sem inoculação; inoculação de sementes, pulverização foliar e inoculação de sementes associado à pulverização foliar com *A. brasilense*, testados em dois ambientes de produção. Os tratamentos foram avaliados por análises morfométricas, teor de nutrientes nos tecidos vegetais, componentes da produção e produtividade da cultura. O tiametoxam, assim como a inoculação via semente aliada a pulverização foliar com *A. brasilense*, promoveram incrementos no comprimento das plantas, diâmetro de colmo, acúmulo de massa e área foliar ao longo do ciclo vegetal, em ambos os ambientes de produção. Redução no teor de umidade, impurezas e descontos da massa de grãos, assim como incrementos nos níveis foliares de fósforo são resultados da inoculação, contudo sem apresentar alterações na produtividade do

milho. Tiametoxam também reduziu a umidade da massa de grãos. A produtividade apenas foi incrementada pela presença do tiametoxam em ambiente conduzido em semeadura convencional.

PALAVRAS-CHAVE: *Zea mays*, bioativador, bactérias promotoras de crescimento vegetal, regulador vegetal.

3.1 Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal cultivado em todos os continentes, apresentando elevada relevância econômica devido à amplitude de formas de utilização. Tal característica é atribuída ao emprego do grão em inúmeros produtos, variando desde a alimentação humana e animal, até a indústria de alta tecnologia (Paes, 2008).

Dados recentes reforçam a elevada importância mundial da cultura, atingindo o patamar de 981 milhões de toneladas produzidas. Deste montante, o Brasil contribui significativamente com 80 milhões de toneladas do grão, tornando-o o terceiro produtor e segundo maior exportador do cereal na temporada 2013/2014 (Companhia Nacional de Abastecimento, 2014).

Estes patamares produtivos são resultados de pesquisas iniciadas no passado, gerando híbridos de elevado potencial genético aliados a transgenia, e desenvolvimento e melhoria na qualidade do setor de sementes. Adicionalmente, a manipulação espacial das plantas facilitaram o aproveitamento de nutrientes, água, luz e controle de daninhas, correções de fertilidade do solo e controle químico de doenças em sistemas de elevada tecnologia (Cruz, 2012). Ainda segundo o autor, as produtividades médias obtidas pelos produtores são bastante variáveis devido a diferença de investimentos entre os sistemas de produção.

Impulsionando os recentes avanços em produtividade, substâncias promotoras de crescimento vegetal merecem papel de destaque na agricultura contemporânea (Busato et al., 2010), as quais podem ser advindas de origem biológica ou química.

Substância bioativadora de destaque, o tiametoxam originalmente é uma molécula inseticida de efeito sistêmico, com ação secundária de bioativação vegetal, recomendado para utilização via tratamento de sementes para controle de pragas iniciais em diversas culturas. Sua atuação bioativadora dá-se por alterações dos fatores de transcrição no vegetal, culminando em aumento da expressão gênica de proteínas transportadoras das membranas e enzimas metabólicas. Isto gera incremento no metabolismo vegetal pela síntese de aminoácidos precursores de proteínas e síntese de hormônios vegetais, assim como elevação nas taxas de transporte iônico, e conseqüentemente, aporte na nutrição mineral (Carvalho et al., 2011; Castro, 2006).

Em geral, bioativadores são substâncias orgânicas modificadoras do metabolismo vegetal, ativando várias reações fisiológicas, dentre os quais na expressão de proteínas. Por sua vez, estas proteínas podem interagir com vários mecanismos de defesa, permitindo que a planta se adapte as condições ambientais adversas (Almeida et al., 2009). Apesar de incrementar os níveis hormonais dos vegetais, estes compostos não demonstram atividade reguladora direta, sendo estes resultantes do maior desenvolvimento e síntese endógena dos hormônios (Castro et al., 2007).

O tiametoxam propicia às plantas maior capacidade de sobreviver à situações adversas devido ao estímulo na atividade de peroxidases em períodos de estresse, com função de combater formas reativas de oxigênio que danificam biomoléculas ocasionando morte celular (Soares et al., 2008). Sob estresses por déficit hídrico e salinidade, as plantas tornam-se mais tolerantes devido ao aumento no diâmetro dos vasos do xilema, assim como aumento no número de vasos nas raízes para transporte de água e nutrientes (Martins et al., 2012).

Efeitos indiretos de seus mecanismos são observados no processo de acúmulo de fitomassa, elevação da taxa fotossintética e formação de raízes mais longas (Almeida et al., 2012). O aumento de absorção de água e da resistência estomática, incremento nos níveis nutricionais dos tecidos vegetais (Castro, 2006), efeitos na germinação de sementes (Soares et al., 2014, 2012; Vieira et al.,

2014) e auxílio na atividade de fungicidas sistêmicos sobre doenças foliares (Battistus et al., 2013) também são resultado de sua utilização.

Da mesma forma, estas substâncias promotoras também podem ter origem biológica, como é o caso das bactérias promotoras de crescimento vegetal. Desde a década de 1970 estuda-se a ampla distribuição do gênero *Azospirillum*, sendo de ocorrência natural, presente junto à culturas forrageiras e cereais (Dobereiner et al., 1976). Esses microrganismos possuem motilidade e quimiotaxia para ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e compostos aromáticos comumente presentes em exsudados de raízes, permitindo sua instalação na rizosfera (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). Estas bactérias se beneficiam desses compostos como fonte de carbono e energia, e se consolidam na região rizosférica ou colonizam internamente o vegetal (Baldani e Baldani, 2005). O resultado desta interação é a maior capacidade de absorção de água e nutrientes devido ao estímulo hormonal (Pedraza, 2008), resultando em benefícios ao crescimento vegetal.

Diversos autores atribuem os efeitos da utilização do gênero *Azospirillum* à fixação biológica de nitrogênio (Hungria et al., 2010), produção hormonal - destacada pelas auxinas e giberelinas (Bashan et al., 2004; Masciarelli et al., 2013; Tien et al., 1979) - e outros compostos reguladores como poliaminas (Cassán et al., 2009a; Perrig et al., 2007), solubilização de fosfatos (Rodriguez et al., 2004) e redução dos níveis de etileno pelo aumento da atividade da enzima ACC deaminase produzida pela bactéria (Blaha et al., 2006). Desta forma, a ação conjunta desses mecanismos resulta em maior crescimento radicular, proporcionado melhor exploração do solo e absorção de nutrientes pela planta (Hungria et al., 2010).

Contudo, processos adicionais como tolerância a estresses salinos (Hamdia et al., 2004) e incremento na atividade do óxido nítrico (Alen'kina e Nikitina, 2010; Creus et al., 2005) estão sendo estudados como mecanismos de ação auxiliares das bactérias promotoras de desenvolvimento vegetal.

Resultados positivos da inoculação podem ser verificados tanto no crescimento inicial (Rampim et al., 2012) quanto no teor de nitrogênio de plântulas (Klein et al., 2012), estendendo-se até os componentes da produção (Quadros et al., 2014) e produtividade das culturas (Novakowski et al., 2011).

Bactérias desse gênero são comumente encontradas associadas à diversos gêneros de Poaceas, principalmente na rizosfera das plantas (Reis Junior et al., 2004). Porém, além da rizosfera, possuem capacidade de colonizar outras partes da planta, como o filoplano e tecidos internos dos vegetais (Davidson, 1988).

Sabendo-se da capacidade do *Azospirillum* em colonizar diversos órgãos vegetais, sua utilização em cultivo comercial pode dar-se tanto via inoculação de sementes como via pulverização foliar (Portugal et al., 2012), incrementando o acúmulo de biomassa (Neto et al., 2013) e produtividade da cultura (Portugal et al., 2013) em ambas situações.

A amplitude de utilizações do gênero *Azospirillum* no sistema produtivo do milho e dos efeitos benéficos desencadeados pelo emprego de bioativadores são bem elucidados isoladamente, contudo, há escassez de resultados sobre a utilização conjunta dessas tecnologias.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar efeitos da utilização do bioativador tiametoxam associado à inoculação via semente e/ou pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* no crescimento e produtividade da cultura do milho em dois ambientes de produção.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Delineamento Experimental

O estudo foi conduzido a nível de campo sob delineamento de blocos casualizados em esquema fatorial 2 x 4, com quatro repetições, em dois ambientes de produção, em plantio direto com adoção de alta tecnologia no sistema produtivo, e em plantio convencional com média tecnologia de

produção. O primeiro fator “Bioativador” foi constituído pela presença e ausência de tratamento químico de sementes com tiametoxam (28 mg i. a. por 60.000 sementes) de acordo com Battistus et al. (2014). O segundo fator “Inoculação” englobou os seguintes tratamentos: sementes sem inoculação; inoculação de sementes com *A. brasilense* AbV5+AbV6 (100 mL por 60.000 sementes); pulverização foliar de *A. brasilense* AbV5+AbV6 no estágio V5 do milho (300 mL ha⁻¹); Inoculação de sementes com *A. brasilense* associado à pulverização foliar de *A. brasilense* no estágio V5 do milho nas doses previamente descritas para tratamentos anteriores. Como padrão para os ensaios utilizou-se o híbrido simples Dekalb 240 VTPro, de ciclo precoce e alta responsividade a fertilidade.

3.2.2 Aplicação dos tratamentos

O tratamento de sementes com tiametoxam foi efetuado no Laboratório de Fisiologia Vegetal pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná dois dias antes da semeadura, com agitação manual rotativa das sementes + calda do produto em frascos de vidro durante três minutos. A inoculação com *A. brasilense* foi efetuada em sacos plásticos, adicionando o volume correspondente de inoculante, e homogeneizado por agitação manual durante três minutos, 30 minutos antes da semeadura. A aplicação foliar foi efetuada no estágio V5 da cultura, ao entardecer, com pulverização de inoculante à base de *A. brasilense*. Utilizou-se pulverizador costal, mantido à pressão constante por CO₂, equipado com seis pontas Magno 11002 ADGA, espaçadas em 0,5 m, a pressão de 40 kgf cm⁻², fornecendo um volume de calda de 300 L ha⁻¹.

3.2.3 Localização e caracterização das áreas experimentais

Os experimentos foram conduzidos em dois locais com distância de 85 quilômetros entre si. O primeiro local, conduzido sob sistema de plantio direto consolidado onde se utilizou alto nível tecnológico na produção, foi no município de Corbélia – Paraná, com latitude 24° 85’ 61” S, longitude

53° 25' 03" O e 673 metros de altitude, em área fornecida por produtor rural. O segundo local, sob sistema de plantio convencional com revolvimento do solo previamente ao plantio e regime de média aplicação de tecnologia de produção, foi no município de Marechal Cândido Rondon - Paraná na Fazenda Experimental "Professor Antônio Carlos dos Santos Pessoa", pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, latitude 24° 53' 19" S, longitude 54° 01' 73" O e altitude de 400 metros.

Ambas as localidades possuem solos classificados como Latossolo Vermelho eutrófico (EMBRAPA, 2013). Previamente a instalação do experimento coletou-se amostras na camada de 0,00-0,20 metros para determinação da fertilidade de ambos solos (Tabela 1).

3.2.4 Ambiente 1: Sistema Plantio Direto

Na localidade de Corbélia as parcelas experimentais foram compostas de 6 metros de comprimento por seis linhas de plantas com entrelinhas de 0,50 metros, sendo a parcela útil de 8 m², descartando-se um metro em cada extremidade e as linhas laterais da cultura.

A área encontrava-se sob sistema de plantio direto consolidado, ou seja, há mais de 10 anos, tendo como culturas precedentes o milho (inverno 2012), soja (verão 2012/2013) e trigo (inverno 2013), deixando sobre o solo 7000 kg ha⁻¹ de palhada residual contendo 49 kg ha⁻¹ de nitrogênio, 15,05 kg ha⁻¹ de fósforo e 72,80 kg ha⁻¹ de potássio.

A semeadura foi realizada com semeadora mecânica no dia 4 de setembro de 2013, tendo como adubação de base 345 kg ha⁻¹ de formulado NPK 12-31-17. O estande final foi de 75.000 plantas ha⁻¹. Seis dias após a semeadura efetuou-se aplicação de cobertura de potássio à lanço, distribuindo 103 kg ha⁻¹ de cloreto de potássio (KCl). A área encontrava-se sob manejo de agricultura de precisão.

Durante o estágio V3 da cultura foi efetuada a pulverização de 3,5 kg ha⁻¹ de atrazina para controle de plantas daninhas. No estágio V4, 27 dias após a semeadura (DAS) foi efetuada a adubação

de cobertura, efetuada à lanço através da distribuição de 92 Kg ha⁻¹ de nitrogênio na forma de sulfato de amônio de liberação gradual.

A pulverização aérea de *A. brasilense* ocorreu 36 DAS, no dia 10 de outubro de 2013. No momento da aplicação, a temperatura encontrava-se a 22,8 °C, umidade relativa do ar a 73% e velocidade do vento em 3,96 km h⁻¹.

No estádio V7 realizou-se aplicação de fertilizantes foliares, distribuindo 24,9 g ha⁻¹ de molibdênio, 114 g ha⁻¹ de manganês, 22,8 g ha⁻¹ de zinco, 11,4 g ha⁻¹ de cobre e 68,4 g ha⁻¹ de enxofre. A pulverização de fungicidas foi efetuada no estádio Vt, pulverizando 40 mL ha⁻¹ de azoxistrobina, 16 mL ha⁻¹ de ciproconazol e 100 mL ha⁻¹ de difeconazol. A colheita da parcela útil (8 m²) foi realizada no dia 30 de janeiro de 2014, totalizando 148 dias de ciclo.

3.2.5 Ambiente 2: Sistema Plantio Convencional

No experimento localizado no município de Marechal Cândido Rondon as parcelas experimentais foram compostas de 6 metros de comprimento com seis linhas de semeadura, espaçadas à 0,70 metros de entrelinha, sendo a parcela útil de 11,2 m², descartando-se as as linhas laterais e um metro em cada extremidade da parcela. O solo foi revolvido por escarificação após o cultivo de inverno, tendo como culturas prévias milho (verão 2012/2013) e crambe (inverno 2013), deixando sobre o solo 5300 kg ha⁻¹ de palhada residual que continha 51,03 kg ha⁻¹ de nitrogênio, 23,27 kg ha⁻¹ de fósforo e 33,39 kg ha⁻¹ de potássio.

A semeadura foi realizada no dia 21 de setembro de 2013. A adubação de base foi realizada previamente com uso de semeadora mecânica, distribuindo 40 kg ha⁻¹ de nitrogênio, 80 kg ha⁻¹ de fosforo e 60 kg ha⁻¹ de potássio, por meio das fontes uréia, superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente. A semeadura foi realizada com auxílio de distribuidores manuais tipo bazuca, totalizando estande de 75.000 plantas ha⁻¹.

Capinas manuais com o auxílio de enxada foram efetuadas no estádio V3, V7, Vt e R2. No estádio V4, 24 dias após a semeadura efetuou-se a adubação de cobertura à lanço com distribuição de 120 kg ha⁻¹ de nitrogênio na forma de ureia.

A pulverização aérea de *A. brasilense* foi realizada aos 27 DAS no dia 18 de outubro de 2013. As condições climáticas médias no momento da aplicação foram de 21,9 °C de temperatura, umidade relativa do ar de 70% e velocidade do vento de 2,52 km h⁻¹. A colheita da parcela útil (11,2 m²) foi realizada no dia 03 de fevereiro de 2014, totalizando 133 dias de ciclo.

3.2.6 Quantificação bactérias diazotróficas e *A. brasilense*

Para quantificação da população de microrganismos diazotróficos, coletou-se amostra de solo na camada de 0-5 centímetros de profundidade em ambos locais. No Laboratório de Fisiologia Vegetal, as amostras foram secas ao ar e peneiradas para retirada de torrões e resíduos culturais. Em seguida, um grama da amostra foi homogenizada em 9 mL de solução fisiológica (0,85 NaCl), por turbo agitação em tubo de ensaio. A partir desta amostra (10⁻¹), diluiu-se serialmente, tomando-se alíquota de 100 µL e adicionando-a 900 µL de solução fisiológica formando a diluição 10⁻², e assim sucessivamente, contemplando diluições de 10⁻¹ até 10⁻⁸. Após as diluições, uma alíquota de 100 µL foi inserida em tubos de penicilina contendo 5 mL de meio de cultura NFb (Dobereiner et al., 1976) semi-sólido, tampadas com uma peça de espuma esterelizada e incubadas durante sete dias à 30 °C. Avaliou-se então a formação de película, característica de microrganismos diazotróficos, e quantificou-se a população através do método de NMP (Tabela 2) (Döbereiner et al., 1995).

Juntamente a cada inoculação e pulverização de *A. brasilense*, uma alíquota de 10 mL do inoculante foi selecionada e armazenada em tubo falcon esterelizado para quantificação em laboratório da população viável de bactérias. Esta alíquota foi diluída serialmente em solução fisiológica (0,85% NaCl) adicionando 100 µL do inoculante a 900 µL de solução fisiológica

formando a diluição 10^{-1} , e a partir da mesma, tomou-se alíquota de 100 μL adicionando-a novamente a 900 μL de solução fisiológica formando a diluição 10^{-2} , e sucessivamente, contemplando diluições de 10^{-1} até 10^{-8} .

Distribuiu-se então as diluições em placas de petri contendo meio de cultura NFb (Dobereiner et al., 1976) através da técnica de micro gota, com volume de 10 μL por gota, em três repetições por diluição em cada placa. Posteriormente, as mesmas foram incubadas a 30 °C durante 120 horas, quando realizou-se a contagem de colônias desenvolvidas, expresso em unidades formadoras de colônia (UFC) mL^{-1} de inoculante (Tabela 2).

3.2.7 Avaliações

Análises morfométricas foram efetuadas nos estádios V8, Vt e R3, baseados na coleta aleatória de três plantas por parcela, avaliando com auxílio de trena graduada comprimento de planta, compreendido entre a base do colmo ao ápice da mais longa folha e/ou pendão e comprimento de colmo sendo determinado entre a base do colmo e a inserção da mais alta folha ligulada. Com auxílio de paquímetro determinou-se o diâmetro de coleto, baseada no diâmetro longitudinal da estrutura.

Posteriormente, as plantas foram seccionadas em colmo + bainha, folhas (a partir da lígula) e demais estruturas, acondicionadas em sacos de papel tipo kraft e levadas a estufa de circulação forçada de ar para secagem à 65 °C até obtenção de massa constante. Em seguida, estas amostras foram pesadas em balança analítica, e os resultados expressos em gramas por planta. A soma da massa de matéria seca de colmo + bainha, folhas e demais estruturas foram utilizadas para a estimativa da massa de matéria seca total. A área foliar foi determinada pela técnica da área foliar conhecida (Kemp, 1960), por meio da determinação da massa seca de quatro anéis de 4,1457 cm^2 provenientes de folhas distintas, e relacionadas matematicamente com a massa total de folhas.

No estádio R1 coletou-se o terço médio da folha oposta e abaixo da espiga superior e excluída da nervura central de cinco folhas por parcela, acondicionando-as em sacos kraft. Também ao final do ciclo uma amostra de grãos de cada parcela foi coletada. Ambas as amostras foram levadas a estufa de circulação forçada de ar para secagem à 65 °C durante três dias, processadas em moinho, para então serem determinados os teores nutricionais de nitrogênio por digestão sulfúrica, e de , fósforo e potássio por digestão nitro-perclórica (Silva, 2009).

No momento da colheita, todas as plantas da parcela útil tiveram suas espigas colhidas manualmente. Dez espigas foram separadas aleatoriamente para serem avaliados os componentes da produção do milho: A contagem do número de fileira de grãos e número de grãos por fileira, efetuada manualmente; com auxílio de régua graduada foi mensurado o comprimento de espiga e com paquímetro o diâmetro de espiga; em seguida, as espigas foram trilhadas e a massa de grãos mensurada em balança analítica, de onde duas amostras por parcela foram coletadas para determinação da umidade, calculada em base úmida (Marcos Filho, 2005), e determinação da massa de mil grãos (Brasil, 2009).

Por fim, mais duas amostras por parcela foram coletadas para quantificação de impurezas presentes na massa de grãos, como fragmentos de espigas, grãos ardidos, danificados, germinados, fermentados, entre outros (Brasil, 2011) pela pesagem da massa limpa de grãos e das impurezas, expressada em porcentagem. O teor de umidade foi ajustado para 14%, juntamente com a porcentagem de impurezas, as quais foram utilizados para estimar a porcentagem de descontos, que compreende o valor de massa perdido pela massa de grãos bruta quando submetidos ao beneficiamento por secagem e limpeza (Brasil, 2011). Após efetuados os descontos, estimou-se a produtividade, expressa em Mg ha^{-1} , composta da massa de grãos beneficiada com umidade aferida para 14%.

No final do ciclo, três plantas por parcela tiveram a sua parte aérea coletada para determinação da massa seca, utilizada para o cálculo do índice de colheita, expresso pela relação da massa seca de grãos dividida pela massa seca de parte aérea produzida pela planta (Gifford et al., 1984).

3.2.8 Condições climáticas

Durante todo o período experimental as condições meteorológicas foram monitoradas, com os dados pluviométricos do município de Corbélia (Figura 1) sendo provenientes de monitoramento e os de temperatura extraídos do Sistema de Monitoramento Agrometeorológico - AGRITEMPO (Embrapa Informática Agropecuária, 2002), e os dados do município de Marechal Cândido Rondon (Figura 2) fornecidos pela estação climatológica localizada na própria fazenda experimental.

3.2.9 Análise Estatística

Os dados para cada local foram submetidos à análise de variância com o auxílio do programa Sisvar 5.1 Build 72 (Ferreira, 2011). No caso de efeito significativo a 95% de significância, efetuou-se teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Os gráficos foram plotados com auxílio do software Microsoft Office Excell 2013[®].

3.3 Resultados

3.3.1 Ambiente 1: Sistema plantio direto

De acordo com a análise de variância baseada nos resultados dos quadrados médios dos atributos (Tabela 3), as avaliações apresentaram interação apenas para a porcentagem de impurezas. De modo geral, o bioativador afetou o crescimento da planta, contudo não exerceu efeitos isolados de sua utilização nos componentes da produção e produtividade da cultura. As formas de aplicação de *A. brasilense* apresentaram resultados durante todo o ciclo da cultura, porém em menor número de

atributos que o tiametoxam. Ambos os fatores não afetaram o acúmulo de nutrientes, tanto nos tecidos foliares como nos grãos de milho.

A análise dos atributos morfométricos realizada no estágio V8 da cultura (Figura 3) apresentou diferenças no comprimento das estruturas das plantas, diâmetro de coleto e acúmulo de massa seca nos órgãos avaliados para ambos os fatores, sem constatação de interação significativa.

O comprimento de planta foi superior quando as sementes foram tratadas com tiametoxam (Figura 3A), assim como o colmo que também apresentou leve alongamento em relação à testemunha. O tratamento conjunto de inoculação via semente e pulverização foliar, ambos com *A. brasilense*, distinguiu-se da testemunha quando avaliado o comprimento de planta (Figura 3B). Também, a pulverização foliar destacou-se quando avaliado o comprimento do colmo, diferindo da testemunha quando utilizada isoladamente ou conjuntamente à inoculação de *A. brasilense* via semente.

Em relação ao diâmetro de coleto, os tratamentos que receberam tiametoxam (Figura 3C) e *A. brasilense* em qualquer forma de aplicação (Figura 3D) apresentaram valores superiores em relação à testemunha.

O acúmulo de matéria seca de colmo, folhas e total foram superiores para os tratamentos que receberam tiametoxam (Figura 3E), assim como os que foram inoculados e/ou pulverizados com *A. brasilense* (Figura 3F), que também foram superiores à testemunha. Os tratamentos de inoculação via semente e pulverização foliar de *A. brasilense*, de forma isolada, foram semelhantes tanto à testemunha quanto à inoculação e pulverização conjuntas. A área foliar não apresentou distinção significativa em função dos tratamentos (Tabela 3).

No início do estágio reprodutivo (Vt), apenas o comprimento de planta (Figura 4A) manteve a diferença apresentada no estágio V8, e somente para a presença do tratamento com tiametoxam, sem apresentar distinção para as formas de inoculação de *A. brasilense*. A análise do comprimento de colmo não resultou em diferenças significativas em função dos tratamentos (Tabela 3).

O diâmetro de coleto continuou a exibir diferenças para o fator bioativador (Figura 4B), onde a presença de tiametoxam proporcionou melhores resultados. Efeitos do tiametoxam ainda foram detectados no estágio Vt quanto ao acúmulo de matéria seca (Figura 4C), sendo que tanto o acúmulo de matéria seca no colmo e nas folhas, assim como a matéria seca total, apresentaram os maiores valores na sua presença. Contudo, somente o acúmulo de matéria seca de folhas diferiu estatisticamente em função das formas de inoculação de *A. brasilense*, sendo apenas a inoculação via sementes associada à pulverização foliar superior a testemunha.

Diferentemente da avaliação anterior (estádio V8), a área foliar apresentou diferenças no estágio Vt (Figura 4E), sendo significativa para o fator bioativador, onde a utilização de tiametoxam promoveu incremento de 12,40% na área foliar das plantas.

No estágio reprodutivo (R3) o diâmetro de colmo seguiu exibindo diferenças (Figura 5A), sendo estimulado pela aplicação de tiametoxam nas sementes, promovendo aumento de 10,20 % em relação a testemunha.

O acúmulo de matéria seca apresentou efeito para o fator bioativador (Figura 5B) para os atributos matéria seca de folhas e matéria seca total, sendo os tratamentos com tiametoxam superiores ao tratamento testemunha. As formas de inoculação de *A. brasilense* influenciaram somente a matéria seca total das plantas (Figura 5C), promovendo maior acúmulo nos tratamentos que receberam inoculação via semente aliada a pulverização foliar. Contudo, esse resultado não diferiu da testemunha, sendo distinto apenas dos tratamentos que receberam isoladamente a inoculação via semente ou a pulverização foliar do inoculante.

Os fatores estudados não exerceram influência sobre o acúmulo de nitrogênio, potássio e fósforo no tecido foliar das plantas de milho. Quanto aos componentes da produção, nenhuma variável apresentou resposta significativa aos tratamentos (Tabela 3). Contudo, nota-se tendência de

incremento na produtividade ($P = 0,098$) pela ação da inoculação conjunta via semente e foliar em relação a testemunha.

Ocorreu interação entre os fatores bioativador e formas de inoculação de *A. brasilense* para a quantidade de impurezas na massa de grãos (Figura 6A). Quando avaliado somente as formas de inoculação, a testemunha apresentou maior teor de impurezas na massa de grãos, sendo equivalente à inoculação de *A. brasilense* via semente, mas diferindo de ambos os tratamentos que receberam pulverização foliar do inoculante. Contudo, quando os mesmos tratamentos foram submetidos à influência do tiametoxam, todos demonstraram semelhança. Ainda sob o efeito do tiametoxam, os tratamentos testemunha e inoculação via semente de *A. brasilense* apresentaram redução de impurezas quando sob ação do bioativador, o que não foi constatado para os tratamentos que receberam pulverização foliar da bactéria.

O teor de umidade dos grãos teve efeito das formas de aplicação do *Azospirillum* (Figura 6B), sendo que a testemunha se assemelhou a inoculação via semente e a pulverização foliar quando utilizados isoladamente. Porém, quando as práticas foram efetuadas em conjunto, houve redução de 7,45 % no teor de umidade dos grãos no momento da colheita em relação à testemunha e 6,80 % em relação à inoculação via semente.

A porcentagem de descontos apresentou influência apenas sobre as formas de inoculação do *A. brasilense* (Figura 6C). Tanto a testemunha quanto as plantas que receberam inoculação via semente apresentaram massa de grãos com maiores porcentagens de descontos, equivalendo-se ao tratamento que recebeu pulverização foliar. Quanto a inoculação conjunta via semente e foliar, esta reduziu a porcentagem de descontos frente à testemunha e a inoculação via semente isolada, impulsionada pela redução na umidade, sendo, no entanto, semelhante à pulverização foliar isolada, a qual propiciou resposta intermediária.

Por fim, o índice de colheita (Figura 6D) apresentou comportamento contrário ao verificado até então para a presença do bioativador, visto que o mesmo proporcionou menores valores. Estes resultados estão baseados principalmente no aumento do acúmulo de massa seca verificado durante o ciclo da cultura (Figura 3, 4 e 5), e que não se refletiram em aumento na produtividade do milho.

3.3.2 Ambiente 2: Sistema Plantio Convencional

A análise de variância (Tabela 4) mostrou baixa interação dos fatores estudados, verificado apenas para o teor de fósforo foliar. O tratamento de sementes com tiametoxam foi efetivo e evidenciado praticamente em todas as etapas de avaliação do ensaio, alterando inclusive a produtividade da cultura. As formas de inoculação de *A. brasilense* pouco exibiram sua ação, sendo pontual para comprimento da planta e diâmetro de coleto no estágio V8, e para a área foliar no estágio R3. Nenhum dos fatores interferiram na concentração de nutrientes nos grãos de milho.

Na avaliação inicial (estádio V8), a utilização do tiametoxam incrementou tanto o comprimento de planta quanto o diâmetro do colmo (Figura 7A), sendo os tratamentos que receberam o bioativador superiores a testemunha.

As formas de inoculação de *A. brasilense* influenciaram positivamente o diâmetro de coleto (Figura 7B). Contudo, somente o tratamento com inoculação via semente associado a pulverização foliar diferiu significativamente da testemunha.

A utilização do bioativador como tratamento de sementes incrementou o acúmulo de matéria seca de colmo, folhas e total (Figura 7C), sendo todos superiores a testemunha. Da mesma forma, o tiametoxam proporcionou incremento na área foliar das plantas de milho (Figura 7D), em torno de 11,15 % em relação a testemunha.

No início do período vegetativo (Vt), a avaliação morfométrica somente foi influenciada pelo bioativador (Tabela 4). Tanto o comprimento de planta, quanto o comprimento de colmo (Figura

8A) foram impulsionados pela presença de tiametoxam. O diâmetro de coleto (Figura 8B) seguiu o mesmo padrão.

Quanto ao acúmulo de matéria seca (Figura 8C), colmo, folhas e matéria seca total, todas foram superiores à testemunha quando sob efeito do tiametoxam. Também a área foliar (Figura 8D) manteve o mesmo padrão, apresentando maiores valores para o tratamento com o bioativador.

No estágio R3 do milho, o diâmetro de coleto continuou a ser influenciado positivamente pelo tiametoxam (Figura 9A), sendo superior ao tratamento testemunha. O acúmulo de matéria seca também foi incrementado pelo bioativador (Figura 9B), onde tanto colmo, como folhas, acumularam mais massa, culminando no aumento de matéria seca total da planta quando sob efeito do bioativador.

A área foliar apresentou efeito tanto do bioativador (Figura 9C), como das formas de inoculação com *A. brasilense* (Figura 9D). No primeiro caso ocorreu acréscimo significativo de 12,89 % quando as plantas eram provenientes de sementes tratadas com tiametoxam. Entretanto, para as formas de inoculação, a testemunha foi equivalente a inoculação via semente, e os tratamentos que receberam pulverização foliar com *A. brasilense*, seja de forma isolada ou associado a inoculação via semente, foram superiores aos demais, contudo, equivalentes entre si.

Os teores foliares de nitrogênio e potássio não foram alterados pelos tratamentos, contudo os teores de fósforo no tecido foliar foram influenciados pela interação dos fatores (Figura 10). Quando as plantas receberam tiametoxam via semente, os tratamentos com *A. brasilense* não foram efetivos em alterar os teores de fósforo. Contudo, quando os tratamentos com *A. brasilense* não estavam sob ação do tiametoxam, detectou-se aumento do teor de fósforo para a inoculação via semente aliado a pulverização foliar com *A. brasilense*, o qual foi equivalente a pulverização foliar isolada, porém este não diferiu significativamente da testemunha e da inoculação via semente.

Os componentes da produção não apresentaram diferenças significativas, contudo para produtividade de grãos e atributos referentes ao beneficiamento dos grãos houve efeito significativo dos tratamentos.

O teor de umidade dos grãos (Figura 11A) foi reduzido quando utilizado tiametoxam comparado a testemunha, onde o bioativador amortizou em 9,51 % os descontos com umidade da massa de grãos no momento da colheita.

Por fim, a produtividade foi incrementada pelo bioativador, com valor de 1,85 Mg ha⁻¹ superior à testemunha, o que representa aumento de 14,33 % da produtividade da cultura quando efetuado o tratamento de sementes com tiametoxam.

3.4 Discussões

Os efeitos encontrados para o tiametoxam nesse estudo, com resultados positivos quanto aos atributos morfométricos e produtivos são verificados também na literatura. As respostas são positivas desde a germinação, estendendo-se ao longo do ciclo do vegetal. Nos primeiros dias do processo de emergência de plântulas de trigo e arroz, variáveis como o crescimento inicial da raízes tem seus valores reduzidos pela utilização do bioativador, devido a ativação do metabolismo secundário que demanda energia, se normalizando e equiparando-se ao longo do processo, invertendo essa tendência de acordo com o crescimento das plântulas, promovendo maior expansão do sistema radicular (Macedo e Castro, 2012).

Ainda, considerando-se o efeito do tiametoxam durante os eventos da germinação das sementes, este atua também protegendo as sementes, aumentando a germinação sob testes que induzem estresses abióticos, como o envelhecimento acelerado, e em condições normais, eleva a percentagem de germinação na primeira contagem e a percentagem de germinação, assim como

promove incrementos na parte aérea em diversas doses testadas na cultura do amendoim (Vieira et al., 2014), como verificado nas avaliações morfométricas em ambos ambientes.

A ampla gama de respostas verificadas para a cultura do milho em campo justifica-se na ação do tiametoxam, constatada tanto em sementes de baixo como alto vigor, porém as melhores respostas ocorrem em sementes de médio-elevado vigor, devido ao incremento da atividade do metabolismo secundário, possibilitado por plantas com melhores condições fisiológicas (Dan et al., 2013). Essas respostas são evidenciadas no principal sítio da atividade do tiametoxam, que é o sistema radicular, promovendo maior acúmulo na matéria seca neste órgão, o qual se reflete em acréscimos significativos de reservas no colmo, conseqüentemente culminando no aumento do diâmetro (Figura 3C, 4B, 5A, 8B e 9A) e estrutura das plantas (Figura 3A, 4A, 7A e 8A), assim como verificado em cana-de-açúcar (Pereira et al., 2010). Desta forma, a formação de plântulas mais vigorosas é capaz de refletir suas vantagens ao longo do ciclo da cultura, como no presente trabalho.

Outros trabalhos em Poaceas também demonstram o efeito positivo da aplicação do tiametoxam. Pode-se destacar, como exemplo, a pulverização deste bioativador na parte aérea da cana-de-açúcar, com efeitos no sistema radicular, incrementando o diâmetro dos cilindros vasculares e o número de elementos de vaso do metaxilema em raízes adventícias, facilitando a absorção de água e nutrientes pela planta (Martins et al., 2012). Esses efeitos em locais onde não receberam a aplicação direta de tiametoxam ocorrem devido à elevada mobilidade de sua molécula, sendo transportada tanto via xilema como floema de folhas desenvolvidas para folhas novas, caule e raízes, embora em baixas quantidades frente à quantidade aplicada na região objetivada na aplicação (Torres e Rigitano, 2012). Estas respostas evidenciam a facilidade de distribuição em todo o vegetal, sendo que quando este produto é aplicado via tratamento de sementes, exerce influência na planta desde o início de seu desenvolvimento (Battistus et al., 2014).

Na cultura do arroz, assim como no presente trabalho, a altura de plantas é influenciada pelo tiametoxam, aditivamente ao teor de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenóides), os quais são incrementados linearmente em função da elevação da dose do bioativador (Macedo et al., 2013a). Isto permite maior proteção do aparato fotossintético do vegetal, proporcionando maiores taxas fotossintéticas (Taiz e Zeiger, 2013), podendo ser refletidas nos acúmulos de massa seca evidenciados nos resultados (Figura 3E, 4C, 5B, 7C, 8C e 9B). Grohs et al. (2012), estudando também os efeitos deste bioativador na cultura do arroz encontraram incrementos no perfilhamento das plantas, cultivado tanto em sistema convencional como pré-germinado. Conseqüentemente, houve aumentando no número de panículas por área, porém sem afetar a produtividade, como verificado para o ambiente sob plantio direto (Figura 6E). Os principais efeitos foram verificados no acúmulo de massa seca das plantas, reduzindo a esterilidade das espiguetas, e elevando a estatura das plantas em diversas fases de crescimento, entretanto dependente das condições climáticas no período de desenvolvimento do vegetal até sua avaliação (Grohs et al., 2012), justificando a ausência de resultados em determinados momentos de avaliação no presente estudo.

Efeitos positivos do uso de tiametoxam, corroborando com os presentes resultados, são citados em várias culturas. Em trigo, esses resultados foram verificados por incrementos lineares no crescimento de raízes, teor de proteínas, massa seca de parte aérea e massa seca de espigas (Macedo e Castro, 2011), afirmando os resultados (Figura 3E, 4C, 5B, 7C, 8C e 9B). Em braquiária, o tiametoxam altera positivamente o teor de proteína bruta, contudo, reduz a massa seca e a área foliar da planta, concentrando seus efeitos no sistema radicular, onde promove incrementos no volume radicular (Macedo et al., 2013b), sendo fator interessante em situações de estresse hídrico. Em soja relata-se aumento do vigor e desenvolvimento inicial de plântulas, que durante o ciclo expressou-se pela maior área foliar e radicular, verificado ao longo de todo o ciclo no ambiente de sistema convencional (Figura 7D, 8D e 9D) e no florescimento no ambiente com plantio direto (Figura 4E),

culminando em incrementos na produtividade, embasando o incremento obtido no ambiente cultivado em sistema convencional (Figura 11B) (Castro et al., 2007).

O aumento na produtividade do milho obtido com a aplicação do bioativador via semente no ensaio conduzido no ambiente com sistema convencional com média tecnologia (Figura 11B) relaciona-se, possivelmente, com a bioquímica da enzima fenilalanina amônia liase. A atividade desta enzima é incrementada pelo bioativador, sendo responsável por vários processos contra estresses abióticos e bióticos, sendo capaz de acelerar e induzir respostas de defesa no vegetal (Macedo e Castro, 2011). Nessa condição de cultivo não foram realizados controle de doenças via fungicida, e as condições de manejo de solo foram inferiores quando comparado ao ambiente de alta tecnologia. Macedo e Castro (2011) ainda relatam decréscimos na atividade da enzima nitrato redutase na cultura do trigo quando sob influência de tiametoxam. Porém, em arroz e braquiária, a nitrato redutase foi alterada com ajuste quadrático, sendo que em concentrações adequadas, o tiametoxam promoveu aumento da atividade da enzima (Macedo et al., 2013a, 2013b), o que representa maior capacidade da planta na assimilação do N, mascarando possíveis efeitos da inoculação e promovendo aumento da produtividade de grãos (Figura 11B).

Vale destacar ainda que, o metabolismo do nitrogênio é modificado pelo bioativador, ativando rotas de síntese de compostos pelo metabolismo secundário das plantas, consumindo o nutriente (Macedo et al., 2013a). Contudo, essas respostas variam conforme a espécie em questão, visto que em milho o tiametoxam não demonstrou efeito sobre o acúmulo de nitrogênio nos tecidos vegetais como verificado no presente estudo.

Especificamente na cultura do milho, o bioativador atua desde o início do seu desenvolvimento a campo, evidenciado por Battistus et al. (2014) e encontrados nas avaliações ao longo do ciclo do milho nos dois ambientes, promovendo maior percentagem de germinação, assim como no crescimento de raízes por estímulos na expressão gênica e síntese de giberelinas. Esse

incremento nos teores de giberelinas atuam em conjunto com a inibição da síntese do ABA, afetando o vegetal como um todo apenas modulando a expressão genética (Afifi et al., 2014). Estes autores ainda relatam que o bioativador promove maior expressão gênica e síntese tanto de α -amilases como β -amilases, sendo esta última mais expressiva, acelerando a germinação das sementes. Ao mesmo tempo, genes codificadores de nanismo das plantas tem sua expressão reduzida, e os resultados no crescimento são mais evidenciados em condições adversas, como situações de desenvolvimento inicial sob mato competição (Afifi et al., 2014). Deste modo, esse mecanismo de ação embasa os incrementos na parte aérea (Figura 3, 4, 5, 7, 8 e 9), assim como a elevação da produtividade no ambiente de semeadura convencional e média tecnologia (Figura 11B), verificados no presente estudo.

A utilização de tiametoxam em culturas monocotiledôneas usualmente acarreta em maiores valores radiculares e de acúmulo de massa seca em diversos órgãos vegetais pelo estímulo do metabolismo secundário, afetando o conteúdo proteico, absorção de nitrogênio, pigmentos fotossintéticos e enzimas de defesa vegetal (Macedo, 2012). Contudo nem sempre esse conjunto de alterações culmina em diferenças significativas de produtividade (Figura 6E) em culturas monocotiledôneas.

Os componentes da produção pouco são afetados pelo tiametoxam, porém alguns estudos indicam aumento na massa de espigas e número de espiguetas fertilizadas em trigo (Macedo e Castro, 2011), assim como aumento na sanidade em plantas da mesma espécie (Battistus et al., 2013). Essas evidências possivelmente acarretaram na redução de impurezas (Figura 6A) e, devido a condição mais sadia das espigas de milho.

Por fim, diferenças no índice de colheita promovidos pelo tiametoxam (Figura 6D) são variáveis devido a relação que compõe o dado, principalmente quando incrementos no acúmulo de massa não se refletirem em diferenças significativas na produtividade, reduzindo o índice de colheita.

Em estudos com doses crescentes do bioativador, comportamento cúbico foi encontrado para o índice de colheita devido à flutuação desta relação (Macedo e Castro, 2011).

Por outro lado, estudos denotam que inoculantes à base de *A. brasilense* promovem o crescimento de plantas de milho, baseados na excreção de ácido indol-3-acético, ácido giberélico e zeatinina (citocinina) pelas bactérias (Cassán et al., 2009b). Estes compostos pertencem aos grandes grupos hormonais com ação focada no crescimento do vegetal, quando em balanço adequado (Cato et al., 2013).

Diversos trabalhos relatam incrementos no comprimento de parte aérea de plantas inoculadas (Cassán et al., 2009b; Oliveira et al., 2004; Rampim et al., 2012), fato que foi observado também no presente estudo (Figura 3B). Contudo, poucos relatos descrevem as regiões de maior efeito de promoção de crescimento, o qual normalmente é atribuído, por diversos autores, à produção de auxinas e giberelinas pela bactéria (Araújo et al., 2010; Masciarelli et al., 2013).

Assim, bactérias promotoras de crescimento vegetal, quando presentes em quantidades apropriadas nos tecidos da planta, afetam o desenvolvimento vegetal principalmente pela ação de auxinas (Perrig et al., 2007; Radwan et al., 2004). Esse hormônio induz a síntese e ativação de ATPases pré-existentes na membrana celular vegetal, reduzindo a rigidez da parede e favorecendo a entrada de água no protoplasma, e conseqüentemente a expansão da célula (Taiz e Zeiger, 2013), acarretando em incrementos na parte aérea das plântulas (Figura 3B, 3D, 3F, 4D, 5C e 7B).

A elevação nas médias de comprimento de planta (Figura 3B) evidenciam-se devido à atividade hormonal ocasionada pela presença de *A. brasilense*, principalmente devido a atividade de auxinas (Masciarelli et al., 2013; Perrig et al., 2007). Esta atividade hormonal ocorre de maior forma como dominância apical nas plântulas de milho, promovendo alongamento da parte aérea e alteração no diâmetro de colmo por intermédio da diferenciação vascular promovida pelo mesmo hormônio (Taiz e Zeiger, 2013), fato que elucidada a elevação nas médias do diâmetro de colmo (Figura 3D e 7B).

A causa dessas elevações podem ser somadas ao efeito das giberelinas excretadas simultaneamente às auxinas, (Perrig et al., 2007), atuando diretamente no alongamento e divisão celular pela quebra de reservas, sendo a principal delas o amido, reduzindo o potencial osmótico no protoplasma, permitindo a entrada de água e expansão celular (Taiz e Zeiger, 2013).

Por outro lado, as não respostas da inoculação no acúmulo de massa seca podem ser atribuídos à incrementos em morfofocarterísticas da parte aérea, as quais podem ser alcançados sem o acompanhamento do acúmulo de matéria seca na respectiva região quando inoculado por bactérias promotoras de crescimento, devido ao alongamento celular por mecanismo denominado como turgescência vacuolar (Conceição et al., 2008).

Outro ponto a se considerar ao avaliar os resultados ligados ao *A. brasilense* no acúmulo de matéria seca na parte aérea, assim como para a estatura das plantas e comprimento de suas estruturas, promovidas pelas diversas espécies de *Azospirillum* é o fato de que tais resultados dependem da capacidade de interação entre o genótipo da planta e a espécie bacteriana em questão (Quadros et al., 2014). Contudo, esses resultados são expressivos quando evidenciados, e usualmente são reflexo do incremento no acúmulo radicular (Reis Junior et al., 2008).

Resultados ressaltam que os efeitos promovidos pela inoculação atuam tanto na parte aérea (Figura 3B, 3D, 3F, 4D, 5C e 7B) como radicular das plantas, indicando a ampla ação do gênero *Azospirillum* nos vegetais, e que o bom desenvolvimento aéreo é espelho da melhor distribuição radicular no solo (Oliveira et al., 2004). Deste modo, pulverizações na parte aérea podem agir de duas formas distintas, tendo primeiramente sua atividade direta na parte aérea, promovendo alterações nos níveis hormonais e incrementando o crescimento.

Por outro lado, parte do elevado volume de calda pulverizada, necessário quando se trata de microrganismos vivos, que não é interceptada pela planta chega ao solo, encontrando condições mais adequadas de umidade e temperatura, e ambiente menos sujeito à oscilações, conseqüentemente

facilita a instalação do *A. brasilense*. Este segundo mecanismo de ação derivado da pulverização em parte aérea pode ser alavancado pelas boas condições resultantes do correto manejo conservacionista do solo, presente no ambiente sob sistema de semeadura direta, sendo fator decisivo para a boa instalação da bactéria (Bashan e Holguin, 1995; Quadros et al., 2014), e promovendo melhores resultados para a inoculação em relação ao ambiente de semeadura convencional.

Por sua vez, as bactérias estando instaladas em ampla área do solo e tendo por característica serem endofíticas facultativas, podendo sobreviver sem hospedeiro (Baldani e Baldani, 2005), assim restaria a elas apenas aguardar o desenvolvimento natural do sistema radicular da cultura, para iniciar a associação (Pedraza, 2008; Steenhoudt e Vanderleyden, 2000) e promover seus efeitos diretamente na rizosfera (Bashan e Holguin, 1995), que refletem-se na parte aérea do vegetal, como verificado no ambiente de semeadura direta (Figura 3B, 3D, 3F, 4D, 5C), sendo mais expressivo que no ambiente de semeadura convencional (Figura 7B).

Desta forma, tanto inoculações como pulverizações possibilitam a consolidação dessas bactérias na lavoura, onde levam à alterações nas camadas mais externas do córtex das raízes, tanto em milho como trigo, devido à alta taxa de divisão celular nestas extremidades (Baset Mia et al., 2010). Aliando-se ao efeito de alongamento celular das auxinas (Taiz e Zeiger, 2013), essas alterações promovem o alongamento das raízes, proliferação de raízes laterais e pelos radiculares, elevando a área de contato raiz-solo (Glick, 1995).

Em plantas inoculadas com *Azospirillum* ocorrem também alterações na atividade das membranas celulares, acarretando principalmente em alterações na morfologia radicular, com incremento de matéria seca total do vegetal (Figura 3F e 5C) (Bashan et al., 2004). Este maior crescimento vegetal é resultado do estímulo hormonal associado aos desvios de rotas metabólicas (Neto et al., 2013) que fornecem aporte de mecanismos, nutrientes e água, que estimulam o crescimento e acúmulo de massa seca em seus tecidos (Puente et al., 2009).

O *A. brasilense* contribui para o aumento do sistema radicular principalmente pela formação de raízes secundárias, proporcionando maior contato superficial raiz/solo (Oliveira et al., 2004). A produção de cadaverina (Perrig et al., 2007) é apontada como importante assistente neste desenvolvimento radicular (Niemi et al., 2002). Este fator é liderado pela produção de AIA (Radwan et al., 2004, 2002; Tien et al., 1979), tendo também auxílio da atividade do óxido nítrico no desenvolvimento de pelos radiculares (Creus et al., 2005) incrementando o volume radicular (Moreira et al., 2010) e capacidade de absorção de água e nutrientes. Deste modo, os efeitos verificados no ambiente sob sistema de plantio direto (Figura 3B, 3D, 3F, 4D, 5C) são provenientes da maior atividade hormonal resultante de melhores condições para sobrevivência das bactérias.

Valores mais elevados de volume do sistema radicular podem ser encontrados quando realizada a inoculação com *Azospirillum*, seja em aplicações via semente (Quadros et al., 2014) ou pulverizações foliares (Neto et al., 2013). Esta característica é importante em épocas de precipitação restrita ou estresses hídricos que ocorrem naturalmente ao longo do dia, onde o maior volume radicular mais elevado possibilita maior capacidade de absorção de água e nutrientes, culminando em maior potencial de produção do milho (Quadros et al., 2014). Este mecanismo possivelmente teve grande participação no período compreendido entre a última dezena de outubro e o mês completo de novembro, onde houve redução da precipitação no ambiente de plantio direto (Figura 1), e entre o final de novembro e todo o mês de dezembro para o ambiente de semeadura convencional (Figura 2), refletido na área foliar (Figura 9D) na avaliação em R3.

Desta forma, fica em evidência que *A. brasilense* apresenta efeitos ao longo de todo o ciclo da planta, devido a sua ampla distribuição no vegetal (Tortora et al., 2012) e excreção de substâncias promotoras de crescimento (Perrig et al., 2007), exibindo resultados positivos tanto quando aplicado via semente como em pulverização aérea (Figura 3B, 3D, 3F, 4D, 5C e 7B).

A redução do percentual de impurezas, promovida por plantas que receberam pulverização foliar isolada e/ou inoculação das sementes aliada a pulverização foliar (Figura 6A), se deve ao efeito sanitário de bactérias promotoras de crescimento vegetal. Sementes produzidas por plantas que receberam inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* apresentam menor incidência de fungos durante a germinação (Sousa et al., 2012). Desta forma, a redução de impurezas baseia-se na melhor qualidade estrutural da espiga, assim como na redução de grãos avariados.

O maior acúmulo de P nas folhas no ambiente de média tecnologia (Figura 10), liga-se automaticamente ao efeito de solubilização de fosfato das estirpes AbV5 e AbV6. Contudo, várias espécies pertencentes ao gênero *Azospirillum* são negativas para biotestes de solubilização de fosfatos (Perrig et al., 2007; Wang et al., 2012). Porém, é de conhecimento geral a baixa mobilidade do elemento fósforo no solo, o qual pode ser compensado pela maior exploração radicular, promovido pela maior formação radicular (Baset Mia et al., 2010; Bashan et al., 2004), visto que em ambos ambientes os teores de fósforo estavam altos (Tabela 1). O resultado oposto para o ambiente de alta tecnologia relaciona-se com a influência negativa de agroquímicos, onde a interação com bactérias ocasiona diversos efeitos prejudiciais para a população do *Azospirillum* (Conceição et al., 2009; Fernandes et al., 2012; Gomez et al., 1998; Omar and Abd-Alla, 1992; Procópio et al., 2011).

Todavia, melhores resultados na cultura do milho são encontrados quando é inoculada população de *A. brasilense* variando de 1 a 10 milhões de células por sementes (Dobbelaere et al., 2002), e no presente estudo aplicou-se aproximadamente 430000 células por sementes via inoculação e 58000 células via pulverização foliar por planta. Desta forma, o avanço na tecnologia de inoculantes que permita maiores concentrações de bactérias é necessária para melhores expressões dos resultados promovidos pelo *A. brasilense*.

Apesar dos obstáculos até então descritos, quando inoculadas e/ou pulverizadas, as células de *A. brasilense* ficam expostas diversos à fatores adversos quando fora do meio de cultura. Em

organismo quiescente como a semente, a qual tende a absorver água do meio por estar em estado higroscópico (Marcos Filho, 2005) ou ambientes sujeitos a desidratação, como a folha, há problemas de desidratação das células bacterianas, com subsequente morte e redução da população, sendo imprescindível boas condições climáticas e de umidade do solo no momento da aplicação, seja via semente ou foliar.

A utilização de defensivos químicos, via tratamento de sementes ou pulverização foliar também é empecilho a inoculação, pois apresenta efeitos negativos sobre a população das bactérias promotoras de crescimento vegetal. O aumento no tempo de geração e redução da fase log (Fernandes et al., 2012; Gomez et al., 1998) é efeito da interação com agroquímicos, que também suprimem o crescimento, respiração (Omar e Abd-Alla, 1992) e a atividade da nitrogenase das bactérias (Procópio et al., 2011), evidenciando a baixa interação entre os fatores estudados. A soma desses fatores, aliado a ausência de condições favoráveis como encontrado no ambiente sob sistema de plantio convencional, acarreta na redução da população original de *A. brasilense* inoculada (Conceição et al., 2009), e portanto, seus efeitos benéficos.

O clima, tipo e manejo de solo, condições e equipamentos utilizados no momento da aplicação interferem na boa adaptação das bactérias que estão sendo inoculadas. Esses fatores podem ocasionar variações nos resultados de acordo com o local (Quadros et al., 2014), atribuído ao fato que a sobrevivência, seja na rizosfera, filoplano ou outras estruturas vegetais, é essencial para o sucesso da inoculação (Bashan and Holguin, 1995).

Deste modo, em relação aos ambientes, condições adequadas para a boa instalação e sobrevivência inicial no campo das bactérias do gênero *Azospirillum*, seja por inoculação via semente ou pulverização, fazem grande diferença para a expressão de seus resultados, como evidenciado no ambiente de semeadura direta, onde a presença de palhada sobre o solo ameniza a oscilação e temperatura e mantém a umidade do solo, condição ausente no ambiente sob sistema de semeadura

convencional. Por outro lado, em condições mais adversas, como em semeadura convencional, o tiametoxam desempenha melhor seu papel, proporcionando melhor desenvolvimento as plantas tratadas com a molécula, como verificado nos resultados (Figura 7, 8, 9, 10 e 11), sendo também encontrados em semeadura direta, porém com menor expressão.

3.5 Conclusões

O tiametoxam promove incrementos morfométricos e de matéria seca na cultura do ciclo do milho, influenciando positivamente a produtividade em sistema de plantio convencional, além de reduzir a umidade e impurezas presentes na massa de grãos.

Efeitos do *A. brasilense* são mais evidentes quando utilizada a inoculação via sementes aliada a pulverização foliar, com acréscimos morfométricos e de matéria seca.

A redução no teor de umidade, impurezas e descontos da massa de grãos, assim como incrementos nos teores foliares de fósforo também são resultados da inoculação de sementes aliado à pulverização foliar com *A. brasilense*, contudo sem apresentar alterações na produtividade do milho.

3.6 Referências bibliográficas

- Afifi, M., Lee, E., Lukens, L., Swanton, C., 2014. Maize (*Zea mays*) seeds can detect above-ground weeds; thiamethoxam alters the view. *Pest Manag. Sci.* 4. doi:10.1002/ps.3936
- Alen'kina, S.A., Nikitina, V.E., 2010. Effect of lectins from *Azospirillum brasilense* to peroxidase and oxalate oxidase activity regulation in wheat roots. *Biol. Bull.* 37, 105–108. doi:10.1134/S1062359010010127
- Almeida, A. da S., Tillmann, M.Â.A., Villela, F.A., Pinho, M. da S., 2009. Bioativador no desempenho fisiológico de sementes de cenoura. *Rev. Bras. Sementes* 31, 87–95. doi:10.1590/S0101-31222009000300010
- Almeida, A. da S., Villela, F.A., Meneghello, G.E., Lauxen, L.R., Deuner, C., 2012. Desempenho fisiológico de sementes de aveia-preta tratadas com tiametoxam. *Semin. Ciências Agrárias* 33, 1619–1628. doi:10.5433/1679-0359.2012v33n5p1619
- Araújo, A.E. da S., Rossetto, C.A.V., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., 2010. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. *Cienc. Agrotc.* 34, 932–939. doi:10.1590/S1413-70542010000400019
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77, 549–579. doi:10.1590/S0001-37652005000300014
- Baset Mia, M.A., Shamsuddin, Z.H., Wahab, Z., Marziah, M., 2010. Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured *Musa* plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Aust. J. Crop Sci.* 4, 85–90.
- Bashan, Y., Holguin, G., 1995. Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. *Microb. Ecol.* 29, 269–281. doi:10.1007/BF00164890
- Bashan, Y., Holguin, G., Luz, E., 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50, 521–577. doi:10.1139/W04-035
- Battistus, A.G., Hachmann, T.L., Mioranza, T.M., Müller, M.A., Madalosso, T., Favorito, P.A., Guimaraes, V.F., Klein, J., Kestring, D., Inagaki, A.M., Bulegon, L.G., 2014. Synergistic action of *Azospirillum brasilense* combined with thiamethoxam on the physiological quality of maize seedlings. *African J. Biotechnol.* 13, 4501–4507. doi:10.5897/AJB2014.14059
- Battistus, A.G., Kuhn, O.J., Stangarlin, J.R., Rodrigo, M., Hoffmann, B., Stülp, J.L., Istchuk, A.N., 2013. Comportamento da cultura do trigo tratado com enraizador e bioativador de plantas. *Sci. Agrar. Parana.* 12, 17–29.

- Blaha, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M.S., Moëgne-Loccoz, Y., 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 455–470. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00082.x
- Brasil, 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa/ACS, Brasília.
- Brasil, 2011. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa n° 60, de 22 de dezembro de 2011. Diário Of. da União.
- Busato, J.G., Zandonadi, D.B., Dobbss, L.B., Façanha, A.R., Canellas, L.P., 2010. Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. *Sci. Agric.* 67, 206–212. doi:10.1590/S0103-90162010000200012
- Carvalho, N.L., Perlin, R.S., Costa, E.C., 2011. Thiametoxam em tratamento de sementes. *Monogr. Ambient.* 2, 158–175.
- Cassán, F., Maiale, S., Masciarelli, O., Vidal, A., Luna, V., Ruiz, O., 2009a. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur. J. Soil Biol.* 45, 12–19. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.003
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., Luna, V., 2009b. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.* 45, 28–35. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.005
- Castro, P.R. de C. e, Pitelle, A.M. de C.M., Peres, L.E.P., Aramaki, P.H., 2007. Análise da atividade reguladora de crescimento vegetal de Tiametoxam através de biotestes. *Publ. UEPG - Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Eng.* 13, 25–29.
- Castro, P.R.C., 2006. Agroquímicos de controle hormonal na agricultura tropical. ESALQ, Piracicaba.
- Cato, S.C., Macedo, W.R., Peres, L.E.P., Castro, P.R. de C. e, 2013. Sinergism among auxins, gibberellins and cytokinins in tomato cv. Micro-Tom. *Hortic. Bras.* 31, 549–553. doi:10.1590/S0102-05362013000400007
- Companhia Nacional de Abastecimento, 2014. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. CONAB, Brasília.
- Conceição, P.M. da, Vieira, H.D., Canellas, L.P., Marques Júnior, R.B., Olivares, F.L., 2008. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 43, 545–548. doi:10.1590/S0100-204X2008000400015
- Conceição, P.M., Vieira, H.D., Silva, R.F., Campos, S.C., 2009. Germinação e vigor de sementes de milho recobertas e viabilidade do inóculo durante o armazenamento. *Cienc. Agrotc.* 33, 765–772.

- Creus, C.M., Graziano, M., Casanovas, E.M., Pereyra, M.A., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Barassi, C.A., Lamattina, L., 2005. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* 221, 297–303. doi:10.1007/s00425-005-1523-7
- Cruz, J.C., 2012. Cultivo do Milho: Apresentação. Sist. produção 1.
- Dan, L.G.M., Braccini, A.L., Barroso, A.L.L., Dan, H.A., Piccinin, G.G., Vroniak, J.M., 2013. Physiological potential of soybean seeds treated with thiamethoxam and submitted to storage. *Agric. Sci.* 4, 19–25. doi:10.4236/as.2013.411A003
- Davidson, J., 1988. Plant Beneficial Bacteria. *Nat. Biotechnol.* 6, 282–286. doi:10.1038/nbt0388-282
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., Vanderleyden, J., 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol. Fertil. Soils* 36, 284–297. doi:10.1007/s00374-002-0534-9
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., 1995. Como isolar e identificar bactérias diaotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa Agrobiologia, Brasília.
- Dobereiner, J., Marriel, I.E., Nery, M., 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22, 1464–1473.
- EMBRAPA, 2013. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, 3rd ed. Embrapa Solos, Brasília.
- Embrapa Informática Agropecuária, 2002. Agritempo - Sistema de monitoramento agrometeorológico.
- Fernandes, M.F., Procópio, S.D.O., Teles, D.A., Sena Filho, J.G. de, Cargnelutti Filho, A., Machado, T.N., 2012. Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. *Rev. Ciências Agrar. - Amaz. J. Agric. Environ. Sci.* 55, 318–326. doi:10.4322/rca.2012.077
- Ferreira, D.F., 2011. SISVAR : A computer statistical analysis system. *Cienc. Agrotec.* 35, 1039–1042. doi:10.1590/S1413-70542011000600001
- Gifford, R.M., Thorne, J.H., Hitz, W.D., Giaquinta, R.T., 1984. Crop productivity and photoassimilate partitioning. *Science* 225, 801–808. doi:10.1126/science.225.4664.801
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109–117. doi:10.1139/m95-015
- Gomez, F., Salmeron, V., Rodelas, B., Martinez-Toledo, M. V., Gonzalez-Lopez, J., 1998. Response of *Azospirillum brasilense* to the pesticides bromopropylate and methidathion on chemically defined media and dialysed-soil media. *Ecotoxicology* 47, 43–47. doi:10.1023/A:1008807701523

- Grohs, M., Marchesan, E., Roso, R., Formentini, T.C., de Oliveira, M.L., 2012. Desempenho de cultivares de arroz com uso de reguladores de crescimento, em diferentes sistemas de cultivo. *Pesqui. Agropecuária Bras. Bras.* 47, 776–783. doi:10.1590/S0100-204X2012000600007
- Hamdia, M.A.E., Shaddad, M.A.K., Doaa, M.M., 2004. Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. *Plant Growth Regul.* 44, 165–174. doi:10.1023/B:GROW.0000049414.03099.9b
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331, 413–425. doi:10.1007/s11104-009-0262-0
- Kemp, C.D., 1960. Methods of estimating the leaf area of grasses from linear measurements. *Ann. Bot.* 24, 491–499.
- Klein, J., Rampim, L., Nacke, H., Rodrigues-costa, A.C.P., Guimarães, V.F., 2012. Qualidade nutricional de plântulas de cultivares de trigo submetidas à inoculação com *Azospirillum*, bioestimulante e triadimenol. *Sci. Agrar. Parana.* 11, 59–69.
- Macedo, W.R., 2012. Bioativador em culturas monocotiledoneas: avaliações bioquímicas, fisiológicas e da produção. Esalq/USP, Piracicaba.
- Macedo, W.R., Araújo, D.K., Castro, P.R.C., 2013a. Unravelling the physiologic and metabolic action of thiamethoxam on rice plants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 107, 244–249. doi:10.1016/j.pestbp.2013.08.001
- Macedo, W.R., Castro, P.R.C., 2012. Crescimento radicular em sementes de trigo e arroz tratadas com bioativador. *Comun. Sci.* 3, 72–75.
- Macedo, W.R., Castro, P.R.D.C.E., 2011. Thiamethoxam: Molecule moderator of growth, metabolism and production of spring wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100, 299–304. doi:10.1016/j.pestbp.2011.05.003
- Macedo, W.R., Fernandes, G.M., Possenti, R.A., Lambais, G.R., de Camargo e Castro, P.R., 2013b. Responses in root growth, nitrogen metabolism and nutritional quality in *Brachiaria* with the use of thiamethoxam. *Acta Physiol. Plant.* 35, 205–211. doi:10.1007/s11738-012-1064-1
- Marcos Filho, J., 2005. Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas. Fealq, Piracicaba.
- Martins, R.G., Martins, M.B.G., Silva, J.M., Pereira, M.A., Appezzato-da-Glória, B., Castro, P.R. de C. e, 2012. Thiamethoxam on the histological characteristics of sugarcane young roots. *Ciência Rural* 42, 1936–1940. doi:10.1590/S0103-84782012005000090
- Masciarelli, O., Urbani, L., Reinoso, H., Luna, V., 2013. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. *J. Microbiol.* 51, 590–597. doi:10.1007/s12275-013-3136-3

- Moreira, F.M.S., Silva, K., Nóbrega, R.S.A., Carvalho, F., 2010. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comun. Sci.* 1, 74–99.
- Neto, F.J.D., Yashimi, F.K., Garcia, R.D., Miyamoto, Y.R., Domingues, M.C.S., 2013. Desenvolvimento e produtividade do milho verde safrinha em resposta à aplicação foliar com *Azospirillum brasilense*. *Enciclopédia Biosf.* 9, 1030–1040.
- Niemi, K., Haggman, H., Sarjala, T., 2002. Effects of exogenous diamines on the interaction between ectomycorrhizal fungi and adventitious root formation in Scots pine in vitro. *Tree Physiol.* 22, 373–381. doi:10.1093/treephys/22.6.373
- Novakowski, J.H., Sandini, I.E., Falbo, M.K., Moraes, A. De, Novakowski, J.H., Cheng, N.C., 2011. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Semin. Ciências Agrárias* 32, 1687–1698. doi:10.5433/1679-0359.2011v32Suplp1687
- Oliveira, A.A.S., Arruda, T.F., Bach, E.E., 2004. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). *ConScientiae Saúde* 3, 29–35.
- Omar, S.A., Abd-Alla, M.H., 1992. Effect of pesticides on growth, respiration and nitrogenase activity of *Azotobacter* and *Azospirillum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 326–328. doi:10.1007/BF01201891
- Paes, M.C.D., 2008. Aspectos físicos, químicos e tecnológico do grão de milho, in: Cruz, J.C., Karam, D., Monteiro, M.A.R., Mmagalhães, P.C. (Eds.), *A Cultura Do Milho*. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, p. 517.
- Pedraza, R.O., 2008. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 25–35. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.079
- Pereira, J.M., Fernandes, P.M., Veloso, V.R.S., 2010. Efeito fisiológico do inseticida thiamethoxam na cultura da cana-de-açúcar. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*. 77, 159–164.
- Perrig, D., Boiero, M.L., Masciarelli, O. a, Penna, C., Ruiz, O. a, Cassán, F.D., Luna, M. V, 2007. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1143–1150. doi:10.1007/s00253-007-0909-9
- Portugal, J.R., Arf, O., Longui, W.V., Gitti, D. de C., Barbieri, M.K.F., Gonzaga, A.R., Teixeira, D.S., 2012. Inoculação com *Azospirillum brasilense* Via Foliar Associada à Doses de Nitrogênio em Cobertura na Cultura do Milho, in: XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO. Águas de Lindóia, pp. 1413–1419.
- Portugal, J.R., Arf, O., Peres, A.R., Franco, A.A., Gitti, D. de C., 2013. Inoculação via foliar com *Azospirillum brasilense* associada a doses de nitrogênio em cobertura na cultura do milho safrinha, in: XII Seminário Nacional Milho Safrinha: Estabilidade E Produtividade. Dourados, pp. 1–6.

- Procópio, S., Fernandes, M., Teles, D., Sena Filho, J., Cargnelutti Filho, A., Vargas, L., Sant'Anna, S.A., 2011. Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. Planta Daninha. doi:10.1590/S0100-83582011000500015
- Puente, M.L., Garcia, J.E., Alejandro, P., 2009. *Azospirillum brasilense* in the inoculum and its plant growth regulator compounds on crop yield of corn (*Zea mays* L.) in the field. World J. Agric. Sci. 5, 604–608.
- Quadros, P.D. de, Roesch, L.F.W., Silva, P.R.F. da, Vieira, V.M., Roehrs, D.D., Camargo, F.A. de O., 2014. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. Rev. Ceres 61, 209–218. doi:10.1590/S0034-737X2014000200008
- Radwan, T.E.-S.E.-D., Mohamed, Z.K., Reis, V.M., 2002. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. Symbiosis 32, 39–53.
- Radwan, T.E.-S.E.-D., Mohamed, Z.K., Reis, V.M., 2004. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. Pesqui. Agropecuária Bras. 39, 987–994. doi:10.1590/S0100-204X2004001000006
- Rampim, L., Rodrigues-Costa, A.C.P., Nacke, H., Klein, J., Guimarães, V.F., 2012. Qualidade fisiológica de sementes de três cultivares de trigo submetidas à inoculação e diferentes tratamentos. Rev. Bras. Sementes 34, 678–685. doi:10.1590/S0101-31222012000400020
- Reis Junior, F.B., Machado, C.T.T., Machado, A.T., Sodek, L., 2008. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. Rev. Bras. Cienc. do Solo 32, 1139–1146. doi:10.1590/S0100-06832008000300022
- Reis Junior, F.B., Silva, M.F., Teixeira, K.R.S., Urquiaga, S., Reis, V.M., 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitohermônio pela bactéria. Rev. Bras. Ciência do Solo 28, 103–113.
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. Naturwissenschaften 91, 552–555. doi:10.1007/s00114-004-0566-0
- Silva, F.C., 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes, 2nd ed. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
- Soares, B.J.A., Ferrari, T.B., Corniani, N., Fátima, R. de, Soares, Cataneo, A.C., 2008. Ação do Cruiser (Thiamethoxam) sobre a germinação de milho (*Zea mays* L.): Proteção contra efeitos da salinidade, in: V Congresso Iteano de Iniciação Científica. Botucatu, pp. 1–12.
- Soares, V.N., Radke, A.K., Tillmann, M.Â.A., Moura, A.B., Schuch, L.O.B., 2014. Physiological performance of rice seeds treated with thiamethoxam or rhizobacteria under different temperatures. J. Seed Sci. 36, 186–193. doi:/10.1590/2317-1545v32n2925

- Soares, V.N., Tillmann, M.Â.A., Moura, A.B., Zanatta, Z.G.C.N., 2012. Physiological potential of rice seeds treated with rhizobacteria or the insecticide thiamethoxam. *Rev. Bras. Sementes* 34, 561–572. doi:10.1590/S0101-31222012000400006
- Sousa, R.F.B., Guimarães, V.F., Junior, A.S.P., Oro, T.H., 2012. Avaliação da qualidade sanitária de sementes de milho provenientes do cultivo associado com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. *Cultiv. o Saber* 5, 213–218.
- Steenhoudt, O., Vanderleyden, J., 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1016/S0168-6445(00)00036-X
- Taiz, L., Zeiger, E., 2013. *Fisiologia Vegetal*, 5th ed. Artmed, Porto Alegre.
- Tien, T.M., Gaskins, M.H., Hubbell, D.H., 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 1016–1024.
- Torres, F.Z.V., Rigitano, R.L.O., 2012. Translocação do inseticida Tiametoxam no floema de mamoneiras, utilizadas como plantas-modelo. *Pestic. Rev. Ecotoxicologia e Meio Ambient.* 22, 51–64. doi:10.5380/pes.v22i1.30797
- Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C., Pedraza, R.O., 2012. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 356, 279–290. doi:10.1007/s11104-011-0916-6
- Vieira, J.F.J.F., Soares, V.N., Villela, F.A., Espinola, J.E.F.J.E.F., Castanho, F.R., Almeida, T.L.T.L. De, 2014. Use of thiamethoxam as bioactivator on cucumber seed physiological quality and seedling performance. *Rev. Bras. Ciências Agrárias* 9, 317–321. doi:10.5039/agraria.v9i3a2162
- Wang, Z., Gao, J., Li, L., Jiang, H., 2012. Purification and characterization of an extracellular poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) depolymerase from *Acidovorax* sp. HB01. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2395–2402. doi:10.1007/s11274-012-1048-8

Tabela 1. Análise química de solo derivado dos ambientes experimentais de Corbélia – Paraná e Marechal Cândido Rondon – Paraná.

Variável	Unidade	Local	
		Corbélia	Marechal Cândido Rondon
Ca ²⁺		4,51	4,84
Mg ²⁺		1,79	1,44
K ⁺		0,15	0,51
Al ⁺³	cmolc dm ⁻³	0,05	0,15
H+Al		4,54	6,69
SB		6,45	6,79
CTC		11,1	13,48
MO	g dm ⁻³	33,96	27,34
V	%	58,32	50,37
P	mg dm ³	31,2	26,29
pH CaCl ₂	0,01 mol L ⁻¹	6,23	4,75

P e K: Extrator Mehlich; Al, Ca e Mg: KCl 1 mol L⁻¹; H+Al: pH SMP (7,5).

Tabela 2. Análise microbiológica de solo e de inoculante à base de *A. brasilense* coletados no momento de instalação do experimento e/ou aplicação dos tratamentos nos locais experimentais de Corbélia –Paraná e Marechal Cândido Rondon – Paraná.

Substrato	Unidade	Local	
		Corbélia	Marechal Cândido Rondon
Solo	UFC g ⁻¹ diazotróficos	2,00x10 ⁶	2,00x10 ⁶
Inoculação	UFC mL ⁻¹	4,33x10 ⁸	8,33x10 ⁷
Pulverização	<i>A. brasilense</i>	2,00x10 ⁷	1,00x10 ⁷

UFC: Unidades formadoras de colônia.

Tabela 3. Quadro de análise de variância e teste F baseado no quadrado médio dos atributos analisados no ensaio. Corbélia – PR.

Fonte Variação	Bioativador	Inoculação	Interação	Média	Erro	CV (%)
Morfometria estádio V8						
Comprimento planta	392,00**	167,25**	64,08	85,37	32,65	6,69
Comprimento colmo	11,64*	16,52**	3,40	19,67	2,62	8,23
Diâmetro coleto	30,42**	19,73**	1,04	20,56	2,49	7,68
Matéria seca colmo	6,89**	3,51**	0,82	8,10	0,58	9,41
Matéria seca folhas	21,35**	4,73*	1,89	10,76	1,63	10,02
Matéria seca total	52,50**	16,27**	5,02	18,87	3,21	9,50
Área foliar	42,15	28,00	8,27	34,77	11,31	9,68
Morfometria estádio Vt						
Comprimento planta	385,03*	129,03	80,11	253,90	61,54	3,09
Comprimento colmo	220,50	54,79	59,50	210,06	59,94	3,69
Diâmetro coleto	24,32*	13,37	6,29	31,79	5,40	7,31
Matéria seca colmo	4359,21**	703,92	287,76	118,29	352,48	15,87
Matéria seca folhas	281,85**	78,37*	19,70	45,24	22,74	10,54
Matéria seca total	6857,96**	1248,5	450,10	163,53	536,04	14,16
Área foliar	1134,37*	269,23	324,83	101,92	171,40	12,85
Morfometria estádio R3						
Comprimento planta	13,78	19,86	58,11	258,21	93,26	3,74
Comprimento colmo	28,12	10,83	180,45	210,50	71,91	4,03
Diâmetro coleto	71,10**	7,09	2,67	30,64	7,52	8,95
Matéria seca colmo	398,6	590,05	138,67	118,49	267,23	13,80
Matéria seca folhas	171,49*	51,97	15,49	48,86	30,75	11,35
Matéria seca total	6788,16**	2691,76*	1023,43	270,23	709,44	9,86
Área foliar	250,09	142,14	47,41	110,86	158,24	11,35
Teor foliar de nutrientes						
Nitrogênio	4,74	0,77	4,24	27,94	5,12	8,10
Fósforo	0,16	0,01	0,10	2,88	0,08	10,06
Potássio	1,22	11,63	33,22	21,28	13,46	17,24
Teor de nutrientes nos grãos						
Nitrogênio	2,35	1,09	0,74	10,77	0,80	8,32
Fósforo	0,11	0,03	0,02	2,71	0,03	6,49
Potássio	0,03	0,03	0,08	5,76	0,04	3,67
Componentes de produção e produtividade						
Comprimento espiga	0,03	0,12	0,25	18,77	0,15	2,13
Diâmetro espiga	0,25	0,52	0,16	49,26	0,73	1,75
Fileira de grãos	0,005	0,02	0,55	14,15	0,24	3,48
Grãos por fileira	1,11	0,07	1,26	42,03	0,58	1,82
Massa mil grãos	6,28	90,04	177,18	295,35	77,52	2,98
Impurezas	3,51**	0,55	1,29**	1,20	0,23	40,40
Umidade	0,39	5,08**	1,97	21,48	0,81	4,21
Descontos	2,77	8,51**	3,20	9,76	1,15	11,01
Produtividade	0,004	1,34	0,22	13,91	0,56	5,39
Índice colheita	0,01	0,0007	0,005	0,50	0,002	10,20

**significativo a 1% pelo teste F; *significativo a 5% pelo teste F; CV: coeficiente de variação.

Tabela 4. Quadro de análise de variância e teste F baseado no quadrado médio dos atributos analisados no ensaio. Marechal Cândido Rondon – PR.

Fonte Variação	Bioativador	Inoculação	Interação	Média	Erro	CV (%)
Morfometria estádio V8						
Comprimento planta	276,12**	49,54*	13,04	109,81	16,07	3,65
Comprimento colmo	38,28**	4,86	2,11	28,40	3,18	6,28
Diâmetro coleto	5,20	11,69*	5,87	24,65	2,83	6,83
Matéria seca colmo	4,46*	1,81	1,37	5,62	0,93	17,15
Matéria seca folhas	10,49*	4,57	1,47	10,28	1,83	13,17
Matéria seca total	28,65*	11,99	5,67	15,90	5,24	14,39
Área foliar	99,95*	29,27	9,75	33,44	14,53	11,40
Morfometria estádio Vt						
Comprimento planta	712,53*	27,19	49,36	224,21	132,59	5,14
Comprimento colmo	603,78*	10,44	10,61	184,90	130,56	6,18
Diâmetro coleto	34,44	9,57	11,29	30,61	7,17	8,75
Matéria seca colmo	2213,12**	91,78	242,49	88,54	126,51	12,7
Matéria seca folhas	360,12**	32,50	54,30	46,12	20,74	9,87
Matéria seca total	4358,74**	224,89	522,41	134,66	230,82	11,28
Área foliar	2293,06**	200,03	377,13	116,43	186,84	11,74
Morfometria estádio R3						
Comprimento planta	157,53	34,36	32,28	250,90	52,87	2,90
Comprimento colmo	136,12	14,45	30,45	219,93	47,06	3,25
Diâmetro coleto	31,60*	2,91	1,55	28,90	4,39	7,25
Matéria seca colmo	1778,31**	78,59	37,61	103,04	199,68	13,71
Matéria seca folhas	213,15**	41,81	10,65	46,62	20,49	9,71
Matéria seca total	3943,16*	421,59	192,70	256,74	762,23	10,75
Área foliar	1280,43**	265,43*	48,64	104,46	85,80	8,87
Teor foliar de nutrientes						
Nitrogênio	0,59	3,91	3,28	26,82	2,40	5,78
Fósforo	0,0009	0,24	0,30*	3,44	0,84	8,45
Potássio	4,03	4,76	1,96	17,80	3,14	9,96
Teor de nutrientes nos grãos						
Nitrogênio	0,004	1,16	0,24	11,87	0,96	8,25
Fósforo	0,01	0,03	0,003	2,73	0,06	9,01
Potássio	0,01	0,11	0,07	5,94	0,07	4,61
Componentes de produção e produtividade						
Comprimento espiga	0,36	0,08	1,27	47,48	1,16	2,27
Diâmetro espiga	0,06	0,31	0,12	18,96	0,28	2,82
Fileira de grãos	0,005	0,32	0,06	14,57	0,19	3,04
Grãos por fileira	0,43	0,27	0,13	45,27	0,37	1,34
Massa mil grãos	0,004	113,58	12,74	284,73	98,44	3,48
Impurezas	0,51	2,36	3,06	1,72	1,32	66,49
Umidade	6,47*	2,31	2,85	9,81	1,03	10,35
Descontos	0,51	2,36	3,06	1,72	1,32	66,49
Produtividade	27,59**	1,09	0,71	13,84	1,42	8,59
Índice colheita	0,004	0,001	0,004	0,55	0,004	11,42

**significativo a 1% pelo teste F; *significativo a 5% pelo teste F; CV: coeficiente de variação.

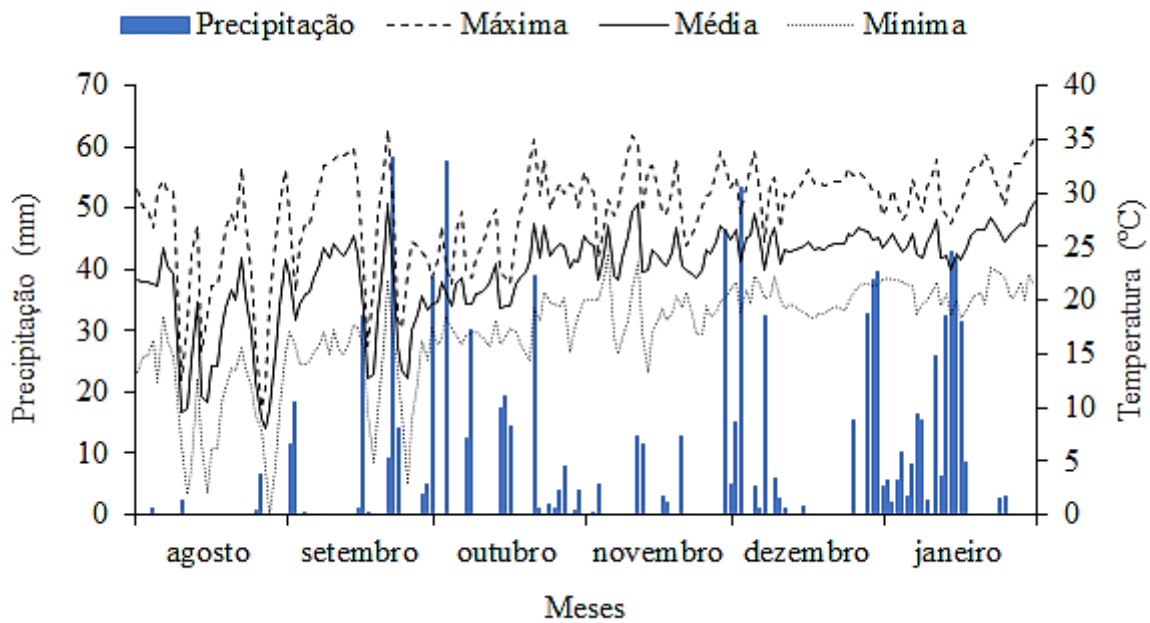


Figura 1. Precipitação, temperatura máxima, mínima e média no período compreendido entre agosto de 2013 a janeiro de 2014. Corbélia – PR

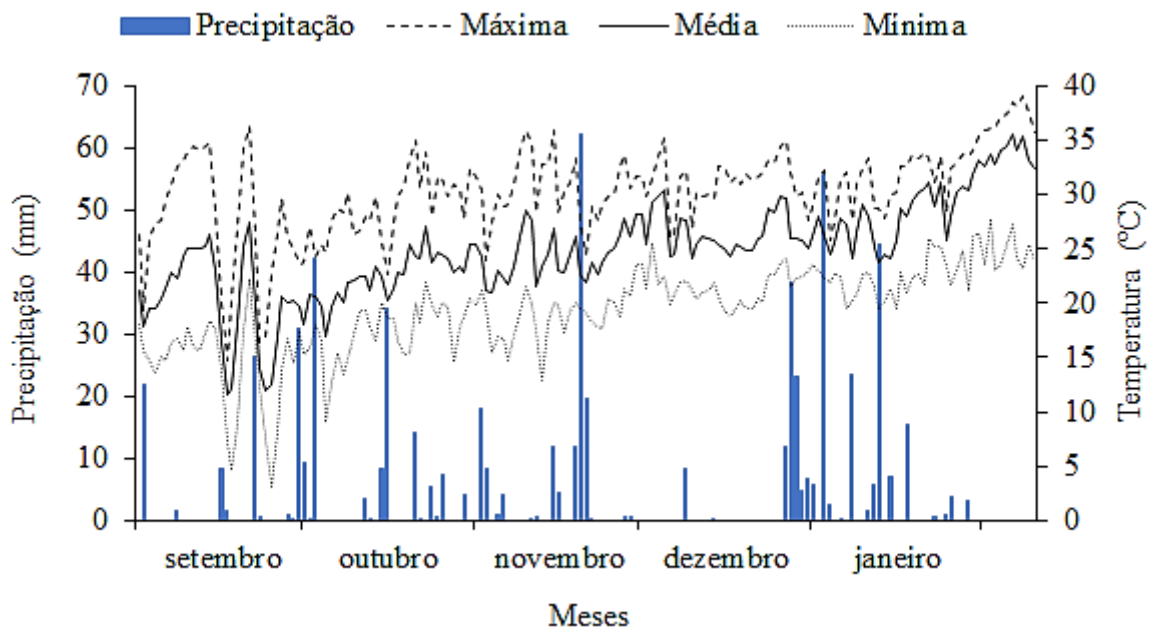


Figura 2. Precipitação, temperatura máxima, mínima e média no período compreendido entre setembro de 2013 a fevereiro de 2014. Marechal Cândido Rondon – PR.

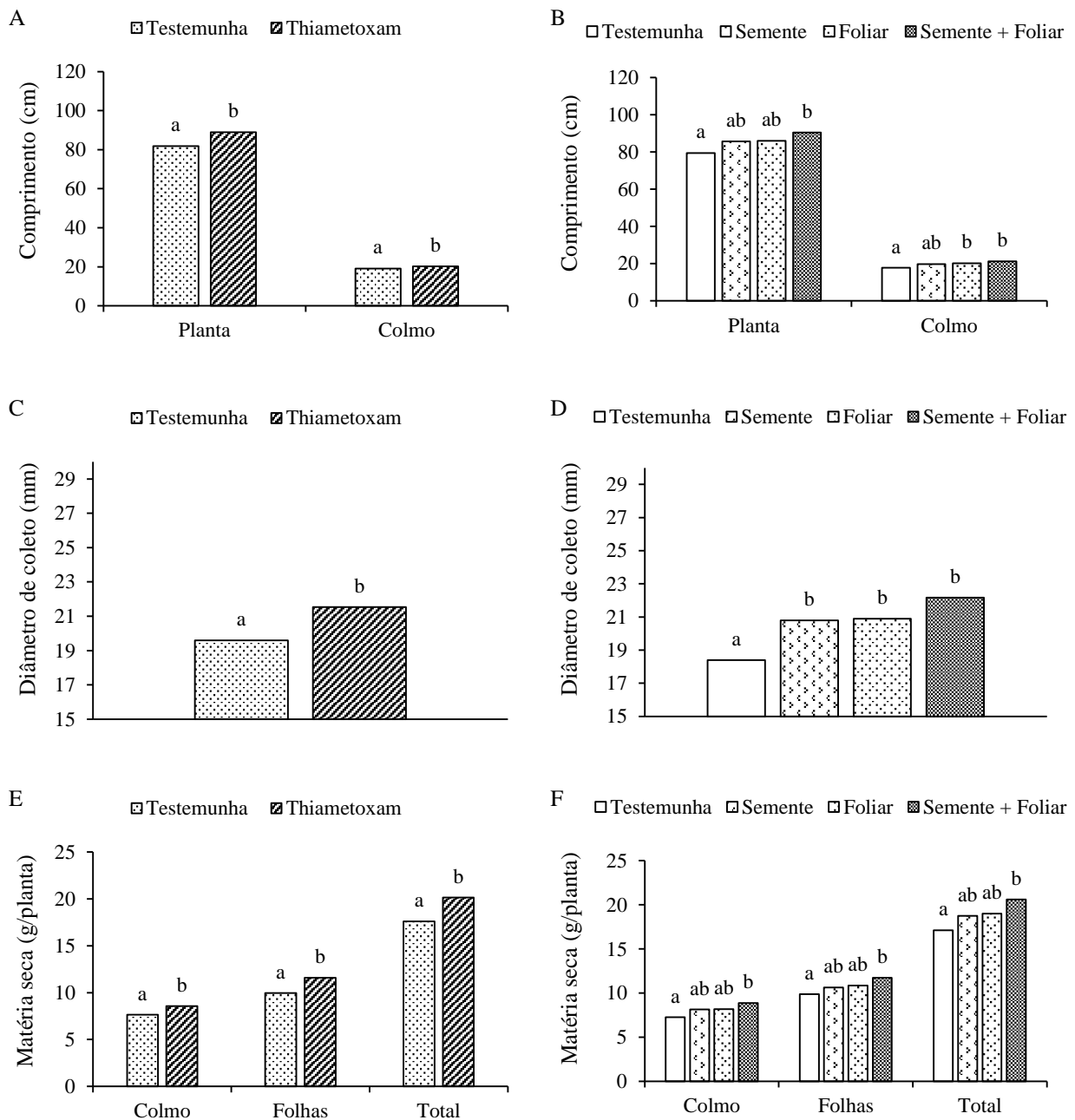


Figura 3. Atributos morfométricos e acúmulo de massa da cultura do milho no estágio V8 submetida ao tratamento de sementes com tiametoxam, inoculação via semente e/ou pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* AbV5+AbV6. Corbélia – PR. Colunas seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

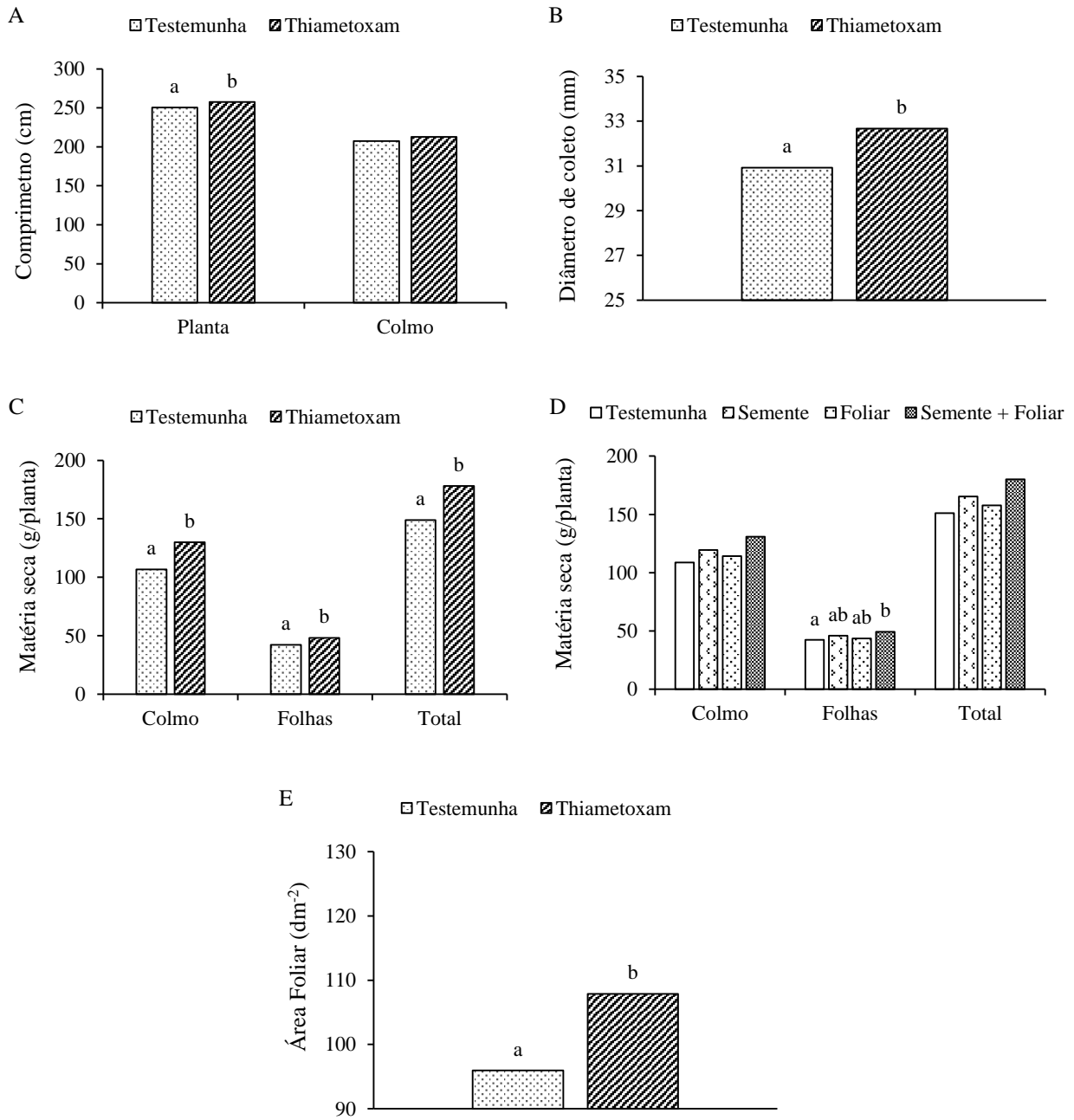


Figura 4. Atributos morfométricos e acúmulo de massa da cultura do milho no estágio Vt submetida ao tratamento de sementes com tiametoxam, inoculação via semente e/ou pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* AbV5+AbV6. Corbélia – PR. Colunas seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

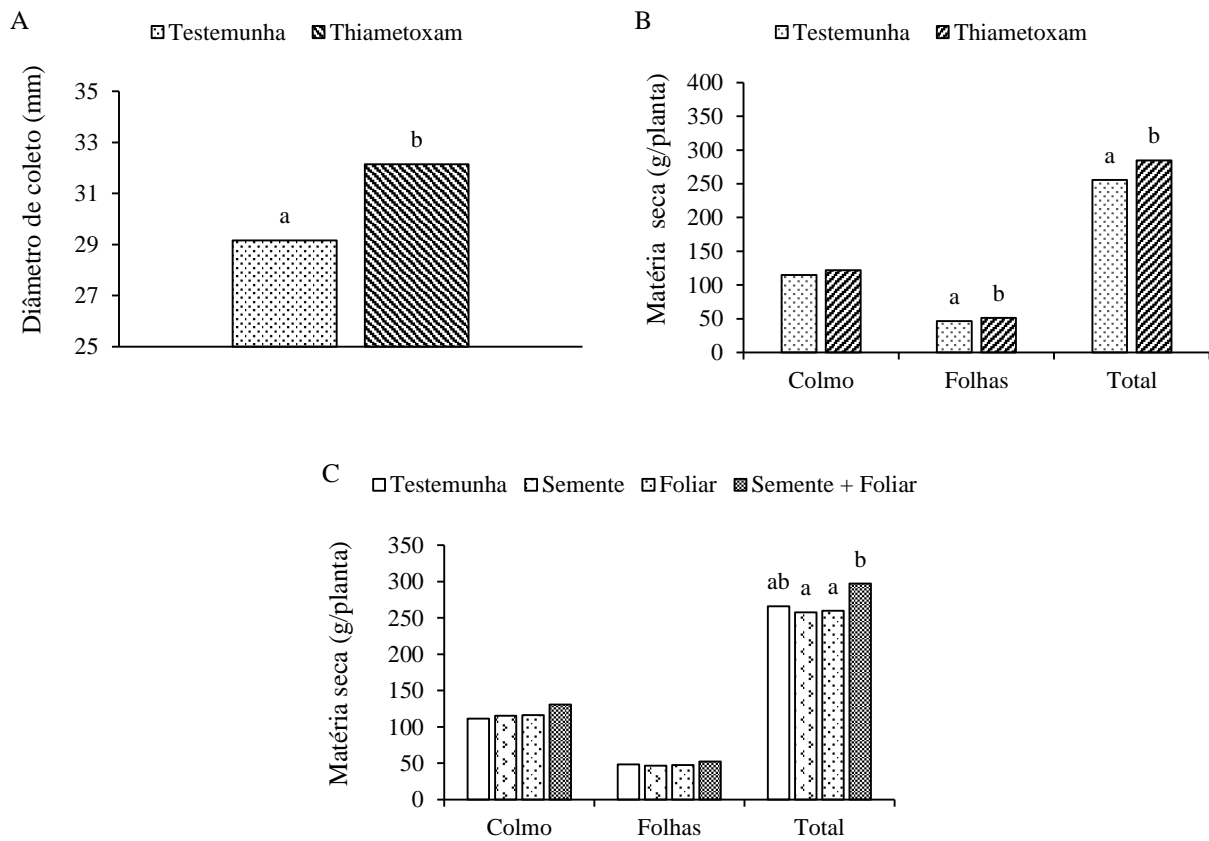


Figura 5. Atributos morfométricos e acúmulo de massa da cultura do milho no estágio R3 submetida ao tratamento de sementes com tiametoxam, inoculação via semente e/ou pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* AbV5+AbV6. Corbélia – PR. Colunas seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

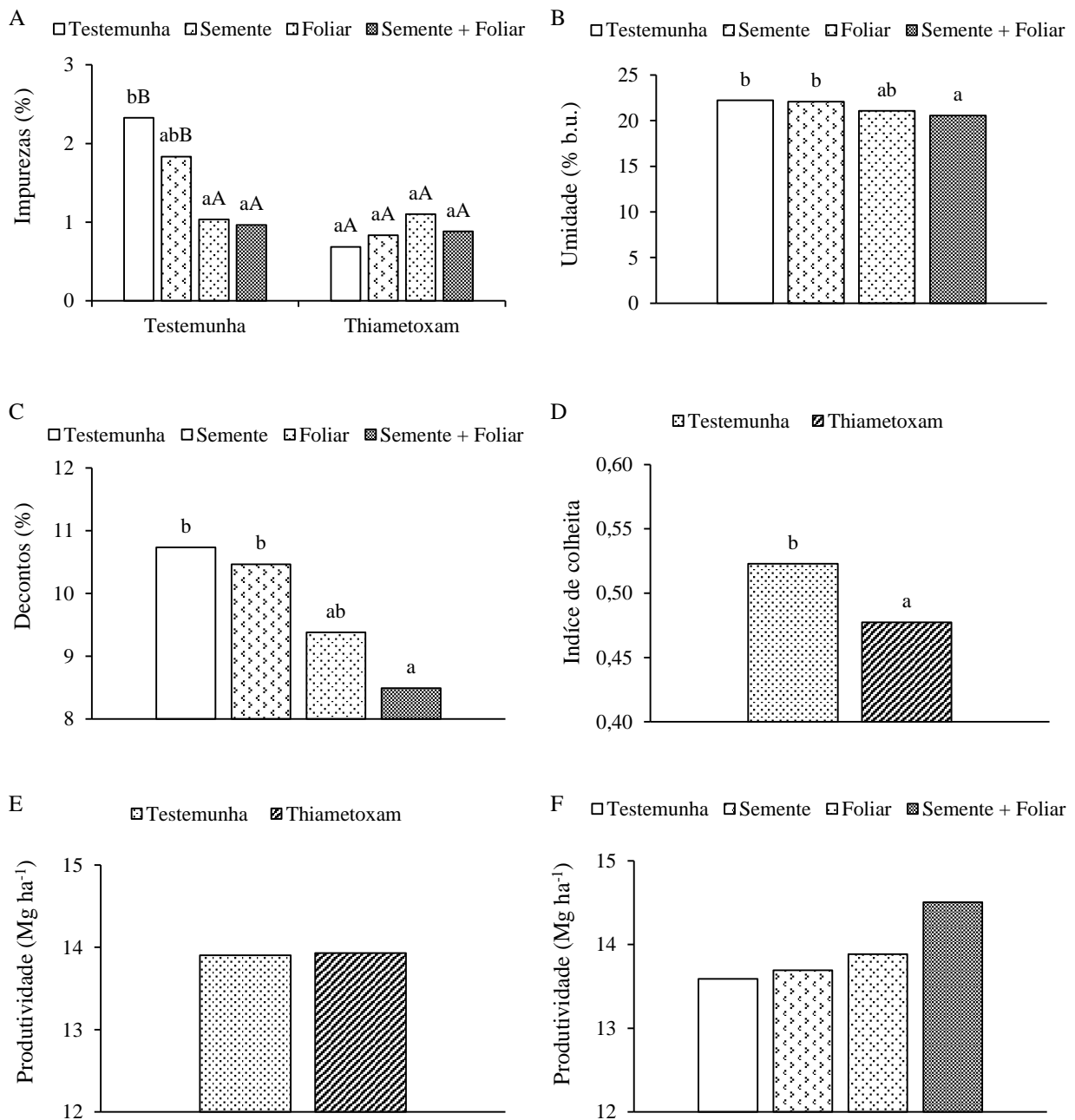


Figura 6. Porcentagem de impurezas, teor de umidade, porcentagem de descontos, índice de colheita e produtividade da cultura do milho submetida ao tratamento de sementes com tiametoxam, inoculação via semente e/ou pulverização foliar com *Azospirillum brasilense* AbV5+AbV6. Corbélia – PR. Colunas seguidas de letras distintas, maiúsculas para tratamento de sementes com tiametoxam e minúsculas para inoculação via semente e/ou pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* AbV5+AbV6, diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

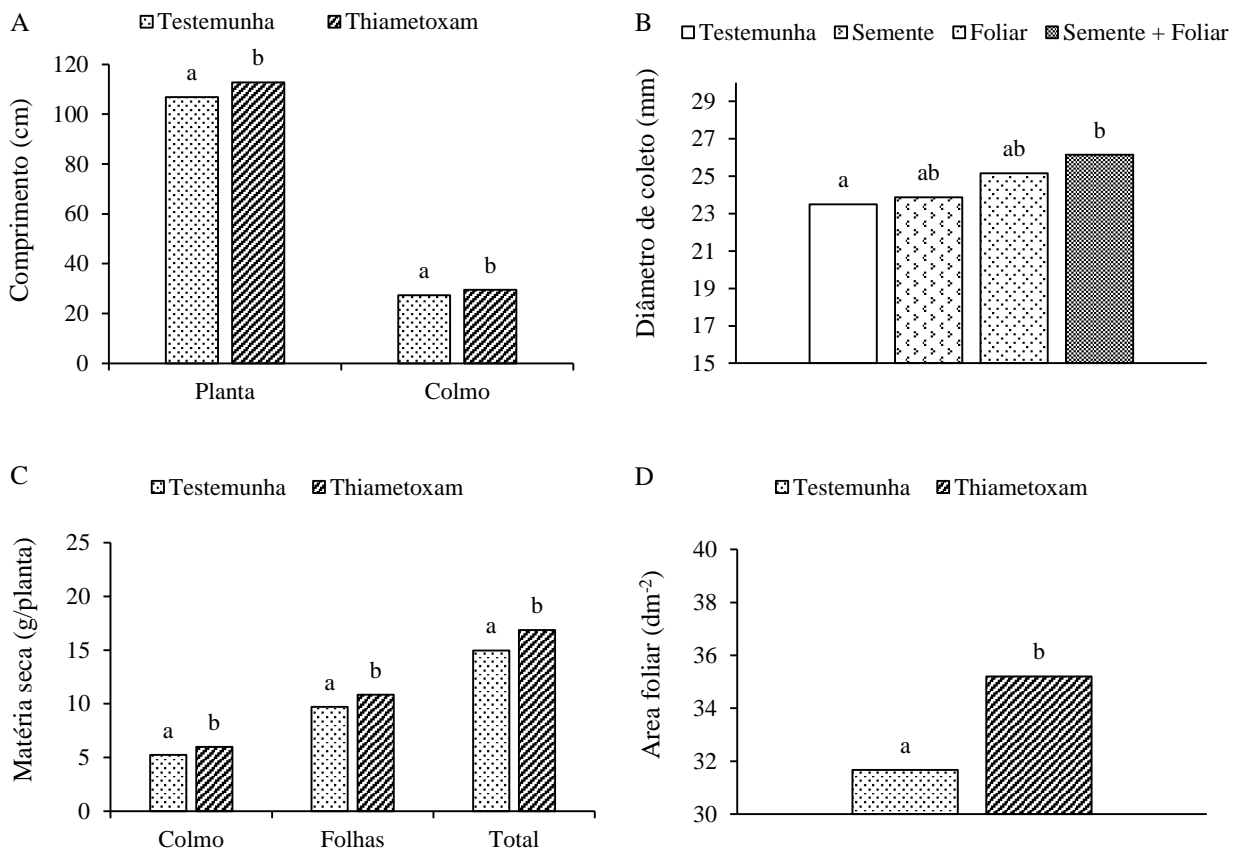


Figura 7. Atributos morfométricos e acúmulo de massa da cultura do milho no estágio V8 submetida ao tratamento de sementes com tiametoxam, inoculação via semente e/ou pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* AbV5+AbV6. Marechal Cândido Rondon – PR. Colunas seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

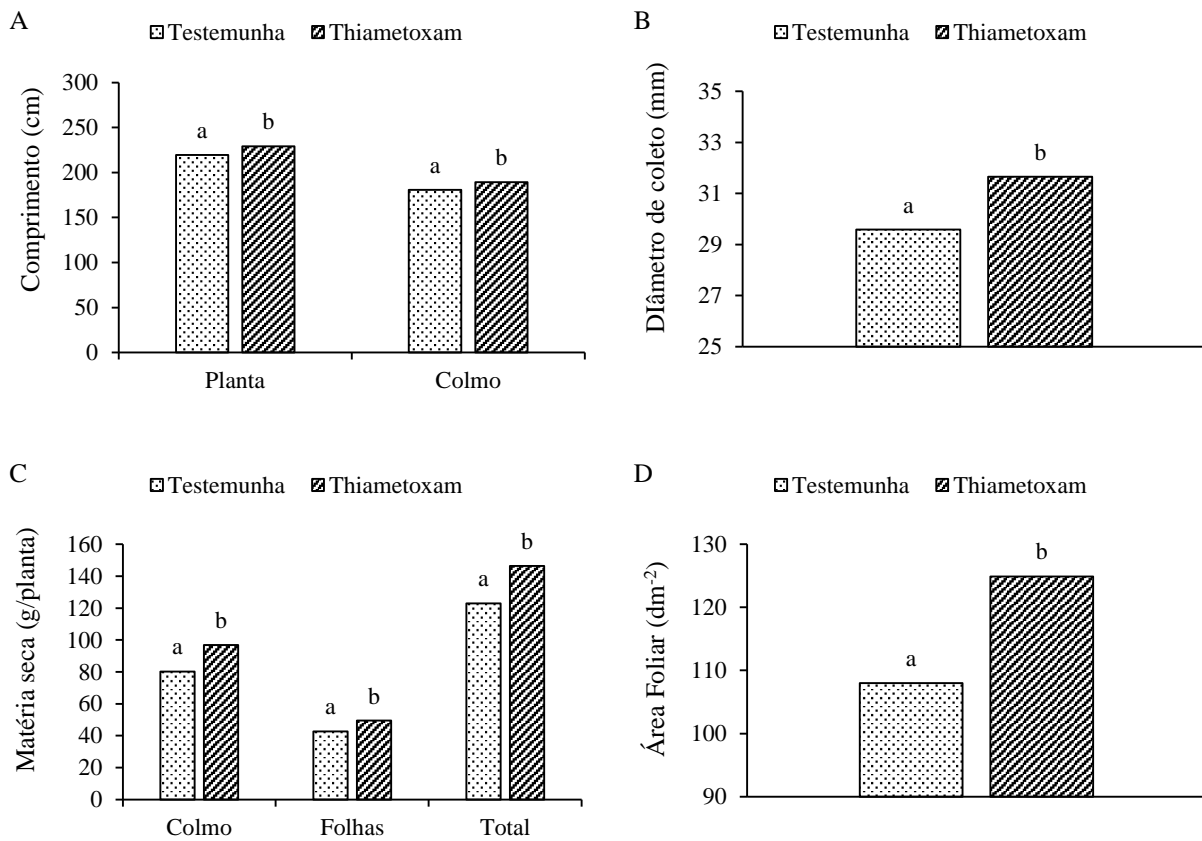


Figura 8. Atributos morfométricos e acúmulo de massa da cultura do milho no estágio Vt submetida ao tratamento de sementes com tiametoxam, inoculação via semente e/ou pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* AbV5+AbV6. Marechal Cândido Rondon – PR. Colunas seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

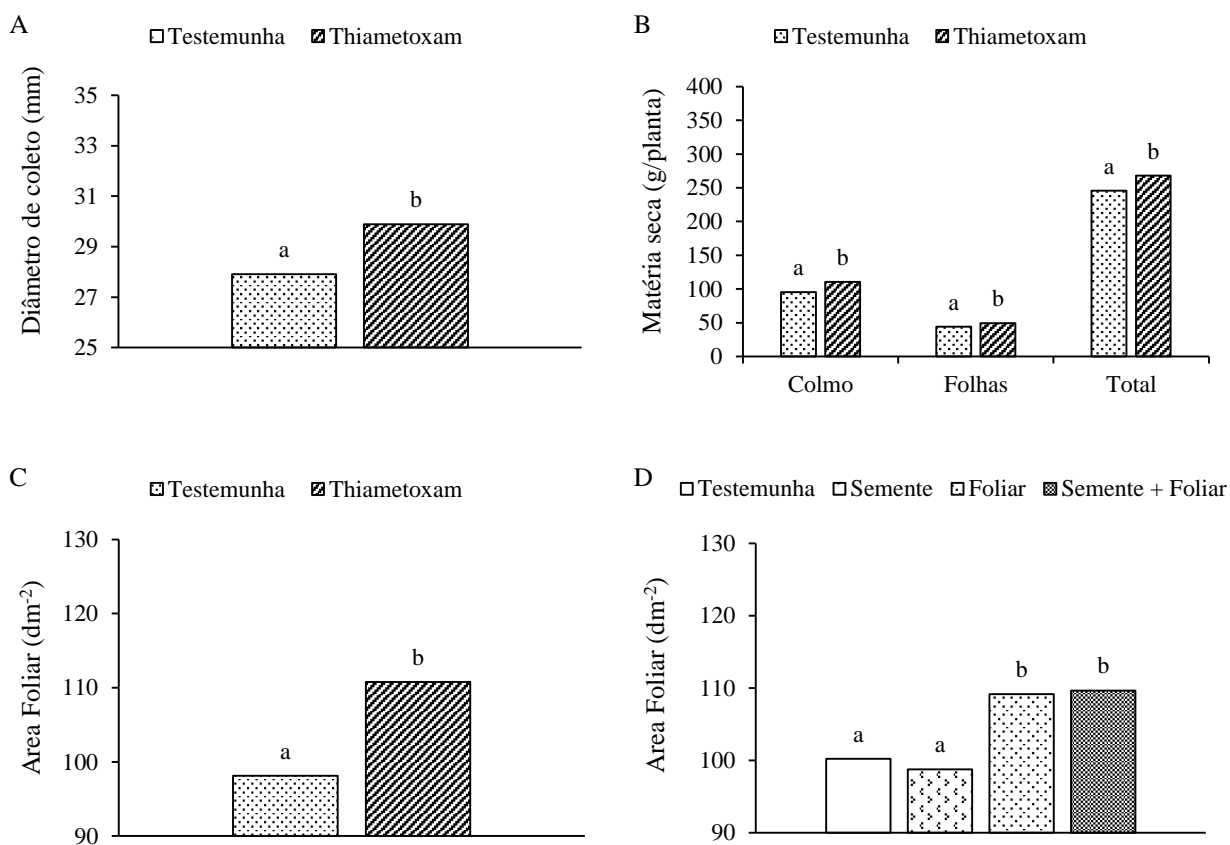


Figura 9. Atributos morfométricos e acúmulo de massa da cultura do milho no estágio R3 submetida ao tratamento de sementes com tiametoxam, inoculação via semente e/ou pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* AbV5+AbV6. Marechal Cândido Rondon – PR. Colunas seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

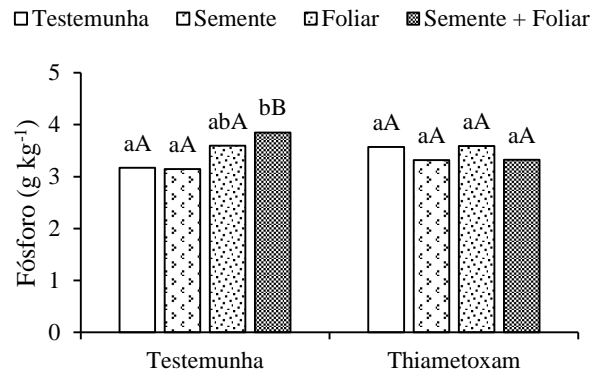


Figura 10. Teor de fósforo no tecido foliar da cultura do milho submetida ao tratamento de sementes com tiametoxam, inoculação via semente e/ou pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* AbV5+AbV6. Marechal Cândido Rondon – PR. Colunas seguidas de letras distintas, maiúsculas para tratamento de sementes com tiametoxam e minúsculas para inoculação via semente e/ou pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* AbV5+AbV6, diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

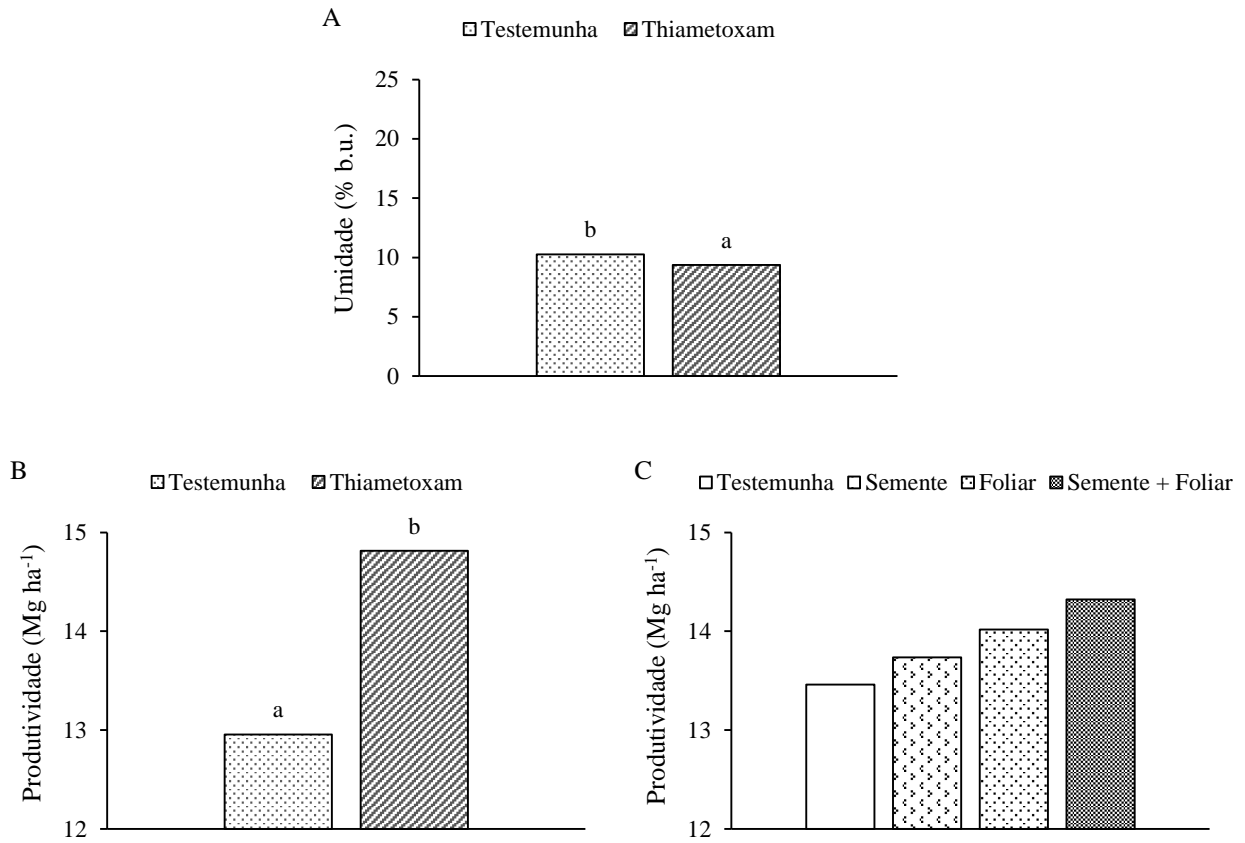


Figura 11. Teor de umidade e produtividade da cultura do milho submetida ao tratamento de sementes com tiametoxam, inoculação via semente e/ou pulverização foliar de *Azospirillum brasilense* AbV5+AbV6. Marechal Cândido Rondon – PR. Colunas seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A utilização de tiametoxam no tratamento de sementes apresenta toxicidade ao *A. brasilense*, ocasionando redução da sua população. Contudo, mesmo na presença do bioativador, a inoculação de sementes com *A. brasilense* resulta em incrementos significativos na qualidade fisiológica de plântulas de milho.

A dose de 28 mg de tiametoxam por 60.000 sementes quando combinada com a inoculação com *A. brasilense*, atua sinergicamente, apresentando melhores resultados de crescimento radicular e parte aérea no crescimento inicial das plântulas.

Em campo, o tiametoxam promove incrementos na morfometria e acúmulo de matéria seca ao longo do ciclo do milho, influenciando positivamente a produtividade de grãos em condições maiores de estresse, assim como reduz a umidade e impurezas da massa de grãos de milho.

A utilização conjunta da inoculação via semente com a pulverização foliar de *A. brasilense* eleva o crescimento e acúmulo de matéria seca em órgãos da parte aérea do milho, sendo essas alterações dependentes das condições climáticas. Redução no teor de umidade, impurezas e descontos da massa de grãos, assim como incrementos dos teores foliares de fósforo são resultados da inoculação com *A. brasilense*, contudo sem apresentar alterações na produtividade do milho.

A combinação das tecnologias de bioativadores e bactérias promotoras de desenvolvimento vegetal podem ser efetuadas, visto que ambas apresentam resultados positivos no potencial produtivo da cultura do milho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBO, S.; LEV-YADUN, S.; GOPHER, A. Agricultural Origins: Centers and Noncenters; A Near Eastern Reappraisal. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, p. 317–328, 2010.

AFIFI, M. et al. Maize (*Zea mays*) seeds can detect above-ground weeds; thiamethoxam alters the view. **Pest Management Science**, v. 4, n. November, 2014.

ALEN'KINA, S. A.; NIKITINA, V. E. Effect of lectins from *Azospirillum brasilense* to peroxidase and oxalate oxidase activity regulation in wheat roots. **Biology Bulletin**, v. 37, n. 1, p. 105–108, 2010.

ALMEIDA, A. DA S. et al. Bioativador no desempenho fisiológico de sementes de cenoura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 3, p. 87–95, 2009.

ALMEIDA, A. DA S. et al. Desempenho fisiológico de sementes de aveia-preta tratadas com thiametoxam. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1619–1628, 30 out. 2012.

ANDALÓ, V. et al. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: *Pseudococcidae*). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 4, p. 463–467, ago. 2004.

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

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. **Microbial Ecology**, v. 29, p. 269–281, 1995.

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

BLAHA, D. et al. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, n. 3, p. 455–470, 2006.

BUSATO, J. G. et al. Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 2, p. 206–212, 2010.

CARVALHO, N. L.; PERLIN, R. S.; COSTA, E. C. Thiametoxam em tratamento de sementes. **Monografias Ambientais**, v. 2, n. 2, p. 158–175, 2011.

CASSÁN, F. et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 12–19, 2009.

CASTRO, P. R. C. **Agroquímicos de controle hormonal na agricultura tropical**. Piracicaba: ESALQ, 2006. p. 46

CASTRO, P. R. DE C. E et al. Análise da atividade reguladora de crescimento vegetal de Tiametoxam através de biotestes. **Publicatio UEPG - Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 13, n. 3, p. 25–29, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: CONAB, 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: Conab, 2015.

CONCEIÇÃO, P. M. et al. Germinação e vigor de sementes de milho recobertas e viabilidade do inóculo durante o armazenamento. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p. 765–772, 2009.

CREUS, C. M. et al. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, v. 221, n. 2, p. 297–303, 2005.

CRUZ, J. C. Cultivo do Milho: Apresentação. **Sistemas de produção**, v. 1, n. 8, 2012.

DAVIDSON, J. Plant Beneficial Bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 6, p. 282–286, 1988.

DOBBELAERE, S. et al. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, n. 4, p. 284–297, 2002.

DOBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian journal of microbiology**, v. 22, n. 10, p. 1464–73, out. 1976.

FERNANDES, M. F. et al. Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. **Revista de Ciências Agrárias - Amazon Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 55, n. 4, p. 318–326, 2012.

GOMEZ, F. et al. Response of *Azospirillum brasilense* to the pesticides bromopropylate and methidathion on chemically defined media and dialysed-soil media. **Ecotoxicology**, v. 47, n. 1, p. 43–47, 1998.

GROHS, M. et al. Desempenho de cultivares de arroz com uso de reguladores de crescimento, em diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 776–783, 2012.

HAMDIA, M. A. E.; SHADDAD, M. A. K.; DOAA, M. M. Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. **Plant Growth Regulation**, v. 44, n. 2, p. 165–174, 2004.

HARLAN, J. R. Agricultural origins: centers and noncenters. **Science (New York, N.Y.)**, v. 174, p. 468–474, 1971.

HUERGO, L. F. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. DE (Eds.). **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. 1. ed. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 276.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413–425, 2010.

- KLEIN, J. et al. Qualidade nutricional de plântulas de cultivares de trigo submetidas à inoculação com *Azospirillum*, bioestimulante e triadimenol. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. Suplemento, p. 59–69, 2012.
- MACEDO, W. R. et al. Responses in root growth, nitrogen metabolism and nutritional quality in *Brachiaria* with the use of thiamethoxam. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 205–211, 2013.
- MACEDO, W. R.; CASTRO, P. R. D. C. E. Thiamethoxam: Molecule moderator of growth, metabolism and production of spring wheat. **pesticide**, v. 100, n. 3, p. 299–304, 2011.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. p. 495
- MARTINS, R. G. et al. Thiamethoxam on the histological characteristics of sugarcane young roots. **Ciência Rural**, v. 42, n. 11, p. 1936–1940, 2012.
- MASCIARELLI, O. et al. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590–597, out. 2013.
- MATSUOKA, Y. et al. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 6080–6084, 2002.
- MIRANDA, R. A.; DUARTE, J. O.; GARCIA, J. C. Cultivo do milho: Economia da produção. **Sistemas de produção**, v. 1, n. 8, 2012.
- NETO, F. J. D. et al. Desenvolvimento e produtividade do milho verde safrinha em resposta à aplicação foliar com *Azospirillum brasilense*. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, n. 17, p. 1030–1040, 2013.
- NOVAKOWISKI, J. H. et al. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. Suplp, p. 1687–1698, 2011.
- OLIVEIRA, A. A. S.; ARRUDA, T. F.; BACH, E. E. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **ConScientiae Saúde**, v. 3, p. 29–35, 2004.
- OMAR, S. A.; ABD-ALLA, M. H. Effect of pesticides on growth, respiration and nitrogenase activity of *Azotobacter* and *Azospirillum*. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 326–8, 1992.
- PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológico do grão de milho. In: CRUZ, J. C. et al. (Eds.). **A Cultura do Milho**. 1. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. p. 517.
- PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 125, n. 1, p. 25–35, 2008.
- PEREIRA, J. M.; FERNANDES, P. M.; VELOSO, V. R. S. Efeito fisiológico do inseticida thiamethoxam na cultura da cana-de-açúcar. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 1, p. 159–164, 2010.

PERRIG, D. et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143–50, 2007.

PORTUGAL, J. R. et al. **Inoculação com *Azospirillum brasilense* Via Foliar Associada à Doses de Nitrogênio em Cobertura na Cultura do Milho** XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO. **Anais...Águas de Lindóia**: 2012

PORTUGAL, J. R. et al. **Inoculação via foliar com *Azospirillum brasilense* associada a doses de nitrogênio em cobertura na cultura do milho safrinha** XII Seminário Nacional Milho Safrinha: Estabilidade e Produtividade. **Anais...Dourados**: 2013

PROCÓPIO, S. . et al. Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. **Planta Daninha**, v. 29, n. spe, p. 1079–1089, 2011.

QUADROS, P. D. DE et al. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014.

RADWAN, T. E.-S. E.-D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 987–994, 2004.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitohermônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 2, p. 103–113, 2004.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552–555, 2004.

SOARES, B. J. A. et al. **Ação do Cruiser (Thiamethoxam) sobre a germinação de milho (*Zea mays* L.): Proteção contra efeitos da salinidade** V Congresso Iteano de Iniciação Científica. **Anais...Botucatu**: 2008

SOARES, V. N. et al. Physiological performance of rice seeds treated with thiamethoxam or rhizobacteria under different temperatures. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 186–193, 2014.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 487–506, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 918

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016–1024, 1979.