

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

ADRIANO MITIO INAGAKI

**TROCAS GASOSAS E MORFOMETRIA DE PLANTAS DE MILHO INOCULADAS
COM *Azospirillum brasilense* E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES SOB
ADUBAÇÃO FOSFATADA**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2017

ADRIANO MITIO INAGAKI

**GAS EXCHANGES AND MORPHOMETRY OF INOCULATED CORN PLANTS
WITH *Azospirillum brasilense* AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI UNDER
PHOSPHATE FERTILIZATION**

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

Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

Coorientadores: Prof. Dr. José Renato Stangarlin
Prof. Dr. Leandro Rampim

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2017

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

I35t Inagaki, Adriano Mitio
Trocas gasosas e morfometria de plantas de milho inoculadas com
Azospirillum brasilense e fungos micorrízicos arbusculares sob adubação
fosfatada / Adriano Mitio Inagaki. – Marechal Cândido Rondon, 2017.
81 f.

Orientador: Dr. Vandeir Francisco Guimarães
Coorientadores: Dr. José Renato Stangarlin
Dr. Leandro Rampim

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2017.

1. Milho. 2. Micorriza. 3. Nitrogênio - Fixação. I. Guimarães, Vandeir
Francisco. II. Stangarlin, José Renato. III. Rampim, Leandro. IV. Título.

CDD 22.ed. 633.15
CIP-NBR 12899

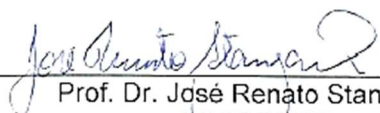
Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini-Leitzke CRB-9/539

ADRIANO MITIO INAGAKI

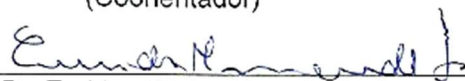
TROCAS GASOSAS E MORFOMETRIA DE PLANTAS DE MILHO
INOCULADAS COM *Azospirillum brasilense* E FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES SOB ADUBAÇÃO FOSFATADA

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

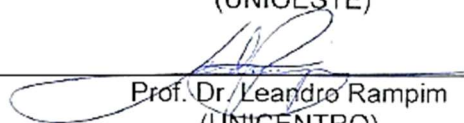
APROVADA: 22 de fevereiro de 2017



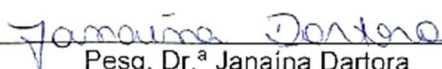
Prof. Dr. José Renato Stangarlin
(UNIOESTE)
(Coorientador)



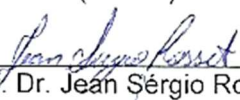
Prof. Dr. Eurides Küster Macedo Júnior
(UNIOESTE)



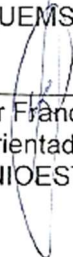
Prof. Dr. Leandro Rampim
(UNICENTRO)
(Coorientador)



Pesq. Dr.ª Janaina Dartora
(IAPAR)



Prof. Dr. Jean Sérgio Rosset
(UEMS)



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

À Deus,

Aos meus amados: Pais, José Haryoshi Inagaki e Ana Kiyoko Umeda Inagaki

Irmãos, Aléx Takao Inagaki e Meire Akiko Inagaki

Thaísa Muriel Mioranza

Aos meus amigos

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser uma pessoa abençoada, com o teu manto, sempre me protegeu e me manteve cercado de pessoas boas, novas famílias.

Minha amada Família que sempre me apoiou. Meu pai, por me ensinar sobre caráter, educação e humildade. Minha mãe que sempre acreditou no meu potencial, me dando muito amor e carinho. Meu querido irmão que sempre honrou seu caráter através de suas conquistas pessoais, sendo um exemplo de irmão e companheiro. Minha irmã, mesmo com seu jeito sistemático sempre me ajudou a ser uma pessoa melhor.

À minha amada Thaís Muriel Mioranza, com seu jeito simples, mudou minha vida de forma significativa.

Onde criei um novo laço familiar, agradeço à família Mioranza, em especial Divo Mioranza e Noeli Mioranza, que me abraçaram e confortaram em seu lar.

Por sempre me fazer sentir um bom profissional, um bom estudante e por me orientar durante poucos 5 anos. Aqui deixo um agradecimento especial ao meu orientador e amigo Vandeir Francisco Guimarães.

Coorientadores: Professor Dr. Rampim, pela coorientação me passando muitas de suas experiências profissionais. Por todas sugestões e ensinamentos em sala de aula, agradeço de forma imensurável o Professor Dr. José Renato.

Aos meus amigos e colegas pertencentes ao Laboratório de Fisiologia Vegetal, Luiz Offemann, Andre Battistus, Lucas Bulegon, Graciela Dalastra, Tiago Hachmann, Mônica Anghinoni, Marcos Sarto e Jaque Sarto, Moratelli e Debora, Aline Pomini, Débora Kestring Klein, Jeferson Klein e Gabizinha.

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

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

*“O filé mignon da vida,
A vida que de fato vale a pena,
É a vida assumidamente dedicada ao outro,
Lição de Jesus”*
(Prof. Clóvis de Barros Filho)

RESUMO

INAGAKI, Adriano Mitio. Dr. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro de 2017. **Gas exchanges and morphometry of inoculated corn plants with *Azospirillum brasilense* and Arbuscular Mycorrhizal Fungi under phosphate fertilization.** Orientador: Vandeir Francisco Guimarães. Coorientadores: José Renato Stangarlin e Leandro Rampim.

O objetivo do trabalho foi analisar o desenvolvimento e trocas gasosas de plantas de milho conduzidas sob adubação fosfatada e inoculação de *Azospirillum brasilense* em associação aos fungos micorrízicos arbusculares (FMA), bem como os efeitos residuais do *A. brasilense* e do fósforo sob segundo cultivo de milho em resposta a adubação nitrogenada de cobertura. Em casa de vegetação, no primeiro experimento houve dois cultivos de milho. Para o primeiro cultivo utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições, em esquema fatorial 2x4. Testou-se a inoculação de *A. brasilense* e tratamento sem inoculação, e quatro doses de adubação fosfatada (0; 150; 300 e 450 mg dm⁻³), desprovido da adubação nitrogenada. No segundo cultivo foi avaliado o efeito residual da inoculação e doses de P, obtendo o mesmo esquema fatorial (2x4) composto pelos mesmos tratamentos, sob cultivo sucessivo de milho, com adubação nitrogenada de cobertura. No segundo experimento utilizou-se delineamento em blocos ao acaso em esquema fatorial de 2x5 e quatro repetições. O primeiro fator foi composto pela presença e ausência de adubação fosfatada e o segundo pela combinação da inoculação com *A. brasilense* e espécies de FMA resultando nos seguintes tratamentos: sem inoculação; inoculação de *A. brasilense*; *A. brasilense*+*Acaulospora scrobiculata*; *A. brasilense*+*Claroideoglomus etunicatum*; e *A. brasilense*+*Gigaspora margarita*. Foram realizadas análises das seguintes variáveis: diâmetro de colmo, número de folhas, comprimento de plantas, volume de raiz, massa de matéria seca de folhas, colmo+bainha, raiz, área foliar e índice SPAD. Também se avaliou o teor foliar de N e P, população de bactérias diazotróficas endofíticas nas raízes e número de esporos de FMA no substrato. Avaliou-se ainda índices de trocas gasosas: taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), transpiração foliar (*E*), condutância estomática (*g_s*) e concentração interna de CO₂ (*C_i*). Com os resultados do primeiro experimento constatou-se que a inoculação de *A. brasilense* em sementes de milho associada à adubação fosfatada, sem adição de nitrogênio, proporcionou maior desenvolvimento de plantas aos 36 dias após emergência (DAE). Sob dose de 300 mg dm⁻³ de P, plantas de milho conduzidas com adubação nitrogenada de cobertura e população remanescente de *A. brasilense*, demonstraram efeito positivo em relação ao desenvolvimento da cultura. Em consequência do maior teor de P e clorofila foliar, as plantas apresentaram maior *A*, *E*, *g_s* e *C_i* resultando em maior eficiência no uso da água (*A/E*). No segundo experimento, os tratamentos de *A. brasilense*+*A. scrobiculata* e *A. brasilense*+*C. etunicatum* resultaram maior acúmulo no teor foliar de N na ausência da adubação fosfatada, comparado ao tratamento sem inoculação. A inoculação com *A. brasilense* de forma isolada aumentou o teor foliar de P quando comparado ao tratamento sem inoculação. A utilização da adubação fosfatada resultou em aumento nas trocas gasosas e em consequência, maior desenvolvimento de plantas. Raízes de plantas de milho submetido à adubação fosfatada apresentaram maior população de bactérias diazotróficas. No presente estudo, não foi observado esporos micorrízicos de *A. scrobiculata*, *C. etunicatum* e *G. margarita*, no substrato aos 30 DAE.

Palavras-chave: *Zea mays* L. Interação de microrganismos. Micorriza. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Fotossíntese. Fósforo.

ABSTRACT

INAGAKI, Adriano Mitio. Dr. State University of Western Paraná, in February de 2017. **Gas Exchanges and morphometry of inoculated corn plants with *Azospirillum brasilense* and Arbuscular Mycorrhizal Fungi under phosphate fertilization.** Advisor: Vandeir Francisco Guimarães. Co-Advisors: José Renato Stangarlin e Leandro Rampim.

The objective of this work was to analyze the development and gas exchange of maize plants under fertilization and inoculation of *Azospirillum brasilense* in Arbuscular Microrrhizal Fungi (AMF), as well as the residual effects of *A. brasilense* and for the production of phosphorus in corn. Response to nitrogen fertilization. In the greenhouse, no first experiment had two corn crops. For the first cultivation use the block design with four replications, in a 2x4 factorial scheme. Inoculation of *A. brasilense* and control and four doses of phosphate fertilization (0; 150; 300 and 450 mg dm⁻³) were tested, without nitrogen fertilization. In the second harvest, a residual effect of the inoculation and P doses was obtained, obtaining the same factorial scheme (2x4) composed of the same treatments, under successive maize cultivation, with nitrogen fertilization. In the second experiment, a randomized block design was used in a 2x5 factorial scheme and four replications. The first factor was the presence and absence of phosphate fertilization and the second factor was the combination of inoculation with *A. brasilense* and FMA species, resulting in the following treatments: control; Inoculation of *A. brasilense*; *A. brasilense* + *Acaulospora scrobiculata*; *A. brasilense* + *Claroideoglossum etunicatum*; E *A. brasilense* + *Gigaspora margarita*. Similar shapes of the following variables: stem diameter, leaf number, plant length, root volume, leaf dry matter mass, stem + hem, root, leaf area and SPAD index. Also evaluated were foliar content of N and P, populations of endophytic diazotrophic bacteria in the roots and number of AMF spores in the substrate. Net assimilation rate of CO₂ (*A*), leaf transpiration (*E*), stomatal conductance (*g_s*) and internal CO₂ concentration (*C_i*). With the results of the first experiment, the inoculation of *A. brasilense* on corn seeds associated with phosphate fertilization, without addition of nitrogen, resulted in a higher development of the plants at 36 days after emergence (AED). At a dose of 300 mg dm⁻³ of P, maize plants with nitrogen fertilizer coverage and the remaining population of *A. brasilense* had a positive effect in relation to the development of the crop. As a consequence of the higher content of P and leaf chlorophyll, the plants showed higher *A*, *E*, *g_s* and *C_i* resulting in higher water efficiency (*A/E*). In the second experiment, the treatments of *A. brasilense* + *A. scrobiculata* and *A. brasilense* + *C. etunicatum* resulted in a greater accumulation of leaf N in the absence of phosphate fertilization in relation to treatment without inoculation. The inoculation with increased insulation or foliar content of P when compared to the control treatment. The use of phosphate fertilization resulted in an increase in the gas exchange and, consequently, a greater development of plants. Roots of maize plants submitted to phosphate fertilization had a higher population of diazotrophic bacteria. In the present study, the mycorrhizal spores of *A. scrobiculata*, *C. etunicatum* and *G. margarita* were not observed on the substrate at 30 DAE.

Key words: *Zea mays* L. Interaction of microorganisms. Mycorrhiza. Plant growth promoting bacteria. Photosynthesis. Phosphorus.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A cultura do milho.....	15
2.2 Formas e dinâmica de fósforo no solo.....	16
2.3 Azospirillum brasilense e bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV).....	17
2.4 Ação de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cultivadas.....	19
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
4 ARTIGO 1 - Benefícios no crescimento e trocas gasosas de plantas de milho inoculadas com Azospirillum brasilense sob adubação fosfatada em cultivo sucessivo e adubação nitrogenada	28
5 INTRODUÇÃO.....	29
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
6.1 Local e delineamento experimental.....	30
6.2 Solo, inoculação de sementes e adubação fosfatada.....	31
6.3 Trocas gasosas	32
6.4 Avaliações morfobiométricas e teor foliar de N e P.....	34
6.5 Análise estatística	35
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
7.1 1º Cultivo.....	35
7.2 2º Cultivo.....	42
8 CONCLUSÕES	56
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
10 ARTIGO 2 - Impactos da interação entre Azospirillum brasilense e fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento do milho sob adubação fosfatada	61
11 INTRODUÇÃO.....	62
12 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
12.1 Local e delineamento experimental.....	64
12.2 Adubação e tratamentos de sementes	64
12.3 Trocas Gasosas	65
12.4 Avaliações morfobiométricas, índice SPAD e teores foliares de N e P	66
12.5 Quantificação de bactérias diazotróficas	66
12.6 Quantificação de esporos de FMA	67
12.7 Análise estatística	67

13 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
14 CONCLUSÕES	76
15 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
16 CONCLUSÕES GERAIS	79
17 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

1 INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais cultivados no mundo, fornecendo produto para o consumo tanto humano quanto animal. Em escala mundial a produção desta gramínea ocupa área de 181 milhões de hectares e produção total de 1037,93 milhões de toneladas, ao passo que o Brasil produzindo 86,5 milhões de toneladas, representa o segundo maior país produtor deste cereal, estando o EUA em primeiro lugar com 386,75 milhões de toneladas (USDA, 2017).

O cultivo de cereais demanda grandes quantidades de nutrientes para atingir altos rendimentos. A adição de fertilizantes sintéticos é a principal via utilizada pela agricultura convencional. Os nutrientes adicionados em cultivos de larga escala estão sujeitos a grandes perdas principalmente por lixiviação, volatilização e erosão do solo. Cerca de 50% do nitrogênio (N) adicionado como fertilizante é perdido pela lixiviação e volatilização. Especialmente em solos intemperizados, como ocorrem em grande parte da área cultivada no Brasil, o fósforo (P) possui forte grau de interação com o solo (GONÇALVES et al., 1985). Isto requer recomendação de altas doses deste nutriente em função de sua baixa eficiência de aproveitamento que está relacionada à elevada capacidade de adsorção pelo solo, notadamente sob culturas de ciclo curto, como o milho (BASTOS et al., 2010).

Apesar da cultura do milho possuir alta eficiência no uso de N e P (FRITSCHÉ-NETO et al., 2012), o enraizamento de plantas de milho deve apresentar desenvolvimento adequado para maior absorção de nutrientes do solo, sobretudo para elementos de baixa mobilidade como o P (ZHU; LYNCH, 2004). Nas últimas décadas, estudos sobre a utilização de microrganismos como fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (DANNEBERG et al., 1993; ZHU et al., 2012) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (DE SALOMONE; DÖBEREINER, 1996; DARTORA et al., 2016) tem sido hábeis para a exploração de seus efeitos sob a cultura do milho.

Os FMA pertencem ao filo Glomeromycota e são considerados microrganismos biotróficos, os quais se associam às raízes de plantas apresentando mutualismo, com desenvolvimento de hifas no solo que promovem maior absorção de água e nutrientes, importantes para o desenvolvimento das plantas (KIRIACHEK et al., 2009).

A inoculação de FMA *Glomus etunicatum* na cultura do milho proporciona plantas com maior taxa fotossintética e eficiência no uso da água, em consequência têm indicado maior resistência a ambientes desfavoráveis ao desenvolvimento, tal como o estresse hídrico (ZHU et al., 2012). Cozzolino; Di Meo; Piccolo, (2013), utilizando fosfato monocálcico, relataram maior

eficiência na absorção de P no solo, quando plantas de milho foram inoculadas com *Glomus intraradices*. Para este efeito pode-se considerar a produção de sideróforos e a exsudação de ácidos orgânicos que podem alterar a solubilidade de P. O principal mecanismo envolvido na solubilização de fosfatos pela microbiota do solo está associado à liberação de ácidos orgânicos, atuando nos fosfatos de Ca e Al (MASSENSINI et al., 2015).

A espécie *A. brasilense* é uma bactéria associativa endofítica facultativa capaz de colonizar regiões internas com preferência à rizosfera de plantas hospedeiras (BALDANI et al., 1997). Esta espécie promove o crescimento de plantas através da produção de fitohormônios como ácido indolacético (AIA) (BALOTA et al., 1995; MEHDIPOUR MOGHADDAM; EMTIAZI; SALEHI, 2012), giberelina (BOTTINI et al., 1989), citocinina (CACCIARI et al., 1989) e a inibição da produção de etileno (GLICK, 2005), possibilitando maior enraizamento e consequentemente maior aproveitamento de nutrientes como nitrogênio. As bactérias associativas presentes na rizosfera, como o *A. brasilense*, também apresentam características favoráveis à disponibilização de P às raízes, pela solubilização de fosfatos.

Ruíz-Sánchez et al. (2011) ao avaliarem o efeito da associação de *A. brasilense* e colonização de FMA em plantas de arroz, relataram que os efeitos benéficos de *A. brasilense* sobre a maioria dos efeitos fisiológicos e bioquímicos de plantas foram claramente visíveis quando estas foram micorrizadas. Esses autores observaram valores superiores de eficiência quântica do fotossistema II e condutância estomática (80%) em plantas submetidas ao déficit hídrico, comparado com plantas apenas micorrizadas.

Além da promoção de crescimento de plantas proporcionada pela indução de fitohormônios, algumas espécies de BPCV também possuem a capacidade de solubilização de fosfato (BSP). Baldotto et al. (2012) relataram maior acúmulo de N e P foliar em plantas milho inoculadas com bactérias diazotróficas e solubilizadoras de fosfato, quando comparado ao sem inoculação, ao passo que a adubação de vermicomposto ($87,3 \text{ g dm}^{-3} \text{ MO}$) contribuiu no aumento da população de microrganismos diazotróficos, de forma que a microflora natural do solo pode influenciar diretamente na atividade das BPCV. Baldani et al. (1997) relatam que bactérias endofíticas facultativas são menos afetadas em solos esterilizados, indicando que fatores bióticos interferem na sobrevivência dessas bactérias. Zhang et al., (2011) ao avaliarem os efeitos da inoculação de *Glomus mosseae*, aplicações de fertilizantes orgânicos (FO) e esterilização do solo no crescimento de milho, observaram maior absorção de nutrientes e desenvolvimento de plantas quando aplicado $0,5 \text{ g dm}^{-3}$ de FO, sob condições de solo esterilizado.

Neste sentido, há necessidade de investigar os efeitos da inoculação de *A. brasilense* sob cultivo sucessivo de milho, visando verificar seu efeito no desenvolvimento da cultura, bem como sua influência na associação com espécies de FMA, em função de adubação fosfatada sem adição de nitrogênio.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- BALDANI, J.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 911–922, maio 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071796002180>>.
- BALDOTTO, L. E. B.; SILVA, L. G. J. S.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BALDOTTO, M. A. Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 262–270, 2012.
- BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DOBEREINER, J. Interações e efeitos fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 1335–1345, 1995.
- BASTOS, A. L.; COSTA, J. P. V. da; SILVA, I. de F. da; RAPOSO, R. W. C.; OLIVEIRA, F. de A.; ALBUQUERQUE, A. W. de. Resposta do milho a doses de fósforo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 5, p. 485–491, maio 2010. Disponível em: <<http://www.agriambi.com.br>>.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A(1), A(3), and Iso-A(3) in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant physiology**, v. 90, n. 1, p. 45–7, maio 1989. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1061674&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 mar. 2016.
- CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v. 115, n. 1, p. 151–153, 1989.
- COZZOLINO, V.; DI MEO, V.; PICCOLO, A. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 40–44, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.02.006>>.
- DANNEBERG, G.; LATUS, C.; ZIMMER, W.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDER-POETSCH, H.; BOTHE, H. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 141, n. 1, p. 33–39, 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161711808485>>.
- DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MENEZES, C. R. J.; FREIBERGER, M. B.; CASTOLDI, G.; GONÇALVES, E. D. V. Maize response to inoculation with strains of plant growth-promoting bacteria. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 7, p. 606–611, jul. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662016000700606&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

DE SALOMONE, I. G.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 193–196, 1 fev. 1996. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/Index/10.1007/s003740050048>>.

FRITSCHÉ-NETO, R.; RESENDE, M. D. V.; MIRANDA, G. V.; DOVALE, J. C. Seleção genômica ampla e novos métodos de melhoramento do milho. **Revista Ceres**, v. 59, n. 6, p. 794–802, dez. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2012000600009&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 31 jan. 2017.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1–7, 1 out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099604>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

GONÇALVES, J. L. M.; FIRME, D. J.; NOVAIS, R. F. de; RIBEIRO, A. C. Cinética de adsorção de fósforo em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 1985. .

KIRIACHEK, S. G.; AZEVEDO, L. C. B. de; PERES, L. E. P.; LAMBAIS, M. R. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 1–16, fev. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832009000100001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

MASSENSINI, A. M.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C.; COSTA, M. D. Solubilização potencial de fosfatos mediada pela microbiota rizosférica de eucalipto cultivado em topossequência típica da Zona da mata Mineira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 1, p. 692–700, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832015000300692&lang=pt>.

MEHDIPOUR MOGHADDAM, M. J.; EMTIAZI, G.; SALEHI, Z. Enhanced auxin production by *Azospirillum* pure cultures from plant root exudates. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 5, p. 985–994, 2012.

RUÍZ-SÁNCHEZ, M.; ARMADA, E.; MUÑOZ, Y.; GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; AROCA, R.; RUÍZ-LOZANO, J. M.; AZCÓN, R. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1031–1037, jul. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161711000794>>.

USDA, U. S. D. of A. World Agricultural Production. **Circular Series January 2017**, p. 1–29, 2017. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>.

ZHANG, G.-Y.; ZHANG, L.-P.; WEI, M.-F.; LIU, Z.; FAN, Q.-L.; SHEN, Q.-R.; XU, G.-H. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi, organic fertilizer and soil sterilization on maize growth. **Acta Ecologica Sinica**, v. 31, n. 4, p. 192–196, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chnaes.2011.04.005>>.

ZHU, J.; LYNCH, J. P. The contribution of lateral rooting to phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays*) seedlings. **Functional Plant Biology**, v. 31, n. 10, p. 949–958, 2004.

ZHU, X. C.; SONG, F. B.; LIU, S. Q.; LIU, T. D.; ZHOU, X. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. **Plant, Soil and**

Environment, v. 58, n. 4, p. 196–203, 2012. Disponível em:
<<http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/63009.pdf>>.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta pertencente à família das Poaceas. Em consequência de sua alta eficiência fotossintética, sob condições favoráveis, possui alto potencial produtivo. Sendo um alimento de valor proteico elevado, o milho é amplamente consumido na forma “in natura”, ao passo que é tradicionalmente utilizado na culinária da maioria dos brasileiros (NAVES et al., 2004). No setor agropecuário, a produção elevada de massa verde juntamente ao teor de carboidratos solúveis, contribuem na produção de silagem, importante na alimentação animal (DOS SANTOS et al., 2010).

A cultura do milho encontra-se amplamente disseminada no Brasil. A produção no estado do Paraná totalizou em 15,9 milhões de toneladas, representando o segundo maior produtor deste grão no país. Em primeiro lugar está o estado de Mato Grosso com 21,6 milhões de toneladas, na safra 2016/2017. O Brasil, utilizando área de 16 milhões de hectares, produziu-se 84 milhões de toneladas durante a safra de 2016/2017 segundo Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017).

Em relação aos estudos que envolvem a origem do milho, Brieger (1944) relata a não existência de espécies selvagens que possam ser consideradas como os tipos ancestrais. Existem relatos sobre o início da domesticação que se deu pelos índios, na região da Bolívia, Paraguai e leste do Mato Grosso. Essa hipótese pode ser confirmada pela descoberta de evidências que comprovam amplo cultivo no Arcaico Tardio (3000-1800 aC) na região Norte Chico do Peru (HAAS et al., 2013). O cultivo do milho em larga escala teve início por volta de 1970, nos países do norte da Europa, incluindo Bélgica, França e Alemanha (STRUIK, 1983). A cultura pode ser cultivada sob diferentes climas podendo tolerar baixas temperaturas de até 15 °C, mantendo alta eficiência quântica fotossintética (FRACHEBOUD et al., 1999). Por pertencer ao grupo de plantas C4, o milho apresenta alta eficiência na taxa de assimilação líquida de CO₂. No ciclo C4, catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP), a reação apresenta uma grande vantagem em relação às plantas C3 porque o CO₂ fixado pela via C4, é essencialmente “bombeado” das células do mesófilo para as células da bainha vascular. Isso mantém uma elevada razão CO₂/O₂ no sítio de ação da ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), o que favorece a carboxilação da ribulose-1,5-bisfosfato (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Na deficiência de um nutriente essencial como o nitrogênio (N), a atividade das enzimas Rubisco e PEP decresce, consequentemente, a eficiência quântica e a fotossíntese líquida de CO₂ é prejudicada (WEI et al., 2016).

A alta demanda por nutrientes pela cultura do milho, é geralmente suprida através da utilização de fertilizantes sintéticos. Para isso, estudos relacionados ao melhoramento do milho, tornam-se eficazes na seleção de genótipos cada vez mais responsivos na eficiência do uso de nutrientes do solo (FRITSCH-NETO et al., 2012).

A necessidade de adubação nitrogenada e fosfatada para a cultura do milho podem chegar até 240 kg ha⁻¹ de N (ARAÚJO; FERREIRA; CRUZ, 2004; HURTADO et al., 2009). Já para o fósforo, em relação ao cultivo do milho, pode variar de acordo com o tipo do solo (Latosolo Amarelo coeso, Argissolo Acinzentado, Neossolo Flúvico, Neossolo Quartzarênico, Luvisolo Crômico órtico e Luvisolo Crômico pálico) alternando de 10% e 30% da capacidade máxima de adsorção de fósforo (CMAP) (BASTOS et al., 2010).

No solo, plantas de milho possuem capacidade de extração total de N de até 290 kg ha⁻¹, sendo que parte deste elemento é fornecido por microrganismos, durante a decomposição de resíduos vegetais. Já para os elementos fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre, a extração total pode chegar até 43, 203, 31, 52 e 20 kg ha⁻¹, respectivamente (SÁ et al., 2010).

2.2 Formas e dinâmica de fósforo no solo

O P é um nutriente que tem como particularidade alto grau de interação com o solo e sua forma disponível às plantas encontra-se como íons ortofosfato (H₃PO₄). Em decorrência de reações de equilíbrio em solos ácidos, predomina na solução do solo a forma H₂PO₄⁻, ao passo que íons de HPO₄²⁻ ocorrem em função de valores acima de pH 6,0 (NOVAIS; SMYTH, 1999). Devido a essa característica, o P é facilmente complexado a elementos de Fe e Al, que resulta na deficiência na maioria dos solos brasileiros. O teor total de P nos solos pode variar de 100 a 3000 mg dm⁻³, ou seja, pode chegar em até 0,3%. O fator condicionante principal dos teores totais de fósforo é o material de origem do solo, ao passo que na solução do solo, os teores deste elemento no Brasil são muito baixos (SILVA; RAIJ, 1999).

O P no solo pode ser dividido em dois grandes grupos, o P orgânico (Po) o fósforo inorgânico (Pi) (GYANESHWAR et al., 2002). Fatores ambientais, como temperatura e umidade controlam propriedades físico-químicas e mineralógicas do solo, bem como o desenvolvimento de microrganismos do solo, os quais controlam a disponibilidade de íons ortofosfato (SANTOS; GATIBONI; KAMINSKI, 2008). Grande parte do P se encontra em formas não disponíveis e, inclusive uma pequena fração na forma disponível 0,1 mg dm⁻³.

Em solos menos intemperizados, o P ainda pode ocorrer em minerais primários ou fracamente ligados aos secundários, deste modo, este elemento pode ser encontrado em forma de Po, principalmente como fitato (Na-IHP). Já para solos altamente intemperizados como os Latossolos, predominam formas inorgânicas ligados às argilas silicatadas e nos R-OH dos oxihidróxidos de ferro e alumínio (VILAR et al., 2010).

A interação do P no solo pode ser notada pela alta afinidade de reação com alguns metais como, Fe, Al e Ca. Essas reações ocorrem na solução do solo, com a formação de compostos de solubilidade muito baixa. Ligações covalentes ou troca de ligantes resultam no P adsorvido de forma irreversível. A adsorção do fosfato aos oxihidróxidos de ferro e alumínio se dá nos sítios ácidos de Lewis, onde os grupos OH e OH_2^+ ligados mono e tricordenadamente ao Fe ou Al são trocados pelo fosfato, caracterizando o fenômeno de troca de ligantes (BARROW, 1983).

Em relação a disponibilidade de P em solos considera-se (RAIJ, 2011): i) fator intensidade: representado pela concentração de P na solução do solo; ii) fator quantidade: representado pelo P o que pode passar para a solução do solo, ou P lábil; iii) fator capacidade (poder tampão): representado pela condição do solo de poder manter ou restabelecer o P em solução, em níveis adequados, pela dissolução do elemento da fase sólida; e iv) fator difusão: representado pelas características que permitem aos íons fosfato migrar da superfície da fase sólida do solo, na qual se dissolvem, até a superfície das raízes.

O fornecimento de P às plantas cultivadas, de forma predominante, ocorre via utilização de fertilizantes sintéticos. Devido ao expressivo consumo destes insumos, pesquisas em geral dão maior destaque à estudos relacionados ao Pi do que Po. Os teores de Po encontrados em solos não manejáveis são capazes de se manter, mesmo em solos de baixa fertilidade, através da ciclagem do Po (CONTE; ANGHINONI; RHEINHEIMER, 2002). Em solos florestais, o teor médio de Po total pode alcançar níveis de 160 mg dm^{-3} (CUNHA et al., 2007). As principais formas encontradas são fosfatos de inositol (até 80% Po total), que são imobilizados por microrganismos que o utilizam como fonte de carbono e energia, implicando na mineralização e disponibilização do P (SANTOS; GATIBONI; KAMINSKI, 2008).

2.3 *Azospirillum brasilense* e bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV)

O gênero *Azospirillum* pertence ao grupo de BPCV de vida livre e são capazes de sobreviver no solo livre de plantas hospedeiras. São bactérias associativas endofíticas facultativas, com capacidade de colonizar a rizosfera e regiões internas de plantas (BALDANI et al., 1997).

A espécie *Spirillum lipoferum* descoberta e classificada pela pesquisadora Dr^a. Johanna Döbereiner, foi subsequente reclassificada como *A. brasilense* e *A. lipoferum*, devido a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (azoto) (FBN), quando associada com gramíneas (DÖBEREINER; MARRIEL; NERY, 1976). A partir da descoberta da capacidade de fixação de N por *A. brasilense*, vários trabalhos relacionados a inoculação em gramíneas foram realizados. Incrementos de até 20% na produção de grãos e forragens foram observados, bem como aumento de 120 kg N ha⁻¹ derivado da fixação biológica. Por meio destes resultados, Dr^a. Döbereiner contribuiu com mais de 300 publicações, reconhecida internacionalmente, tornou-se a brasileira mais citada pela comunidade internacional (FRANCO; BODDEY, 1997).

Em relação aos benefícios proporcionados pelo *Azospirillum*, estudos sobre a obtenção de N pela fixação biológica em gramíneas foram os primeiros a serem explorados. Porém, poucos destes estão relacionados ao ciclo do N dentro da célula. O mecanismo de FBN proporcionado pelas bactérias associativas em plantas não leguminosas geraram controvérsia. A transferência de nitrogênio (¹⁵N₂) fixada por *Azospirillum* para as plantas é mínima (KENNEDY et al., 1997). Estudos relataram que grande parte do aumento no N total da planta, é resultado do aumento da aquisição de nitrogênio mas não através da atividade de nitrato redutase bacteriana. Em atmosfera enriquecida de ¹⁵N₂, a fixação de N foi detectada em raízes de trigo cultivado aos 26 dias, porém maiores níveis de ¹⁵N foram encontrados em brotos de trigo (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). Através destes resultados, acredita-se que o fornecimento de N por *Azospirillum* às plantas seja através do N que é assimilado pelas mesmas, no entanto não aproveitado no seu metabolismo (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016), no entanto, podem variar de 20% a 40% (DOBEREINER, 1997).

Atualmente, as bactérias diazotróficas são reconhecidas em promover o crescimento de plantas, principalmente pela indução da produção de alguns fitohormônios bem conhecidos como ácido indolacético (AIA) (BALOTA et al., 1995; MEHDIPOUR MOGHADDAM; EMTIAZI; SALEHI, 2012), giberelina (BOTTINI et al., 1989), citocinina (CACCIARI et al., 1989) e a inibição da produção etileno (GLICK, 2005).

Ao avaliar o efeito do ácido indol-3-acético (AIA) produzido por *Azospirillum brasilense* sob o acúmulo de amônio intracelular em *Chlorella vulgaris*, foi observado um aumento transitório de AIA proporcionalmente às atividades das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato desidrogenase (GDH). Desta forma, o principal fitohormônio produzido por *A. brasilense* pode estar envolvido na absorção e assimilação do nitrogênio pelas plantas (MEZA; DE-BASHAN; BASHAN, 2015).

As BPCV também possuem a capacidade de inibir a produção de etileno nas plantas através da produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, a qual promove um desvio da rota da formação do etileno, sequestrando e clivando o ACC produzido na planta, e o convertem em α -cetobutirato e amônio, utilizado para seu metabolismo (GLICK, 2014). A redução de níveis de etileno nas plantas permite maior eficiência de resistência sob condições de estresse ambiental, principalmente hídrico.

Uma importante parte dos microrganismos do solo possui a habilidade de solubilizar fosfatos inorgânicos (Pi) e mineralizar fosfatos orgânicos (Po), fornecendo P assimilável as raízes (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016). O principal mecanismo utilizado pelas bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP) está baseada na secreção de ácidos orgânicos, principalmente pela população da rizosfera, ao passo que a mesma espécie de bactéria pode promover tanto a solubilização quanto a mineralização de fosfatos no solo (AHEMAD; KIBRET, 2014).

A inoculação de BPCV sob desenvolvimento inicial de plantas de milho, incrementou teor de N (103%) e P (41%) no tecido vegetal, em consequência foi observado aumento de até 30% no acúmulo de massa de matéria seca da parte aérea (BALDOTTO et al., 2012). Novakowski et al. (2011), ao avaliarem a inoculação de *A. brasilense* e o teor residual de N na cultura do milho, observaram economia de até 89 kg ha⁻¹ de N, comparado ao tratamento sem inoculação. Os autores destacam os resultados devido a excreção de fitohormônios vegetais, principalmente o AIA, por bactérias do gênero *Azospirillum* que desempenham papel essencial na promoção de crescimento vegetal (MEZA; DE-BASHAN; BASHAN, 2015).

2.4 Ação de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cultivadas

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pertencem ao Filo *Glomeromycota*, Classe *Glomeromycetes* (glomeromicetos). Estes organismos são biotróficos obrigatórios, que se associam com raízes de angiospermas e gimnospermas, formando relação simbiótica mutualista (REDECKER et al., 2013). Estudos relacionados a esses fungos tem ganhado importância devido ao papel que eles exercem na aquisição de nutrientes pelas plantas. Neste caso pode-se destacar o P que é o elemento mais limitante para o cultivo de plantas, devido a sua baixa mobilidade e grande adsorção no solo (MOTTA et al., 2002).

As micorrizas são classificadas quanto à morfologia. No Brasil as pesquisas têm focado principalmente em três tipos reconhecidos: endomicorrizas arbusculares, orquidoides e ectomicorrizas. São consideradas ectomicorrizas quando as hifas se desenvolvem intercelularmente formando a rede de Hartig. As endomicorrizas são caracterizadas quando as

estruturas do fungo se desenvolvem intracelularmente (SOUZA et al., 2010). Vale destacar que a infecção dessas espécies depende de condições favoráveis como temperatura do ar e solo, umidade e pH do solo (SCHWAN, 1984).

No processo de infecção de FMA, a troca de sinais entre os simbiossiontes inicia-se antes do contato físico, através de exsudação pelas raízes capazes de estimular a ramificação das hifas, chamadas fatores de ramificação (FR) (BUEE et al., 2000). Após o desenvolvimento das hifas na superfície das raízes, estas se diferenciam em apressórios e penetram através da epiderme, não invadindo a região meristemática e o tecido vascular (KIRIACHEK et al., 2009). Além do crescimento intrarradicular, os FMA formam um micélio externo que se desenvolve no solo formando extensa rede micelial que explora microambientes não alcançados pelas raízes não colonizadas por esses fungos (LAMBAIS; RAMOS, 2010).

A utilização de FMA em áreas degradadas apresenta papel importante, podendo influenciar diretamente na aquisição de nutrientes e tolerância a estresses ambientais, seja químico, físico ou biológico. No processo de decomposição das hifas no solo é liberado uma glicoproteína denominada glomalina. Essa proteína atua na agregação do solo influenciando a relação carbono/nitrogênio (DRIVER; HOLBEN; RILLIG, 2005). Silva et al. (2014), realizando estudo com revegetação, utilizando espécies de *Sesbania virgata*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Acacia mangium*, relataram que FMA demonstraram eficácia no aumento de quantidade de proteínas do solo relacionada à glomalina.

A aplicação de inóculo micorrízico comercial (*Glomus intraradices*) em plantas de milho resultou em produtividade similar a plantas que receberam fertilização com NPK, indicando que as raízes micorrizadas mobilizam mais P do que plantas não micorrizadas (COZZOLINO; DI MEO; PICCOLO, 2013).

O déficit hídrico é um dos mais importantes fatores de estresse abióticos que limitam o crescimento e desenvolvimento das plantas. A utilização de FMA pode aumentar a tolerância das plantas em condições ambientais drásticas, especialmente em escassez de água. Apesar dos FMA também serem prejudicados pela deficiência hídrica, plantas de milho micorrizadas com *Claroideoglomus etunicatum* mantêm maior teor relativo de água e apresentam maior eficiência do uso da água, em comparação com plantas não micorrizadas (ZHU et al., 2012).

Apesar dos FMA apresentarem interação em relação à diversidade de microrganismos do solo, bem como outras espécies de micorrizas (SILVA et al., 2014), Zhang et al. (2011), ao avaliarem os efeitos da inoculação de *Glomus mosseae*, aplicações de fertilizantes orgânicos (FO) e esterilização do solo no crescimento de milho, observaram maior absorção de nutrientes e

desenvolvimento das plantas quando foi aplicado $0,5 \text{ g dm}^{-3}$ de FO, sob condições de solo esterilizado.

De acordo com os estudos já desenvolvidos e relatados na literatura, fica evidente a eficiência dos FMA na promoção de crescimento das plantas, podendo estes efeitos serem maximizados pela presença de bactérias associativas como o *A. brasilense*. Vale destacar que essas associações se mostram eficientes quando as plantas estão sob condições de estresses abióticos como as deficiências hídrica e nutricional.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>>.
- ARAÚJO, L. A. N. De; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. Da. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 771–777, 2004.
- BALDANI, J.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 911–922, maio 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071796002180>>.
- BALDOTTO, L. E. B.; SILVA, L. G. J. S.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BALDOTTO, M. A. Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 262–270, 2012.
- BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DOBEREINER, J. Interações e efeitos fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 1335–1345, 1995.
- BARROW, N. J. A mechanistic model for describing the sorption and desorption of phosphate by soil. **Journal of Soil Science**, v. 34, n. 4, p. 733–750, dez. 1983. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2389.1983.tb01068.x>>.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum* -plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521–577, 2004. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w04-035>>.
- BASTOS, A. L.; COSTA, J. P. V. da; SILVA, I. de F. da; RAPOSO, R. W. C.; OLIVEIRA, F. de A.; ALBUQUERQUE, A. W. de. Resposta do milho a doses de fósforo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 5, p. 485–491, maio 2010. Disponível em:

<<http://www.agriambi.com.br>>.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A(1), A(3), and Iso-A(3) in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant physiology**, v. 90, n. 1, p. 45–7, maio 1989. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1061674&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

BRIEGER, F. G. Estudos experimentais sobre a origem do milho. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 1, n. 0, p. 225–277, 1944. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0071-12761944000100011&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 31 jan. 2017.

BUEE, M.; ROSSIGNOL, M.; JAUNEAU, A.; RANJEVA, R.; BÉCARD, G. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 6, p. 693–698, jun. 2000. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.2000.13.6.693>>.

CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v. 115, n. 1, p. 151–153, 1989.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos Monitoramento agrícola- Safra 2016/2017**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>.

CONTE, E.; ANGHINONI, I.; RHEINHEIMER, D. S. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácida após aplicação de fosfato em solo no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 4, p. 925–930, dez. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832002000400009&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

COZZOLINO, V.; DI MEO, V.; PICCOLO, A. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 40–44, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.02.006>>.

CUNHA, G. de M.; GAMA-RODRIGUES, A. C. da; COSTA, G. S.; VELLOSO, A. C. X. Fósforo orgânico em solos sob florestas montanas, pastagens e eucalipto no Norte Fluminense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 4, p. 247–255, ago. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

06832007000400007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

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

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 1464–1473, out. 1976.

DOS SANTOS, R. D.; PEREIRA, L. G. R.; NEVES, A. L. A.; AZEVÊDO, J. A. G.; DE MORAES, S. A.; COSTA, C. T. F. Características agronômicas de variedades de milho para produção de silagem. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 32, n. 4, p. 367–373, 2010.

DRIVER, J. D.; HOLBEN, W. E.; RILLIG, M. C. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 101–106, jan. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071704002718>>.

FRACHEBOUD, Y.; HALDIMANN, P.; LEIPNER, J.; STAMP, P. Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 338, p. 1533–1540, 1999. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org/content/50/338/1533.abstract>>.

FRANCO, A. A.; BODDEY, R. M. Dr Johanna Döbereiner: A brief biography. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. ix–xi, maio 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071796002362>>.

FRITSCHÉ-NETO, R.; RESENDE, M. D. V.; MIRANDA, G. V.; DOVALE, J. C. Seleção genômica ampla e novos métodos de melhoramento do milho. **Revista Ceres**, v. 59, n. 6, p. 794–802, dez. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2012000600009&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 31 jan. 2017.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1–7, 1 out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099604>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>>.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, 19 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2015.1127500>>. Acesso em: 16 jan.

2017.

GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, p. 83–93, 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1020663916259>>.

HAAS, J.; CREAMER, W.; HUAMÁN MESÍA, L.; GOLDSTEIN, D.; REINHARD, K.; RODRÍGUEZ, C. V. Evidence for maize (*Zea mays*) in the Late Archaic (3000-1800 B.C.) in the Norte Chico region of Peru. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 13, p. 4945–9, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3612639&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HURTADO, S. M. C.; RESENDE, Á. V. de; SILVA, C. A.; CORAZZA, E. J.; SHIRATSUCHI, L. S. Variação espacial da resposta do milho à adubação nitrogenada de cobertura em lavoura no cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 3, p. 300–309, mar. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2009000300012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

KENNEDY, I. R.; PEREG-GERK, L. L.; WOOD, C.; DEAKER, R.; GILCHRIST, K.; KATUPITIYA, S. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, v. 194, n. 1/2, p. 65–79, 1997. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1004260222528>>.

KIRIACHEK, S. G.; AZEVEDO, L. C. B. de; PERES, L. E. P.; LAMBAIS, M. R. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 1–16, fev. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832009000100001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

LAMBAIS, M. R.; RAMOS, A. C. Sinalização e transdução de sinais em micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA, J. O. et al. **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. p. 119-132.

MEHDIPOUR MOGHADDAM, M. J.; EMTIAZI, G.; SALEHI, Z. Enhanced auxin production by *Azospirillum* pure cultures from plant root exudates. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 5, p. 985–994, 2012.

MEZA, B.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Involvement of indole-3-acetic acid produced by *Azospirillum brasilense* in accumulating intracellular ammonium in *Chlorella vulgaris*. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 72–83, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.010>>.

- MOTTA, P. E. F.; CURTI, N.; SIQUEIRA, J. O.; VAN RAIJ, B.; FURTINI NETO, A. E.; LIMA, J. M. Adsorção e formas de fósforo em latossolos: influência da mineralogia e histórico de uso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 2, p. 349–359, jun. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832002000200008&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 16 jan. 2017.
- NAVES, M. M. V.; SILVA, M. S. S.; CERQUEIRA, F. M.; PAES, M. C. D. Avaliação química e biológica da proteína do grão em cultivares de milho de alta qualidade protéica. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 34, n. 1, p. 1–8, 2004.
- NOVAIS, R. F. de; SMYTH, T. J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. **Informações Agronômicas**, v. 87, p. 10–11, 1999.
- NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A. de; NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. Suplp, p. 1687–1698, 6 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/1687>>.
- RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba: IPNI, 2011. 420p.
- REDECKER, D.; SCHÜSSLE, A.; STOCKINGER, H.; STÜRMER, S. L.; MORTON, J. B.; WALKER, C. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **Mycorrhiza**, v. 23, n. 7, p. 515–531, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00572-013-0486-y>>.
- RUÍZ-SÁNCHEZ, M.; ARMADA, E.; MUÑOZ, Y.; GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; AROCA, R.; RUÍZ-LOZANO, J. M.; AZCÓN, R. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1031–1037, jul. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161711000794>>.
- SÁ, J. C. de M.; FERREIRA, A. de O.; BRIEDIS, C.; VIEIRA, Â. M.; FIGUEIREDO, A. G. de. Crescimento radicular, extração de nutrientes e produção de grãos de genótipos de milho em diferentes quantidades de palha de aveia-preta em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1207–1216, ago. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832010000400020&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 1 fev. 2017.
- SANTOS, D. R. Dos; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 576–586, 2008.

SILVA, C. F. da; ARAÚJO, J. L. S. de; SILVA, E. M. R. da; PEREIRA, M. G.; SCHIAVO, J. A.; FREITAS, M. S. M. de; SAGGIN-JUNIOR, O. J.; MARTINS, M. A. Comunidade de fungos micorrízicos arbusculares: diversidade, composição e glomalina em área revegetada com sesbânia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 423–431, abr. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832014000200007&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

SILVA, F. C. da; RAIJ, B. Van. Disponibilidade de fósforo em solos avaliada por diferentes extratores. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 267–288, fev. 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X1999000200016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 1 fev. 2017.

STRUICK, P. C. **Physiology of forage maize (zea mays L.) in relation to its production and quality**. 1983. 233 p. Tese (Doutorado em Ciência Pecuária) - Universidade de Agricultura, Wageningen, 1983. Disponível em: <http://books.google.be/books/about/Physiology_of_forage_maize_Zea_mays_L_in.html?id=RjchAQAAMAAJ&pgis=1>.

SOUZA, F. A. et al. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUEIRA, J. O. et al. **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. p. 15-73.

SCHWAN, K. R. F. **Caracterização, incidência e ecologia de micorrizas em viveiro e florestas de *Eucalyptus* spp, na região de Viçosa, Minas Gerais**. 1984. 55 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5th. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013.

VILAR, C. C.; COSTA, A. C. S. da; HOEPERS, A.; SOUZA JUNIOR, I. G. de. Capacidade máxima de adsorção de fósforo relacionada a formas de ferro e alumínio em solos subtropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1059–1068, ago. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832010000400006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

WEI, S.; WANG, X.; SHI, D.; LI, Y.; ZHANG, J.; LIU, P.; ZHAO, B.; DONG, S. The mechanisms of low nitrogen induced weakened photosynthesis in summer maize (*Zea mays* L.) under field conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, p. 118–128, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.007>>.

ZHANG, G.-Y.; ZHANG, L.-P.; WEI, M.-F.; LIU, Z.; FAN, Q.-L.; SHEN, Q.-R.; XU, G.-H. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi, organic fertilizer and soil sterilization on maize growth. **Acta Ecologica Sinica**, v. 31, n. 4, p. 192–196, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.chnaes.2011.04.005>>.

ZHU, X. C.; SONG, F. B.; LIU, S. Q.; LIU, T. D.; ZHOU, X. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. **Plant, Soil and Environment**, v. 58, n. 4, p. 196–203, 2012. Disponível em: <<http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/63009.pdf>>.

4 ARTIGO 1 - Benefícios no crescimento e trocas gasosas de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* sob adubação fosfatada em cultivo sucessivo e adubação nitrogenada

Resumo: A inoculação de *Azospirillum brasilense*, bem como seus benefícios no desenvolvimento da cultura do milho pode apresentar benefícios no cultivo sucessivo. O objetivo do trabalho foi analisar o crescimento e trocas gasosas de plantas de milho conduzidas em casa de vegetação, sob doses de fósforo e inoculação de *A. brasilense*, bem como os efeitos residuais desses fatores sob segundo cultivo de milho em resposta a adubação nitrogenada de cobertura. Para o primeiro cultivo, utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições, com esquema fatorial 2x4 onde se testou a inoculação de *A. brasilense* e tratamento sem inoculação, e quatro doses de adubação fosfatada, desprovido da adubação nitrogenada. No segundo cultivo, foi avaliado o efeito residual da inoculação e doses de P, obtendo o mesmo esquema fatorial (2x4) e tratamentos, sob cultivo sucessivo de milho, com adição nitrogenada de cobertura. A inoculação de *A. brasilense* em sementes de milho juntamente à adubação fosfatada, sem adubação nitrogenada, proporcionou maior desenvolvimento de plantas, aos 36 dias após emergência. Sob dose de 300 mg dm⁻³, plantas de milho conduzidas com adição de adubação nitrogenada de cobertura e população remanescente de *A. brasilense*, demonstraram efeito positivo em relação ao desenvolvimento da cultura. Em consequência do maior teor de P e clorofila foliar, tais plantas apresentaram maior taxa de assimilação líquida de CO₂, transpiração foliar, condutância estomática, concentração interna de CO₂ e eficiência no uso da água.

Palavras-chave: *Zea mays* L. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Fotossíntese. Fósforo.

Abstract: Inoculation of *Azospirillum brasilense*, as well as its non-developmental benefits of maize can yield benefits not successive cultivation. The objective of this work was to analyze the growth and gas exchange of corn plants conducted under greenhouse conditions, under doses of phosphorus and inoculation of *A. brasilense*, as well as the residual effects of the factors in the second corn crop in response to nitrogen fertilization of coverage for the first cultivation, a randomized complete block design with four replications was used, with a 2x4 factorial scheme, where an inoculation of *A. brasilense* and control treatment was tested, and four doses of phosphate fertilization, without nitrogen fertilization, were tested. In the second crop, the residual effect of the inoculation and P doses were evaluated, obtaining the same factorial scheme (2x4) and treatments, under successive cultivation of corn, with nitrogen addition of cover. The inoculation of *A. brasilense* on corn seeds with phosphate fertilization, without nitrogen fertilization, provided a higher development of plants at 36 days after emergence. Under a dose of 300 mg dm⁻³, corn plants conducted with addition of nitrogen fertilization and the remaining population of *A. brasilense* showed a positive effect in relation to the development of the crop. As a consequence of the higher content of P and leaf chlorophyll, these plants had higher rates of CO₂ assimilation, leaf transpiration, stomatal conductance, CO₂ internal concentration and water use efficiency.

Key words: *Zea mays* L. Plant growth promoting bacteria. Photosynthesis. Phosphorus.

5 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o principal cereal produzido no Brasil, com produção de 80 milhões de toneladas na safra 2016/2017 (CONAB, 2017). Para isso, a cultura requer a utilização de elevadas quantidades de fertilizantes, dentre eles o nitrogênio (N) e o fósforo (P), que são cruciais para atender a produção e acúmulo de massa. O N é o elemento mais exigido pela cultura, tornando-o fator limitante na produção de grãos (ARGENTA et al., 2003; BASI et al., 2011). Embora a exigência de P pelo milho seja inferior a de N e potássio (K), a capacidade de adsorção de P recorrente nos solos brasileiros evidencia a necessidade de grandes quantidades de adubação fosfatada (10% – 30% da capacidade máxima de adsorção de P - CMAP) no cultivo do milho, variando de acordo com o tipo de solo (BASTOS et al., 2010).

O fornecimento de N e P ocorre predominantemente através do uso de fertilizantes sintéticos. O N é absorvido na forma de NO_3^- e NH_4^+ e o P como H_2PO_4^- , ambos suscetíveis a perdas significativas, através da lixiviação e erosão, respectivamente. De forma diferente do N, que apresenta mobilidade no solo, o P com taxa de difusão no solo (10^{-11}) torna-se um elemento de baixa mobilidade, resultado da retenção do P pela interação com cálcio (Ca), ferro (Fe) e alumínio (Al), tendo assim, menor acessibilidade às raízes. Tal condição é agravada em solos intemperizados, devido adsorção à superfícies de óxidos e oxi-hidróxidos de Fe e Al, originando fosfatos inorgânicos, formas não lábeis (MOTTA et al., 2002).

Como opção para maximizar o uso de nutrientes, tem-se a utilização das bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), como o *Azospirillum brasilense*, que se associam às raízes e se desenvolvem na rizosfera e em regiões internas das plantas (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). Isto promove o aumento da superfície de contato das raízes, através do desenvolvimento de pelos radiculares, permitindo maior absorção de água e minerais da solução do solo (DOBBELAERE et al., 2002). Deve-se considerar também a disponibilização de N provido da fixação biológica (BALDANI et al., 1997), variando de 20% a 40% (DOBEREINER, 1997), através do N não utilizado para seu metabolismo (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016).

A espécie *A. brasilense* atua também como bactéria solubilizadora de fosfato (BSP), seja em leguminosa (CHARANA WALPOLA; YOON, 2013) quanto em gramínea (INAGAKI et al., 2014). As BSP ao colonizarem raízes de seu hospedeiro são capazes de sintetizar ácidos orgânicos, que solubilizam fosfatos inorgânicos (AHEMAD; KIBRET, 2014). Além da solubilização de fosfatos, espécies do gênero *Azospirillum* possuem potencial em produção de fitohormônios promotores de crescimento vegetal como auxina, citocinina, giberelina e inibição

da síntese de etileno nas folhas (AHEMAD; KIBRET, 2014; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016).

Por conseguinte, Dartora et al. (2013), ao avaliarem a interação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* juntamente à adubação nitrogenada, relataram efeito positivo para a cultura do milho com incremento de 7% na produtividade comparado ao tratamento sem inoculação. Plantas de milho inoculadas com BPCV resultaram incrementos significativos no acúmulo de N (11%), P (30%) e K (17%) no tecido vegetal, durante o desenvolvimento inicial das plantas (BALDOTTO et al., 2012b). Em relação ao N, estes resultados podem estar atribuídos ao aumento da atividade da enzima nitrato redutase (DE SALOMONE; DÖBEREINER, 1996).

Novakowski et al. (2011) observaram efeito residual da adubação nitrogenada, aplicada em culturas de inverno, sob cultivo sucessivo de milho inoculado com *A. brasilense*. A produtividade da cultura foi superior quando comparada ao tratamento sem inoculação, mesmo com aumento da quantidade de N aplicada no inverno. Baldani et al. (1997) relatam que bactérias endofíticas facultativas são menos afetadas em solos esterilizados, indicando que fatores bióticos interferem na sobrevivência dessas bactérias. O efeito do cultivo sucessivo sob o efeito residual do *A. brasilense* no solo ainda é pouco conhecido. Desta forma, a absorção de nutrientes pelas raízes de forma eficiente, diminuindo perdas e otimizando o aproveitamento da fertilidade do solo, através da inoculação de *A. brasilense*, bem como seu efeito sob o cultivo sucessivo, podem influenciar positivamente no desenvolvimento da cultura do milho.

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi analisar o crescimento e trocas gasosas de plantas de milho conduzidas sob doses de fósforo e inoculação de *A. brasilense*, bem como os efeitos residuais desses fatores sob segundo cultivo de milho sob a adubação nitrogenada de cobertura.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Local e delineamento experimental

O experimento foi realizado de setembro a dezembro de 2014, na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido “Prof. Dr. Mário César Lopes” pertencente à Unioeste, no município de Marechal Cândido Rondon, PR, conduzido em estufa com teto tipo arco, revestida com filme de polietileno de baixa densidade (150 µm de espessura) e laterais protegidas com tela branca de 40% de sombreamento.

A pesquisa se compõe em dois cultivos, ambos sob o delineamento em blocos ao acaso com esquema fatorial 2 x 4 com quatro repetições. No primeiro cultivo utilizou-se a inoculação *A. brasilense* e tratamento sem inoculação como primeiro fator, já para o segundo fator foram

realizadas adubações fosfatadas no solo, 0; 150; 300 e 450 mg dm⁻³ de P. No segundo cultivo, foi utilizado o mesmo solo sem revolvimento. Então, para o primeiro fator alocou-se a população remanescente de *A. brasilense* juntamente ao tratamento sem inoculação, e o segundo fator determinado pelo teor de fósforo remanescente no solo após primeiro cultivo.

6.2 Solo, inoculação de sementes e adubação fosfatada

O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico (LVef) (SANTOS et al., 2013), apresentando as seguintes características química e física, P= 5,56 mg dm⁻³; MO= 17,77 g dm⁻³; pH (CaCl₂)= 4,67; H+Al= 3,44 cmol_c dm⁻³; Al³⁺= 0,20 cmol_c dm⁻³; K⁺= 0,13 cmol_c dm⁻³; Ca²⁺= 3,82 cmol_c dm⁻³; Mg²⁺= 1,03 cmol_c dm⁻³; SB= 4,98 cmol_c dm⁻³; CTC= 8,42 cmol_c dm⁻³; V%= 59,14; Al%= 3,86; 578,00 g kg⁻¹ de argila, 348,58 g kg⁻¹ de silte e 73,42 g kg⁻¹ de areia.

Após secagem em condições ambiente o solo foi submetido a adubação fosfatada conforme tratamentos estabelecidos e homogeneização utilizando superfosfato simples (17% de P₂O₅) como fonte de P, em seguida irrigadas e mantida em repouso por 30 dias em vasos de 8 dm³ (unidade experimental).

O inoculante contendo a espécie de *A. brasilense* estirpe AbV5, foi fornecido pelo laboratório de Bioquímica e Biologia molecular da UFPR de Curitiba, PR. O volume de solução inoculadora adotada foi de 4 mL para 1000 sementes, contendo a concentração de 10⁸ unidades formadoras de colônias mL⁻¹ (UFC mL⁻¹), aferido no Laboratório de Fisiologia Vegetal pertencente a Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR.

A inoculação foi realizada em sacos plásticos devidamente esterilizados com 1000 sementes do híbrido de milho 30F53H *Pioneer*[®] dentro de uma câmara de fluxo laminar, após ser submetida a 30 min de lâmpada germicida UV com o intuito da redução do número de microrganismos nas superfícies e no ar. Com o intuito de não ocorrer interferência na embebição das sementes em diferentes volumes de inoculação, com utilização de água destilada, foi mantido o mesmo volume do líquido de inoculante para cada tratamento. Após serem tratadas e homogeneizadas, as sementes foram mantidas em repouso por 12 horas à sombra e temperatura ambiente, 25 °C. Foram semeadas seis sementes por vaso e aos quatro dias após emergência (DAE) houve desbaste para estabelecer três plantas por vaso.

No primeiro cultivo do experimento, a cultura foi conduzida até fase vegetativa V5 (35 DAE), sem adubação nitrogenada. No segundo cultivo, com solo não revolvido, foram semeadas o mesmo híbrido 30F53H, que se conduziu até fase V10 (55 DAE), provida de uma adubação nitrogenada em cobertura utilizando uma dose de 50 mg dm⁻³ de N (uréia), fase V5 (33 DAE). As adubações de fósforo e nitrogênio (50%) foram baseadas conforme

recomendação de ensaios em ambiente controlado (NOVAES; NEVES; BARROS, 1991), ao passo que as doses de P foram determinadas em 0%, 50%, 100% e 150% de 300 mg dm⁻³.

6.3 Trocas gasosas

Com auxílio do medidor portátil de trocas gasosas *Infra-Red Gas Analyzer* (IRGA) Li-6400XT, medidas tipo “survey” foram realizadas obtendo-se as seguintes variáveis: A – Taxa de assimilação líquida de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); E – Taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); g_s – Condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); C_i – Concentração interna de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$); EUA - Eficiência no uso da água A/E ; $EiUA$ – Eficiência intrínseca no uso da água A/g_s .

As análises foram realizadas em folhas totalmente expandidas e expostas à luz solar direta, na região do terço médio foliar, dois terços do comprimento da folha, a partir da base. Utilizou-se densidade padrão de 1200 μmols de densidade de fótons, fluxo de ar padronizado a 500 μm por minuto e 400 μmols de CO₂ utilizando cilindro de gás de dióxido de carbono pressurizado, 12 g (*LI-COR*).

No primeiro cultivo, as análises tipo “survey” foram realizadas na fase vegetativa V3 (14 DAE) e curvas de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (*DFFFA*) durante a fase V5 (35 DAE), as quais perduraram entre 8h00min a 9h00min e 10h00min a 11h00min, respectivamente, em folhas completamente expandidas e expostas ao sol. Portanto, exibiram diferentes temperaturas do ar interno da câmara, temperatura das folhas e do bloco da câmara (Figura 1).

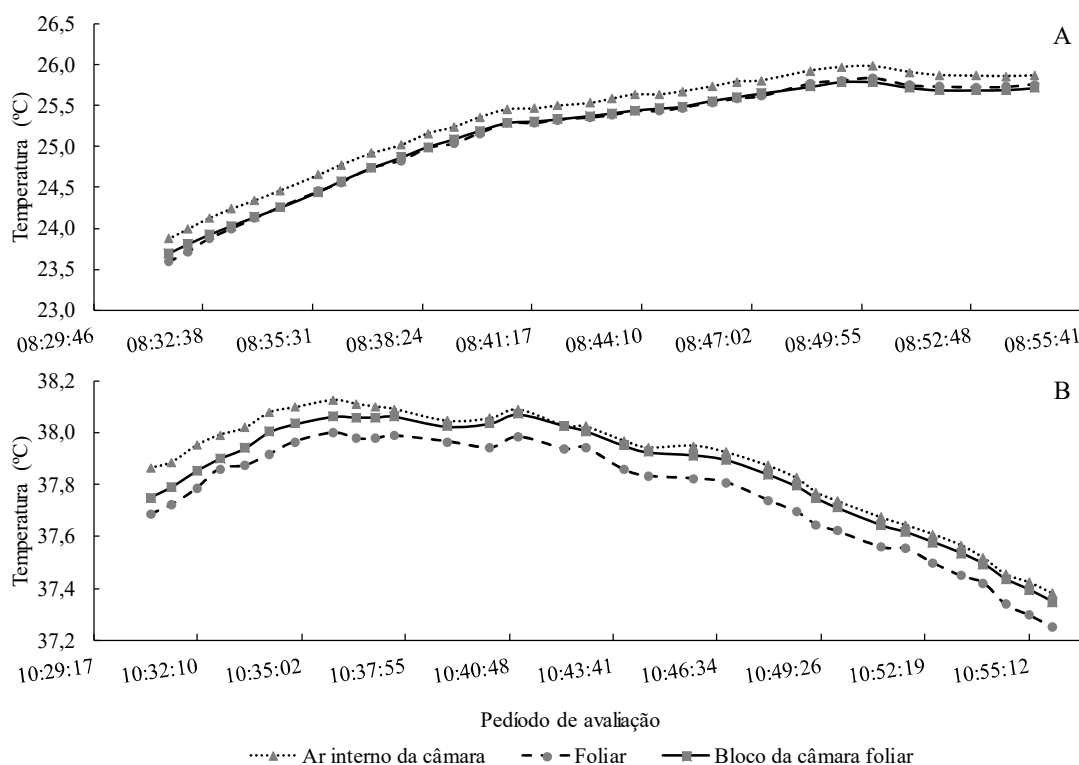


Figura 1 - Temperatura do ar interno da câmara foliar, temperatura foliar e do bloco da câmara durante avaliação em V3 (A) e V5 (B) em plantas de milho, do primeiro cultivo, submetidas a inoculação de *A. brasilense* e conduzidas sob doses de fósforo no solo.

Durante a fase fenológica V5, foram realizadas análises de curvas com diferentes densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (*DFFFA*). Para isso, foram utilizados quatro tratamentos, 300 mg dm⁻³ de P e sem adubação fosfatada e com e sem inoculação de *A. brasilense*. Utilizando o mesmo equipamento IRGA (Li-6400XT), as densidades de fótons variaram de forma decrescente, 2200; 1800; 1450; 960; 480; 240; 120; 80; 40; 20; 10 e 0 μmol, com fluxo de ar padronizado a 500 mL por minuto e 400 μmols de CO₂ de referência, durante o período de 8h00 a 12h00.

A curva de resposta de *A* e *DFFFA* foi ajustada de acordo com a equação (PRADO; DE MORAES, 1997):

$$A = A_{\max} [1 - e^{-k(Q - Q_c)}]$$

Abaixo de 240 μmol fótons m⁻² s⁻¹ variou-se a *DFFFA* em intervalos menores, para que possa obter vários pontos e calcular a eficiência quântica aparente (Φ [μmol CO₂/ μmol fótons]). Utilizou-se um ajustamento de equação linear: $A = a + \Phi \cdot Q$, onde “a” e “ Φ ” são coeficientes de ajuste e “Q” representa a densidade de fótons. Na intersecção da reta no eixo X, tem-se o valor do ponto de compensação de luz.

No segundo cultivo, avaliou-se as trocas gasosas das plantas tratadas com doses de P e inoculadas com *A. brasilense* em resposta a adubação nitrogenada de cobertura. Foram efetuadas sete dias de avaliações tipo “survey”, sendo que a 1ª e 2ª avaliação antecederam a adubação nitrogenada aos 30 e 31 DAE (V4-5), e posteriormente, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª e 7ª avaliação aos 37 (V6), 40 (V7), 43 (V7), 47 (V8) e 48 (V8) DAE, respectivamente. Da mesma forma que foi apresentada no primeiro cultivo, as análises foram realizadas no período matutino (8h00min a 11h00min) em folhas totalmente expandidas desprovida de sombreamento, no terço médio da folha.

Tabela 1 - Temperatura foliar máxima e mínima durante cada período de avaliação

Dia de avaliação	Variação de temperatura foliar (°C)							
	1º dia	2º dia	Adubação nitrogenada	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
Máxima	30,07	27,99		31,13	37,41	34,14	33,317	30,83
Mínima	27,30	26,67		30,45	31,85	33,44	29,56	28,96

6.4 Avaliações morfobiométricas e teor foliar de N e P

No primeiro cultivo, aos 36 DAE (V5) após avaliações das medidas de trocas gasosas, com o auxílio do medidor portátil SPAD 502 plus Konica Minolta, aferiu-se o teor relativo de clorofila foliar, índice SPAD. As plantas foram coletadas e submetidas a avaliações de comprimento de plantas (CP); volume do colmo (VC) calculado pela altura (h) e raio da circunferência apical (r_A) e basal do colmo (r_B):

$$VC: [(\pi \times h/3) \times (r_B^2 + r_B \times r_A + r_A^2)]$$

Área foliar (AF) obtida pela equação proposta por Benincasa (2003):

$$AF: [(AF_A \times MSF_T)/MSF_A]$$

Onde AF_A representa a área foliar da amostra coletada, MSF_T é a massa de matéria seca foliar total e MSF_A é a massa de matéria seca foliar da amostra. As amostras foram armazenadas em sacos tipo kraft e mantidas em estufas com circulação de ar forçado a 65 °C, obtendo-se massa de matéria seca de colmo+bainha (MSCB), folhas (MSF) e parte aérea (MSPA).

No segundo cultivo, com o intuito de avaliar a variação do teor relativo de clorofila foliar em função da adubação nitrogenada (V5), aferiu-se o índice SPAD em 8 dias durante as fases vegetativas, V4, V5, V6, V7 e V8, em duas regiões da folha: o terço médio e terço apical foliar, ou seja, dois terços e três terços do comprimento da folha, respectivamente, a partir da base.

Aos 55 DAE, com auxílio de uma régua graduada, foi mensurado o comprimento de planta (CP), diâmetro basal do colmo (DC) utilizando um paquímetro digital, área foliar (AF), além de massa de matéria seca de colmo+bainha (MSCB), foliar (MSF) e parte aérea (MSPA).

Para a determinação do teor de N e P nas folhas, estas foram moídas e digeridas em ácido sulfúrico. O P foi determinado por espectrofotometria e a concentração de N foi determinada por digestão com ácido sulfúrico e destilação de Kjeldahl (EMBRAPA, 2009).

6.5 Análise estatística

Os dados foram tabulados e com o auxílio do programa estatístico Sisvar 5.3, (FERREIRA, 2014) submetidos a análise de variância. Havendo significância para os fatores inoculação de *A. brasilense* e/ou doses de P no solo, foi realizado o teste de comparação de médias Tukey e análise de regressão, respectivamente.

Levando-se em consideração a interação entre dias após emergência e doses de P no solo, os dados foram ajustados no programa estatístico “Sigma Plot” por meio de regressão não-linear utilizando-se o modelo Parabolóide com a equação $f=y_0+ax+by+cx^2+dy^2$ e onde: (a), (b) e (c) são os parâmetros estimados, (f) representa o parâmetro avaliado, (x) os dias após emergência e (y) as doses de P no solo.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 1º Cultivo

A análise de variância mostrou interação entre os fatores inoculação de *A. brasilense* e doses de P, quando testadas as variáveis de comprimento de plantas (CP) e área foliar (AF). As doses de P foram significativas para CP, número de folhas (NF), índice SPAD (SPAD), volume de colmo (VC), massa de matéria seca de colmo+bainha (MSCB), massa de matéria seca de folhas (MSF) e parte aérea (MSPA), apresentando significância a 1% de probabilidade. Ao comparar o fator inoculação de *A. brasilense* de forma isolada, não foi observado diferença pelo teste F para nenhuma destas variáveis, à 5% de probabilidade (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância de comprimento de planta (CP), número de folhas (NF), teor relativo de clorofila (SPAD), volume de colmo (VC), massa de matéria seca do colmo+bainha (MSCB), folhas (MSF), parte aérea (MSPA) e área foliar de plantas de milho com e sem inoculação de *A. brasilense* e submetidas a doses de P no solo

FV ¹	GL	Quadrados Médios									
		CP	NF	SPAD	VC	MSCB	MSF	MSPA	AF		
Inoculação	1	43,45 ^{ns}	0,03 ^{ns}	8,03 ^{ns}	1,27 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,51 ^{ns}		
Doses Fósforo	3	786,41 ^{**}	0,70 ^{**}	51,17 ^{**}	456,11 ^{**}	6,03 ^{**}	10,20 ^{**}	31,80 ^{**}	125,73 ^{**}		
Interação	3	95,30 [*]	0,12 ^{ns}	4,04 ^{ns}	2,50 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,16 ^{ns}	10,16 ^{**}		
Resíduo	21	22,07	0,09	6,77	7,09	0,12	0,10	0,33	1,99		
CV%	-	5,40	4,29	10,98	16,50	19,56	10,96	12,53	12,82		
Média	-	8,92	6,97	23,69	16,14	1,73	2,84	4,57	10,99		

¹ Fonte de variação bloco não demonstrada; FV: Fator de variação; GL: grau de liberdade; ^{ns} Não significativo, * e ** Significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste de Fisher-Snedecor.

Quando sementes de milho receberam a inoculação de *A. brasilense*, observou-se CP linear crescente para o aumento das doses de P, alcançando valor máximo de 99,12 cm de altura, e incremento de 0,049 cm para cada mg dm⁻³ de P (Figura 2 A). Quando as plantas não foram submetidas à inoculação de *A. brasilense*, apresentaram-se médias com comportamento quadrático atingindo comprimento de 92,24 cm com 313,75 mg dm⁻³ de P (Figura 2 A). Este comportamento distinto demonstra que ao realizar o tratamento de inoculação de *A. brasilense* juntamente às plantas, estas apresentaram maior aproveitamento de doses elevadas de P no solo, em relação a esta variável (Figura 2 A).

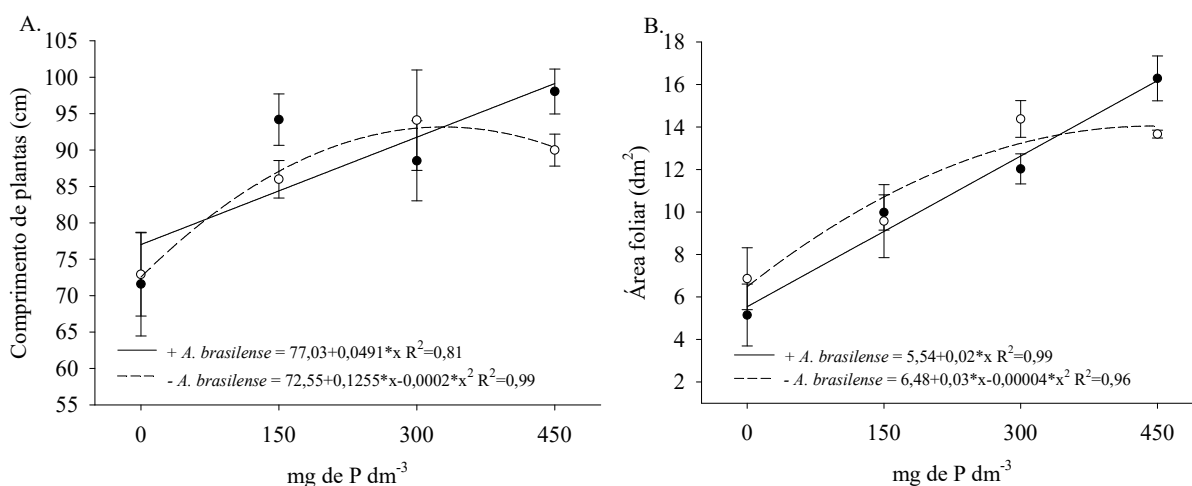


Figura 2 - Comprimento de plantas (A) e área foliar (B) de plantas de milho com e sem inoculação de *A. brasilense*, submetidas a doses de fósforo no solo. + *A. brasilense*: com inoculação; - *A. brasilense*: sem inoculação. As barras representam os valores de desvio padrão.

A área foliar mostrou comportamento semelhante ao comprimento de plantas (Figura 2 B). A inoculação de *A. brasilense* proporcionou médias crescentes de área foliar em relação as doses de fósforo, apresentando maior média (16,29 dm²) quando submetida adubação de 450 mg dm⁻³ de P. Plantas que não receberam inoculação de *A. brasilense*, revelaram

comportamento quadrático com valor máximo de AF (13,35 dm²) aos 375 mg dm⁻³ de P, diminuindo aos 450 mg dm⁻³ de P.

Com o incremento na AF proporcional ao CP, nas plantas inoculadas, reforça-se a hipótese de maior desenvolvimento de pelos radiculares, aumentando a eficiência de absorção de nutrientes na solução do solo. Tal condição, pode ser resultado da produção de fitohormônios como auxina e giberelina promovida pelas bactérias do gênero *Azospirillum* (AHEMAD; KIBRET, 2014). Estes proporcionam o aumento da quantidade de pelos radiculares e alongamento de raízes, melhorando significativamente o aproveitamento de absorção de nutrientes do solo (BALDANI et al., 1997), principalmente aqueles que possuem baixa mobilidade por difusão, neste caso o P (RAIJ, 2011).

O ácido indol-3-acético (IAA), principal fitohormônio excretado pelo *A. brasilense*, em plantas, estimula respostas rápidas como aumento e alongamento celular induzidas quando as auxinas são transportadas para dentro da célula, onde são ionizadas e liberam H⁺ no citoplasma, ativando a bomba de prótons associada à ATPase membranar (FAGAN et al., 2015). Desta forma, a inoculação de *A. brasilense* aumentou a eficiência de assimilação de doses elevadas de P no solo, proporcionando plantas de milho maiores e com maior capacidade de captação de luz solar através do aumento de AF (Figura 2).

Em condições de excesso de adubação fosfatada, não existem restrições em absorção pelas raízes, porém ao exceder a quantidade de assimilação do elemento pelas plantas, neste caso, ocorre o efluxo de P pelas raízes (RAIJ, 2011). O comportamento quadrático apresentado no tratamento sem inoculação, exemplifica a capacidade máxima de aproveitamento deste nutriente (Figura 2 A e B).

Uma resposta linear diretamente proporcional ao aumento de doses de P, também foi observada para MSCB, MSF, MSPA e VC (Figura 3 A, B, C e D, respectivamente). O índice SPAD, diminuiu proporcionalmente ao aumento das doses de P (Figura 3 C).

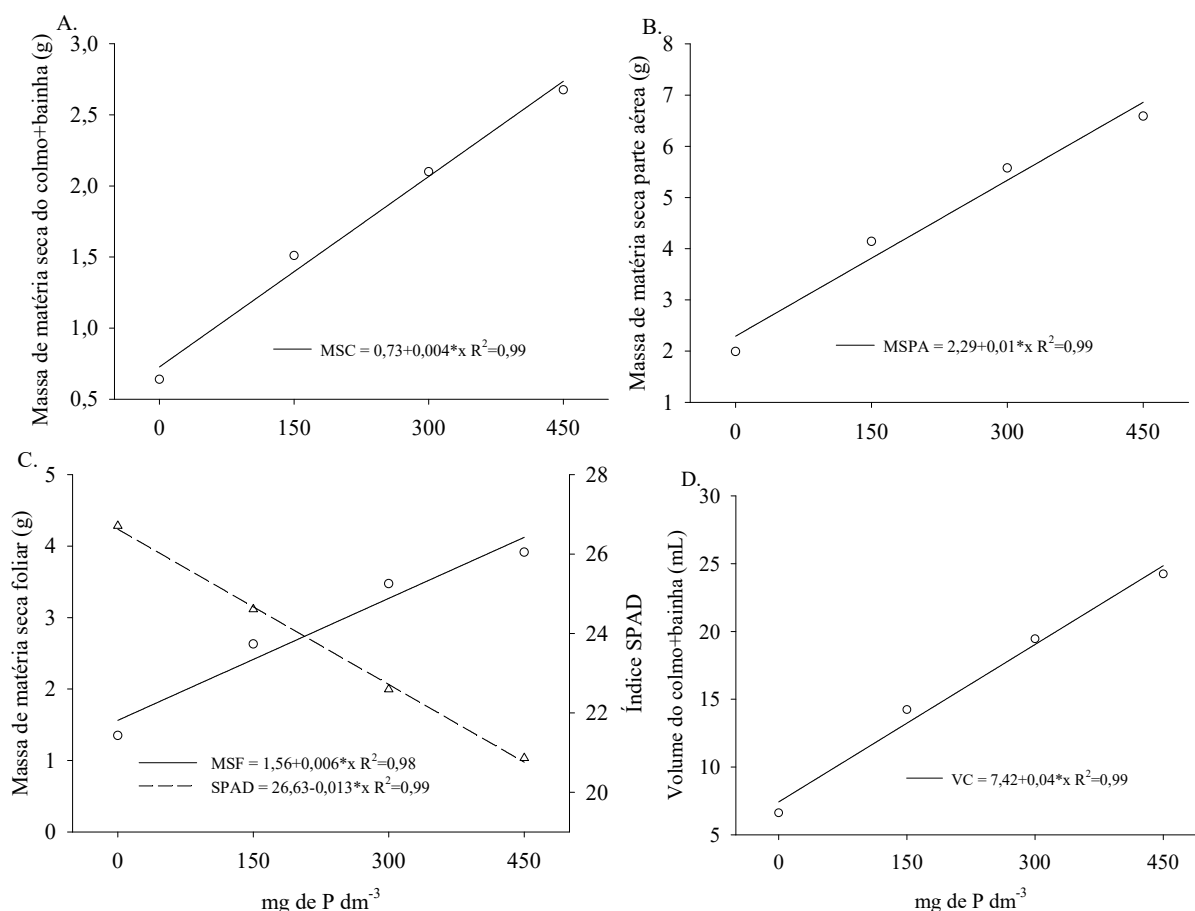


Figura 3 -Massa de matéria seca de colmo+bainha (A), parte aérea (B), foliar e índice SPAD (C) e volume do colmo (D) de plantas de milho independentemente da inoculação de *A. brasilense*, submetidas a doses de P no solo. MSCB: massa de matéria seca do colmo+bainha; MSPA: massa de matéria seca parte aérea; MSF: massa de matéria seca foliar; SPAD: teor relativo de clorofila; VC: volume do colmo.

As plantas responderam às doses de P juntamente ao desenvolvimento e acúmulo de massa, porém o teor de clorofila está diretamente relacionado ao teor de N disponível às raízes (ARGENTA et al., 2003). O N fornecido para as plantas neste cultivo ocorreu através da mineralização da matéria orgânica, disponível no solo. Portanto, o acréscimo das doses de P no solo resultando em maior acúmulo de massa, proporcionou um efeito de diluição do nitrogênio absorvido, resultando em decréscimo no índice SPAD.

Em relação as medidas de trocas gasosas, a análise de variância mostrou diferença para variáveis de taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*), eficiência no uso da água (*EUA*) e eficiência intrínseca no uso da água (*EiUA*), em função das doses de P no solo. A transpiração foliar (*E*) não foi influenciada pelos tratamentos estudados (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância de taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*), transpiração foliar (*E*), eficiência no uso da água (*EUA*) e eficiência intrínseca no uso da água (*EiUA*) de plantas de milho com e sem inoculação de *A. brasilense* e submetidas a doses de P no solo

FV ¹	GL	Quadrados Médios				
		<i>A</i>	<i>g_s</i>	<i>E</i>	<i>EUA</i>	<i>EiUA</i>
		μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹	mol m ⁻² s ⁻¹	mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹	A/E	A/ <i>g_s</i>
Inoculação	1	10,45 ^{ns}	5,71 ^{-4 ns}	0,45 ^{ns}	0,14 ^{ns}	72,25 ^{ns}
Doses P	3	66,39 ^{**}	1,39 ^{-3 *}	0,30 ^{ns}	2,79 ^{**}	1281,50 ^{**}
Interação	3	3,08 ^{ns}	1,25 ^{-4 ns}	0,14 ^{ns}	0,17 ^{ns}	87,35 ^{ns}
Resíduo	21	7,27	3,22 ⁻⁴	0,37	0,08	258,29
CV (%)	-	17,03	24,10	24,47	3,87	7,36
Média	-	15,83	0,07	2,47	7,22	218,35
Com <i>A. brasilense</i>		16,40	0,08	2,59	7,16	216,84
Sem <i>A. brasilense</i>		15,26	0,07	2,35	7,29	219,86

¹ Fonte de variação bloco não demonstrada; FV: Fator de variação; GL: grau de liberdade; ^{ns} Não significativo, * e ** Significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste de Fisher-Snedecor.

As adubações crescentes de P proporcionaram incremento significativo para variáveis de condutância estomática e taxa de assimilação líquida de CO₂, atingindo máxima de 0,084 mol m⁻² s⁻¹ e 18,15 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹, respectivamente (Figura 4 A). Apesar das plantas de milho apresentarem resposta esperada conforme a fertilização de P ao solo, as médias de *g_s* e *A* são consideradas baixas para a cultura do milho (ciclo C4) (MACHADO; LAGÔA, 1994), devido à ausência de fertilização de N na base.

Após abertura estomática, em condições diurnas, a transpiração foliar ocorre de forma inevitável, desta forma, quando as plantas foram submetidas ao tratamento de 300 mg dm⁻³ de P, ocorreu aumento de *E* (Figura 4.B) o quê em sequência, atenuou a eficiência no uso da água (*EUA*) no mesmo tratamento (300 mg dm⁻³ de P) (Figura 4.C). A quantidade de μmols CO₂ fixado por mmols de H₂O perdido por transpiração (*EUA*), foi maior quando se utilizou 150 mg dm⁻³ de P, ou seja, embora a maior média de fotossíntese líquida tenha ocorrido aos 300 mg dm⁻³ de P, quando as plantas foram submetidas a 150 mg dm⁻³ de P, utilizou-se menor quantidade de água para cada molécula de CO₂ fixado, de forma independente da inoculação de *A. brasilense*.

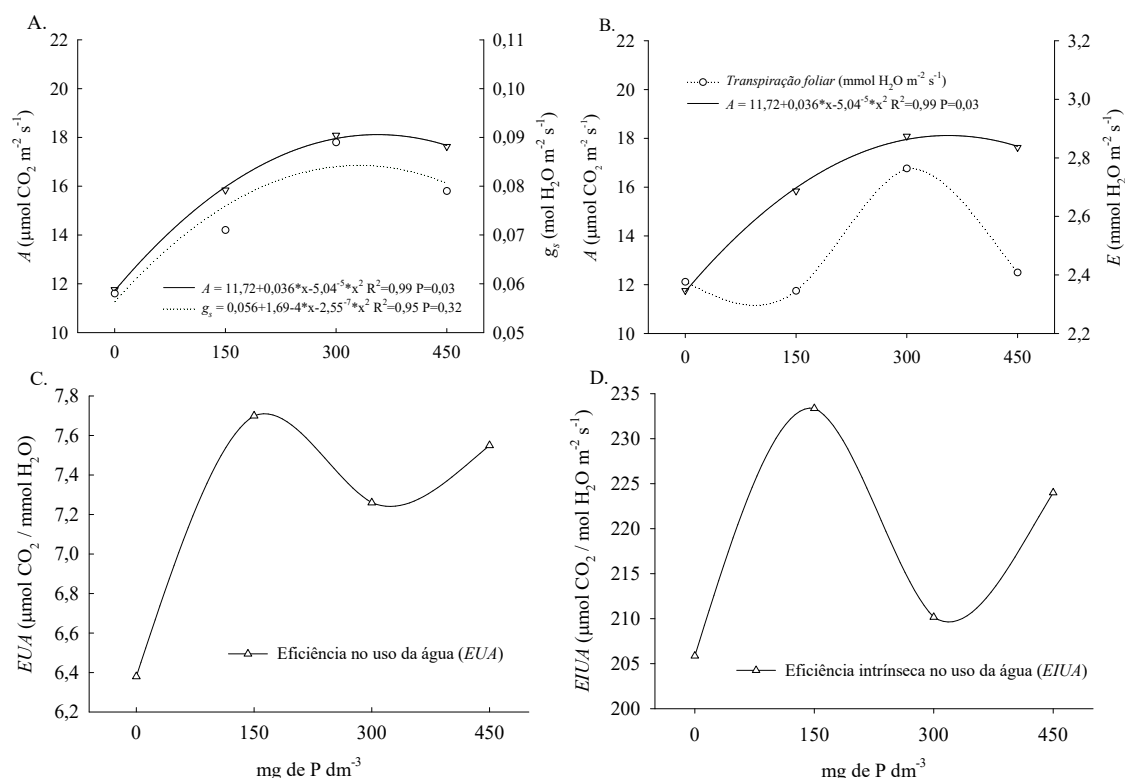


Figura 4 - Taxa de assimilação líquida de CO₂ e condutância estomática (A), eficiência no uso da água e eficiência intrínseca no uso da água (B) de plantas de milho independentemente da inoculação de *A. brasilense*, e submetidas a doses de P no solo.

Da mesma forma foi observado para a eficiência intrínseca no uso da água, onde 150 mg dm⁻³ de P, proporcionou maior quantidade de $\mu\text{mol CO}_2$ fixado por $\text{mol H}_2\text{O}$ na condutância dos estômatos (Figura 4.D). A turgescência das células guardas, permitiu-se a entrada de CO₂ por difusão, conseqüentemente sua fixação no estroma dos cloroplastos. Valores de A e g_s de plantas de *Phaseolus vulgaris* L., submetidas ao estresse hídrico e fertilizadas com amônio dihidrogenofosfato ((NH₄) H₂PO₄), por pulverização, elevaram a *EiUA* (SANTOS et al., 2004), condição semelhante ao observado no presente estudo.

Ao avaliar as curvas de densidades de fluxos de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), o ponto de compensação de luz foi maior em plantas de milho fertilizadas com 300 mg dm⁻³ de P (36,89 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) quando comparado as que não receberam fertilização fosfatada (28,76 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Figura 5.A). A eficiência quântica aparente (Φ , coeficiente angular da região linear da curva de resposta a luz) foi de 0,054 e 0,041 μmol de CO₂ para plantas fertilizadas com P e sem adição de P, respectivamente. A luz aumenta a fixação de CO₂ e proporciona a queda da respiração e fotorrespiração aumentando a fotossíntese líquida (TAIZ e ZEIGER, 2013). Quando a quantidade de CO₂ liberada para atmosfera, na respiração e fotorrespiração, é a mesma assimilada pelas folhas, na fotossíntese, este evento é chamado de ponto de compensação de luz (LARCHER, 2006).

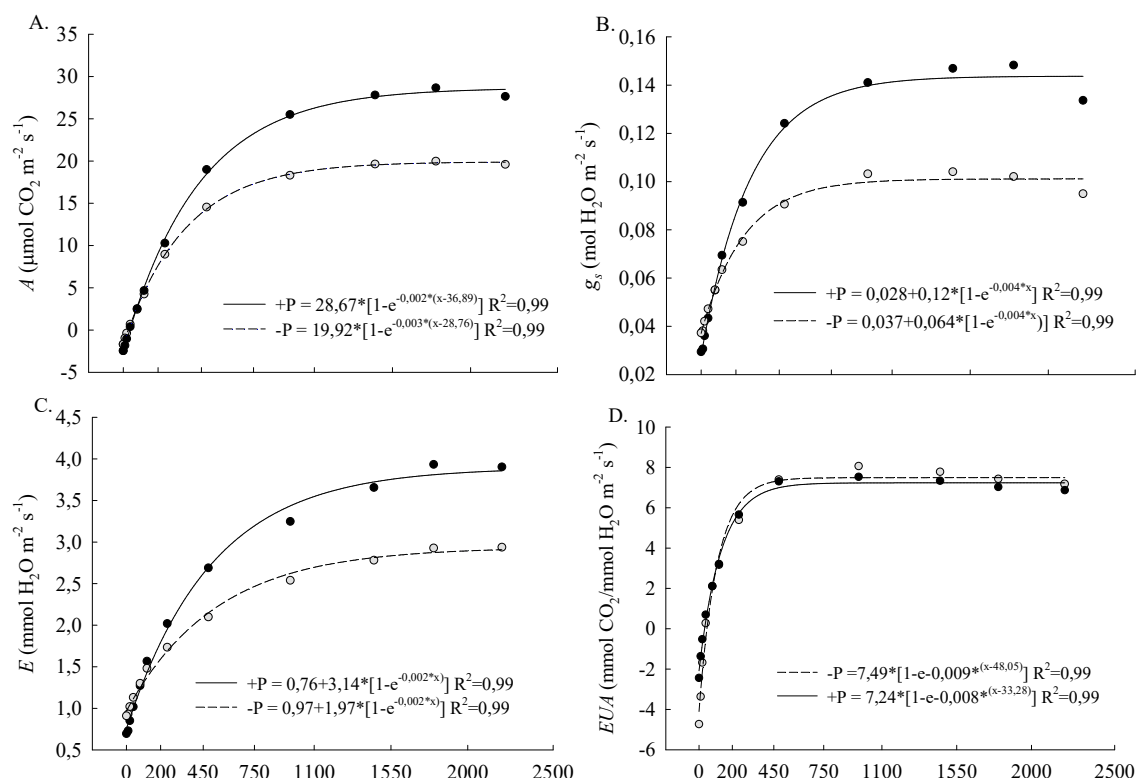


Figura 5 - Curvas de resposta a luz, taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (B), transpiração foliar (C) e eficiência no uso da água (D) de plantas de milho independentemente da inoculação de *A. brasilense*, e submetidas a adubação de P no solo. +P: Com adubação de 300 mg dm^{-3} de P no solo; -P: Sem adubação de P no solo.

Por meio destes resultados, a adição de P no solo pode ter aumentado a eficiência na utilização de ATP e NADPH no ciclo de Calvin, quando comparado ao tratamento sem fertilização de P. Plantas que foram conduzidas em solo sem adição de P, obtiveram taxa de assimilação líquida de CO_2 saturada mais rapidamente, em relação àquelas fertilizadas com P, atingindo A_{max} de $19,92 \mu\text{mol}$ de CO_2 o qual corresponde 30,52% inferior comparado ao tratamento de 300 mg dm^{-3} de P ($28,67 \mu\text{mol}$ de CO_2) (Figura 5 A). Em condições de campo, o A_{max} de plantas de milho podem chegar a $42 \mu\text{mol}$ de $\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, não apresentando saturação lúmica (MACHADO; LAGÔA, 1994). Em condições adequadas de umidade no solo, a luz é um dos principais fatores no processo de abertura estomática. Após abertura dos estômatos, a partir das primeiras horas do dia, a transpiração e difusão de CO_2 estão diretamente relacionados ao funcionamento do maquinário fotossintético (TAIZ e ZEIGER, 2013).

O aumento de densidades do fluxo de fótons, levou ao aumento da g_s o que provoca o aumento de E (Figura 5. B e C). As médias de g_s corresponderam de forma semelhante a taxa de assimilação líquida de CO_2 (Figura 5 A), em relação aos tratamentos de adubação fosfatada. Apesar dos valores de E também serem superiores quando submetidas a adição de P ao solo,

para eficiência no uso da água (*EUA*), os tratamentos 300 mg dm⁻³ e 0 mg dm⁻³ não apresentaram diferença entre si (Figura 5. D).

Plantas de milho submetidas a fertilidade natural do solo, diminuem drasticamente variáveis relacionadas a fotossíntese, dentre elas, são diretamente afetadas a condutância estomática e taxa de assimilação líquida de CO₂ (WEI et al., 2016). No presente estudo, foi observado resultados semelhantes, confirmando a importância do P como elemento essencial influenciando diretamente a fotossíntese na cultura do milho. Visto que, a fertilização de 300 mg dm⁻³ de P apresentou melhores resultados comparado às demais doses de P, em relação ao desenvolvimento e trocas gasosas da cultura do milho, corroborando com a dose de recomendação (NOVAES; NEVES; BARROS, 1991). A utilização da inoculação de *A. brasilense* demonstrou a capacidade de maximizar o aproveitamento de P, juntamente ao desenvolvimento de comprimento e área foliar de plantas de milho.

7.2 2º Cultivo

Ao avaliar os efeitos residuais da inoculação e da adubação fosfatada no desenvolvimento de plantas de milho, foi observado que as variáveis de diâmetro de colmo (DC), comprimento de plantas (CP), área foliar (AF), massa de matéria seca de colmo+bainha (MSCB), folhas (MSF) e parte aérea (MSPA), apresentaram diferença entre o fator doses remanescentes de P no solo, pelo teste F a 5% e 1% de probabilidade (Tabela 4). Em função da população remanescente de *A. brasilense* e a interação entre os fatores, a análise de variância não revelou diferenças para características de crescimento avaliadas (NF, DC, CP, AF, MSCB, MSF e MSPA).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância do número de folhas (NF), diâmetro de colmo (DC), comprimento de plantas (CP), área foliar (AF), massa de matéria seca de colmo+bainha (MSCB), folhas (MSF) e parte aérea (MSPA), de plantas de milho submetidas a população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, conduzidas sob doses remanescentes de fósforo no solo e adubação nitrogenada em cobertura, aos 55 DAE

FV ¹	GL	Quadrados Médios							
		NF	DC (mm)	CP (m)	AF (dm ²)	MSCB (g)	MSF (g)	MSPA (g)	
Inoculação	1	0,42 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,006 ^{ns}	0,26 ^{ns}	7,33 ^{ns}	0,42 ^{ns}	11,27 ^{ns}	
Dose P	3	0,13 ^{ns}	3,86 [*]	0,114 ^{**}	74,61 ^{**}	31,46 ^{**}	10,54 ^{**}	78,12 ^{**}	
Interação	3	0,11 ^{ns}	0,75 ^{ns}	0,003 ^{ns}	6,77 ^{ns}	4,39 ^{ns}	1,61 ^{ns}	10,80 ^{ns}	
Resíduo	21	0,33	1,27	0,007	6,42	4,34	0,96	8,67	
CV%		6,97	9,77	6,47	14,93	31,4	15,71	22,86	
Média		8,28	11,54	1,26	16,96	6,64	6,25	12,88	

¹ fonte de variação bloco não demonstrada GL:3; ^{ns} não significativo, * e ** significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste de Fisher-Snedecor.

Para estas variáveis, a ausência do efeito residual de *A. brasilense* no solo, pode estar relacionada à população inicial do inóculo utilizado ou espécie cultivada. No cultivo anterior do presente estudo utilizou-se um inoculante de alta concentração 10^8 UFC mL⁻¹. Dobbelaere et al. (2002), sugeriram uma concentração ótima de inóculo entre 10^5 – 10^6 UFC planta⁻¹ da estirpe *A. brasilense* Sp 245 para cultura do trigo, o qual proporcionou aumento no desenvolvimento radicular e massa de matéria seca.

As variáveis biométricas, DC, CP e AF apresentaram comportamento quadrático, revelando valores máximo de 11,89 mm de DC com 364,58 mg dm⁻³ de P; 1,48 m de CP com 392,15 mg dm⁻³ de P; e 19,37 dm² de AF com 325,07 mg dm⁻³ de P (Figura 6.A, B e C). As variáveis MSCB, MSF e de MSPA também mostraram respostas quadráticas em função das doses remanescentes de P, sendo obtidos com 342,64 mg dm⁻³ de P acúmulo de 8,40 g de MSCB; aos 321,28 mg dm⁻³ de P atingiu-se 7,16 g de MSF; e aos 333,85 mg dm⁻³ de P o peso de MSPA apresentou média de 15,54 g por planta (Figura 6.D, E e F).

Na cultura do milho, Silva et al. (2014) ao testarem doses crescentes de N e P utilizando uréia e superfosfato simples como fonte, respectivamente, observaram aumento significativo de variáveis de produção como, diâmetro e comprimento de espigas, massa de 100 grãos e produtividade de grãos. A realização da adubação fosfatada possui como principal objetivo buscar incremento na produtividade, em detrimento aos problemas relacionados ao seu excesso, tal como o desequilíbrio com outros minerais, desta forma, certas doses excessivas de fertilizantes fosfatados não se observam incrementos na produtividade (KLEIN; AGNE, 2012). Bastos et al. (2010) ao estudarem o efeito de diferentes doses de P recomendadas pela capacidade máxima de adsorção de P (CMAP) em plantas de milho, também observaram efeito quadrático sob teor foliar de P e acúmulo de massa de matéria seca da parte aérea, bem como diferentes respostas em diferentes classes de solo relacionado a capacidade máxima de adsorção.

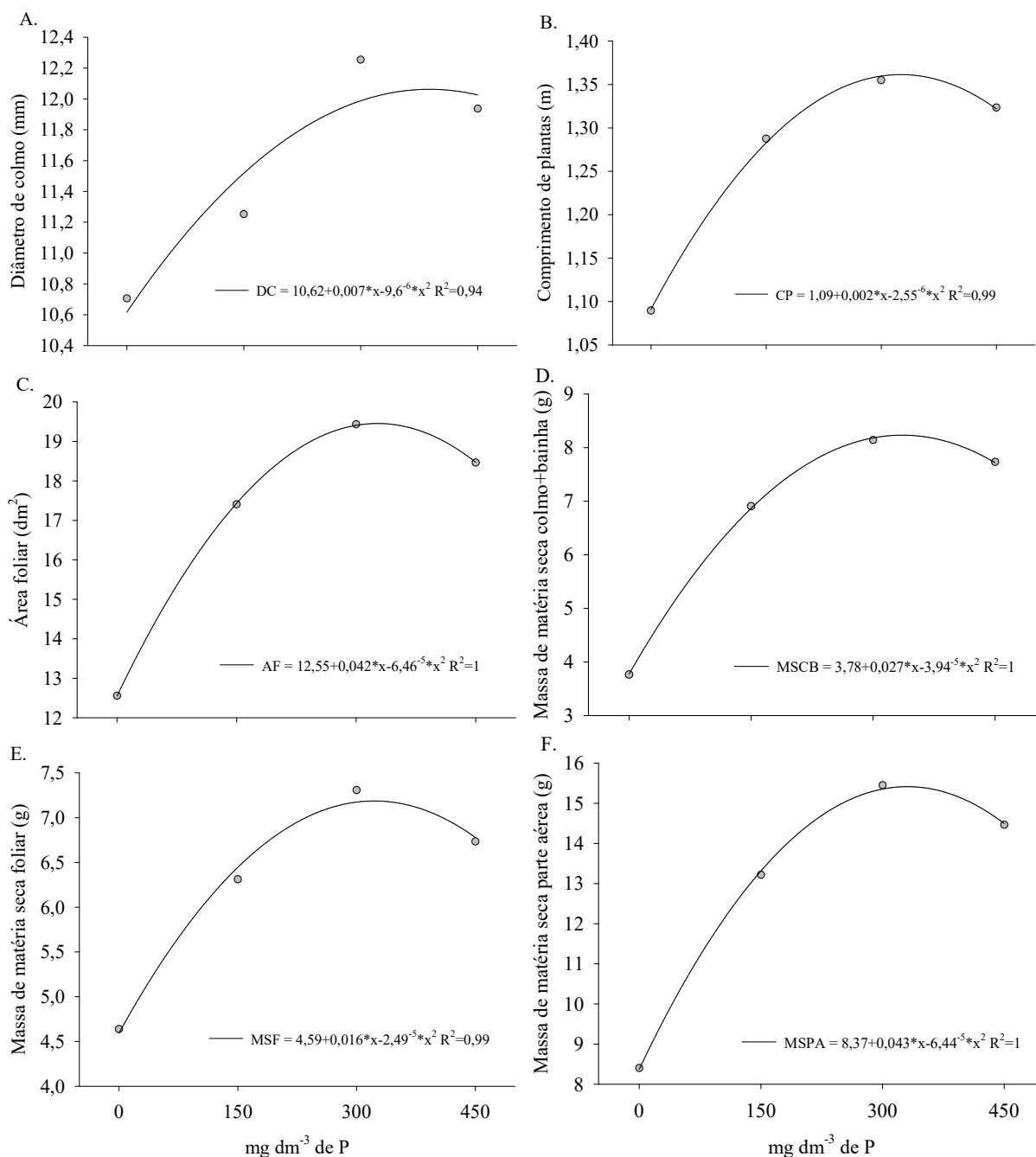


Figura 6 - Diâmetro de colmo (A), comprimento de plantas (B), área foliar (C), massa de matéria seca de colmo+bainha (D), foliar (E) e parte aérea (F) de plantas de milho independentemente da população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, conduzidas sob doses remanescentes de P no solo e adubação nitrogenada em cobertura, aos 55 DAE.

Em relação ao efeito da adubação nitrogenada de cobertura, sob o teor relativo de clorofila foliar no *terço médio foliar* de plantas de milho submetidas à adubação fosfatada e população remanescente de *A. brasilense*. Aos 31 DAE, antes da adubação nitrogenada, houve interação entre os fatores, e aos 40 e 47 DAE houve diferença entre doses de P (Tabela 5).

Tabela 5 - Resumo da análise de variância do índice SPAD no terço médio foliar de plantas de plantas de milho submetidas a população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, conduzidas sob doses remanescentes de P no solo e adubação nitrogenada em cobertura aos 33 DAE

FV	GL	Quadrados médios								
		V4 30 DAE	V5 31 DAE	V5 32 DAE	Adubação nitrogenada	V6 34 DAE	V6 37 DAE	V7 40 DAE	V7 43 DAE	V8 47 DAE
Inoculação	1	0,01 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,72 ^{ns}		1,53 ^{ns}	36,76 ^{ns}	1,66 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,26 ^{ns}
Dose P	3	3,01 ^{ns}	4,53 [*]	3,15 ^{ns}		1,45 ^{ns}	31,35 ^{ns}	65,23 [*]	12,36 ^{ns}	64,97 ^{**}
Interação	3	2,77 ^{ns}	8,13 ^{**}	1,79 ^{ns}		5,84 ^{ns}	7,17 ^{ns}	20,24 ^{ns}	16,84 ^{ns}	12,18 ^{ns}
Resíduo	21	2,68	1,46	1,98		4,17	17,99	13,46	19,69	8,09
CV%		10,17	7,99	10,24		9,23	17,19	11,31	14,75	10,41
Média		16,10	15,12	13,75		15,04	24,68	32,44	30,09	27,34

DAE: dias após emergência. ^{ns} não significativo, * e ** significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste de Fisher-Snedecor.

Ao avaliar o teor relativo de clorofila no *terço apical foliar*, anteriormente da adubação nitrogenada (V4 e V5), a análise de variância não revelou significância em relação aos fatores estudados (Tabela 6). No entanto, após adição de nitrogênio, aos 40 e 43 DAE (V7), foi observado efeito significativo em função de doses P. Também houve interação entre os fatores, adubação remanescente de doses de P e população remanescente de *A. brasilense*, durante avaliação do índice SPAD aos 47 DAE (V8).

Tabela 6 - Resumo da análise de variância do índice SPAD no terço apical foliar de plantas de milho submetidas a população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, conduzidas sob doses remanescentes de fósforo no solo e adubação nitrogenada em cobertura aos 33 DAE

FV	GL	Quadrados médios								
		V4 30 DAE	V5 31 DAE	V5 32 DAE	Adubação nitrogenada	V6 34 DAE	V6 37 DAE	V7 40 DAE	V7 43 DAE	V8 47 DAE
Inoculação	1	0,01 ^{ns}	15,96 ^{ns}	0,001 ^{ns}		0,81 ^{ns}	8,40 ^{ns}	18,76 ^{ns}	19,22 ^{ns}	46,56 [*]
Dose P	3	3,01 ^{ns}	1,94 ^{ns}	7,951 ^{ns}		2,29 ^{ns}	4,34 ^{ns}	212,07 ^{**}	240,69 ^{**}	117,09 ^{**}
Interação	3	2,77 ^{ns}	3,37 ^{ns}	4,584 ^{ns}		0,98 ^{ns}	0,74 ^{ns}	3,30 ^{ns}	5,18 ^{ns}	42,76 [*]
Resíduo	21	2,68	5,83	4,138		1,93	6,45	16,48	13,94	10,32
CV%		10,43	12,84	10,57		11,26	10,32	10,74	9,08	7,66
Média		18,28	18,80	19,24		18,13	24,63	37,81	41,10	41,94

DAE: dias após emergência. ^{ns} não significativo, * e ** significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste de Fisher-Snedecor.

Aos 31 DAE plantas de milho conduzidas sob população remanescente de *A. brasilense*, apresentaram comportamento quadrático para o teor relativo de clorofila no terço médio foliar, em função de doses remanescentes de P no solo. A curva se iniciou com redução até aos 145,98 mg dm⁻³ de P com média de 13,88 (índice SPAD), conforme ajuste da equação de regressão, atingindo valor máximo aos 450 mg dm⁻³ de P. Plantas de milho que não foram conduzidas em solo sob população remanescente de bactérias, apresentaram comportamento quadrático com aumento do teor relativo de clorofila e maior média (15,56) aos 246,30 mg dm⁻³ (Figura 7.A).

Estes resultados condizem com os encontrados por Baldotto et al. (2012a) que ao utilizarem bactérias endofíticas fixadoras de N e solubilizadoras de fosfato em milho, encontraram incrementos significativos para o índice SPAD em consequência, maiores taxas de crescimento. Vale ressaltar que o solo utilizado na condução do experimento, apresentava pH abaixo de 5, nestas condições são predominantes as combinações de P com ferro e alumínio (MOTTA et al., 2002). No entanto, rizobactérias solubilizadoras de fosfato possuem capacidade de solubilização mineral de fosfatos, tal como a mineralização de fosfatos orgânicos (fitato) (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016).

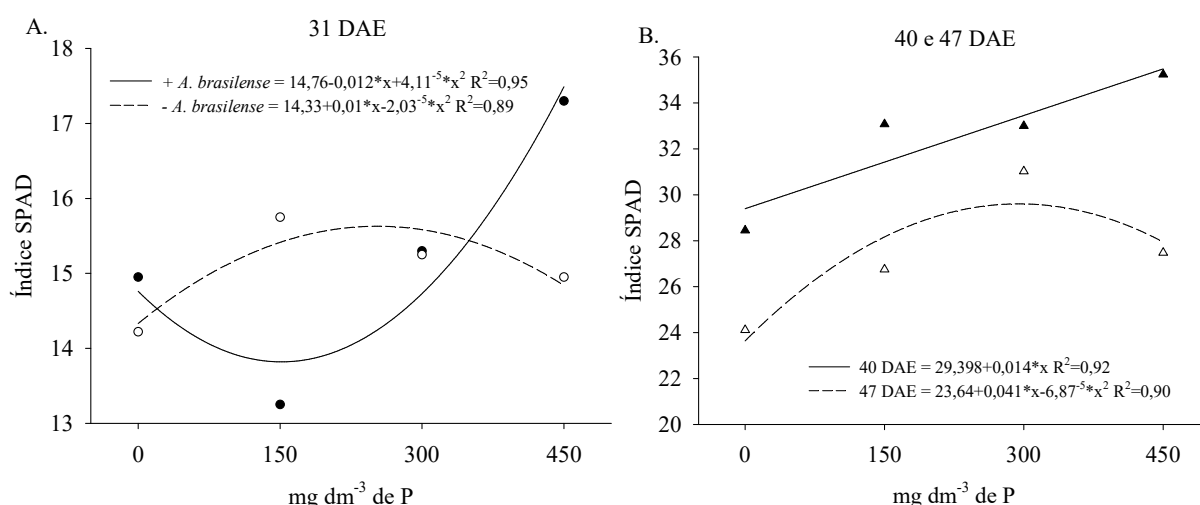


Figura 7 - Teor relativo de clorofila no terço médio foliar de plantas de milho conduzidas sob população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, em função de doses remanescentes de fósforo no solo e adubação nitrogenada em cobertura, aos 31 DAE (V5) (A) e, independentemente da população remanescente de *A. brasilense* aos 40 (V7) e 47 DAE (V8) (B). +*A. brasilense*: com inoculação; -*A. brasilense*: sem inoculação.

Aos 40 DAE a análise de regressão revelou uma reta ascendente para o índice SPAD no terço médio foliar, conforme o aumento de doses remanescentes de P no solo, incrementando 19,24% no teor relativo de clorofila, em relação ao tratamento sem inoculação na dose de 450 mg dm⁻³ de P. Plantas de milho avaliadas aos 47 DAE obtiveram aumento do índice SPAD conforme doses remanescentes de P até a dose de 298,39 mg dm⁻³, com média de 29,75 (Figura 7.B).

Os teores de clorofila obtidos no presente estudo apresentaram inferioridade em comparação com Argenta et al. (2003), em todas fases fenológicas avaliadas, provavelmente pela razão de não ser utilizado adubação nitrogenada de semeadura. Segundo Argenta et al. (2003), ao avaliaram o conteúdo de clorofila na região do terço médio foliar do milho, para diagnóstico do nível de N na planta de milho, as leituras no clorofilômetro acima de 45,4, 52,1,

55,3 e 58,0, respectivamente, para os estádios de V3 - V4, V6 - V7, V10 - V11 e de espigamento, representam nível adequado de N.

De Quadros et al. (2014) em condições á campo, ao avaliarem a inoculação de diferentes espécies de *Azospirillum* na cultura do milho, desprovida de adubação nitrogenada, em diferentes estádios fenológicos, observaram que as bactérias do gênero *Azospirillum* promoveram maior teor relativo de clorofila nas folhas, predominantemente durante a fase vegetativa da cultura. Araújo et al. (2014) observaram incremento significativo na produtividade de milho quando a inoculação de *A. brasilense* foi associada a adubação nitrogenada.

Na fase vegetativa V7, o teor relativo de clorofila no terço apical foliar de plantas de milho aos 43 DAE obteve-se maior média (45,51) aos 357,14 mg dm⁻³ de P, o qual foi superior em relação aos 40 DAE com maior média (42,07) aos 343,43 mg dm⁻³ de P (Figura 8.A).

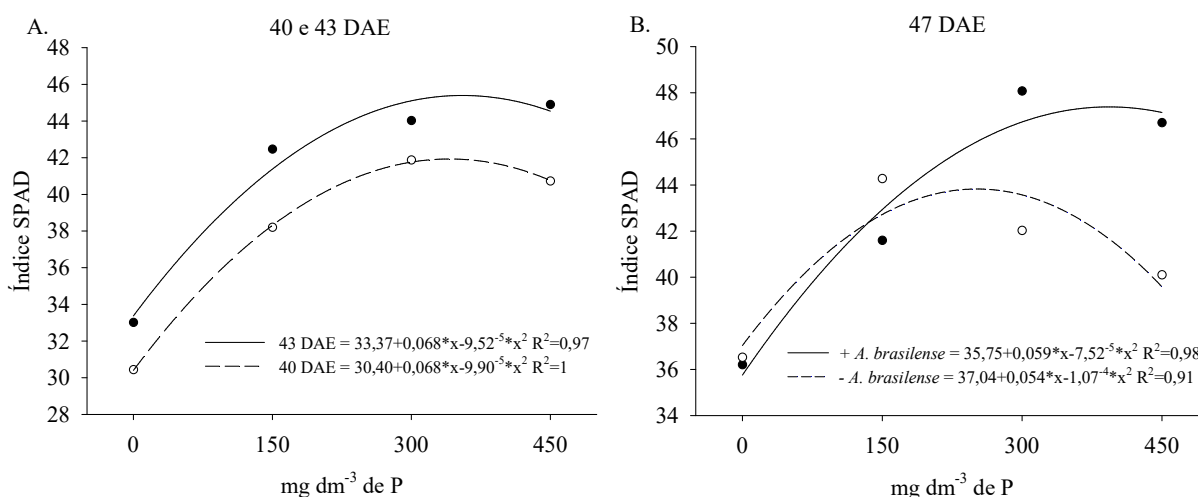


Figura 8 - Teor relativo de clorofila no terço apical foliar de plantas de milho independentemente da população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, conduzidas sob doses remanescentes de fósforo no solo e adubação nitrogenada em cobertura, aos 40 e 43 DAE (V7) (A) e, em função da população remanescente de *A. brasilense* aos 47 DAE (V8) (B). + *A. brasilense*: com inoculação; - *A. brasilense*: sem inoculação.

A população remanescente de *A. brasilense*, incrementou no conteúdo de clorofila no terço apical foliar de plantas de milho, cultivadas sob doses remanescentes de P no solo, aos 47 DAE, quando comparado ao tratamento sem inoculação, desprovido da população remanescente de *A. brasilense* (Figura 8.B). Ambos tratamentos apresentaram curvas quadráticas com pontos máximos distintos, sendo para população remanescente de *A. brasilense* superior (47,32 aos 392,28 mg dm⁻³ de P) ao tratamento sem inoculação (43,85 aos 252,33 mg dm⁻³) com incremento de 7,33%. O acréscimo no índice SPAD, pode promover o aumento da eficiência quântica fotossintética, ao passo que a produção de fotoassimilados corrobora no acúmulo de massa, elevando a produtividade. Durante a fase vegetativa na cultura

do milho, o aumento no teor relativo de clorofila propiciou, na fase reprodutiva, incremento em até 4,8 t ha⁻¹ em massa de matéria seca de folhas + colmo, em função da inoculação de *A. brasilense*, *A. lipoferum* e *A. oryzae*, utilizando o híbrido SH 5050 (De QUADROS et al., 2014).

De acordo com as condições do presente estudo, ao observar o desenvolvimento de plantas de milho em relação ao teor relativo de clorofila foliar, pode-se afirmar que o índice SPAD em plantas de milho é maior na região do terço apical foliar (Figura 9). O monitoramento do teor de clorofila foliar utilizando o clorofilômetro pode indicar níveis adequados e de deficiência de N na cultura do milho (ARGENTA et al., 2003). A assimilação de nitrogênio pelas plantas requer alta demanda energética, e esta é promovida nos cloroplastos pela fotossíntese (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Para maior aproveitamento deste nutriente as plantas necessitam de alta atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato 2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT), produzindo glutamina ou asparagina para o seu transporte atendendo aos drenos (BASI et al., 2011). O *A. brasilense* pode ter influenciado na assimilação de N juntamente ao seu transporte, atenuando o teor de clorofila na região do terceiro terço foliar de plantas de milho, durante o desenvolvimento inicial.

A partir da tabela 7, pode-se observar correlação proporcional entre o teor relativo de clorofila foliar e a fotossíntese líquida de CO₂, de forma independente da inoculação de *A. brasilense*, em função da adubação nitrogenada (33 DAE), sob doses de P no solo, durante o desenvolvimento inicial da cultura do milho (V4 a V8) (Figura 9).

Tabela 7 – Coeficientes de correlação de Pearson entre variáveis de plantas de milho independente da população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, conduzidas sob doses remanescentes de fósforo no solo com adubação nitrogenada por cobertura aos 33 DAE

	SPAD TAF	A: 0	A: 150	A: 300	A: 450
SPAD TMF	0,918 **	0,757 *	0,853 *	0,838 *	0,875 **
SPAD TAF		0,589 ns	0,777 *	0,840 *	0,816 *
A: 0			0,955 **	0,894 **	0,937 **
A: 150				0,973 **	0,981 **
A: 300					0,986 **

SPAD TMF = índice SPAD do terço médio foliar; SPAD TAF = índice SPAD do terço apical foliar; A:0 = taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) de plantas sob adubação de 0 mg dm⁻³ de P; A:150 = A de plantas sob adubação de 150 mg dm⁻³ de P; A:300 = A de plantas sob adubação de 300 mg dm⁻³ de P; A:450 = A de plantas sob adubação de 450 mg dm⁻³ de P.

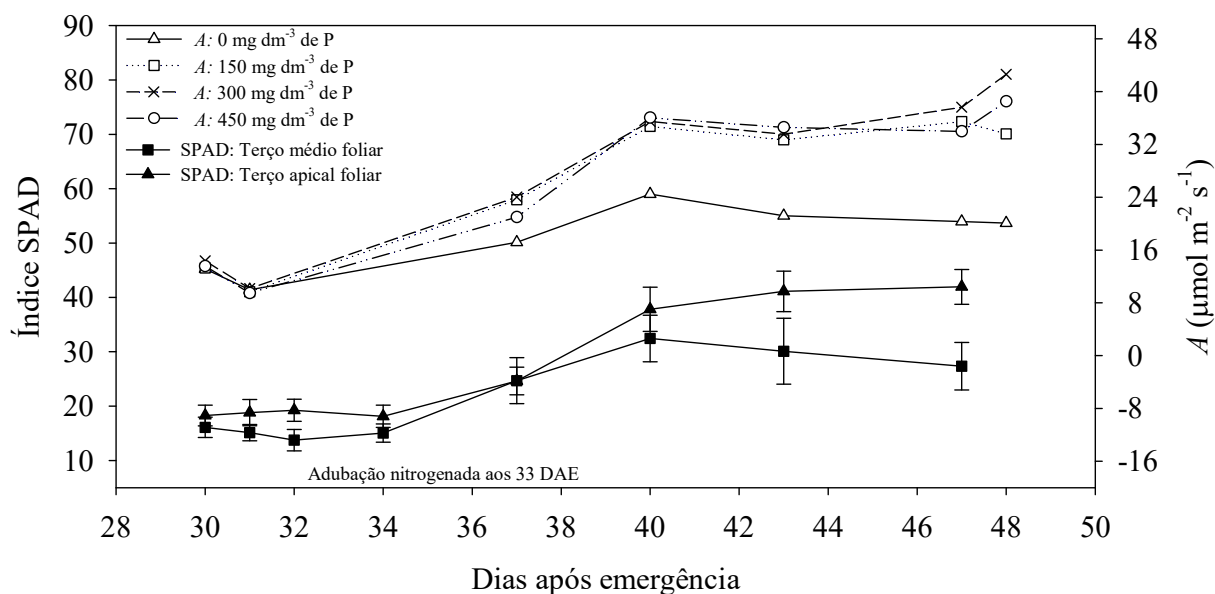


Figura 9 - Teor relativo de clorofila (índice SPAD) no terço médio e apical foliar, e taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) de plantas de milho independente da população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, conduzidas sob doses remanescentes de fósforo no solo com adubação nitrogenada por cobertura aos 33 DAE.

Em base dos resultados obtidos pelo índice SPAD, a inoculação de *A. brasilense* apresentou flutuação de resposta em função do tempo, na fase vegetativa da cultura do milho.

Ao avaliar o teor foliar de N, não foi observado diferenças para os fatores estudados. Já para o teor foliar de P, a análise de variância demonstrou diferença em relação a interação dos fatores de população remanescente de *A. brasilense* e doses de P, no solo (Tabela 8).

Segundo De Salomone; Döbereiner, (1996) a utilização de bactérias do gênero *Azospirillum* aumentam a atividade de nitrato redutase (NR), incrementam a assimilação de N pelas plantas e, conseqüentemente, proporcionam maiores produtividades (ARAÚJO et al., 2014). Porém, Reis Junior et al. (2008) ao avaliarem o comportamento de dois híbridos intervarietais de milho inoculados com *A. amazonense*, sob diferentes doses de N, utilizando solução nutritiva de Hoagland, não encontrou efeito da inoculação de *Azospirillum* na atividade de NR.

Tabela 8 - Resumo da análise de variância de teores foliares de N e P de plantas de milho submetidas a população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, conduzidas sob doses remanescentes de fósforo no solo e adubação nitrogenada em cobertura, aos 55 dias após emergência (V9)

FV	Quadrados Médios	
	N	P
Inoculação (I)	0,0957 ^{ns}	0,2209 ^{ns}
Adubação Fosfatada (A)	12,3384 ^{ns}	1,6564 ^{**}
Interação (I x A)	1,7189 ^{ns}	2,8496 [*]
Resíduo	10,8629	0,6724
CV (%)	17,33	27,17
Média (g kg ⁻¹)	19,01	3,13

^{ns} não significativo, * e ** significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste de Fisher-Snedecor.

Nutrientes que possuem alta exigência pelas plantas, como o N, geralmente influenciam diretamente os metabólitos primários. A fotossíntese é a principal fonte de energia química das plantas, quando submetidas ao déficit nutricional, características envolvidas na fotossíntese como abertura estomática e fixação de CO₂ são absolutamente afetadas. O amarelecimento das folhas está associado a um dos principais sintomas que a deficiência nitrogenada proporciona. Em folhas de milho, concentrações de proteínas solúvel, atividade da ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP) e a fotossíntese diminuem significativamente sob tais circunstâncias (WEI et al., 2016).

Ao realizar o desdobramento das médias do teor foliar de P, observou-se que o tratamento sem adição de P no solo sob população remanescente de *A. brasilense*, foi 37,58% superior quando comparado ao tratamento desprovido da inoculação de *A. brasilense* no cultivo anterior (Figura 10). Quando plantas de milho foram cultivadas sob dose remanescente de 300 mg dm⁻³ de P, a população remanescente de *A. brasilense* reduziu 37,24% do teor foliar de P quando comparado ao tratamento sem inoculação. A inoculação de *A. brasilense* no cultivo anterior, não incrementou no teor foliar de P de plantas de milho cultivadas em função de doses de 150 e 450 mg dm⁻³ de P.

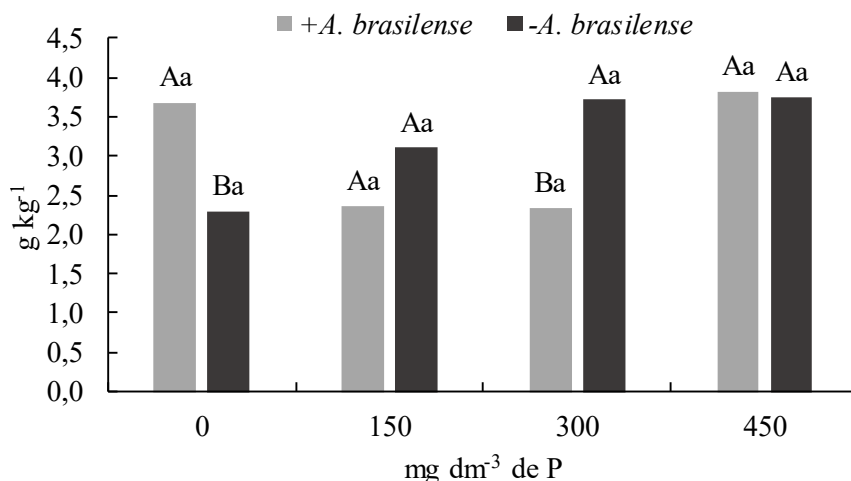


Figura 10 - Teor foliar de P de plantas de milho submetidas a população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, conduzidas sob doses remanescentes de fósforo no solo e adubação nitrogenada em cobertura, aos 55 DAE (V9). Médias seguidas da mesma letra maiúscula dentro das médias de doses de P e minúscula dentro das médias de inoculação de *A. brasilense* não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. +*A. brasilense*: inoculação de *Azospirillum brasilense*; -*A. brasilense*: sem inoculação.

As doses remanescentes de P, por sua vez, não mostraram diferenças tanto para tratamento com *A. brasilense* quanto tratamento sem inoculação. É importante salientar que parte da adubação de P aplicada no cultivo anterior, pode ter sofrido perdas em função da percolação de água, pela irrigação.

A análise do teor foliar de P demonstrou que estes apresentaram-se médias dentro da faixa de suficiência ($2,5 - 3,5 \text{ g kg}^{-1}$) considerada por Büll (1993), com exceção do tratamento de 450 mg dm^{-3} ($3,78 \text{ g kg}^{-1}$). Charana Walpola; Yoon, (2013) ao estudarem a ação do sinergismo das espécies *Pantoea agglomerans* e *Burkholderia anthina* em plantas de *Vigna radiata* L., observaram maiores acúmulos de P no tecido vegetal além de incrementos no desenvolvimento da cultura como massa de matéria seca e comprimento de plantas. Destacando que o solo utilizado na condução do experimento apresentava teor de $5,56 \text{ mg dm}^{-3}$ de P e pH 4,67. Nestas condições o fosfato tende a reagir com Fe e Al, tornando-o indisponível à absorção pelas raízes (RAIJ, 2011). No entanto, a espécie *A. brasilense* demonstrou eficiência no acúmulo de P no tecido foliar de plantas de milho sob fertilidade natural do solo. Bashan; Holguin; De-Bashan, (2004) relatam que em condições de estresse como solos com baixa fertilidade, a utilização de BPCV do gênero *Azospirillum* podem induzir a produção de fitohormônios como auxina, giberelina e a inibição de produção do etileno, aumentando a eficiência de absorção de nutrientes do solo. Neste sentido, a adubação fosfatada dispensou absorção de P pela cultura oriunda da atuação da população residual de *A. brasilense*.

Em relação as variáveis g_s , A , E e EUA , para o fator doses remanescentes da adubação fosfatada, houve diferenças a partir da adubação nitrogenada que ocorreu aos 33 DAE (Figura 11). Com exceção dos dias 30 e 31 DAE, ao comparar médias de condutância estomática (g_s), observou-se superioridade em plantas conduzidas em solos com doses remanescentes de 300 mg dm⁻³ de P, quando comparado ao tratamento sem inoculação, de forma independente da inoculação de *A. brasilense* (Figura 11.A).

A fotossíntese líquida (A) e a transpiração foliar (E) apresentaram comportamentos semelhantes ao serem avaliadas durante o período pré e pós adubação nitrogenada (Figura 11.B e C). Para estes, doses remanescentes de P também não apresentaram efeito significativo nos dias 30 e 31 DAE. Após adubação nitrogenada, aos 37, 40, 43, 47 e 48 DAE, o tratamento que recebeu adubação de 300 mg dm⁻³ de P, apresentou médias superiores quando comparado ao tratamento sem inoculação, não diferenciando dos demais tratamentos (150 e 450 mg dm⁻³ de P). As médias de A e g_s alcançaram valores máximos de 42,63 $\mu\text{mols de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 0,44 $\text{mols m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, estes valores são semelhantes aos encontrados por Lopes et al. (2009) que durante a fase vegetativa do milho em condições de campo, observaram valores aproximados a 48 $\mu\text{mols de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de A e 0,6 $\text{mols m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de g_s . Vale ressaltar que as condições ambientais do presente ensaio foram controladas sob casa de vegetação e avaliadas sob 1200 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de $DPFFA$.

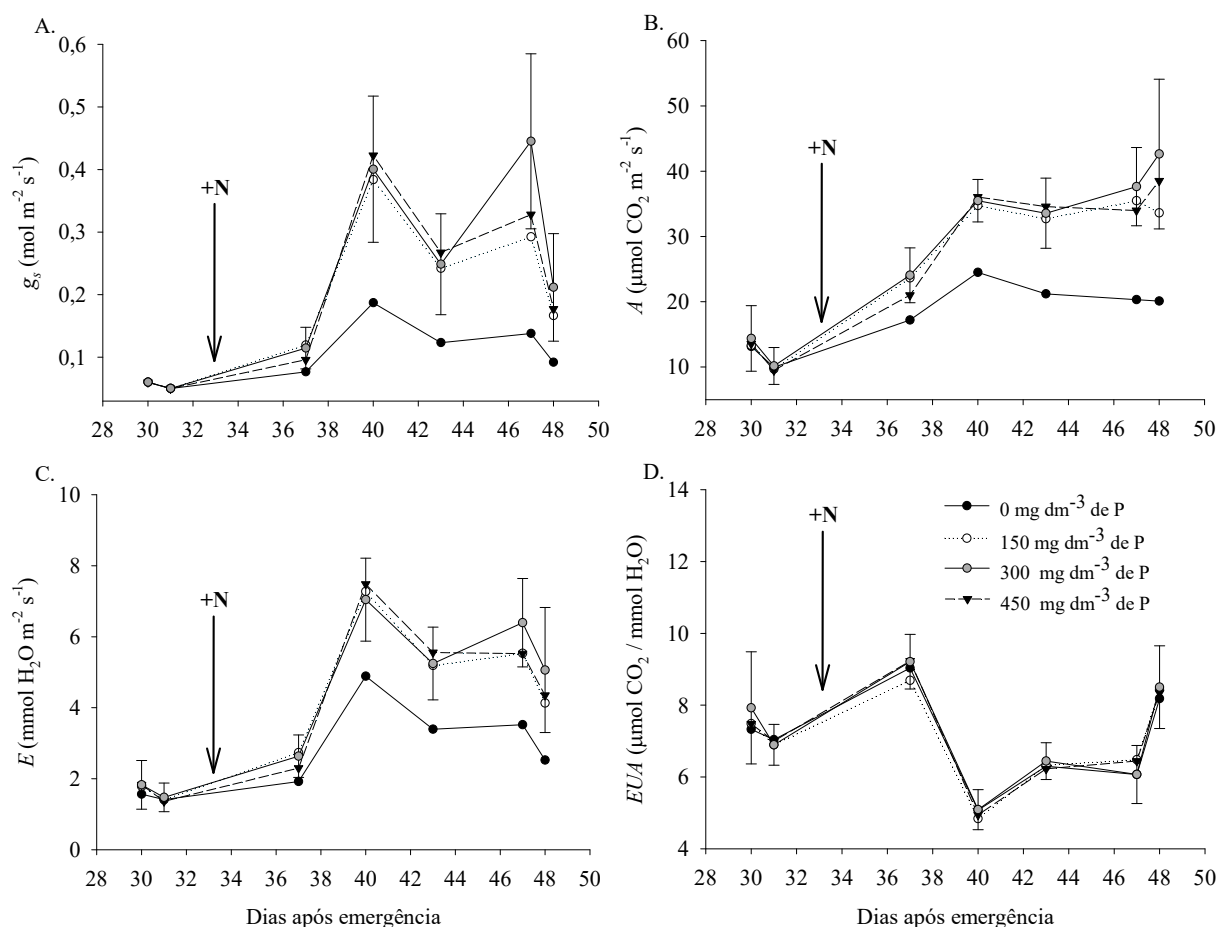


Figura 11 - Condutância estomática (A), taxa de assimilação líquida de CO₂ (B), transpiração foliar (C) e eficiência no uso da água (D) de plantas de milho independentemente da população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, conduzidas sob doses remanescentes de fósforo no solo e adubação nitrogenada em cobertura, aos 30, 31, 37, 40, 43, 47 e 48 DAE. As barras representam os valores de desvio padrão.

Em consequência do aumento de g_s , ocorre a entrada de CO₂ o que proporciona o aumento da concentração interna de CO₂. A partir do CO₂ disponibilizado pela difusão, ocorre a fixação pelas células do mesófilo foliar, sendo que ao mesmo tempo também ocorrem perdas de vapor d'água. Inagaki et al. (2014) ao estudar o efeito da inoculação de *A. brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho sob adubação fosfatada, constatou maior taxa de assimilação líquida de CO₂ e concentração interna de CO₂ em plantas com adubação fosfatada (300 mg dm⁻³ de P), independente da bactéria promotora de crescimento vegetal.

Durante os períodos de avaliação, a eficiência no uso da água (*EUA*) de plantas de milho não foi influenciada pelo fator doses remanescentes de P no solo (Figura 11.D). Pode-se afirmar que a quantidade de água utilizada para fixar CO₂ foram semelhantes para todas doses de P dentro de cada dia de avaliação. No entanto, aos 40 DAE foi quando *EUA* apresentou menores médias em relação aos demais dias de avaliação. O efeito da queda da eficiência no uso da água pode ser observada quando há ausência de resposta de *A* em função de g_s , porém a

abertura estomática provoca aumentos somente em E , consequentemente redução de EUA (MACHADO; LAGÔA, 1994).

A população remanescente de *A. brasilense* promovida pelo primeiro cultivo, proporcionaram médias superiores para g_s , E , A e C_i quando comparado ao tratamento sem inoculação da bactéria, aos 47 DAE (Figura 12). Quando a concentração interna de CO_2 é baixa, a enzima ribulose bifosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco) é saturada em relação ao substrato RuBP, no entanto o aumento de C_i provoca o aumento linear de A até a fotossíntese atingir o valor máximo (MACHADO; LAGÔA, 1994).

A utilização de *A. brasilense* em plantas de milho, também incrementou em EUA aos 43 DAE, ou seja, 10 dias após adubação nitrogenada (Figura 12 C). Resultados promissores em relação às BPCV podem estar associado a capacidade de colonização de diferentes regiões da planta, podendo colonizar a raiz internamente ou rizosfera, sendo que a espécie *A. brasilense* é considerada associativa endofítica facultativa (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978).

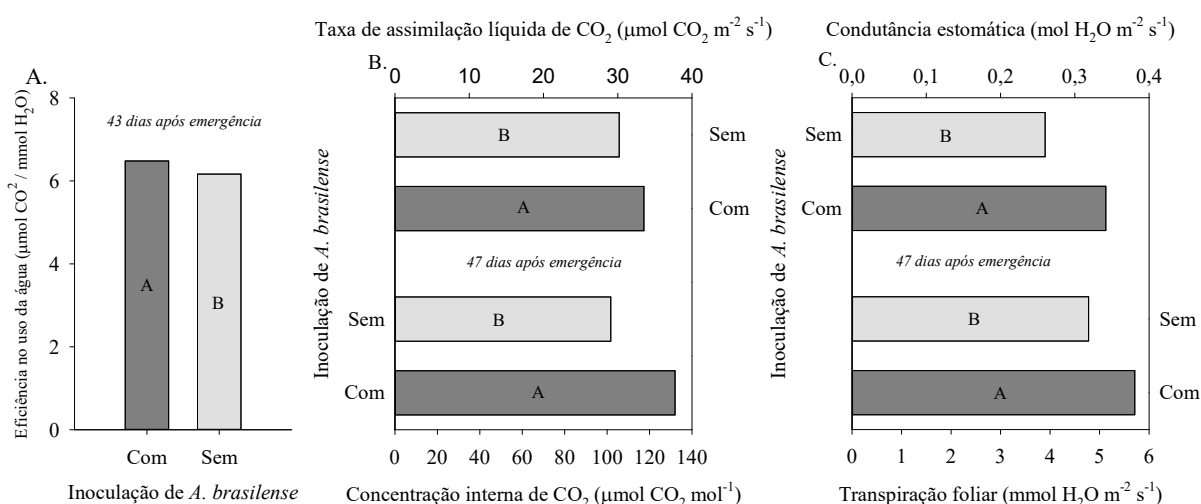


Figura 12 - Eficiência no uso da água aos 43 dias após emergência (DAE) (A), taxa de assimilação líquida de CO_2 e concentração interna de CO_2 (B) e condutância estomática e transpiração foliar aos 47 DAE (C) de plantas de milho, com e sem efeito residual de *A. brasilense* no solo, considerando médias de adubações de doses de P no solo.

Aos 47 DAE, doses remanescentes de P no solo, reduziram médias de eficiência intrínseca no uso da água ($EIUA$) apresentando curvas quadráticas tanto para população remanescente de *A. brasilense* quanto sem inoculação (Figura 13). A inoculação de *A. brasilense* reduziu $EIUA$ acentuadamente aos $444,44 \text{ mg dm}^{-3}$ de P com média de $86 (A/g_s)$. Sendo que o ponto mínimo ($101,18 A/g_s$) apresentado pelo tratamento sem inoculação foi aos 245 mg dm^{-3} de P.

Os efeitos promovidos pelas BPCV podem variar de acordo com as condições que são submetidas como temperatura, umidade, fertilização do solo e pH do solo (BALDANI; BALDANI, 2005). Inagaki et al. (2015) ao avaliarem a inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* em plantas de milho submetidas em diferentes pH do solo, não observaram diferenças para variáveis de *A*, *g_s*, *E* e *EUA*, durante o desenvolvimento inicial da cultura. Plantas de pimenta (*Capsicum annuum* L.) submetidas a inoculação de estirpes de *A. brasilense* associada a adubação nitrogenada, apresentaram médias inferiores de *A*, *E*, teor de clorofila e índice SPAD, comparando com tratamento de alta fertilização de N (DEL AMOR; PORRAS, 2009).

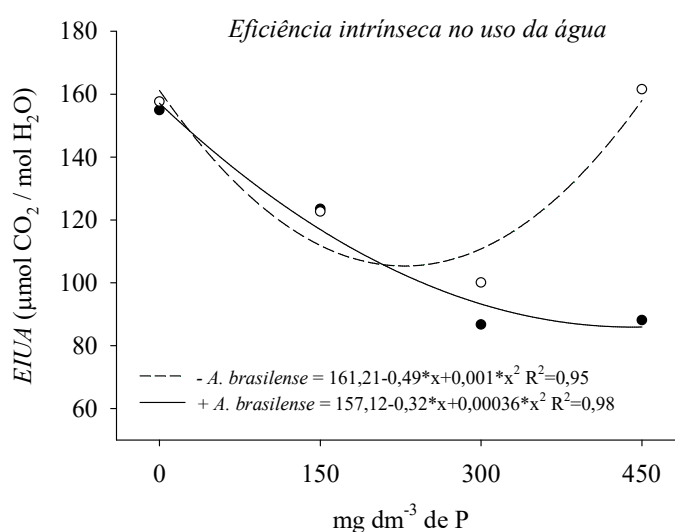


Figura 13 - Eficiência intrínseca no uso da água (*EIUA*) de plantas de milho aos 47 dias após emergência, sob efeito residual de *A. brasilense* no solo, submetidas a adubações de doses de P no solo e adubação nitrogenada aos 32 dias após emergência.

O modelo parabolóide revelou acúmulo do teor relativo de clorofila foliar no desenvolvimento inicial do milho (Figura 14). O desenvolvimento da cultura, em dias após emergência, juntamente a adubação nitrogenada aos 33 DAE e o aumento de doses de P no solo foram favoráveis ao índice SPAD. A população remanescente de *A. brasilense*, mostrou superioridade em relação ao tratamento sem inoculação, sendo maiores incrementos obtidos entre 40 e 44 DAE, sob doses de 300 mg dm^{-3} de P.

$$+A. \text{brasilense} = -145,84 + 0,007 * x + 7,94 * y - 5,96 * x^2 - 0,09 * y^2 \quad R^2 = 0,88$$

$$-A. \text{brasilense} = -123,76 + 0,015 * x + 6,68 * y - 2,17 * x^2 - 0,074 * y^2 \quad R^2 = 0,88$$

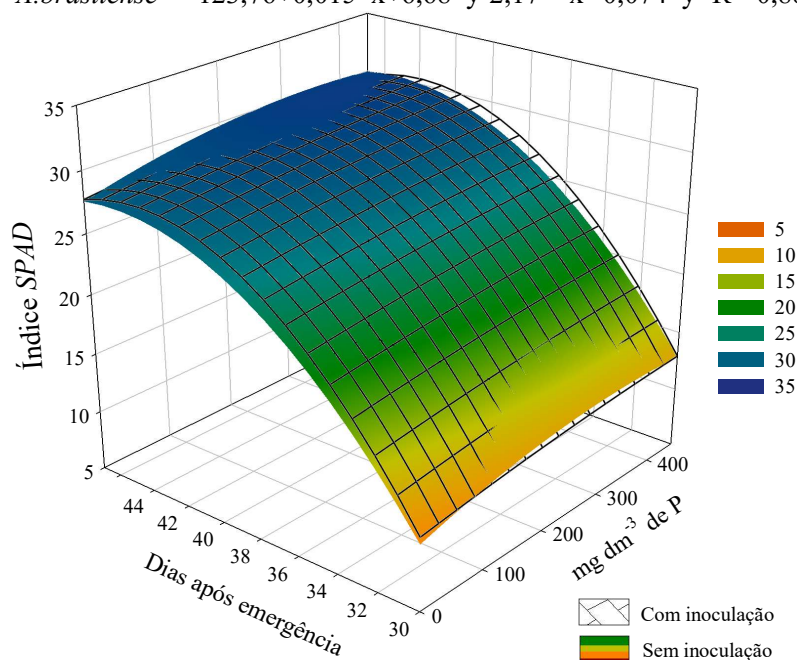


Figura 14 - Teor relativo de clorofila no terço médio foliar de plantas de milho conduzidas sob população remanescente de inoculação de *A. brasilense*, em função de doses remanescentes de P no solo com adubação nitrogenada por cobertura aos 33 DAE

8 CONCLUSÕES

Plantas de milho submetidas a doses de P adicionado ao solo reforçam a importância deste elemento para a cultura, resultando em alteração nas trocas gasosas, com maior assimilação líquida de CO₂ e eficiência no uso da água e consequente aumento nos parâmetros morfobiométricos;

A inoculação de *A. brasilense* em sementes de milho juntamente à adubação fosfatada, sem adição de nitrogênio, proporcionou maior área foliar e comprimento de plantas, aos 36 dias após emergência;

Plantas de milho conduzidas sob adubação nitrogenada de cobertura em solo com população remanescente de *A. brasilense*, demonstraram efeito positivo em relação ao crescimento da cultura. Em consequência do maior teor de P e clorofila foliar, as plantas apresentaram maior taxa de assimilação líquida de CO₂, transpiração foliar, condutância estomática, concentração interna de CO₂ e eficiência no uso da água;

A adubação fosfatada recomendada pela literatura proporcionou resultados esperados com decréscimo no desenvolvimento das plantas ao ultrapassar a dose ideal (300 mg dm⁻³). Após esta dose, a inoculação de *A. brasilense* resultou em acréscimos no desenvolvimento do milho, com aumento de 8% no comprimento de plantas e 16% na área foliar.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>>.
- ARAÚJO, R. M.; F., A. A. S.; NUNES, L. A. P. L.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta do milho verde à inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1556–1560, 2014.
- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F.; FOSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L.; SUHRE, E.; TEICHMANN, L. L. Adubação nitrogenada em milho pelo monitoramento do nível de nitrogênio na planta por meio do clorofilômetro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 1, p. 109–119, fev. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832003000100012&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 16 jan. 2017.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 42 p.
- BALDANI, J.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 911–922, maio 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071796002180>>.
- 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 Ciencias**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005.
- BALDOTTO, L. E. B.; SILVA, L. G. J. S.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BALDOTTO, M. A. Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 262–270, 2012a.
- BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. A.; SANTANA, R. B.; MARCIANO, C. R. Initial performance of maize in response to NPK fertilization combined. **Revista Ceres**, v. 59, n. 6, p. 841–849, dez. 2012b. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2012000600015&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum* -plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521–577, 2004. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w04-035>>.
- BASI, S.; NEUMANN, M.; MARAFON, F.; UENO, R. K.; SANDINI, I. E. Influência da adubação nitrogenada sobre a qualidade da silagem de milho. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 3, p. 219–234, 2011.
- BASTOS, A. L.; COSTA, J. P. V. da; SILVA, I. de F. da; RAPOSO, R. W. C.; OLIVEIRA, F. de A.; ALBUQUERQUE, A. W. de. Resposta do milho a doses de fósforo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 5, p. 485–491, maio 2010. Disponível em: <<http://www.agriambi.com.br>>.

BÜLL, L.T. Nutrição mineral do milho. In: BÜLL, L.T.; CANTARELLA, H. (Eds.). **Cultura do milho**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS, 1993. 301p.

CHARANA WALPOLA, B.; YOON, M.-H. Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). **Chilean journal of agricultural research**, v. 73, n. 3, p. 275–281, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-58392013000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos Monitoramento agrícola- Safra 2016/2017**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1023–1029, out. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662013001000001&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

DE QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; DA SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; DE OLIVEIRA CAMARGO, F. A. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209–218, 2014.

DE SALOMONE, I. G.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 193–196, 1 fev. 1996. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/Index/10.1007/s003740050048>>.

DEL AMOR, F. M.; PORRAS, I. Effects of plant-growth-promoting bacteria on growth and yield of pepper under limited nitrogen supply. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 89, n. 2, p. 349–358, 2009. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-68249115368&partnerID=40&md5=1cb2b5b83a5960a06892c5a286129886>>.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. 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. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00374-002-0534-9>>.

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

EMBRAPA. Métodos de Análises de Tecidos Vegetais Utilizados na Embrapa Solos. **Circular Técnica Nº 6**, p. 41, 2009.

SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. D. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, J. B. de; COELHO, J. B. de; LUMBRERAS, J. F.; CUNHA, T. J. F. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília, 2013. 353p

FAGAN, E. B.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; CHALFUN JÚNIOR, A.; DOURADO NETO, D. **Fisiologia Vegetal: Reguladores Vegetais**. Organização Andrei Editora. São Paulo,

2015.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, 19 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2015.1127500>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

INAGAKI, A. M.; GUIMARÃES, V. F.; LANA, C.; KLEIN, J.; CRISTINA, A.; RODRIGUES, P.; FERNANDO, L.; SOBREIRA, O.; RAMPIM, L. Maize initial growth with the inoculation of plant growth-promoting bacteria (PGPB) under different soil acidity levels. **Australian Journal Crop Science**, v. 9, n. 4, p. 271–280, 2015.

INAGAKI, A. M.; GUIMARAES, V. F.; RODRIGUES, L. F. O. S.; BARTIRA DA SILVA, M.; DIAMANTE, M. S.; RAMPIM, L.; MIORANZA, T. M.; DUARTE-JR., J. B. Phosphorus fertilization associated to inoculation of maize with diazotrophic bacteria. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 48, p. 3480–3487, 2014. Disponível em: <[http://www.academicjournals.org/article/article1416903939_Inagaki et al.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1416903939_Inagaki%20et%20al.pdf)>.

KLEIN, C.; AGNE, S. A. A. FÓSFORO: DE NUTRIENTE À POLUENTE! **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 8, n. 8, p. 0, 11 jan. 2012. Disponível em: <<http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/reget/article/view/6430>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2006. 550p.

LOPES, J. P.; MACHADO, E. C.; DEUBER, R.; MACHADO, R. S. Análise de crescimento e trocas gasosas na cultura de milho em plantio direto e convencional. **Bragantia**, v. 68, n. 4, p. 839–848, 2009.

MACHADO, E. C.; LAGÔA, A. M. M. A. Trocas gasosas e condutância estomática em três espécies de gramíneas. **Bragantia**, v. 53, p. 141–149, 1994.

MOTTA, P. E. F.; CURTI, N.; SIQUEIRA, J. O.; VAN RAIJ, B.; FURTINI NETO, A. E.; LIMA, J. M. Adsorção e formas de fósforo em latossolos: influência da mineralogia e histórico de uso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 2, p. 349–359, jun. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832002000200008&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 16 jan. 2017.

NOVAES, R. F. de; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. de. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A. J.; GARRIDO, W. E.; ARAUJO, J. D. DE; LOURENÇO, S. (Ed.). **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília DF: Embrapa-SE, 1991. p. 189–253.

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A. de; NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. Supl, p. 1687–1698, 6 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/1687>>.

PRADO, C. H. B. A.; DE MORAES, J. A. P. V. Photosynthetic capacity and specific leaf mass in twenty woody species of Cerrado vegetation under field conditions. **Photosynthetica**, v. 33, n. 1, p. 103–112, 1997. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1022183423630>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba: IPNI, 2011. 420p.

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 32, n. 1, p. 1139–1146, 2008.

SANTOS, M. G. dos; RIBEIRO, R. V.; OLIVEIRA, R. F. de; PIMENTEL, C. Gas exchange and yield response to foliar phosphorus application in *Phaseolus vulgaris* L. under drought. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 3, p. 171–179, dez. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04202004000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

SILVA, G. F. da; OLIVEIRA, F. H. T. de; PEREIRA, R. G.; SILVA, P. S. L. e; DIÓGENES, T. B. A.; SILVA, A. R. da C. Doses de nitrogênio e fósforo para produção econômica de milho na Chapada do Apodi, RN. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1247–1254, dez. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662014001200007&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5th. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian journal of microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967–80, ago. 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/356945>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

WEI, S.; WANG, X.; SHI, D.; LI, Y.; ZHANG, J.; LIU, P.; ZHAO, B.; DONG, S. The mechanisms of low nitrogen induced weakened photosynthesis in summer maize (*Zea mays* L.) under field conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, p. 118–128, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.007>>.

10 ARTIGO 2 - Impactos da interação entre *Azospirillum brasilense* e fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento do milho sob adubação fosfatada

Resumo: A interação entre bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), com capacidade de solubilização de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares (FMA), evidenciam atuação em vários mecanismos de promoção de crescimento, otimizando a utilização de fertilizantes fosfatados na cultura do milho. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da inoculação de *Azospirillum brasilense* associada a espécies de FMA em plantas de milho submetidas a adubação fosfatada. Utilizou-se delineamento em blocos ao acaso com esquema fatorial de 2x5 e quatro repetições. O primeiro fator foi representado pela presença e ausência de adubação fosfatada e o segundo pelos tratamentos: sem inoculação; inoculação de *A. brasilense*; *A. brasilense*+*Acaulospora scrobiculata*; *A. brasilense*+*Claroideoglomus etunicatum*; e *A. brasilense*+*Gigaspora margarita*. Foram realizadas análises das seguintes variáveis: índice SPAD, diâmetro de colmo, número de folhas, comprimento de plantas, volume de raiz, massa de matéria seca de folhas, colmo+bainha e raiz e área foliar. Também se avaliou o teor foliar de N e P, população de bactérias diazotróficas endofíticas nas raízes e número de esporos micorrízicos arbusculares no substrato, bem como medidas de trocas gasosas como taxa de assimilação líquida de CO₂, transpiração foliar, condutância estomática e concentração interna de CO₂. Os tratamentos de *A. brasilense*+*A. scrobiculata* e *A. brasilense*+*C. etunicatum* resultaram em maior teor foliar de N na ausência da adubação fosfatada, comparado ao tratamento sem inoculação. A utilização de *A. brasilense* de forma isolada, aumentou o teor foliar de P quando comparado ao tratamento sem inoculação. A utilização da adubação fosfatada resultou em aumento nas trocas gasosas, consequentemente em maior desenvolvimento de plantas. Raízes de plantas de milho submetidas à adubação fosfatada apresentaram maior população de bactérias diazotróficas endofíticas. No presente estudo, não foi observado esporos micorrízicos de *A. scrobiculata*, *C. etunicatum* e *G. margarita* no substrato onde as plantas foram cultivadas.

Palavras-chave: *Zea mays* L. Interação de microrganismos. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Micorriza. Solubilização de fosfato.

Abstract: The interaction between plant growth promoting bacteria (PGPB), with capacity for solubilization of phosphorus and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), evidences performance in several mechanisms of growth promotion, optimizing the use of phosphate fertilizers in the maize crop. Thus, the present study had as objective to evaluate the influence of the inoculation of *Azospirillum brasilense* associated with AMF species in maize plants submitted to phosphate fertilization. A randomized complete block design with factorial scheme of 2x5 and four replications was used. The first factor was represented by the presence and absence of phosphate fertilization and the second by the treatments: without inoculation; Inoculation of *A. brasilense*; *A. brasilense* + *Acaulospora scrobiculata*; *A. brasilense* + *Claroideoglomus etunicatum*; and *A. brasilense* + *Gigaspora margarita*. The following variables were analyzed: SPAD index, stalk diameter, leaf number, plant length, root volume, leaf dry matter mass, stem + sheath and root and leaf area. The foliar content of N and P, population of endophytic diazotrophic bacteria in the roots and number of arbuscular mycorrhizal spores in the substrate, as well as gas exchange measures such as CO₂ assimilation rate, leaf transpiration, stomatal conductance and internal concentration of CO₂. The treatments of *A. brasilense* + *A. Scrobiculata* and *A. brasilense* + *C. Etunicatum* resulted in higher N foliar content in the absence of phosphate fertilization, compared to treatment without inoculation. The use of *A. brasilense* alone increased the leaf content of P when compared to treatment without inoculation. The use of phosphate fertilization resulted in an increase in the gas exchange, consequently in a greater development of plants. Roots of corn plants submitted to phosphate

fertilization showed a higher population of endophytic diazotrophic bacteria. In the present study, mycorrhizal spores of *A. scrobiculata*, *C. etunicatum* and *G. margarita* were not observed in the substrate where the plants were cultivated.

Key words: *Zea mays* L. Interaction of microorganisms. Plant growth promoting bacteria. Mycorrhiza. Phosphate solubilization.

11 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal pertencente à família Poaceae, largamente cultivado e consumido em todo país. Possui alta capacidade de produção no Brasil, estimando em 80 milhões de toneladas para safra 2016/2017 (CONAB, 2016).

A nutrição mineral de plantas é considerada como um dos fatores mais limitantes para o desenvolvimento da cultura do milho. A alta demanda de nutrientes como o nitrogênio (N) e o fósforo (P) está associada ao papel fundamental destes dois nutrientes no metabolismo das plantas. A absorção de N se dá pelo processo ativo que requer energia metabólica para o transporte, necessitando de substâncias redutoras e principalmente ATP (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). No processo de formação dessa molécula energética, o fosfato inorgânico é adicionado ao segundo grupo fosfato da adenosina difosfato (ADP) para formar a ligação éster fosfato (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A obtenção do P pelas plantas via utilização de fertilizantes sintéticos implica-se como principal recurso em função das quantidades requeridas pelas plantas. No entanto, o emprego de adubos químicos possui custos elevados, além de estarem expostos a perdas consideráveis. No caso específico do P, perdas irreversíveis são verificadas, sendo que na utilização de formas solúveis, requer doses superiores às necessárias ao desenvolvimento das plantas. Isto se deve a cerca de 90% do P aplicado ser rapidamente adsorvido às partículas do solo. Além disso pode-se destacar a precipitação de P em formas ativas de alumínio (Al) e ferro (Fe) em solos ácidos, como é o caso da maioria dos solos brasileiros (GONÇALVES et al., 1985).

Neste contexto, o aproveitamento dos benefícios da associação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) pode resultar em aprimoramento do sistema de produção de milho através da otimização do uso de fertilizantes fosfatados.

As bactérias associativas são capazes de colonizar a rizosfera de plantas, ou até regiões internas, variando de gêneros e espécies (BALDANI et al., 1997). As bactérias do gênero *Azospirillum* são conhecidas pela capacidade de promover o crescimento das plantas, principalmente pela indução de produção de alguns fitohormônios bem conhecidos como, ácido indolacético (AIA) (BALOTA et al., 1995; MEHDIPOUR MOGHADDAM; EMTIAZI; SALEHI, 2012), giberelina (BOTTINI et al., 1989), citocinina (CACCIARI et al., 1989) e a inibição do etileno (GLICK, 2005).

Além da produção de fitohormônios, também existem trabalhos que relatam a capacidade de solubilização de fosfatos (AHEMAD; KIBRET, 2014; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016) promovida pelo gênero *Azospirillum*. Massenssini et al., (2015) relatam que a microbiota do solo possui elevado potencial de solubilização de fontes insolúveis de fosfato, utilizando diferentes mecanismos para promover a solubilização. As bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP) possuem capacidade de promover a oxidação extracelular de glicose a ácido glucônico pela quinoproteína glicose desidrogenase, tornando-as eficientes na solubilização (GOLDSTEIN; BRAVERMAN; OSORIO, 1999). No entanto, a solubilização de fontes insolúveis de fosfato pode ocorrer via excreção de ácidos orgânicos levando a acidificação do ambiente (MASSENSINI et al., 2015).

Outro aspecto importante é que bactérias diazotróficas associadas aos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) podem estimular a germinação destes, bem como o crescimento das hifas, sobrevivência e distribuição do micélio através de exsudados que são liberados pelas raízes e pela própria colonização das bactérias (BALOTA et al., 1995; SOUZA et al., 2006). Em trigo, a co-inoculação do fungo micorrízico do gênero *Acaulospora* associado às BPCV *Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera* resultou em desenvolvimento normal das plantas em função da colonização de ambos microrganismos. No entanto, o fungo micorrízico do gênero *Glomus*, quando inoculado isoladamente, foi mais eficiente, proporcionando maior acúmulo de N e aproveitamento da adubação nitrogenada e fosfatada em plantas de trigo (SALA; FREITAS; DA SILVEIRA, 2007). A eficiência de absorção de nutrientes está relacionada ao aumento da atividade de H⁺ATPases de membranas associada às raízes micorrizadas (RAMOS; MARTINS; FAÇANHA, 2005).

O fósforo orgânico (Po) representa cerca de 80% do total de P presente nos solos, sendo que a metade está na forma de ácido fítico (Fitato). Zhang et al, (2014) ao analisarem o efeito da interação de FMA (*Rhizophagus irregularis*) e bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP) (*Pseudomonas alcaligenes*) na mineralização do fitato, verificaram que a inoculação isolada de *P. alcaligenes* aumentou a biomassa microbiana, e quando associada ao *R. irregularis* indicaram maior mineralização do fitato do solo.

Cozzolino; Di Meo; Piccolo, (2013), ao avaliarem a inoculação do produto comercial AEGIS® contendo hifas de *Glomus intraradices* associada a adubação de NPK em plantas de milho, verificaram maior desenvolvimento de plantas, em consequência, maior produtividade em relação ao tratamento sem inoculação.

Face ao exposto, o presente estudo teve como objeto avaliar a influência da inoculação de *A. brasilense* associada a espécies de FMA, em plantas de milho submetidas a adubação fosfatada.

12 MATERIAL E MÉTODOS

12.1 Local e delineamento experimental

O experimento foi realizado durante os meses de novembro a dezembro de 2015, na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido “Prof. Dr. Mário César Lopes” pertencente à Unioeste, no município de Marechal Cândido Rondon, PR. Este foi conduzido em estufa com teto tipo arco, revestida com filme de polietileno de baixa densidade (150 µm de espessura) e laterais protegidas com tela branca de 40% de sombreamento.

Utilizou-se delineamento em blocos ao acaso com esquema fatorial de 2x5 e quatro repetições. Para o primeiro fator, foram determinados os tratamentos, com e sem adubação fosfatada e o segundo estabeleceu-se a inoculação de: *A. brasilense*; *A. brasilense*+*Acaulospora scrobiculata*; *A. brasilense*+*Claroideoglomus etunicatum*; e *A. brasilense*+*Gigaspora margarita* e tratamento sem inoculação.

12.2 Adubação e tratamentos de sementes

O substrato utilizado foi composto pela mistura de solo, areia e composto orgânico (proporção 2:1:1). O solo foi peneirado (malha 1 cm) e submetido a secagem em condições ambiente. A mistura do fertilizante fosfatado ao substrato foi realizada em betoneira por cerca de 5 minutos, utilizando-se o superfosfato simples como fonte de P. Em seguida, para obtenção do substrato esterilizado realizou-se a autoclavagem, a 120 °C e 1 atm, por 1 hora.

Tabela 1 - Análise química do substrato utilizado, mistura de solo, areia e composto orgânico (proporção 2:1:1) com e sem adubação fosfatada

Adubação de P	P	MO	pH CaCl ₂	H + Al	Al ³⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	CTC	V	Al
	mg dm ⁻³	g dm ⁻³	0,01 mol L ⁻¹	-----cmolc dm ⁻³ -----					-----%-----			
Com P	107,51	5,47	5,64	2,69	0,00	0,20	5,51	1,77	7,48	10,17	73,55	0,00
Sem P	25,27	4,10	5,75	2,55	0,00	0,08	2,94	1,11	4,13	6,68	61,83	0,00

H+Al (acidez potencial), SB (soma de bases), CTC (capacidade de troca catiônica), C (carbono orgânico), V% (saturação por bases).

O substrato foi alocado em vasos de 2 dm³ mantido com teor de umidade a aproximadamente 80% da capacidade de campo e incubados em sacos plásticos transparentes por 20 dias, desprovido de adubação nitrogenada.

As sementes de milho (híbrido simples 30F53H) foram inoculadas com *A. brasilense*, utilizando dose de 4 mL para 1000 sementes contendo concentração de 10^8 unidades formadoras de colônias mL^{-1} (UFC mL^{-1}), aferido no Laboratório de Fisiologia Vegetal pertencente a Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR. A inoculação foi realizada em sacos plásticos devidamente esterilizados, utilizando uma câmara de fluxo laminar, após ser submetida a 30 min de lâmpada germicida UV com o intuito da redução do número de microrganismos nas superfícies e no ar. Com o intuito de não ocorrer interferência na embebição das sementes em diferentes volumes de inoculação, foi mantido o mesmo volume do líquido de inoculante para todos os tratamentos, com adição de água destilada. Após serem tratadas e homogeneizadas, as sementes foram mantidas em repouso por 12 horas à sombra e temperatura ambiente 25 °C.

Após este período, optou-se a pré-germinação de sementes em BOD à temperatura de 25 °C, para que ocorra o contato direto do inóculo de FMA às raízes aumentando a eficiência da inoculação. Depois de três dias, quando houve a emissão da radícula, foram transplantadas três sementes por vaso e realizada a inoculação dos FMA. A inoculação foi realizada adicionando-se substrato contendo esporos dos FMA juntamente com as sementes pré-germinadas a aproximadamente 3 cm de profundidade, no momento do transplantio destas para os vasos.

As culturas puras de FMA foram obtidas pela Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota – CICG, Universidade Regional de Blumenau – FURB. As concentrações de esporos encontrados para os inóculos de *Acaulospora scrobiculata*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Gigaspora margarita*, foram de 74, 10 e 3 esporos g^{-1} de substrato, respectivamente, aferido no Laboratório de Nematologia pertencente a Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR.

Desta maneira, foram inoculados aproximadamente 30 esporos por planta utilizando as seguintes doses: 0,4 g para o inóculo de *Acaulospora scrobiculata*, 3 g para a espécie *Claroideoglossum etunicatum* e 10 g para *Gigaspora margarita*.

12.3 Trocas Gasosas

Com auxílio do medidor portátil de trocas gasosas *Infra-Red Gas Analyzer* (IRGA) Li-6400XT, medidas tipo “survey” foram realizadas obtendo-se as seguintes variáveis: *A* – Taxa de assimilação líquida de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); *E* – Taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); *g_s* – Condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); *C_i* – Concentração interna de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$); *EUA* - Eficiência no uso da água *A/E*; *EiUA* – Eficiência intrínseca no uso da água *A/g_s*.

As análises foram realizadas em folhas totalmente expandidas e expostas à luz solar direta, na região do terço médio foliar. Estas foram realizadas aos 14, 21 e 28 DAE, as quais perduraram entre 10h00 a 11h00. Utilizou-se para todos os tratamentos a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de $1200 \mu\text{mol s}^{-1}$, fluxo de ar padronizado a 500 mL por minuto e 400 μmol de CO_2 , utilizando cilindro de gás de dióxido de carbono pressurizado, 12 g (*LI-COR*).

12.4 Avaliações morfobiométricas, índice SPAD e teores foliares de N e P

A fim de reduzir contaminações pela água de irrigação utilizada na casa de vegetação, as plantas foram irrigadas com água destilada conforme a necessidade. Foram realizadas avaliações semanais do teor relativo de clorofila (índice SPAD), diâmetro de colmo (DC), número de folhas (NF) e comprimento de plantas (CP), aos 7, 14, 21 e 28 DAE. Para o índice SPAD utilizou-se clorofilômetro portátil, SPAD 502 plus Konica Minolta, paquímetro digital de duas casas decimais de precisão, para o aferimento do diâmetro do colmo e régua graduada para medir o comprimento.

Aos 30 DAE, também se avaliou o índice SPAD juntamente às variáveis DC, CP, NF, volume de raiz (VR), massa de matéria seca de folhas (MSF), massa de matéria seca de colmo+bainha (MSCB), massa de matéria seca de raiz (MSR) e área foliar (MSF).

Para a avaliação realizada aos 30 DAE, plantas de milho foram coletadas e separadas em folhas, colmo+bainha, e raiz, sendo armazenadas em sacos tipo kraft e mantidas em estufa com circulação de ar forçado com temperatura de 65 °C, por 72 horas. Logo, imediatamente pesadas em balança de precisão tipo capela. Para obter-se o VR, utilizando água destilada, as raízes foram devidamente lavadas e medido o deslocamento de água provocado pela imersão das mesmas em proveta (50 mL).

Para a determinação do teor de N e P nas folhas, estas foram moídas e digeridas em ácido sulfúrico. O P foi determinado por colorimetria, a concentração de N foi determinada por digestão com ácido sulfúrico e destilação de Kjeldahl (EMBRAPA, 2009).

12.5 Quantificação de bactérias diazotróficas

No Laboratório de Fisiologia Vegetal pertencente a Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, *Campus* Marechal Cândido Rondon, aos 30 DAE, amostras de raízes foram coletadas, sendo devidamente lavadas sob água destilada, amostrando frações de 1 g da região do terço final radicular. As amostras foram submetidas a maceração em 9 mL de solução

fisiológica (0,85 NaCl). 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} .

Distribuiu-se então as diluições em placas de petri contendo meio de cultura Nfb (DÖBEREINER; MARRIEL; NERY, 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 96 horas, quando se realizou a contagem de colônias desenvolvidas, expresso em unidades formadoras de colônia (UFC) mL^{-1} .

12.6 Quantificação de esporos de FMA

A extração dos esporos dos FMA ocorreu no Laboratório de Nematologia pertencente a Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, *Campus* Marechal Cândido Rondon. Amostras de 50 g do substrato de cada parcela foram coletadas e submetidas à técnica do peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963), seguido por centrifugação em água e solução de sacarose 45,6% (JENKINS, 1983). Nesse procedimento, cada amostra de solo foi transferida para um recipiente contendo 700 mL de água e homogeneizados à mão, para desestruturação de todos os torrões. Na sequência, o material foi decantado por 1 min, sendo o sobrenadante vertido sobre três peneiras sobrepostas de 60, 200 e 400 mesh. O material retido na última peneira foi recolhido em um tubo de ensaio e submetido à centrifugação em água (1077 g – G-Force) por 5 min. O sobrenadante foi descartado e ao material depositado no fundo, adicionada solução de sacarose 45,6%, homogeneizado com o auxílio de um bastão de vidro e os tubos de ensaio, novamente levados à centrífuga (479 g – G-Force) por 1 min. O sobrenadante foi vertido na peneira de 400 mesh e os esporos nela retidos, lavados em água corrente para a retirada do excesso de sacarose e transferidos para placa quadriculada, em que foi realizada a contagem com o auxílio de microscópio estereoscópico (40x).

12.7 Análise estatística

Os dados foram tabulados e com o auxílio do programa estatístico Sisvar 5.3, (FERREIRA, 2014) submetidos a análise de variância, havendo significância para os fatores tratamento de sementes e adubação fosfatada, foi realizado o teste de comparação de médias Tukey e análise de regressão para os períodos de avaliação.

13 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das medidas do índice SPAD foi possível observar redução das médias, em relação aos dias de desenvolvimento das plantas (7, 14, 21 e 28 DAE). Para adubação fosfatada quanto para o tratamento sem inoculação (Figura 1. A e E). No entanto, na ausência de adubação de P foi observado interação entre os tratamentos com inoculação de *A. brasilense* e FMA e o período de avaliação (Figura 1. E), sendo que as sementes de milho apresentaram menores médias máximas no índice SPAD, sendo 41,40; 38,24; 38,30 e 40,35 para os tratamentos de *A. brasilense*; *A. brasilense*+*A. scrobiculata*; *A. brasilense*+*C. etunicatum* e *A. brasilense*+*Gigaspora margarita*, respectivamente.

A análise de regressão revelou incremento para desenvolvimento do DC, atingindo médias de 7,99 e 6,84 mm para plantas com e sem adubação fosfatada, respectivamente (Figura 1. B e F). Para NF, observou-se desenvolvimento esperado de acordo com desenvolvimento das plantas (Figura 1. C e G). Independentemente dos tratamentos de sementes e adubação fosfatada, houve crescimento do número de folhas respondendo aos atributos genéticos das plantas.

O CP também foi influenciado pelo período de avaliação (DAE) apresentando valores máximos de 69,16 e 58,94 cm de comprimento para plantas com e sem adubação fosfatada, respectivamente (Figura 1. D e H).

No presente estudo, o índice SPAD apresentou valores inversamente proporcionais em relação ao desenvolvimento das plantas (DC, NF e CP). O decréscimo do teor relativo de clorofila pode estar relacionado à diluição do N em relação ao acúmulo de massa juntamente ao crescimento das plantas. Sabe-se que a fonte nitrogenada disponível para o desenvolvimento do milho foi obtida pela matéria orgânica oriunda da mistura do substrato (solo, areia e composto orgânico). Desta forma, o índice SPAD observado no presente estudo revelou valores inferiores daqueles considerados adequados (45,4 índice SPAD) ao desenvolvimento da cultura do milho, na fase V3 – V4 (ARGENTA et al., 2003).

Ao considerar médias referentes aos quatro períodos de avaliação (7, 14, 21 e 28 DAE), a análise de variância mostrou valores significativos para variáveis de índice SPAD, DC, NF e CP, em relação à adubação fosfatada (Tabela 2). Tais variáveis foram favorecidas pela adubação fosfatada com incrementos de 4,91, 28,99, 6,41 e 19,66% no índice SPAD, DC, NF e CP. Em relação ao fator tratamento com *A. brasilense* e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e a interação entre os fatores não foi observado valores significativos.

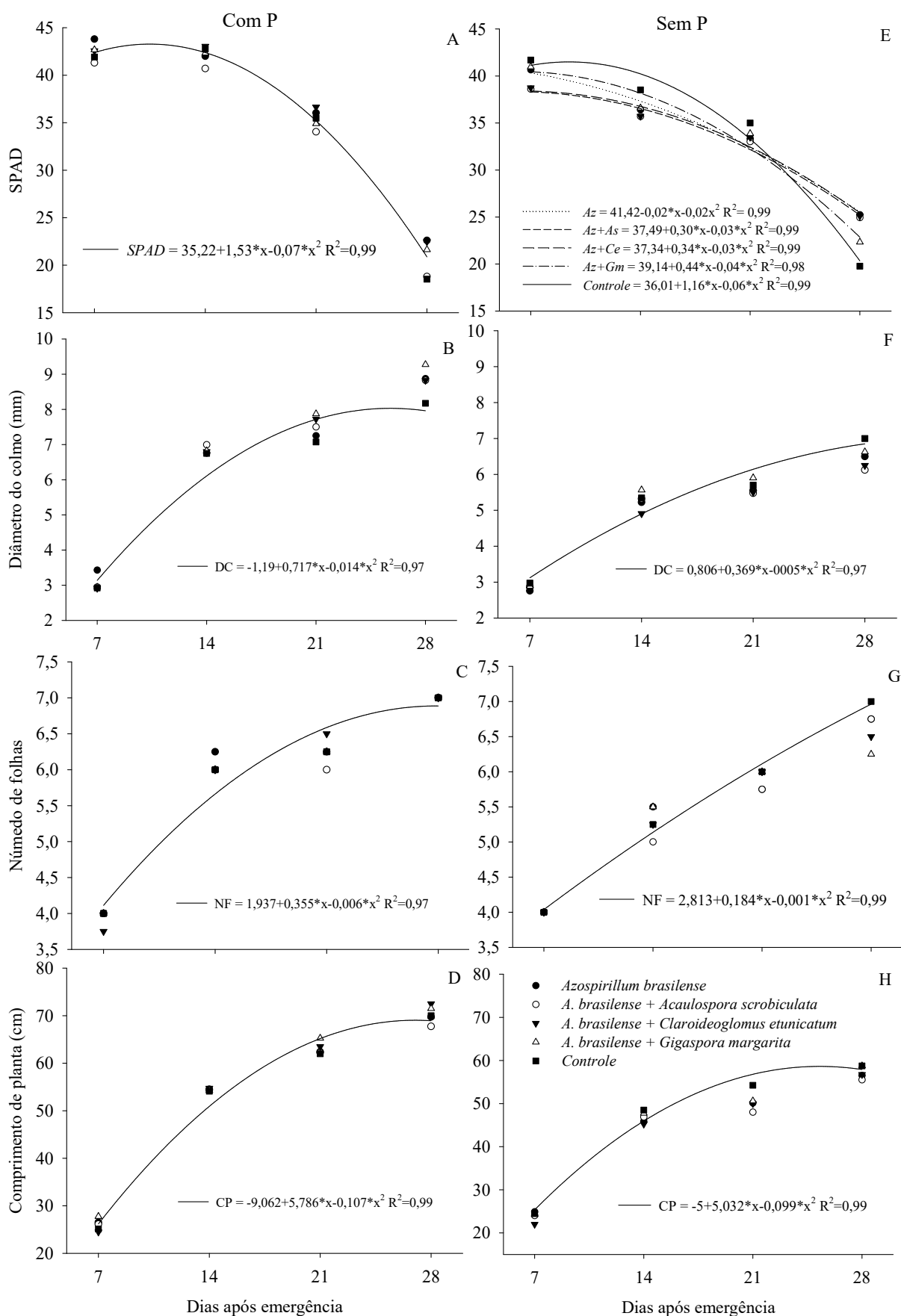


Figura 1 - Teor relativo de clorofila (A e E), diâmetro de colmo (B e F), número de folhas (C e G) e comprimento de plantas (D e H) de milho submetido a fertilização de P (A, B, C e D) e sem (E, F, G e H), em função de tratamentos com *A. brasilense* e associação com fungos micorrízicos arbusculares.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância de índice SPAD (SPAD), diâmetro do colmo (DC), número de folhas (NF) e comprimento (CP) de plantas milho submetidas à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e *A. brasilense*, em função da adubação fosfatada, considerando médias de avaliações aos 7, 14, 21 e 28 dias após emergência

FV	Quadrados Médios			
	SPAD	DC	NF	CP
	--- Índice SPAD ---	--- mm ---	-----	--- cm ---
Adubação P ^(P)	29,8426 **	21,7194 **	1,225 **	772,2016 **
Inoculação ^(T)	3,0375 ns	0,0933 ns	0,0219 ns	4,7494 ns
P x T	1,7487 ns	0,1736 ns	0,0062 ns	4,4252 ns
Resíduo	3,7704	0,1741	0,0361	4,319
CV (%)	5,65	7,19	3,37	4,24
Média	34,35	5,80	5,64	49,05
Teste Tukey (P<0,01)				
Com P	35,21	6,54	5,81	53,44
Sem P	33,48	5,07	5,46	44,66

^P Com e sem adubação fosfatada; ^T Tratamento sem inoculação, inoculação de *A. brasilense*, *A. brasilense* + *A. scrobiculata*, *A. brasilense* + *C. etunicatum*, *A. brasilense* + *G. margarita*; ns não significativo e ** significativo a 0,01 de probabilidade, pelo teste de Fisher-Snedecor.

A adubação de P no solo proporciona aumento do coeficiente de difusão do elemento devido à saturação progressiva da superfície da adsorção (BASTOS et al., 2010). Isto é, houve aumento da disponibilização deste elemento às raízes, resultando em maior desenvolvimento das plantas.

Aos 30 DAE, o índice SPAD não foi influenciado pelos fatores estudados, apresentando médias semelhantes. A fertilização fosfatada proporcionou incrementos no DC, CP, NF, VR, MSF, MSCB, MSR e AF (Tabela 3). A inoculação de *A. brasilense* e fungos MA não influenciou o desenvolvimento do milho, em relação às variáveis estudadas. Zhu et al. (2012) também não observaram diferenças para variáveis de comprimento e massa de matéria seca de plantas de milho inoculadas com *C. etunicatum*, aos 28 DAE. Os mesmos autores atribuíram esta ausência de efeito das micorrizas arbusculares pela drenagem de carbono ou disfunção do metabolismo do milho.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância de teor relativo de clorofila, índice SPAD (SPAD), diâmetro do colmo (DC), comprimento de plantas (CP), número de folhas (NF), volume de raiz (VR), massa de matéria seca de folhas (MSF), colmo+bainha (MSCB), raiz (MSR) e área foliar (AF) de plantas de milho submetidas à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e *A. brasilense*, em função da adubação fosfatada, aos 30 dias após emergência

FV	Quadrados Médios									
	SPAD	DC	CP	NF	VR	MSF	MSCB	MSR	AF	
	-- Índice --	-- mm --	-- cm --	----	-- mL --	-----	g / planta -----	-----	-- cm ² --	
P	71,02 ^{ns}	52,67 ^{**}	1703,03 ^{**}	1,23 ^{**}	60,03 ^{**}	4,10 ^{**}	1,706 ^{**}	0,915 ^{**}	148708,27 ^{**}	
T	29,80 ^{ns}	0,28 ^{ns}	15,90 ^{ns}	0,16 ^{ns}	2,53 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,010 ^{ns}	0,033 ^{ns}	1445,04 ^{ns}	
P x T	21,05 ^{ns}	0,82 ^{ns}	5,65 ^{ns}	0,16 ^{ns}	8,65 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,012 ^{ns}	0,049 ^{ns}	1694,39 ^{ns}	
Resíduo	21,05	0,46	10,20	0,11	5,68	0,25	0,120	0,067	811,58	
CV (%)	20,73	8,91	5,01	4,86	18,30	15,12	17,260	24,890	9,72	
Média	22,14	7,65	63,77	6,82	13,02	1,06	0,630	1,040	292,95	
Teste Tukey (p<0,01)										
Com P	20,80	8,79	70,30	7,00	14,25	1,38	0,84	1,19	353,92	
Sem P	23,47	6,50	57,25	6,65	11,80	0,74	0,43	0,89	231,98	

^P Com e sem adubação fosfatada; ^T Tratamento sem inoculação, inoculação de *A. brasilense*, *A. brasilense* + *A. scrobiculata*, *A. brasilense* + *C. etunicatum*, *A. brasilense* + *G. margarita*; ** significativo P<0,01; ^{ns} não significativo. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

Balota; Machineski; Scherer (2012), ao avaliarem o efeito de *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum* em plantas de pinhão-manso sob doses de P no solo, observaram que o índice de eficiência de utilização de P pelas plantas foi reduzido de acordo com o acréscimo das doses de P no solo. No presente estudo, o solo desprovido da adubação fosfatada apresentou teor de 25,27 mg dm⁻³ de P. Desta forma, a concentração de P presente no solo sob fertilidade natural, já considerada alta, pode ter inibido as respostas em relação aos FMA.

A influência positiva de *A. brasilense* quando inoculado em plantas de milho submetidas a adubação fosfatada pode apresentar flutuações durante o desenvolvimento da cultura, proporcionando plantas de maior comprimento e teor relativo de clorofila aos 21 dias após semeadura (DAS) e maior desenvolvimento de raízes aos 52 DAS (INAGAKI et al., 2014).

Ao avaliar os teores de N e P no tecido foliar de plantas de milho, a análise de variância revelou significância para interação entres os fatores, inoculação de *A. brasilense* e FMA e adubação fosfatada (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância de teores de N e P de plantas de milho submetidas a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e *A. brasilense*, em função da adubação fosfatada, aos 30 dias após emergência

FV	N	P
Tratamento (T)	2,793 ^{ns}	2,249 [*]
Adubação fosfatada (A)	12,939 [*]	21,656 ^{ns}
Interação T x A	8,489 ^{**}	1,276 [*]
Resíduo	1,811	0,547
CV (%)	13,51	42,35
Média	9,96	1,75

^{ns} não significativo, ^{*} e ^{**} significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste de Fisher-Snedecor.

Em relação ao teor foliar de N de plantas de milho, os tratamentos com *A. brasilense* e FMA não apresentaram diferenças em relação às plantas que receberam adubação fosfatada. No entanto, na ausência da fertilização de P no solo, plantas inoculadas com as associações de *A. brasilense*+*A. scrobiculata* (Ab+As) e *A. brasilense*+*C. etunicatum* (Ab+Ce) mostraram médias superiores quando comparado com o tratamento sem inoculação, ao passo que os tratamentos *A. brasilense* e *A. brasilense*+*G. margarita* (Ab+Gm) não apresentaram diferença (Tabela 5).

Para o tratamento sem inoculação, o teor foliar de N apresentou maior média quando as plantas foram submetidas a adubação fosfatada. Porém, os tratamentos Ab, Ab+As e Ab+Ce demonstraram maior eficiência, proporcionando teores foliares de N superiores em plantas sem adubação de P. Ao passo que o tratamento Ab+Gm apresentaram médias semelhantes pelo teste Tukey 5%.

A adubação fosfatada juntamente com a inoculação de *A. brasilense* de forma isolada e associada com *A. scrobiculata* e *C. etunicatum* prejudicou o acúmulo de N no tecido foliar. Porém, este resultado tornou-se benéfico quando submetido a fertilidade natural do substrato. Este desempenho, em condições de baixo teor de P, pode estar relacionado à capacidade dos FMA em alterar características físico-química do solo através da manutenção da estrutura, agregando as partículas do solo via hifas extrarradiculares e seus exsudatos (FOLLI-PEREIRA et al., 2012). Balota et al. (1995) verificaram que bactérias diazotróficas podem induzir o crescimento micelial de FMA, ao passo que a espécie de *Azospirillum lipoferum* isolado da mandioca, apresentaram capacidade de produzir AIA *in vitro*.

Tabela 5 - Teores foliares de N e P de plantas de milho submetidas a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e *A. brasilense*, em função da adubação fosfatada, aos 30 dias após emergência

Teor de N foliar											
Adubação P	Sem inoculação		Ab		Ab+As		Ab+Ce		Ab+Gm		Média
	----- g kg ⁻¹ -----										
Com P	10,7187	Aa	8,4582	Ba	9,4062	Ba	9,1875	Ba	9,1875	Aa	9,3916
Sem P	8,7500	Bb	11,0832	Aab	11,8125	Aa	11,8125	Aa	9,1875	Aab	10,5291
Média	9,7344		9,7707		10,6094		10,5000		9,1875		
Teor de P foliar											
Adubação P	Sem inoculação		Ab		Ab+As		Ab+Ce		Ab+Gm		Média
	----- g kg ⁻¹ -----										
Com P	1,7052	Ab	3,5712	Aa	1,8622	Ab	2,1947	Aab	3,0802	Aab	2,4827
Sem P	0,8217	Aa	0,7437	Ba	0,9477	Aa	0,6945	Ba	1,8480	Ba	1,0111
Média	1,2635		2,1575		1,4050		1,4446		2,4641		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. Ab: *A. brasilense*, Ab+As: *A. brasilense* + *A. scrobiculata*, Ab+Ce: *A. brasilense* + *C. etunicatum*, Ab+Gm: *A. brasilense* + *G. margarita*.

Em relação ao teor foliar de P, quando plantas de milho foram submetidas ao tratamento com P, a inoculação isolada de *A. brasilense* revelou média superior quando comparado ao tratamento sem inoculação e Ab+As (Tabela 5). Os demais tratamentos de *A. brasilense* associado com as espécies de FMA (Ab+Ce e Ab+Gm) não apresentaram significância pelo teste de médias. Quando as plantas foram conduzidas em solo sem adubação fosfatada, o teor foliar de P não foi influenciado em relação aos tratamentos de *A. brasilense* e FMA, apresentando médias semelhantes.

Sob adubação fosfatada sementes inoculadas com *A. brasilense* de forma isolada e associada com *C. etunicatum* e *G. margarita* desenvolveram plantas com teor foliar de P superior quando comparado ao tratamento sem P. A inoculação de Ab+As e o sem inoculação não apresentaram diferença em relação ao fator adubação de P. Por meio dos resultados obtidos, observou-se coerência em relação aos encontrados por Zhang et al. (2014). Estes autores observaram sinergismo entre espécies de BSP e FMA na cultura do milho, ao passo que proporcionaram maior capacidade de mineralização de ácido fítico presente no solo, em consequência, observou-se maior acúmulo no teor foliar de P. Cozzolino; Di Meo; Piccolo, (2013), ao avaliarem plantas de milho inoculadas com *G. intraradices*, observaram aumento na taxa de colonização micorrízica, resultando em aumento no teor de P no tecido foliar.

A análise de variância mostrou valores significativos para taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), transpiração foliar (*E*), condutância estomática (*g_s*), concentração de CO₂ (*Ci*), eficiência no uso da água (*EUA*), intrínseca no uso da água (*EIUA*) e eficiência de carboxilação (*ACi*) em relação ao fator adubação fosfatada (Tabela 6).

Tabela 6 - Medidas de trocas gasosas, taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*), concentração de CO₂ (*Ci*), transpiração foliar (*E*), eficiência no uso da água (*EUA*), intrínseca no uso da água (*EIUA*) e eficiência de carboxilação (*ACi*) de plantas de milho submetidas à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e *A. brasilense*, em função da adubação fosfatada, considerando médias de avaliações aos 14, 21 e 28 dias após emergência

FV	Quadrados Médios													
	<i>A</i>		<i>g_s</i>	<i>Ci</i>		<i>E</i>	<i>EUA</i>	<i>EIUA</i>	<i>ACi</i>					
	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$		$\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$		$\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	<i>A/E</i>	<i>A/g_s</i>	<i>A/Ci</i>					
P	113,78	**	3,23 ⁻³	**	1404,61	*	0,652	**	2,95	**	297,77	*	1,92 ⁻²	**
T	2,24	ns	1,77 ⁻⁴	ns	721,71	*	0,025	ns	0,36	ns	229,9	*	1,24 ⁻³	ns
PxT	7,09	ns	2,96 ⁻⁴	ns	385,46	ns	0,064	ns	0,16	ns	51,08	ns	1,99 ⁻³	ns
Residuo	6,25		3,46 ⁻⁴		245,21		0,078		0,14		68,67		1,07 ⁻³	
CV (%)	12,49		1,78		11,45		10,54		4,99		5,98		21,35	
Média	20,01		0,14		136,7		2,65		7,55		138,68		0,15	
Teste Tukey (p<0,01)														
Com P	21,7		0,154		142,63		2,78		7,82		141,41		0,17	
Sem P	18,33		0,136		130,78		2,53		7,28		135,95		0,13	

^P Com e sem adubação fosfatada; ^T Tratamento sem inoculação, inoculação de *A. brasilense*, *A. brasilense* + *A. scrobiculata*, *A. brasilense* + *C. etunicatum*, *A. brasilense* + *G. margarita*; ns não significativo, * e ** significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade respectivamente, pelo teste de Fisher-Snedecor. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

As variáveis de C_i e $EiUA$ revelaram significância ao fator tratamento de *A. brasilense* e FMA. Em relação as medidas de trocas gasosas, não houve interação entre os fatores avaliados. As medidas de trocas gasosas foram influenciadas de forma positiva pela adubação fosfatada, resultando em valores superiores em 18,38, 13,23, 9,06, 9,88, 7,42, 4,01 e 30,76% para A , g_s , C_i , E , EUA , $EiUA$ e ACi , respectivamente.

Apesar do teste F revelar valores significativos, ao realizar o desdobramento das médias de C_i não foi observado diferenças entre as médias dos tratamentos de *A. brasilense* e FMA (Figura 2. A). Já para a eficiência intrínseca no uso da água, a utilização da inoculação de *A. brasilense* de forma isolada, proporcionou média superior quando comparado ao tratamento *A. brasilense*+*G. margarita*, ao passo que os demais tratamentos não diferenciaram significativamente (Figura 2. B). A utilização de *A. brasilense* propiciou em maior quantidade de CO_2 fixado pela quantidade de água utilizada na turgescência de células estomáticas, ou seja, aumentou-se a eficiência de fixação de CO_2 em relação a abertura estomática. A utilização do tratamento Ab+Gm, certamente aumentou-se a condutância estomática, porém a fixação de CO_2 manteve-se estável.

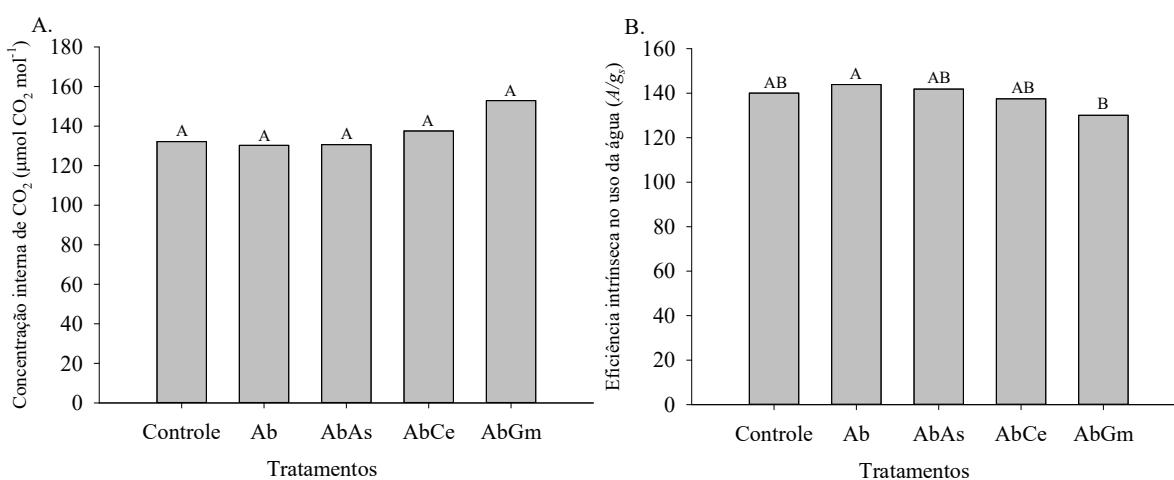


Figura 2 - Concentração interna de CO_2 (C_i) e eficiência intrínseca no uso da água ($EiUA$) de plantas de milho submetidas à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e *A. brasilense*, em função da adubação fosfatada. Barras seguidas da mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

Segundo Ruiz-Sánchez et al. (2010), a inoculação de *Glomus intraradices* em plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico, exibiram maior eficiência fotossintética do fotossistema II, sendo que ao serem reidratadas apresentaram maior condutância estomática em relação as plantas não inoculadas. Plantas de milho ao serem inoculadas com *C. etunicatum* e submetidas ao estresse hídrico, apresentaram maior eficiência fotossintética, taxa de assimilação líquida de CO_2 , transpiração foliar, em consequência maior eficiência no uso da

água, porém redução na concentração interna de CO₂, efeito gerado pelo aumento de *A* (ZHU et al., 2012).

Em relação a quantificação de esporos micorrízicos arbusculares, este não foi observado no presente estudo (dados não mostrados). Apesar dos inoculantes micelianos utilizados no presente estudo serem produzidos em cultura axênica, os esporos só podem ser obtidos a partir de fungos que esporulam em abundância (SOUZA et al., 2006). No entanto, os inóculos de FMA utilizados no presente estudo não apresentaram formação de esporos quando submetidos a associação com *A. brasilense*, no cultivo do milho, até aos 30 DAE.

Para população de bactérias diazotróficas, as raízes de plantas fertilizadas com fósforo desenvolveram maior número de unidades formadoras de colônias, ao comparar com raízes de plantas conduzidas sem adubação de P (Figura 3). Como discutido anteriormente, a ramificação de hifas esporofíticas de FMA, chamadas fatores de ramificação, podem ocorrer através de sinalizadores lançados pelas raízes (SOUZA et al., 2006) e até exsudatos emitidos por bactérias diazotróficas (BALOTA et al., 1995).

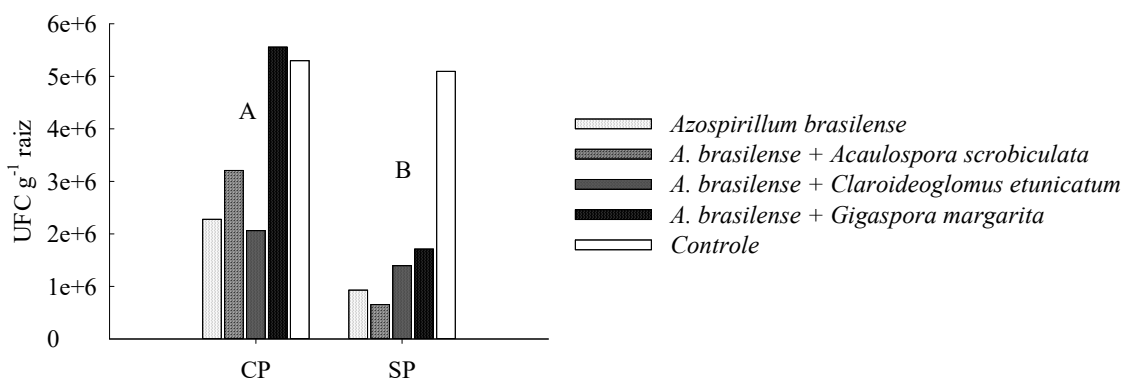


Figura 3 - Densidade de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias diazotróficas de raízes de milho submetidas à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e *A. brasilense*, em função da adubação fosfatada. CP: com 100 mg dm⁻³ de P; SP: sem adição de P.

No presente estudo, a população de bactérias diazotróficas foi influenciada pela adubação fosfatada, tornando-se coerente o desenvolvimento superior de plantas de milho como relatado anteriormente (Tabela 3 e 6). A população microbiana de solubilizadores de fosfato pode alcançar até 40% da população de microrganismos do solo (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016), ao passo que espécies de *A. brasilense* considerada como bactéria facultativa, pode colonizar regiões internas da raiz. A colonização de *A. brasilense* juntamente aos FMA pode ter favorecido o aumento da exsudação radicular de carbono fotossinteticamente fixo, resultando em maior colonização de bactérias diazotróficas nas raízes de milho.

14 CONCLUSÕES

Plantas de milho, inoculadas com *A. brasilense*+*A. scrobiculata* e *A. brasilense*+*C. etunicatum* apresentaram maior teor foliar de N na ausência da adubação fosfatada, comparado ao tratamento sem inoculação. A inoculação de *A. brasilense* de forma isolada, aumentou o teor foliar de P quando comparado ao tratamento sem inoculação e *A. brasilense* + *A. scrobiculata*.

A adubação fosfatada na cultura do milho resultou em benefícios às plantas, aumentando índices de trocas gasosas, promovendo consequentemente, maior desenvolvimento da cultura;

Raízes de plantas de milho submetido a adubação fosfatada apresentaram maior população de bactérias diazotróficas, ao passo que a inoculação de *A. brasilense* e/ou FMA não elevaram estes valores;

No presente estudo, não foi observado esporos micorrízicos de *A. scrobiculata*, *C. etunicatum* e *G. margarita* no substrato onde as plantas foram cultivadas.

15 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, jan. 2014.
- ARGENTA, G. et al. Adubação nitrogenada em milho pelo monitoramento do nível de nitrogênio na planta por meio do clorofilômetro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 1, p. 109–119, fev. 2003.
- BALDANI, J. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 911–922, maio 1997.
- BALOTA, E. L. et al. Interações e efeitos fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 1335–1345, 1995.
- BALOTA, E. L.; MACHINESKI, O.; SCHERER, A. Mycorrhizal effectiveness on physic nut as influenced by phosphate fertilization levels. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 1, p. 23–32, 2012.
- BASTOS, A. L. et al. Resposta do milho a doses de fósforo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 5, p. 485–491, maio 2010.
- BOTTINI, R. et al. Identification of gibberellins A(1), A(3), and iso-A(3) in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant physiology**, v. 90, n. 1, p. 45–7, maio 1989.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365–372, 2000.
- CACCIARI, I. et al. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic

cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v. 115, n. 1, p. 151–153, 1989.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. n. 4, v. 3, p. 160, 2017.

COZZOLINO, V.; DI MEO, V.; PICCOLO, A. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 40–44, 2013.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 1464–1473, out. 1976.

EMBRAPA. Métodos de Análises de Tecidos Vegetais Utilizados na Embrapa Solos. **Circular Técnica Nº 6**, p. 41, 2009.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.

FOLLI-PEREIRA, M. DA S. et al. Micorriza arbuscular e a tolerancia das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 36, n. 6, p. 1663–1679, 2012.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235–244, 1963.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1–7, 1 out. 2005.

GOLDSTEIN, A. H.; BRAVERMAN, K.; OSORIO, N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, n. 4, p. 295–300, dez. 1999.

GONÇALVES, J. L. M. et al. **Cinética de adsorção de fósforo em solos de cerrado** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 1985.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, 19 jan. 2016.

INAGAKI, A. M.; GUIMARAES, V. F.; RODRIGUES, L. F. O. S.; BARTIRA DA SILVA, M.; DIAMANTE, M. S.; RAMPIM, L.; MIORANZA, T. M.; DUARTE-JR., J. B. Phosphorus fertilization associated to inoculation of maize with diazotrophic bacteria. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 48, p. 3480–3487, 2014.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1983.

MASSENSINI, A. M. et al. Solubilização potencial de fosfatos mediada pela microbiota rizosférica de eucalipto cultivado em topossequência típica da Zona da Mata Mineira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 1, p. 692–700, 2015.

MEHDIPOUR MOGHADDAM, M. J.; EMTIAZI, G.; SALEHI, Z. Enhanced auxin production by *Azospirillum* pure cultures from plant root exudates. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 5, p. 985–994, 2012.

RAMOS, A. C.; MARTINS, M. A.; FAÇANHA, A. R. Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microssomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista**

Brasileira de Ciência do Solo, v. 29, n. 2, p. 207–213, abr. 2005.

RUIZ-SÁNCHEZ, M. et al. The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 11, p. 862–869, jul. 2010.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. D. S.; DA SILVEIRA, A. P. D. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1593–1600, 2007.

SOUZA, V. C. De; SILVA, R. A. Da; CARDOSO, G. D.; BARRETO, A. F. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 83, p. 612–618, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5th. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013.

ZHANG, L. et al. Hyphosphere interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate solubilizing bacterium promote phytate mineralization in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 74, n. March, p. 177–183, 2014.

ZHU, X. C. et al. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. **Plant, Soil and Environment**, v. 58, n. 4, p. 196–203, 2012.

16 CONCLUSÕES GERAIS

A adubação fosfatada resultou em maior crescimento da cultura, independente da inoculação de *A. brasilense* e fungos micorrízicos arbusculares.

A adubação nitrogenada na cultura do milho, além de proporcionar benefícios ao desenvolvimento cultura, interage em associação ao *A. brasilense* aumentando a promoção de crescimento de plantas.

O efeito residual de *A. brasilense* sob o cultivo sucessivo de milho com adubação nitrogenada influenciou positivamente o desenvolvimento da cultura, bem como as medidas de trocas gasosas.

A inoculação de *A. brasilense* associada aos FMA, *A. scrobiculata*, *C. etunicatum*, e *G. margarita*, apresentaram interação em função do aumento de teores foliares de nitrogênio e fósforo de plantas de milho, porém não foram observados o desenvolvimento de esporos micorrízicos.

A extração de esporos micorrízicos arbusculares aos 30 dias após emergência de plantas de milho, pode ter sido um período precoce no desenvolvimento dos mesmos. Neste sentido, para garantir a avaliação do número de esporos, haveria necessidade de maior período de condução do experimento, ao passo que avaliações a campo tenderia ao final do ciclo, garantindo o ciclo de propagação das micorrizas.

17 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. A adubação fosfatada na cultura do milho tem sua importância indiscutível, na ausência deste elemento plantas avaliadas proporcionaram sintomas de deficiência de P notáveis, tais como, menor porte de plantas, coloração roxeada seguida por necrose iniciada pelas extremidades das folhas.

2. A condução de experimentos em casa de vegetação requer cuidados relacionados à fertilidade do solo. De fato, a recomendação de adubação para condução de experimentos em vasos deve seguir um protocolo diferenciado quando comparado aos ensaios implantados à campo. Propriedades físicas importantíssimas como, densidade do solo, microporosidade, macroporosidade, compactação e percolação de água no solo, são diferentes comparando quando em condições de campo. Desta forma, é evidente que a adubação de plantas de milho conduzidas em vasos deve ser diferenciada, chegando até 300 ppm de P, 100 ppm de N e 100 ppm de K.

3. O desempenho de bactérias associativas requer condições favoráveis para o seu desenvolvimento, porém existem condições extremas as quais a espécie *Azospirillum brasilense* tem demonstrado alta eficiência, tais como em condições extremas de baixa e alta concentração de P no solo, além do déficit hídrico.

4. A obtenção de inóculos micorrízicos arbusculares de procedência confiável nem sempre é suficiente para se ter certeza que os mesmos possuirão taxa de infecção efetiva. É importante seguir um protocolo de teste de germinação dos esporos, além se proceder à multiplicação dos esporos.

5. A presença de diferentes espécies de Fungos Micorrízicos Arbusculares nos solos brasileiros é ocorrente, principalmente em solos desprovidos da ação antrópica. No entanto, na agricultura em larga escala a atividade destes fungos ainda são efetivas. Face ao exposto, a associação de bactérias solubilizadoras de fosfato devem interagir juntamente aos fungos micorrízicos arbusculares. Esta ação pode ocorrer de forma natural na microbiota do solo, ao passo que através do presente estudo foi possível observar o mesmo.

6. O estudo de dois microrganismos em sinergismo atuando como promotor de crescimento vegetal requer vasta experiência multidisciplinar, a orientação por professores Doutores de áreas específicas como, fitopatologia/microbiologia, fertilidade do solo/nutrição de plantas/fisiologia vegetal é crucial para o desenvolvimento e entendimento dos resultados.

7. A partir das análises de trocas gasosas em plantas utilizando o equipamento portátil IRGA, adquire-se experiências associadas à teoria obtida em sala de aula. Para

confiabilidade dos dados obtidos pelo IRGA é essencial alguns excessos de cuidados para com o equipamento, tais como, limpeza diária, evitar torção de cabos, meio de transporte seguro, troca de reagentes no momento correto, utilização de reagentes de procedência confiável e principalmente conhecimento das variáveis avaliadas.

8. Ainda sobre a veracidade dos dados de trocas gasosas sob plantas de milho, é crucial a importância do estabelecimento da folha de avaliação além da posição de clipagem da câmara de leitura, desta forma, possibilita-se que as amostras possuam leituras padrões para cada parcela. A partir dos dados obtidos foi possível comprovar, o que era notável visualmente, a correlação positiva entre índice SPAD e fotossíntese líquida, em folhas de milho.