

**Desenvolvimento inicial de plântulas de milho reinoculadas com bactérias diazotróficas**

**Initial development of reinoculated maize seedlings with diazotrophic bacteria**

**Desarrollo inicial de plántulas de maíz reinoculadas con bacterias diazotróficas**

Recebido: 20/03/2020 | Revisado: 20/03/2020 | Aceito: 25/03/2020 | Publicado: 26/03/2020

**Leandro Rampim**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8300-7424>

Universidade Estadual do Centro Oeste, Brasil

E-mail: [rampimleandro@yahoo.com.br](mailto:rampimleandro@yahoo.com.br)

**Vandeir Francisco Guimarães**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7117-1905>

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil

E-mail: [vandeirfg@yahoo.com.br](mailto:vandeirfg@yahoo.com.br)

**Fernanda Heerdt Salla**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1825-5664>

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil

E-mail: [fernandaheerdt@hotmail.com](mailto:fernandaheerdt@hotmail.com)

**Andréia Cristina Peres Rodrigues da Costa**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8700-5960>

Universidade Estadual de Maringá, Brasil

E-mail: [andriacpr@hotmail.com](mailto:andriacpr@hotmail.com)

**Adriano Mitio Inagaki**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9519-3161>

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil

E-mail: [mitioinagaki@gmail.com](mailto:mitioinagaki@gmail.com)

**Lucas Guilherme Bulegon**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8802-2519>

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil

E-mail: [lucas\\_bulegon@yahoo.com.br](mailto:lucas_bulegon@yahoo.com.br)

**Roberto de França**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0391-1745>

Universidade Estadual do Centro Oeste, Brasil

E-mail: [roberto.franssa@gmail.com](mailto:roberto.franssa@gmail.com)

## Resumo

A eficiência comprovada da inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura de milho, traz dúvidas sobre o uso sequencial em sementes obtidas de plantas previamente inoculadas, devido produção de hormônios pelas bactérias, que interferem no desenvolvimento das plantas em baixa quantidade. O objetivo do trabalho foi avaliar desenvolvimento inicial bem como qualidade fisiológica de sementes milho reinoculadas, provenientes do cultivo associado com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada. O experimento foi realizado em delineamento de blocos casualizados com fatorial 6x2, sendo seis tratamentos provenientes do manejo anterior das sementes [0, 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> de N (ureia) sem inoculação e inoculação das sementes com *A. brasiliense* na dose 50, 100 e 150 mL/25kg de sementes cultivadas com 60 kg ha<sup>-1</sup> de N], tanto unicamente com inoculação realizada no cultivo anterior e reinoculação das sementes de milho híbrido DKB 285 PRO<sup>®</sup>. Dose elevada de inoculante *A. brasilense* (150 mL + 60 Kg N ha<sup>-1</sup>) no cultivo anterior pode ter reduz germinação e desenvolvimento inicial, sobretudo, ao reinocular, há reestabelecimento da emergência e qualidade fisiológica das plântulas. A inoculação com 100 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N seguida de reinoculação com *A. brasilense* se destaca no desenvolvimento inicial de plântulas de milho para cultivos sucessivos. Sementes de milho reinoculadas com *A. brasilense* promove maior desenvolvimento radicular de plântulas de milho, ampliando superfície para absorção de água e nutrientes do solo, porém reduz desenvolvimento para parte aérea.

**Palavras-chave:** *Azospirillum brasilense*; qualidade fisiológica; índice de velocidade de germinação; *Zea mays*.

## Abstract

Proved efficiency by *Azospirillum brasilense* inoculation in maize crop, raises questions about the sequential use of seeds obtained from inoculated plants, that product hormones by bacteria that affect the development of plants in low amount. It aimed to evaluate early development and physiological seed quality reinoculated corn, from cultivation associated with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilizer. Experiment was conducted in a randomized block design with factorial 6x2, with six treatments from the previous management of seeds [0, 60 and 120 kg ha<sup>-1</sup> N (urea) without inoculation and seed inoculation with *A. brasiliense* at dose 50, 100 and 150 mL/25 kg of seeds grown with 60 kg ha<sup>-1</sup> N], both only with inoculation on previous crop and re-inoculation by maize hybrid seed DKB 285 PRO<sup>®</sup>. High dose

inoculum of *A. brasilense* (150 ml + 60 kg N ha<sup>-1</sup>) in the previous crop can be reduced germination and early development, on the other hand, reinoculation reestablish physiological quality and emergence of the seedlings. Inoculation with 100 ml of inoculant + 60 kg ha<sup>-1</sup> N followed by reinoculation with *A. brasilense* stands out in the initial development of maize seedlings for crop rotation. Reinoculated maize seeds with *A. brasilense* promotes greater root development maize seedlings, increasing surface by roots to water and nutrients absorb from soil, but reduce shoot development.

**Keywords:** *Azospirillum brasilense*; physiological quality; index of germination rate; *Zea mays*.

### Resumen

La eficacia comprobada de la inoculación de *Azospirillum brasilense* en cultivos de maíz, plantea dudas sobre el uso secuencial en semillas obtenidas de plantas previamente inoculadas, debido a la producción de hormonas por bacterias, que interfieren en el desarrollo de plantas en baja cantidad. El objetivo del estudio fue evaluar el desarrollo inicial, así como la calidad fisiológica de las semillas de maíz reinoculadas del cultivo asociado con *Azospirillum brasilense* y la fertilización con nitrógeno. El experimento se llevó a cabo en un diseño de bloque aleatorizado con factorial 6x2, seis tratamientos de la gestión previa de semillas [0, 60 y 120 kg ha<sup>-1</sup> de N (urea) sin inoculación e inoculación de semillas con *A. brasiliense* a la dosis 50, 100 y 150 mL/25kg de semillas cultivadas con 60 kg de ha<sup>-1</sup> de N], ambas sólo con inoculación realizada en el cultivo anterior y reinoculación de las semillas de maíz híbridas DKB 285 PRO<sup>®</sup>. Alta dosis de inoculante *A. brasilense* (150 mL + 60 Kg N ha<sup>-1</sup>) en el cultivo anterior puede haber reduce lagerminación y el desarrollo inicial, especialmente para el reinocular, se da un restablecimiento de la emergencia y la calidad fisiológica de las plántulas. Inoculación con 100 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N seguida de reinoculación con *A. brasilense* destaca en el desarrollo inicial de plántulas de maíz para cultivos sucesivos. Las semillas de maíz reinoculadas con *A. brasilense* promueven un mayor desarrollo radicular de las plántulas de maíz, expandiendo la superficie para la sorción de nutrientes del agua y del suelo, pero reduce el desarrollo para brotes.

**Palabras clave:** *Azospirillum brasilense*; calidad fisiológica; índice de velocidad de germinación; *Zea mays*.

## 1. Introdução

A previsão de produção de milho no Paraná na safra 2014/2015 é de 14,59 milhões toneladas, com produtividade de 6060 kg ha<sup>-1</sup> em área de 2,40 milhões de hectares. A produção total no Brasil é de 80,05 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2015).

Os custos econômicos e ambientais relacionados à fertilização nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a utilização deste fertilizante sem que haja diminuição da produtividade (Roesch et al., 2005). Assim, é crescente a busca por maior sustentabilidade nos sistemas agrícolas de produção, sendo umas das principais alternativas para a economia de fertilizante nitrogenado, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias diazotróficas como o *Azospirillum brasilense*, a qual pode suplementar ou, até mesmo, substituir a utilização destes fertilizantes (Bergamaschi, 2007; Reis Júnior et al., 2008).

O *A. brasilense* é uma bactéria de comportamento endofítico facultativo, pode colonizar tanto a rizosfera quanto regiões internas das plantas (Baldani & Baldani, 2005) tendo efeito também de promotoras de crescimento vegetal, devido a estímulos e a produção de hormônios como auxinas (Crozier et al., 1988) e giberelinas (Bottini et al., 1989), além de outros compostos (Perring et al., 2007; Moreira et al., 2010) que estimulam o desenvolvimento vegetal, principalmente em raízes, atuando no aumento da absorção de água e nutrientes (Dobbelaere et al., 2002).

Desta forma, Dalla Santa et al. (2008), observaram a influência da inoculação de *Azospirillum* sp. em trigo, cevada e aveia, onde ocorreu substituição parcial da fertilização nitrogenada inorgânica. Quando se considera a promoção de crescimento, Quadros (2009) observou aumento do volume de raiz em cultivares de milho inoculadas com *Azospirillum* culminando em aumento da massa seca da parte aérea. Também são relatadas plantas com maior área foliar, diâmetro de colmo e teor relativo de clorofila (Dartora et al., 2013; Inagaki et al., 2014; Inagaki et al., 2015).

Além desses efeitos já mencionados, as sementes de milho oriundas de plantas inoculadas possuem maior acúmulo de reservas (Sousa et al., 2012). Nishi et al. (1996) utilizou a reinoculação na cultura da soja, buscando incrementar os níveis de produtividade dessa leguminosa via fixação biológica de nitrogênio com a estirpe do gênero *Bradyrhizobium* e visando o acúmulo de N no solo para a cultura seguinte, e constataram que com a reinoculação da soja obteve incremento no rendimento e no teor de nitrogênio no grão; e para

o trigo, cultura sucessora observou incremento nos teores de N nos grãos e conseqüentemente aumento da produtividade sem que essas tivessem nenhum tipo de adubação nitrogenada.

Devido as respostas da reinoculação nas culturas, é oportuno verificar os efeitos da reinoculação na cultura de milho interagindo com diferentes doses de inoculação e adubação nitrogenada, além de avaliar vantagens aos sistemas agrícolas auxiliando na sustentabilidade da agricultura. Sobretudo, a eficiência comprovada da inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura de milho, traz dúvidas sobre o uso sequencial em sementes obtidas de plantas previamente inoculadas, devido produção de hormônios pelas bactérias, que interferem no desenvolvimento das plantas em baixa quantidade.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar desenvolvimento inicial bem como qualidade fisiológica de sementes milho reinoculadas, provenientes do cultivo com adubação nitrogenada e inoculado com *Azospirillum brasilense*.

## 2. Metodologia

O experimento foi realizado em condições de laboratório, com ambiente controlado.

Sobretudo, as sementes utilizadas no ensaio de reinoculação são provenientes do híbrido DKB 285 PRO<sup>®</sup>, cultivado no Campus Regional de Umuarama da Universidade Estadual de Maringá (UEM), na cidade de Umuarama, região Noroeste do Paraná. A área experimental estava localizada na latitude de 23° 47' 55" Sul e longitude 53° 18' 48" Oeste e altitude de 430 m. O referido ensaio foi realizado em solo classificado como Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico típico (Embrapa 2013). Os tratamentos foram: T1 - Testemunha sem nitrogênio (N) e sem inoculação; T2 - Dose de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N; T3 - Dose de 60 kg ha<sup>-1</sup> de N; T4, T5 e T6 - Inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* na dose de 50, 100 e 150 mL/25kg de sementes, respectivamente + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N.

As sementes colhidas foram separadas em dois lotes de cada tratamento, que foram selecionadas em tamanho homogêneo e eliminação das sementes defeitos, as quais foram secas a temperatura ambiente até atingirem aproximadamente 14% de umidade.

Para a implantação do experimento foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial (6x2), onde o primeiro fator foi representado pelos seis tratamentos provenientes do manejo anterior das sementes; e para o segundo fator foi utilizado as sementes colhidas no cultivo anterior (grãos colhidos do experimento implantado com sementes submetidas a inoculação com *A. brasilense*) e sementes reinoculadas (grãos colhidos do experimento anterior reinoculadas com *A. brasilense*), com quatro repetições de 25

sementes para cada parcela, totalizando 48 parcelas experimentais. Inoculação do cultivo anterior quanto reinoculação foram realizadas com *A. brasilense* (estirpe AbV5) na dose de 150 mL para cada 25 kg de semente, sendo utilizado inoculante da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sendo preparados a partir de uma solução de bactérias pura na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Como substrato foi utilizado areia de granulometria inferior a 2 mm, esterilizada em autoclave a 120 °C por 15 minutos, e umedecida com água na quantidade de 60% da capacidade de retenção da areia (Brasil, 2009).

Para semeadura, foram utilizadas bandejas plásticas (42 x 28 x 6 cm), onde foram semeadas quatro repetições de cada tratamento. As sementes foram colocadas sobre uma camada uniforme de areia umedecida e cobertas com areia solta, de forma a obter uma camada de aproximadamente um centímetro sobre as sementes e então submetidas à temperatura constante de 25 °C, com fotoperíodo de 12 H, com reposição constante de água no substrato. Para esse estudo se considerou as sementes de milho germinadas quando o hipocótilo emergido obteve aproximadamente dois centímetros.

Para realizar o teste de germinação, foi calculado o índice de velocidade de emergência, conforme adaptação de (Maguire 1962) e percentagem de emergência (PE), sete dias após a semeadura (DAS).

Sete DAS as plântulas foram avaliadas quanto ao comprimento de raiz e plântula, utilizando-se para isso uma régua graduada, número e volume de raiz, diâmetro de coleto, massa de matéria seca de raiz e parte aérea. Para estimar o volume radicular, as raízes foram cortadas e imersas em água numa proveta graduada (Rossiello et al., 1995). Raízes e parte aérea foram submetidas à desidratação em estufas com circulação forçada de ar, a 65 °C, até atingir peso constante, para determinação da massa de matéria seca de raiz e parte aérea.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5 e 10% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

### **3. Resultados e discussão**

#### **3.1 Resultados**

Emergência das plântulas

Ao observar a análise de variância foi observado que houve interação significativa entre os tratamentos e reinoculação para as variáveis testadas, com exceção para número de raiz e massa seca de parte aérea (Tabela 1). No entanto, os dois fatores analisados separadamente, afetaram significativamente a massa de matéria seca de parte aérea. Já para número de raiz, somente a reinoculação obteve-se significância.

Para o índice de velocidade de emergência, notou-se que as plântulas inoculadas com tratamento de maior dose de inoculante (150 mL de inoculante) apresentou menor valor, porém não diferindo dos tratamentos com 0 e 60 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio (N) (Tabela 2). Para as sementes reinoculadas, o índice de velocidade de emergência apresentou comportamento semelhante, não diferindo estatisticamente dos tratamentos estudados.

Analisando os tratamentos do cultivo anterior em relação à reinoculação, verifica-se no tratamento com 50 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> N apresentou maior índice de velocidade de emergência quando sementes apenas foram inoculadas. Por outro lado, para o tratamento com 150 mL de inoculante, as sementes reinoculadas apresentaram maior valor de IVE em relação a inoculação.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância de índice de velocidade de emergência (IVE), percentagem de emergência (G), comprimento de plântula (CP), diâmetro de coleto (DC), comprimento de raiz (CR), número de raiz (NR), massa de matéria seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSPA) de milho (DKB 285 PRO<sup>®</sup>), provenientes da inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada, e reinoculadas com *Azospirillum brasilense*

FV (GL)	Quadrado médio							
	IVE	G	CP	DC	CR	NR	MSR	MSPA
Tratamentos								
Cultivo anterior (5)	1,02*	249,13 <sup>o</sup>	4,15**	0,13**	20,83**	0,17 <sup>ns</sup>	0,03**	0,01**
Reinoculação (1)	0,59 <sup>ns</sup>	96,33 <sup>ns</sup>	4,67**	0,73**	70,64**	1,23*	0,01 <sup>ns</sup>	0,04**
Interação (5)	0,94*	337,13*	1,90**	0,04 <sup>o</sup>	21,25**	0,43 <sup>ns</sup>	0,07**	0,00 <sup>ns</sup>
CV (%)	12,54	12,33	4,39	5,5	9,68	12,95	19,94	12,21
Média	4,65	96,92	12,82	2,46	14,23	4,04	0,32	0,39

FV: Fonte de Variação; GL: Grau de liberdade; <sup>ns</sup> não significativo, \*\* significativo a 1%, \* significativo a 5% e <sup>o</sup> significativo a 10% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Para a percentagem de emergência de plântulas de milho foi observado que as sementes providas de plantas inoculadas obtiveram diferença para os tratamentos com 150 mL de inoculante e 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, o qual apresentou menor valor (66%) em relação aos demais tratamentos com exceção do tratamento controle e 60 kg de N ha<sup>-1</sup>. Comparando a emergência das sementes reinoculadas e apenas inoculadas no cultivo anterior, foi observado menor percentagem de germinação (66%) quando se utilizou a maior dose de inoculante (150 mL + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>). Para as sementes reinoculadas não foram observadas diferença significativa quando comparado entre os tratamentos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Índice de velocidade de emergência (IVE) e percentagem de emergência de plântulas de milho (DKB 285 PRO<sup>®</sup>), provenientes da inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada, e reinoculadas com *Azospirillum brasilense*

Tratamentos	(IVE)			Porcentagem de emergência (%)		
	Inoculadas	Reinoculadas	Média	Inoculadas	Reinoculadas	Média
0 N	4,84 abA	4,40 aA	4,62	87,00 abA	86,00 aA	86,5
60 Kg N ha <sup>-1</sup>	4,80 abA	4,80 aA	4,8	84,00 abA	94,00 aA	89
120 Kg N ha <sup>-1</sup>	5,12 aA	5,06 aA	5,09	92,00 aA	95,00 aA	93,5
50 mL <sup>1</sup> + 60 Kg N ha <sup>-1</sup>	5,09 aA	3,87 aB	4,48	90,00 aA	77,00 aA	83,6
100 mL + 60 Kg N ha <sup>-1</sup>	5,09 aA	4,61 aA	4,85	94,00 aA	88,00 aA	91
150 mL + 60 Kg N ha <sup>-1</sup>	3,63 bB	4,48 aA	4,05	66,00 bB	90,00 aA	78
Média	4,76	4,54		85,5	88,33	
CV (%)		12,2			12,01	

<sup>1</sup> quantidade de inoculante para 25 kg de semente. Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

#### Desenvolvimento radicular

Ao observar o volume de raiz (Figura 1A), nas plântulas de milho sem reinoculação (apenas inoculadas no cultivo anterior), o controle apresentou maior volume de raiz (3,68 cm<sup>3</sup>) quando comparado ao tratamento de 60 kg de N ha<sup>-1</sup> (2,40 cm<sup>3</sup>) e a maior dose de

inoculante (150 mL + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>) (1,38 cm<sup>3</sup>), todavia, semelhante aos demais tratamentos (120 kg de N ha<sup>-1</sup>, 50 mL e 100 mL + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>). Ao se realizar a reinoculação, as sementes oriundas do tratamento 100 mL + 60 kg de N ha<sup>-1</sup> obtiveram maior volume de raiz (3,73 cm<sup>3</sup>), contudo apenas superior ao tratamento controle sem adubação nitrogenada e sem inoculação.

Para as sementes inoculadas e reinoculadas ocorreram efeito pronunciados para o tratamento controle e 150 mL de inoculante 60 kg de N ha<sup>-1</sup>.

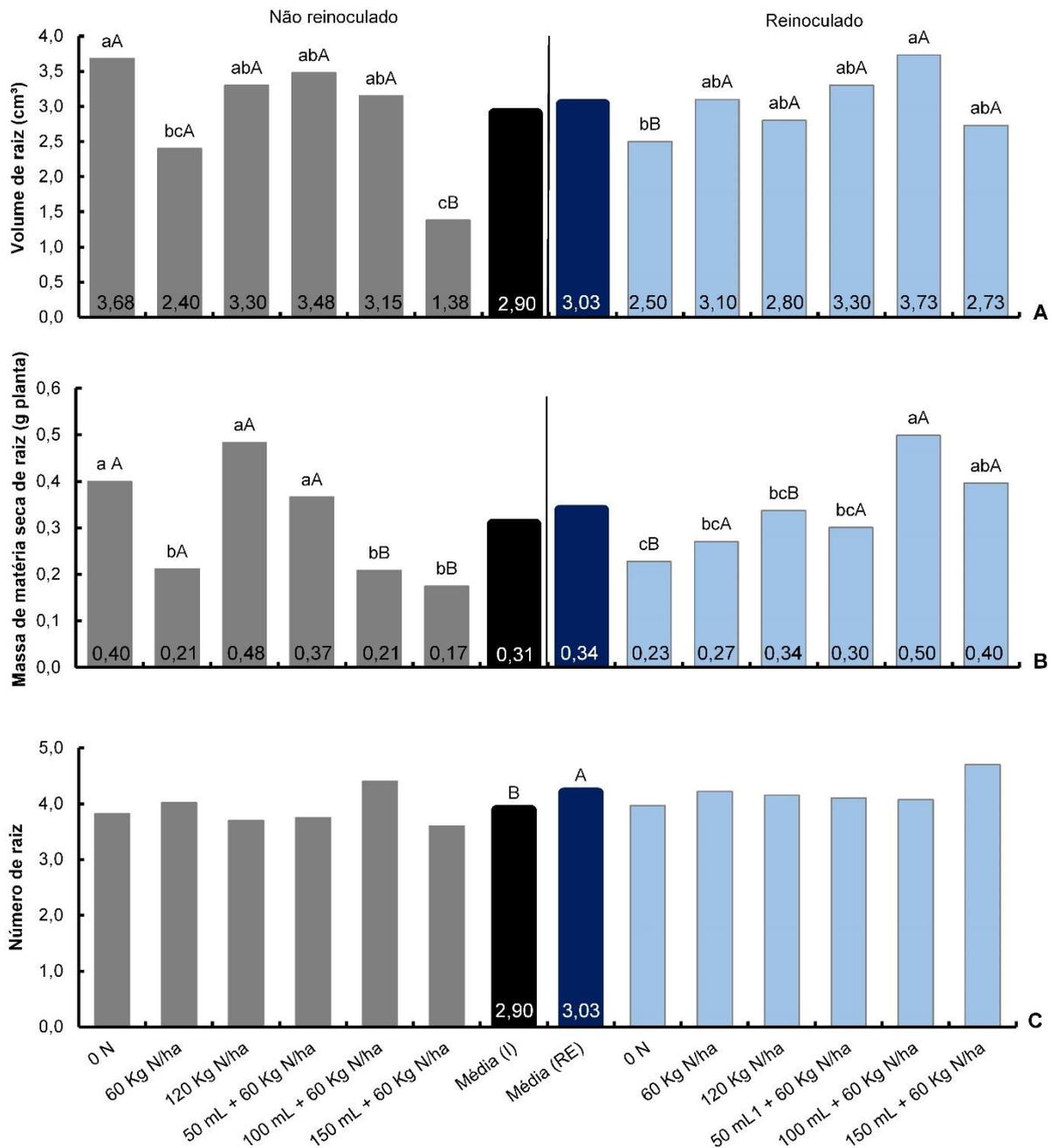
Para as sementes do tratamento controle, quando submetidas à reinoculação, apresentaram volume de raízes reduzido em 32,06%. Com 150 mL de inoculante + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, a reinoculação proporcionaram plântulas com incremento de 97,8% no volume de raiz.

Na produção de massa de matéria seca de raiz (MSR) pelas plântulas, sementes inoculadas apenas no cultivo anterior, apresentaram valores superiores para os tratamentos controle, 120 kg de N ha<sup>-1</sup> e 50 mL de inoculante + 60 kg de N ha<sup>-1</sup> (Figura 1B). Quando se utilizou reinoculação, as sementes com tratamento de 100 mL de inoculante + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, desenvolveram plântulas com maior MSR, diferenciando do tratamento controle, 60 e 120 kg de N ha<sup>-1</sup>, e 50 mL de inoculante + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, ao mesmo tempo foi semelhante ao tratamento 150 mL de inoculante + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>. Ao se observar o desdobramento da interação, as sementes de milho sem adubação nitrogenada quanto 120 kg de N ha<sup>-1</sup> apresentaram maiores médias de MSR quando não receberam a reinoculação. A reinoculação beneficiou as plântulas com tratamento de 100 e 150 mL de inoculante + 60 Kg N ha<sup>-1</sup>, os quais apresentaram 58,12% e 55,81% de aumento, quando comparados aos mesmos apenas com inoculação no primeiro cultivo, respectivamente.

Não houve interação entre os fatores inoculação e reinoculação para avaliação de número de raiz (Figura 1C). Apesar de ser característica genotípica, quando se comparou as médias dos tratamentos, plântulas de milho que foram reinoculadas apresentaram maior média de número de raiz, independente do tratamento realizado no cultivo anterior.

Desta forma, a reinoculação das sementes provenientes de plantas de milho tratadas ou não com *A. brasilense*, beneficiaram as raízes de plântulas no seu desenvolvimento inicial aos sete dias após a semeadura, de fato, quando as sementes com maior dose de inoculante (150 mL) foram reinoculadas, foi observado aumento de 30,56% no número de raízes e aumento de 11,84% em relação ao tratamento controle (Figura 1).

**Figura 1.** Volume de raiz (A), massa de matéria seca de raiz (B) e número de raiz (C) de milho (DKB 285 PRO®), provenientes da inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada, e reinoculadas com *Azospirillum brasilense*



Valores representados por diferentes letras minúsculas diferem cada tratamento dentro de inoculação e reinoculação, diferentes letras maiúsculas, diferem inoculação e reinoculação dentro de cada tratamento pelo teste Tukey  $p \leq 0,05$ .

Analisando os valores de comprimento de raiz (Figura 2A), em sementes apenas inoculadas no primeiro cultivo, o tratamento com a menor dose de inoculante (50 mL + 60 Kg

N ha<sup>-1</sup>) proporcionou valor superior de comprimento de raiz, porém não diferindo do tratamento controle. Em sementes reinoculadas, o tratamento com 100 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N, apresentou menores valores de comprimento de raiz. Para os valores de comprimento de raiz as plântulas das sementes reinoculadas com *A. brasilense*, o tratamento com 120 kg ha<sup>-1</sup> de N elevou em 22,29% o CR, não diferindo estatisticamente dos tratamentos com 0 e 60 kg ha<sup>-1</sup> de N e 50 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Ao comparar o efeito da reinoculação para cada tratamento no comprimento de raiz, foi identificadas médias iguais estatisticamente em 60, 120 kg ha<sup>-1</sup> de N e 100 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N, sendo que para os demais tratamentos, a reinoculação reduziu CR.

De maneira geral, o desenvolvimento de raízes com reinoculação de *A. brasilense* proporcionaram plântulas de milho com raízes robustas, porém com comprimento radicular reduzido (Figura 1; Figura 2A).

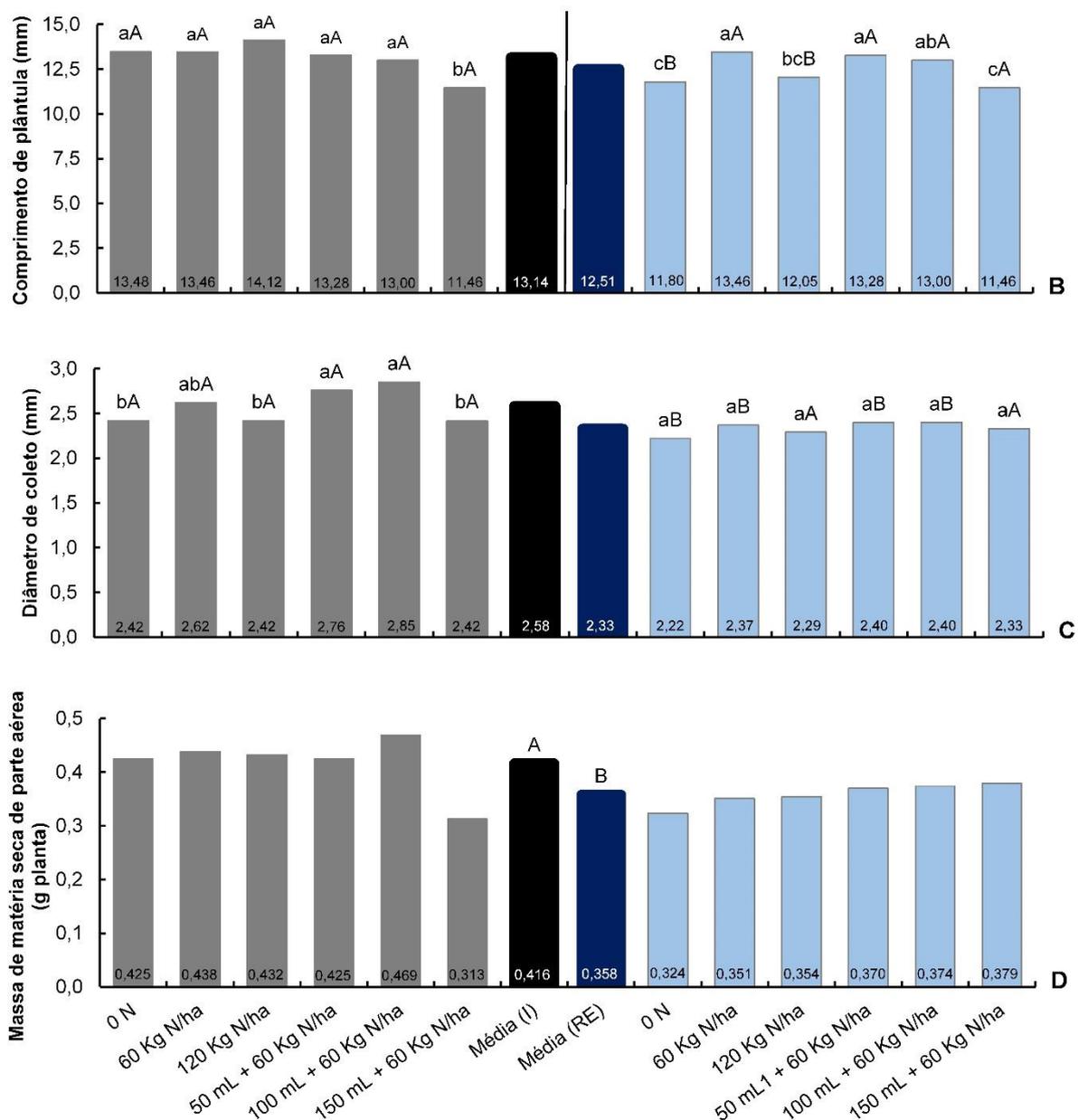
#### *Desenvolvimento parte aérea*

Para os valores de comprimento de plântula de milho (Figura 2B), sementes inoculadas com *A. brasilense* no cultivo anterior apresentaram comportamento semelhante, exceto para o tratamento de maior dose (150 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N), o qual proporcionou menor valor médio com redução de 15% (2,02 mm) no comprimento de plântulas em relação ao tratamento controle. Para plântulas provenientes da reinoculação com *A. brasilense*, valores maiores foram observados para plântulas provenientes de sementes dos tratamentos com 60 kg ha<sup>-1</sup> de N e, 50 e 100 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N. O tratamento com a maior dose de inoculante (150 mL), mesmo com reinoculação apresentou plântulas menores, não diferindo do controle e do tratamento com 120 kg ha<sup>-1</sup> de N. As plântulas reinoculadas apresentaram reduções no comprimento de plântulas em relação às apenas inoculadas em 12,5 e 14,7% para os tratamentos controle e 120 kg ha<sup>-1</sup> de N, respectivamente. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças em relação à reinoculação das sementes.

Para diâmetro de coleto (Figura 2C), na inoculação, foi verificadas plântulas maiores para os tratamentos com 50 e 100 mL de inoculante + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, não diferindo do tratamento com 60 kg<sup>-1</sup> de N ha<sup>-1</sup>, sendo este semelhante estatisticamente ao controle. Não obstante, os tratamentos controle, 120 kg ha<sup>-1</sup> de N e 150 mL de inoculante + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, proporcionaram menores valores de diâmetro do coleto. Para as sementes reinoculadas com *A. brasilense* os valores médios dos tratamentos foram semelhantes. No diâmetro e coleto, na

interação entre sementes inoculadas e reinoculadas, apenas nos tratamentos com 120 kg ha<sup>-1</sup> de N e 150 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N não houve redução com reinoculação.

**Figura 2.** Comprimento de raiz (A), comprimento de planta (B), diâmetro de coleto (C) e massa de matéria seca de parte aérea (D) de milho (DKB 285 PRO<sup>®</sup>), provenientes da inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada, e reinoculadas com *Azospirillum brasilense*



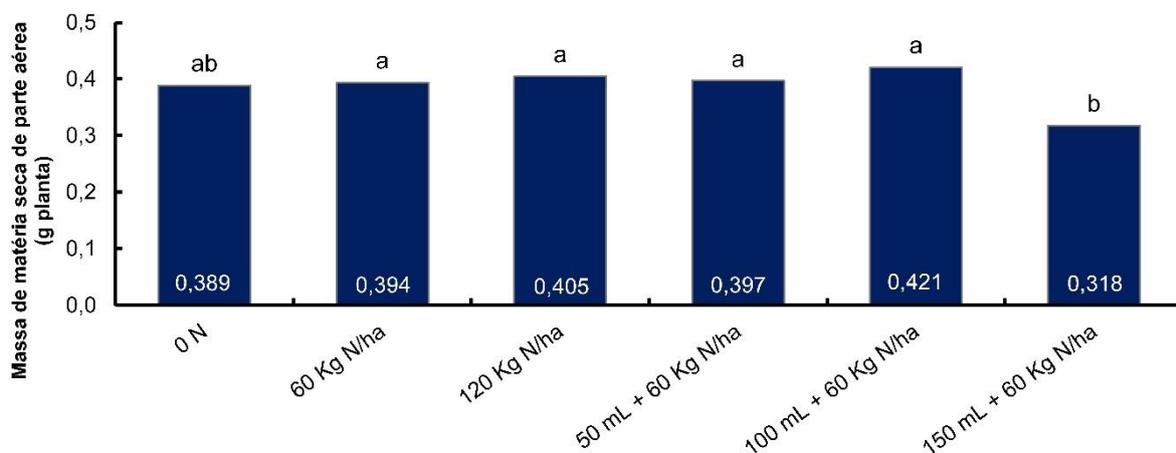
Valores representados por diferentes letras minúsculas diferem cada tratamento dentro de inoculação e reinoculação, diferentes letras maiúsculas, diferem inoculação e reinoculação dentro de cada tratamento pelo teste Tukey  $p \leq 0,05$ .

Na Figura 2D, para avaliação de massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), sementes reinoculadas apresentaram menor desenvolvimento da parte aérea de plântulas de milho (0,359 g de MSPA) em relação a inoculação no cultivo anterior (0,416 g).

De forma independente, com ou sem reinoculação, dose de inoculação com *A. brasilense* (150 mL + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N) prejudicou MSPA de plântulas de milho conduzido aos sete dias após emergência, sendo semelhante ao controle (Figura 3).

Face ao exposto, a utilização da reinoculação de sementes provenientes de plantas de milho submetido à inoculação das doses 50 e 100 + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N, reduziu coleta de plântulas de milho aos sete dias após emergência. Da mesma forma, a reinoculação não promoveu melhorias no crescimento da parte aérea em relação aos tratamentos 0, 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> de N.

**Figura 3.** Massa de matéria seca de raiz de plântulas de milho (DKB 285 PRO<sup>®</sup>), provenientes da inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada, e reinoculadas com *Azospirillum brasilense*



Valores representados por diferentes letras diferem entre si pelo teste Tukey  $p \leq 0,05$ .

### 3.2 Discussão

De forma geral, aceitou-se nível de significância a 10% de probabilidade de erro para a variável diâmetro de coleto (DC) ( $p \leq 0,095$ ), devido aos resultados serem semelhantes observados em outras pesquisas que utilizaram a mesma estirpe de *Azospirillum brasilense* (AbV5) (Inagaki *et al* 2015, Rodrigues *et al* 2014, Dartora *et al* 2013).

A inoculação de sementes possibilita produção de sementes, que ao serem cultivadas apresentaram maior índice de velocidade de emergência e maior percentagem de emergência,

contudo o uso de dose elevada de inoculante (150 mL 25 kg<sup>-1</sup> de sementes) prejudica a velocidade de emergência e germinação (Tab. 2). Sobretudo, a reinoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* originadas de plantas inoculadas, de maneira geral minimizou os problemas causados pela dose elevada de inoculante no cultivo anterior (150 mL 25 kg<sup>-1</sup> de sementes), adequando germinação e IVE. A inoculação com 100mL + 60 Kg N ha<sup>-1</sup> se destacou, pois não sofreu redução do IVE ao realizar reinoculação. De fato, a utilização de bactérias promotoras de crescimento deve seguir quantidade adequada para não interferir negativamente no desenvolvimento das plantas, visto que produzem substâncias hormonais, como auxina, giberelina e citocinina (Moreira *et al* 2010, Fibach-Paldi *et al* 2012, Sivasakthivelan & Saranraj 2013), que podem alterar o equilíbrio das mesmas no momento de formação de grãos, interferindo posteriormente na fisiologia de germinação, e consequentemente reduzindo emergência. A interferência de bactérias diazotróficas pode elevar o acúmulo de solutos orgânicos, alterando equilíbrio osmótico (Santos *et al* 2014) e alterando processos como germinação, como entrada de água nas sementes para ocorrer germinação, consequentemente interferir positivamente ou negativamente na germinação, depende com acúmulo de solutos e níveis de hormônios na semente. Por outro lado, a operação de reinoculação, com uso de bactéria *A. brasilense*, pode fornecer tais substâncias em momento oportuno promovendo crescimento vegetal.

Em continuidade, sementes provenientes de plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* em dose elevada (150 mL 25 kg<sup>-1</sup> de sementes) do cultivo anterior reduziu qualidade fisiológica das plântulas, com menor desenvolvimento inicial de plantas (baixo comprimento de planta, diâmetro de coleto, comprimento de raiz, volume de raiz, número de raiz, massa seca de raiz e massa seca de parte aérea), repercutindo impacto negativo no desequilíbrio hormonal. Dartora *et al.* (2013), não encontraram diferença na altura de plantas (na parte aérea), tanto na fase vegetativa quanto reprodutiva em solo de pH 4,8, ao testarem inoculação de sementes com *A. brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em híbrido de milho 30R50. De fato, ao efetuar reinoculação, dose mais adequada para inoculação no primeiro cultivo (100mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N) apresenta maior comprimento de planta em relação ao controle e dose mais elevada de inoculante, provavelmente por considerar o comprimento de raiz, ou seja, atuação de *A. brasilense* interfere primeiramente no sistema radicular. No entanto, a alteração de resultados com diferentes doses de inoculante (alto número de unidades formadoras de colônia) pode ter relação com competitividade do inoculante com população de microrganismos nativa do solo (Moreira *et al* 2010).

Sementes de milho reinoculadas com *Azospirillum brasilense* promove maior desenvolvimento radicular de plântulas de milho (maior número de raízes e valor 10 % maior em massa de massa seca de raiz e 4,5% maior em volume de raiz), podendo gerar melhor absorção e aproveitamento de nutrientes do solo, porém reduz desenvolvimento para parte aérea (menor massa seca de parte aérea). Para Moreira *et al.* (2010), a produção de hormônios como citocinina pelo *Azospirillum* possibilita maior desenvolvimento do sistema radicular, inicialmente detectado pelo incremento da densidade e comprimento dos pêlos radiculares, que resulta em aparecimento de raízes laterais e aumento do volume da superfície radicular; mais especificamente devido ao aumento da diferenciação das células epidérmicas.

A reinoculação no tratamento controle (sem adubação nitrogenada e sem inoculação) permitiu constatar redução da maioria das variáveis biométricas avaliadas, contudo, houve aumento do número de raízes. Tal fato, evidencia os efeitos da promoção de crescimento ao utilizar *A. brasilense*, incrementando número de raízes, sobretudo no sistema radicular (Fibach-Paldi *et al* 2012, Sivasakthivelan & Saranraj 2013). Nestes casos, o direcionamento do metabolismo da planta, repercuti em redução de massa de raiz e parte aérea, diâmetro de coleto e volume de raízes, com formação de mais raízes e mais finas. Nestes casos, tem-se possibilidade de ocorrer efeitos esperados com utilização de inoculante em gramíneas, como maior área de contato de nutrientes e água do solo (Fibach-Paldi *et al* 2012). Neste contexto, ao reinocular, valores superiores de comprimento de planta estão relacionados a valores menores de diâmetro de coleto nos tratamentos de inoculação de 50 e 100 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N. O incremento de desenvolvimento de sistema radicular, tanto em número de raízes ou em comprimento de raízes e em outros casos, com aumento do comprimento de parte aérea, apresenta redução do diâmetro de coleto, provavelmente devido ao alongamento celular provocado por *Azospirillum* (Fibach-Paldi *et al* 2012).

A inoculação com 100 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N seguida de reinoculação com *A. brasilense* se destaca no desenvolvimento inicial de plântulas de milho, mantendo elevada volume de raiz, massa seca de raiz e parte aérea e comprimento de parte aérea, sobretudo, reinoculação reduz diâmetro de colmo, não obstante semelhante à ausência de inoculação e reinoculação. Tal dose de inoculação pode estar mais adequada ao híbrido DKB 785 PRO, permitindo a utilização única da inoculação ou acréscimo de reinoculação no cultivo seguinte, visto que ocorre variações entre cultivares/híbridos. Com a reinoculação, especialmente no tratamento com 100 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N, a promoção de crescimento no número de raízes foi evidente, de acordo com autores que provaram promoção de desenvolvimento do sistema radicular de gramíneas com uso de bactérias diazotróficas

(Roesch *et al* 2005, Moreira *et al* 2010, Fibach-Paldi *et al* 2012, Sivasakthivelan & Saranraj 2013). Em trabalho realizado em ambiente controlado com solução nutritiva, Roesch *et al.* (2005) constataram maior comprimento de raiz em plântulas de trigo reinoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum*. Sousa *et al.* (2012) também observaram elevação do volume de raiz em híbrido de milho DKB 390<sup>®</sup> ao inocular com *Azospirillum* e *Herbaspirillum*. De forma geral, *Azospirillum* pode induzir alongamento das células radicular, devido produção de AIA (ácido indolil 3-acético), interferindo diretamente no aumento do sistema radicular (Crozier *et al* 1988, Perring *et al* 2007, Moreira *et al* 2010). Em trabalho realizado por Faleiro *et al.* (2013) é comprovada a atuação da bactéria no sistema radicular de milho, identificaram grande quantidade de fragmentos de DNA bacteriano em raízes de milho híbrido DKB 240 e P30F53 inoculadas com *A. brasilense*, principalmente a partir do sétimo de décimo dia após inoculação. Recentemente, Araújo *et al.* (2015) evidenciaram que a produtividade de milho híbrido P3646H 75 mL *A. brasilense* por 25 kg de sementes + 30 Kg N ha<sup>-1</sup> foi semelhante a 120 kg N ha<sup>-1</sup>, sendo superior ao cultivo de milho sem N e sem inoculação.

#### 4. Considerações finais

É possível concluir que dose de inoculante *A. brasilense* (150 mL+60 Kg N ha<sup>-1</sup>) no cultivo anterior pode reduzir germinação e desenvolvimento inicial, sobretudo, ao reinocular, há reestabelecimento da emergência e qualidade fisiológica das plântulas.

A inoculação com 100 mL de inoculante + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N seguida de reinoculação com *A. brasilense* se destaca no desenvolvimento inicial de plântulas de milho para cultivos sucessivos.

Sementes de milho reinoculadas com *A. brasilense* promove maior desenvolvimento radicular de plântulas de milho, ampliando superfície para absorção de água e nutrientes do solo, porém reduz desenvolvimento para parte aérea.

É válido dar continuidade ao aprofundamento nos trabalhos de reinoculação com diferentes híbridos de milho e em outras espécies comerciais cultivadas.

#### 5. Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e PNPd (Programa Nacional de Pós-Doutorado). Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), INCT / FBN (Instituto

Nacional de Ciência e Tecnologia em Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), pelo apoio financeiro.

## Referências

Araújo, E. O., Mercante, F. M., & Vitorino, A. C. T. (2015). Effect of nitrogen fertilization associated with inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* on corn. *African Journal of Agricultural Research*, 10(3), 137-145.

Baldani, J. I., & Baldani, V. L. D., (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, 77(3), 549-579. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652005000300014>

Bergamaschi, C., Roesch, L. F. W., Quadros, P. D., & Camargo, F. A. O. (2007). Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. *Ciência Rural*, 37(3), 727-733. < <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000300019>>

BRASIL. 2009. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS. 399 p.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. (2015). Acompanhamento de Safra Brasileira Grãos, v.2 - Safra 2014/15, n.6 - Sexto Levantamento, Brasília, março, 103 p. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>>. Acesso em: 12 mai. 2015.

Dalla Santa, O. R., Dalla Santa, H. S., Fernández, R., Michelena, G., Ronzelli Júnior, P., & Soccol, C. R. (2008). Influência da inoculação de *Azospirillum* sp. em trigo, cevada e aveia. *Ambiência*, 4(2), 197-207.

Dartora, J., Guimarães, V. F., Marini, D., & Sander, G. (2013). Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 17(10), 1023–1029. < <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662013001000001>>

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., & Vanderleyden, J. (2002). Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*, 36(4), 284-297. < <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-002-0534-9>>

Faleiro, A. C., Pereira, T. P., Espindula, E., Brod, F. C. A., & Arisi, A. C. M. (2013). Real time PCR detection targeting nifA gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. *Symbiosis*, 61, 125–133. <http://dx.doi.org/10.1007/s13199-013-0262-y>

Ferreira D. F. (2011). Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciencia e Agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

Fibach-Paldi, S., Burdman, S., & Okon, Y. (2012). Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 32(6), 99-108.

Inagaki, A. M., Guimaraes, V. F., Lana, M. C., Klein, J., Costa, A. C. P. R., Rodrigues, L. F. O. S., & Rampim, L. (2015). Maize initial growth with the inoculation of plant growth-promoting bacteria (PGPB) under different soil acidity levels. *Australian Journal of Crop Science*, 9(4), 271-280.

Inagaki, A. M., Guimarães, V. F., Rodrigues, L. F. O. S., Silva, M. B., Diamante, M. S., Rampim, L., Mioranza, T. M., & Duarte Júnior, J. B. (2014). Phosphorus fertilization associated to inoculation of maize with diazotrophic bacteria. *African Journal of Agricultural Research*, 9(48), 3480-3487. < <http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2014.9103>>

Moreira, F. M. S., Silva, K., Nóbrega, R. S. A., & Carvalho, F. (2010). Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1(2), 74-99.

Nishi, C. Y. N., & Hungria, M. (1996). Efeito da reinoculação na soja [*Glycine Max* (L.) MERRILL] em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com as estirpes

semia 566, 586, 587, 5019, 5079 e 5080. 1996. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 31(5), 359-368.

Quadros P. D. 2009. *Inoculação de Azospirillum spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul*. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

Reis Júnior F. B. dos, Machado T. C. T. de T., Machado A. T., & Sodek L. (2008). Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 32(3), 1139-1146. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832008000300022>.

Rodrigues, L. F. O. S., Guimarães, V. F., Silva, M. B., Pinto Junior, A. S., Klein, J., & Costa, A. C. P. R. (2014). Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 18(1), 31-37. < <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662014000100005>>

Roesch, L. F., Camargo, F. O., Selbach, P. A., & SÁ, E. S. de. (2005). Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. *Ciência Rural*, 35(5), 1201-1204. < <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000500035>>

Rossiello, R. O. P., Araújo, A. P., Manzatto, C. V., & Fernandes, M. S. (1995). Comparação dos métodos fotoelétricos e da interseção na determinação da área, comprimento e raio médio radicular. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 30(5), 633-638.

Santos, J. F., Sacramento, B. L., Mota, K. N. A. B., Souza, J. T., & Azevedo Neto, A. D. (2014). Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 44(2), 142-150.

Sivasakthivelan, P., & Saranraj, P. (2013). *Azospirillum* and its Formulations: A Review Int J Microbiol Res 4(3), 275-287. < <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2013.4.3.825>.

Sousa, R. F. B., Guimaraes, V. F., Pinto Junior, A. S., & Oro, T. H. (2012). Avaliação da qualidade sanitária de sementes de milho provenientes do cultivo associado com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. *Revista Cultivando o Saber*, 5(4), 213-218.

**Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Leandro Rampim – 25%

Vandeir Francisco Guimarães – 20%

Fernanda Heerdts Salla – 15%

Andréia Cristina Peres Rodrigues da Costa – 15%

Adriano Mitio Inagaki – 15%

Lucas Guilherme Bulegon – 5%

Roberto de França – 5%