

# Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*<sup>1</sup>

Patricia Dörr de Quadros<sup>2</sup>, Luiz Fernando Wurdig Roesch<sup>3</sup>, Paulo Régis Ferreira da Silva<sup>4</sup>, Vladirene Macedo Vieira<sup>5</sup>, Dioni Dinael Roehrs<sup>6</sup>, Flávio Anastácio de Oliveira Camargo<sup>7</sup>

## RESUMO

O uso de inoculantes na cultura do milho tem sido cada vez mais valorizado, em vista dos benefícios que pode trazer à cultura, como a fixação biológica do nitrogênio e o aumento da quantidade de raízes. Isto pode melhorar a absorção de água e nutrientes pela planta, contribuindo para o desenvolvimento do milho, principalmente em períodos de seca. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar, em condições de campo, as características agrônômicas e o rendimento de grãos de híbridos de milho, inoculados, ou não, com uma mistura de três espécies de *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. oryzae*). Foram avaliados o teor relativo de clorofila nas folhas, a altura de planta, a senescência foliar, os componentes de rendimento de grãos, o teor de N, a matéria seca da parte aérea das plantas e o número mais provável de bactérias diazotróficas na rizosfera das plantas. A inoculação manteve o teor de clorofila significativamente maior até o estágio R<sub>3</sub> das plantas, para os três híbridos testados, aumentou o rendimento da matéria seca da parte aérea, dos híbridos AS 1575 e SHS 5050, o peso de 1000 grãos, para o híbrido P32R48 e altura, para o AS 1575. Houve interação entre os genótipos de milho e as bactérias inoculadas, visto que, cada híbrido testado respondeu de forma diferente à inoculação. A inoculação de *Azospirillum* em milho demonstrou estimular o desenvolvimento das plantas no período vegetativo, aumentando a probabilidade de obter-se um estande de plantas uniforme, maior resistência ao estresse e maior concentração de clorofila nas folhas.

**Palavras-chave:** fixação biológica de nitrogênio, rendimento de grãos, inoculação, bactérias diazotróficas.

## ABSTRACT

### Field agronomic performance of maize hybrids inoculated with *Azospirillum*

The use of inoculants in maize crops has been increasing due to benefits that it brings to the plants such as nitrogen biological fixation and increase in root growth. This can lead to better water and nutrient absorption by the plants, contributing to the plant development, mainly in dry weather periods. This study aimed to evaluate the agronomic features of maize hybrids inoculated with a mixture of three species of *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. oryzae*), under field conditions. The relative leaf chlorophyll content, plant height and leaf senescence were evaluated during the maize cycle. After harvest, the components of grain yield, N content and dry mass of the leaves, and the most probable number of N fixers in the rhizosphere of the plants were analyzed. The inoculation increased the

Recebido para publicação em 03/05/2012 e aprovado em 05/08/2013.

<sup>1</sup> Parte da dissertação de mestrado da primeira autora.

<sup>2</sup> Engenheira-Agrônoma, Mestre. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 7712, Bairro Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Bolsista do CNPq. patriciaquadros@ufr.edu (autora para correspondência).

<sup>3</sup> Engenheiro-Agrônomo, Ph.D. Departamento de Biotecnologia e Gestão Ambiental, Universidade Federal do Pampa, Avenida Antônio Trilha, 1847, 97300-000, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil. Bolsista do CNPq. roesch@ufr.edu

<sup>4</sup> Engenheiro-Agrônomo, Ph.D. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 7712, Bairro Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Bolsista do CNPq. paulo.silva@ufrgs.br

<sup>5</sup> Engenheira-Agrônoma, Mestre. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 7712, Bairro Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Bolsista do CNPq. vladirene@gmail.com

<sup>6</sup> Engenheira-Agrônoma, Mestre. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 7712, Bairro Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Bolsista do CNPq. dioneroehrs@yahoo.com.br

<sup>7</sup> Engenheiro-Agrônomo, Ph.D. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 7712, Bairro Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Bolsista do CNPq. fcamargo@ufrgs.br

chlorophyll content in the maize leaves until the R<sub>3</sub> stage, for the three hybrids tested. It also increased the dry mass of shoots of the hybrids AS 1575 and SHS 5050; the 1,000 grain weight of the hybrid P32R48; and height of AS 1575. It was found an interaction between maize genotypes and inoculated bacteria, since each hybrid tested responded differently to the inoculation. The inoculation of *Azospirillum* on maize promotes the development of plants in the growing season, increases the probability of obtaining a uniform plant stand, better resistance to stress and better concentration of chlorophyll in the leaves.

**Key words:** biological nitrogen fixation, *yield grains*, *inoculation*, *diazotrophic bacteria*.

## INTRODUÇÃO

A cultura do milho, além de ter importância na agronegócio, é base de sustentação para a pequena propriedade, constituindo-se, também, num dos principais insumos do complexo agroindustrial. Além disso, a cultura representa um importante papel na rotação de culturas, no sistema semeadura direta. É preciso, porém, investir em tecnologias para redução de custos, mantendo a produtividade. Por essa razão, estudos sobre o uso de inoculantes à base de bactérias promotoras do crescimento de plantas devem ser valorizados.

Bactérias do gênero *Azospirillum* podem ser inoculadas em plantas de interesse agrônomo, estimulando seu crescimento por múltiplos mecanismos, incluindo síntese de fito-hormônio, melhoria da nutrição nitrogenada, mitigação de estresse e controle biológico da microbiota patogênica (Bashan e Bashan, 2010). O gênero *Azospirillum* (bactéria gram-negativa, aeróbica ou microaerofílica) pertence à classe das *Alfaproteobacterias*, família *Rhodospirillaceae* e, atualmente, é possível encontrar-se mais de 200 variações no banco de genes da plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) Taxonomy Browser (acessado em maio de 2013). A abundância e a atividade desses micro-organismos dependem de propriedades do solo, como pH, umidade, temperatura, disponibilidade de fontes de carbono, entre outras (Jacoud *et al.*, 1998; Alexandre *et al.*, 1999; James, 2000; Chotte *et al.*, 2002).

Na cultura do milho, a maioria dos experimentos para avaliação da inoculação de *Azospirillum*, mostrou aumentos de rendimento de grãos de, aproximadamente, 25% (Kennedy *et al.*, 2004). Bashan *et al.* (2004) publicaram uma revisão de 181 trabalhos, de diversos países, sobre o gênero *Azospirillum* (de 1997 a 2003), sendo 103 trabalhos sobre efeito da inoculação de *Azospirillum* e 78 trabalhos sobre inoculação de *Azospirillum* juntamente com outros micro-organismos benéficos às plantas, em que foram abordados aspectos fisiológicos, moleculares, agrícolas e ambientais dessas bactérias. No Brasil, Hungria *et al.* (2010), ao inocularem espécies

selecionadas de *Azospirillum* em milho e trigo, encontraram incrementos de, respectivamente, 26 e 30% na produtividade de grãos dessas culturas, além de aumentos das absorções de P e K pelas plantas. Novakowisk *et al.* (2011) encontraram um aumento na produtividade do milho com a inoculação de *Azospirillum brasilense*, em Guarapuava.

Essas bactérias existem naturalmente na maioria dos solos e apresentam ampla diversidade genética; porém, para sua utilização como inoculantes em culturas agrícolas, faz-se necessária uma seleção de estirpes eficientes para este fim (Ardakani *et al.*, 2011). O sucesso da inoculação de *Azospirillum* a campo depende da habilidade das estirpes selecionadas para sobreviverem e colonizarem sementes germinadas, na presença de grande número de outros micro-organismos da rizosfera, assim como da capacidade de motilidade e quimiotaxia em direção aos exsudatos radiculares (Bashan e Levanony, 1990; Creus *et al.*, 1996; Bashan e Holguin, 1997; Hauwaerts *et al.*, 2002). A fixação de nitrogênio na planta, durante a associação planta-bactérias, é um processo em que as bactérias apenas fornecem o nitrogênio fixado se fontes de carbono e energia estão suficientemente disponíveis (Chubatsu *et al.*, 2012).

Roesch *et al.* (2007), ao utilizarem a metodologia de Döbereiner (1995), isolaram bactérias diazotróficas de raízes de milho, oriundas de 30 regiões com diferentes características edafoclimáticas, do Estado do Rio Grande do Sul, e realizaram uma série de testes de síntese de auxinas e de fixação de N *in vitro*. Neste trabalho, três espécies de *Azospirillum* (isoladas por Roesch *et al.*, 2007) foram selecionadas para serem inoculadas em sementes de milho, em condições de campo.

A hipótese deste trabalho foi que a inoculação de espécies de *Azospirillum* pré-selecionadas e eficientes em fixar N e produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas, poderia auxiliar no estabelecimento e no desenvolvimento de plantas de milho a campo, aumentando a sua produtividade. Tendo em vista esta hipótese e com o objetivo de explorar o potencial dessas bactérias, este estudo avaliou parâmetros e características agrônomicas

de três híbridos de milho inoculados com uma mistura de três espécies de *Azospirillum*, sob condições de campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no município de Eldorado do Sul, região ecoclimática da Depressão Central do RS, em 30° 05' 02" S e 51° 36' 58" O. O clima da região, segundo classificação de Köppen, é subtropical úmido com verão quente, do tipo fundamental Cfa, e o solo da área experimental é classificado como Argissolo Vermelho distrófico típico (Streck *et al.*, 2008). A amostra de solo apresentou os seguintes resultados: argila: 27%; índice SMP: 6,1; P (Mehlich-I): 53 mg L<sup>-1</sup>; K: 178 mg L<sup>-1</sup>; matéria orgânica: 2,4%. O delineamento experimental foi o completamente casualizado. Os híbridos testados foram: Pioneer P 32R48 (P 32R48), Santa Helena 5050 (SHS 5050) e Agroeste 1575 (AS 1575), quanto à inoculação de uma mistura de três espécies de *Azospirillum*. O experimento foi instalado numa área manejada sob semeadura direta há 18 anos, com cultivo anual anterior de milho, sobre palha de aveia branca.

O inóculo continha uma mistura de quatro estirpes de *Azospirillum*, sendo elas: EL-S (*A. brasilense*, isolado de plantas de milho cultivadas no município de Eldorado do Sul, RS, em 30° 05' 02" S e 51° 36' 58" O); LG1-R (*A. lipoferum*, isolado de plantas de milho, cultivadas no município de São Luís Gonzaga, RS, em 28° 24' 30" S e 54° 57' 39" O); M-S (*A. oryzae*, isolado de plantas de milho cultivadas no município de Marau, RS, em 28° 26' 57" S e 52° 12' 00" O), e a L-S (*A. lipoferum*, isolado de plantas de milho, cultivadas no município de Santana do Livramento, RS, em 30° 53' 27" S e 55° 31' 58" O).

Para preparo do inóculo, colônias purificadas de três espécies de *Azospirillum* foram multiplicadas (separadamente) em meio de cultura *dygs* (2 g de dextrose, 1,5 g de peptona bacteriológica, 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g de extrato de levedura, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, (1,5g de ácido glutâmico / 1000 mL de H<sub>2</sub>O), por 24 h, a 28 °C. O caldo bacteriano com as estirpes de *Azospirillum* foi centrifugado, por dez minutos, a 10.000 RPM, em 20 tubos de 50 mL. Após centrifugação, o sobrenadante foi eliminado e o processo foi repetido por três vezes, para obtenção de um grande número de células. Após, foi adicionada água estéril, até que a solução atingisse leitura da densidade óptica de 1,5 em espectrofotômetro, a 453 nm e, então, as três espécies de *Azospirillum* foram homogeneizadas, para posterior aplicação em meio turfoso. A turfa foi coletada no município de Camaquã (Organossolo) e seu pH corrigido para 6,5. Para o preparo do inoculante, a turfa foi secada ao ar e esterilizada, por duas vezes, em autoclave, por 90 minutos, a 120 °C e 111 kgf cm<sup>-2</sup> de pressão (após a primeira esterilização foram aguardadas 24 horas para se repetir o

processo). À turfa seca e estéril acrescentaram-se 200 mL de inóculo por quilo, cuidadosamente homogeneizados com uma espátula. Após 24 horas de estabilização em ambiente refrigerado (4 °C), foi avaliado o número de células viáveis por grama de turfa. Para isto, amostras de 1 g do inoculante turfoso foram diluídas, serialmente, em 9 mL de água estéril por dez vezes, sendo que 1 mL de cada amostra foi adicionado a placas de Petri com meio de cultura *dygs* sólido. As placas foram incubadas, a 27 °C, por 48 horas, realizando-se após a contagem do número de colônias bacterianas formadas, resultando no valor médio de 10<sup>7</sup> células por grama de turfa. O inoculante foi mantido, em refrigerador, a 4 °C, para posterior inoculação nas sementes de milho.

No dia da semeadura do milho, às sementes dos tratamentos com inoculação foi adicionada solução de sacarose a 30%, para melhorar a adesão do inoculante turfoso às sementes (50 ml para cada 10 quilos de sementes) e adicionou-se o inoculante turfoso, na proporção de 100 g para cada 10 quilos de sementes. Cuidadosamente, as sementes e o inoculante foram homogeneizados e imediatamente realizou-se a semeadura.

A semeadura foi realizada com semeadora manual ("saraquá"), em 24 parcelas de 3,2 x 5 m (16 m<sup>2</sup>). O espaçamento entre linhas foi de 0,80 m e o espaçamento entre plantas, na linha, de 0,21 m. Quando as plantas estavam com três a quatro folhas expandidas, foi realizado desbaste, mantendo-se cinco plantas por metro linear, obtendo-se a densidade de 75.000 plantas por hectare. Realizou-se adubação fosfatada (100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e potássica (100 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, dividida em 2 doses), de acordo com a recomendação do Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil (CFSRS/SC, 2004). O milho não recebeu adubação nitrogenada na semeadura nem em cobertura. Quando necessário, as plantas foram irrigadas por aspersão e receberam tratamento fitossanitário.

A partir da primeira semana após a emergência, avaliou-se quinzenalmente o teor relativo de clorofila na folha (leitura SPAD - *Soil Plant Analysis Development*), com clorofilômetro). As leituras foram realizadas sempre nas mesmas plantas, demarcadas no início do experimento, na região do terço superior da última folha completamente expandida (duas leituras por planta, em três plantas por parcela), durante o período vegetativo e, no período reprodutivo, as leituras foram realizadas na folha índice (folha em que está inserida a espiga).

A altura de planta foi avaliada semanalmente e o estágio de desenvolvimento das plantas foi determinado, conforme escala proposta por Ritchie *et al* (1993), com destaque para a senescência foliar e o florescimento das plantas (pendoamento e espigamento). Foram consideradas as de pendoamento quando 50% das plantas apresenta-

ram o pendão liberando pólen e, de espigamento, quando 75% das plantas apresentaram espiga.

No final do ciclo do milho, as espigas das plantas foram colhidas na área útil de cada parcela (metragem linear sem falhas de plantas, excetuando-se a 1ª e a última linhas e a bordadura - 80 cm - do início e final da parcela), para análise dos componentes do rendimento. Amostras da parte aérea das plantas, no centro de cada parcela, foram colhidas para análises do teor de N total, segundo metodologia descrita em Tedesco *et al.* (1995). Amostras de raízes foram coletadas, para quantificação das bactérias diazotróficas pela técnica do número mais provável (NMP), conforme metodologia descrita por Döbereiner *et al.* (1995). A massa da matéria seca da parte aérea foi obtido após secagem, em estufa, a 68 °C, durante sete dias.

A análise de variância, o teste de Tukey, as correlações e a análise dos componentes principais (PCA) foram realizadas, utilizando-se o *software* estatístico XLSTAT2011, a 5% de significância. Para se analisar a interação entre os componentes de rendimento da cultura do milho com a inoculação de *Azospirillum*, foram realizadas as análises de correlação de Spearman e de componentes principais (PCA), usando-se o mesmo programa. Para isto, foram tomados os valores das médias de características agrônomicas e componentes de rendimento, avaliados na cultura (variáveis principais quantitativas), os quais foram ancorados a variáveis suplementares qualitativas (0 = sem inoculação, 1 = com inoculação).

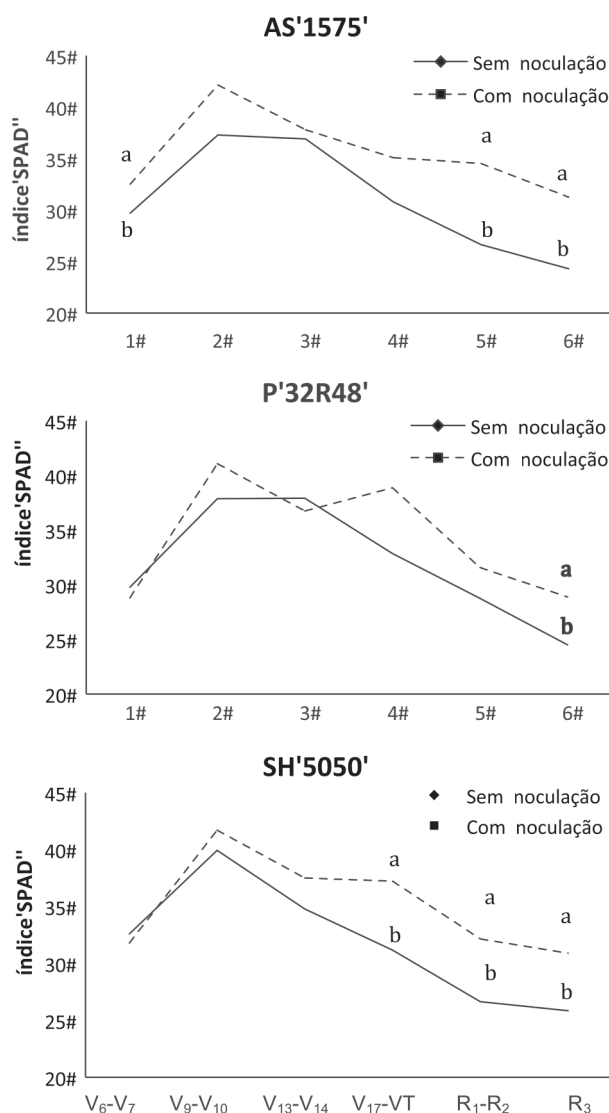
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho buscou avaliar o desempenho agrônômico, a campo, de três híbridos de milho, inoculados com uma mistura de três espécies de *Azospirillum*.

A metodologia utilizada, neste trabalho, para avaliar o teor relativo de clorofila das folhas detectou diferenças significativas entre os tratamentos. Os valores médios das seis leituras SPAD, obtidas durante os estádios V<sub>5</sub> e R<sub>3</sub> de desenvolvimento das plantas no tratamento controle, foram de 31,94 e, no tratamento inoculado, de 34,32 (Figura 1). Os coeficientes de variação das leituras SPAD variaram de 2,4 a 14,3 indicando a precisão do experimento (dados não apresentados). No início do ciclo, o híbrido AS 1575 obteve, no tratamento inoculado, maior teor relativo de clorofila. Durante os estádios V<sub>3</sub> e V<sub>7</sub>, a leitura SPAD nas folhas aumentou linearmente, até V<sub>9</sub>-V<sub>10</sub> (pico), em ambos os tratamentos, o que se deve à extração de N disponibilizado pelo solo e pela decomposição da palhada de aveia-branca. A partir deste período, foi observada uma queda nos valores da leitura, que passou de 38,36 para 31,94, no tratamento controle, e de 41,64 para 34,32, no tratamento inoculado, o que provavelmente corresponde ao período no qual o suprimento

de N do solo e da palhada acabou. No estádio R<sub>3</sub>, a leitura SPAD foi significativamente maior nos três híbridos inoculados. Os híbridos AS 1575 e SH 5050 apresentaram diferenças significativas, em 50% das medições, apresentando valores mais altos no tratamento inoculado. Para o híbrido P 32R48, as diferenças entre inoculado e não inoculado foram significativas somente no final do ciclo da cultura. A oscilação das leituras entre os tratamentos e híbridos deve-se, provavelmente, à capacidade dos híbridos testados de absorverem N da fixação biológica, assim como as variações nos teores naturais de N em micro-sítios do solo.

O teor de N da matéria seca da parte aérea (Figura 2b) variou de 3,0 g kg<sup>-1</sup> (híbrido SHS 5050, no tratamento con-



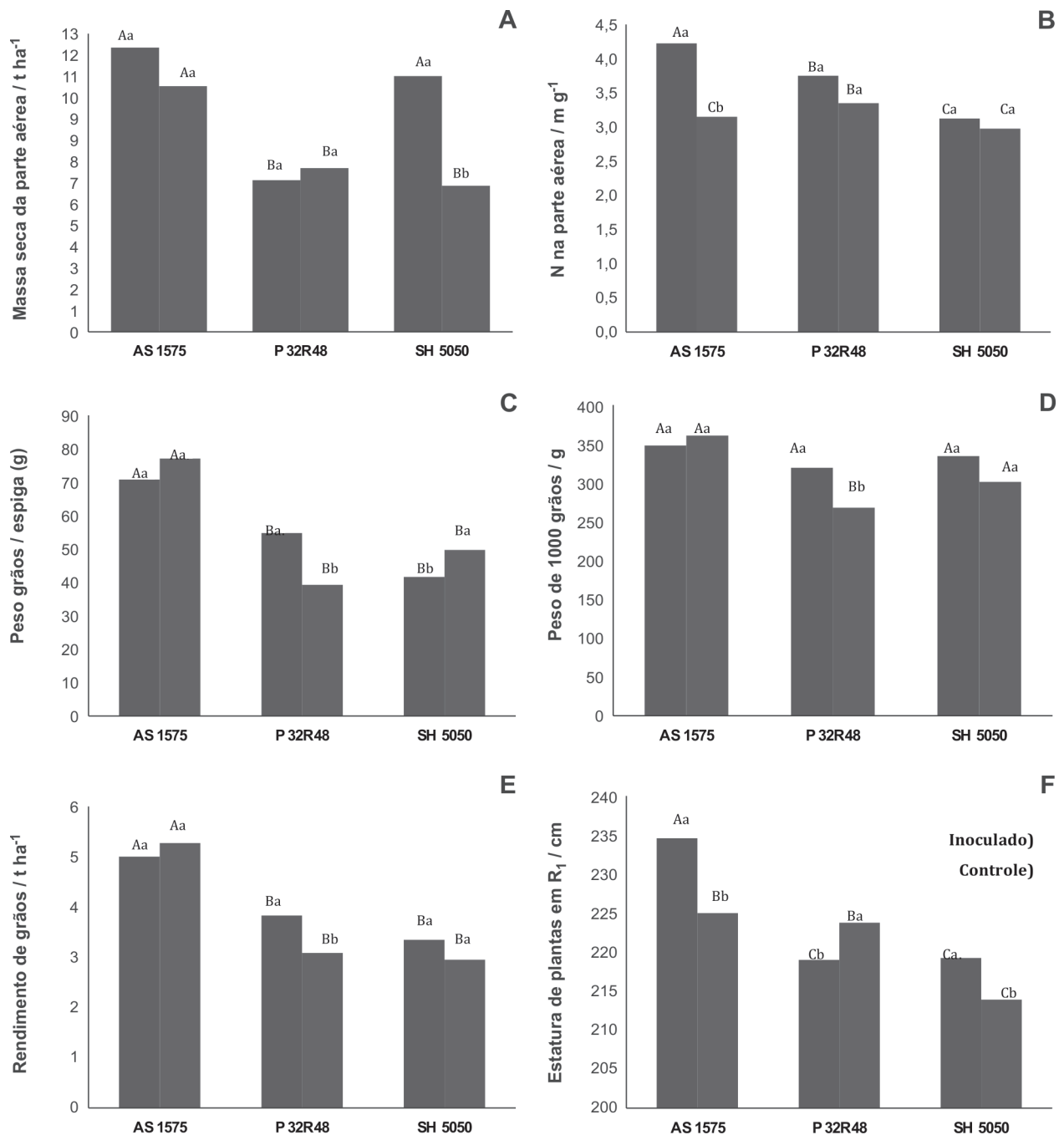
\*Na comparação entre tratamentos no mesmo estádio de desenvolvimento, letras diferentes, diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )

**Figura 1.** Teor relativo de clorofila na folha (Índice SPAD, *Soil Plant Analysis Development*) em três híbridos de milho, com e sem inoculação, entre os estádios de desenvolvimento vegetativo V6 e reprodutivo R3, de acordo com escala proposta por Ritchie *et al.* (1993).

trole), a 4,2 g kg<sup>-1</sup> (híbrido AS 1575, no tratamento inoculado). Os três híbridos inoculados apresentaram maior teor de N na matéria seca da parte aérea (final do ciclo); porém, apenas nos híbridos AS 1575 e P 32R48 essa diferença foi significativa. Estes resultados estão coerentes com os valores da leitura SPAD nas plantas inoculadas, o que era esperado, visto que o teor de N das folhas está relacionado com o teor de clorofila nas folhas da planta. Resultados semelhantes foram encontrados por Kannan e

Ponmurugan (2010), em plantas de arroz inoculadas com *Azospirillum*.

Quanto ao rendimento de matéria seca da parte aérea (folhas e colmos), no estágio R<sub>3</sub>, as médias variaram entre 12,4 t ha<sup>-1</sup> (AS 1575, tratamento inoculado) e 6,4 t ha<sup>-1</sup> (SH 5050, tratamento controle) (Figura 2a). O rendimento de matéria seca do híbrido SH 5050 foi significativamente maior, no tratamento com inoculação, com incrementos de 4,8 t ha<sup>-1</sup>, em relação ao do tratamento contro-



**Figura 2.** Características agrônomicas e rendimento de grãos de três híbridos de milho, com e sem inoculação de *Azospirillum*. Letras maiúsculas indicam diferença entre os híbridos, e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos inoculado e não inoculado, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



le. Reis Júnior *et al.* (2008) também observaram incremento da matéria seca de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum*. Bashan *et al.* (2004) relataram que os fito-hormônios, principalmente o ácido indolacético (AIA), excretados por *Azospirillum*, desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas. Gopalswamy e Vidhy Asekaran (1988) e Hartmann *et al.* (1983) observaram aumento na quantidade de pelos radiculares e na formação e desenvolvimento de numerosas raízes, laterais primárias e secundárias, em plântulas de milho, o que aumenta a absorção de nutrientes da solução do solo, favorecendo o desenvolvimento da parte aérea das plantas. Casanovas *et al.* (2002) observaram que a inoculação de *Azospirillum* aumentou o volume de raízes e incrementou o conteúdo de água das folhas, mitigando o estresse hídrico de plantas de milho, que tiveram redução de até 75% no suprimento de água. Okon e Vanderleyden (1997) observaram aumentos do volume e alterações na arquitetura de raízes, com a inoculação de *Azospirillum*. Este efeito pode ser benéfico para a cultura em épocas de ocorrência de baixa precipitação pluvial, visto que o milho é altamente exigente em água e o aumento da área superficial específica de raízes possibilita maior capacidade de absorção de água e nutrientes do solo.

O peso de grãos por espiga (Figura 2c) variou de 39,3 g (P 32R48, tratamento controle), a 77,1 g (AS 1575, tratamento controle). O peso de 1000 grãos (Figura 2d), variou de 268 g (P 32R48, tratamento controle) a 348 g (AS 1575, tratamento inoculado).

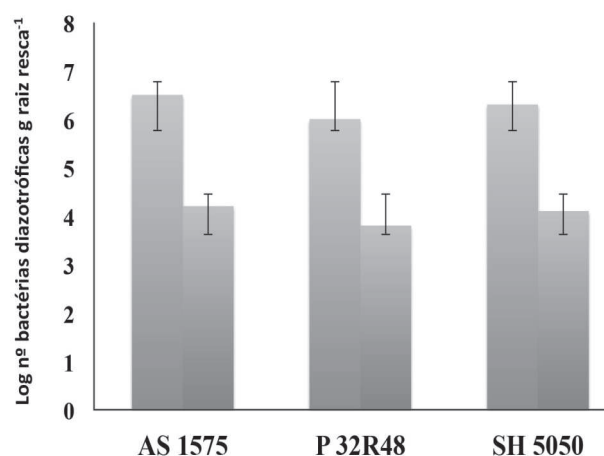
Houve efeito da interação entre híbridos e tratamentos sobre a produtividade, indicando que a inoculação pode ser mais eficiente em determinados híbridos ou cultivares, em relação a outros (Figura 2e). O rendimento de grãos (Figura 2e) variou de 2,95 t ha<sup>-1</sup> (SHS 5050, tratamento controle) a 5,27 t ha<sup>-1</sup> (AS 1575, tratamento controle) e foi maior com a inoculação apenas para o híbrido P 32R48. Observa-se que cada híbrido testado apresentou um resultado diferente com a inoculação. Sugere-se que, dependendo do genótipo do milho, o benefício da inoculação pode ser observado em diferentes partes da planta, como grãos, parte aérea ou colmo. Apenas o híbrido P 23R48 apresentou um dreno de nutrientes maior para as espigas do que para a parte aérea, comparando-se com os outros dois híbridos, para os quais se observou aumento apenas da parte vegetativa das plantas. A inoculação aumentou o peso de grãos por espiga e o peso de 1000 grãos do híbrido P 32R48, aumentando o rendimento de grãos desse híbrido em 750 kg ha<sup>-1</sup>.

A altura de planta no estágio R<sub>1</sub> diferiu entre tratamentos, para os híbridos AS 1575 e SH 5050 (Figura 2f), sendo superior no tratamento inoculado. Este resultado é coerente com os encontrados para rendimento de matéria seca

e teor de N da parte aérea das plantas, os quais também foram significativamente superiores neste híbrido quando inoculado. No híbrido P 32R48, a altura de plantas foi levemente reduzida com a inoculação.

Zemrany *et al.* (2006), estudando a inoculação de *Azospirillum brasilense* em milho, durante dois anos consecutivos, observaram maior crescimento de raízes e maior desenvolvimento de plantas no período vegetativo; isto não se refletiu, porém, no rendimento de grãos. Swedrzyńska e Sawicka (2000) e Hungria *et al.* (2010) encontraram aumentos no rendimento de grãos de milho, quando as plantas foram inoculadas, juntamente com doses de 20-24 kg ha<sup>-1</sup> de N. Lana *et al.* (2012) verificaram que a inoculação de *Azospirillum* proporcionou incrementos de 7 a 14% na produtividade de grãos de milho, mesmo sem a adição de N. É provável que bactérias do gênero *Azospirillum* utilizem N oriundo da adubação nitrogenada, para assimilar carbono e multiplicar-se mais rapidamente, incrementando os efeitos da inoculação. Deve-se considerar, também, que o clima e o tipo de solo interferem na adaptação das bactérias inoculadas, o que pode acarretar variação nos resultados de inoculação, dependendo da localização geográfica.

A sobrevivência, no solo, das bactérias inoculadas é essencial para o sucesso da inoculação, variando conforme o tipo de solo, clima e condições da planta (Bashan e Holguin, 1995). Quanto ao NMP de diazotróficos em raízes das plantas analisadas, a inoculação manteve o número de células de bactérias fixadoras de N significativamente maior, em comparação com o do tratamento controle, para os três híbridos testados (Figura 3), comprovando a sobrevivência das bactérias inoculadas no ambiente rizosférico das plantas de milho. As bactérias diazotróficas encontradas no tratamento sem inoculação referem-se à população nativa do solo, e observa-se que, para os três

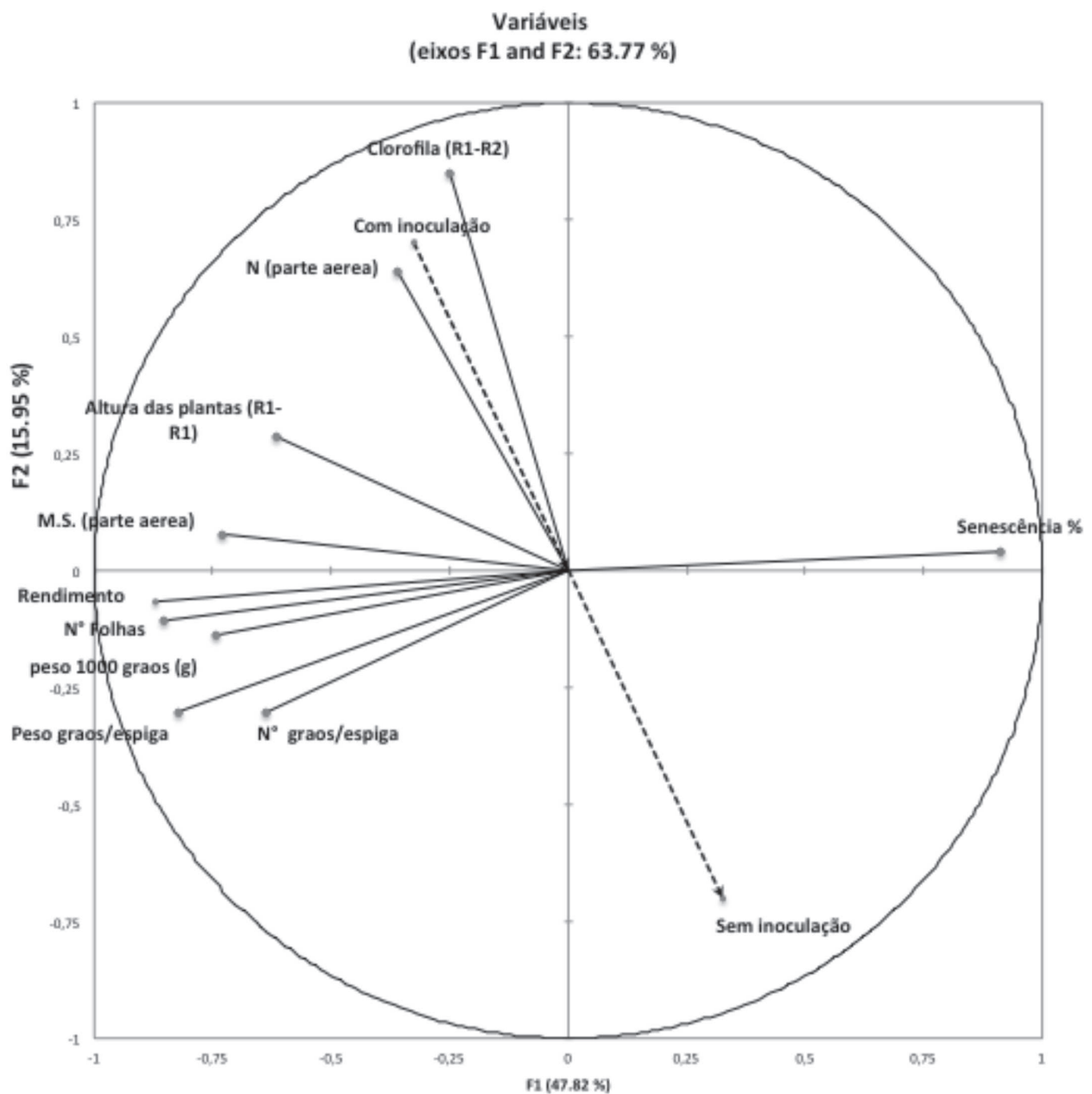


**Figura 3.** Logaritmo (LOG) do número de bactérias diazotróficas em raízes frescas de três híbridos de milho, com e sem inoculação de *Azospirillum*. Barras representam o desvio padrão.

híbridos, o NMP manteve-se constante nos dois tratamentos. O NMP de bactérias diazotróficas presentes, por grama de raízes frescas de milho, variou entre log 3,8 a log de 4,1, para o tratamento controle, e de log 6,0 a 6,4, para o tratamento com inoculação. Swedrzyńska e Sawicka (2000) encontraram, em raízes de milho, um NMP entre 91 e  $858 \times 10^3$  células por grama de raízes frescas, nos tratamentos inoculados, e entre 58 e  $502 \times 10^3$ , nos tratamentos não inoculados, além de um aumento na produtividade. Zemrany *et al.* (2006) observaram adequada sobrevivência das bactérias (em torno de  $\log 10^8$  células por g raízes frescas<sup>-1</sup>) no solo, em monitoramento durante dois anos consecutivos.

Na Tabela 1, observa-se uma correlação positiva recíproca entre inoculação, teor relativo de clorofila nas folhas e teor de N da parte aérea das plantas de milho. O rendimento de matéria seca da parte aérea das plantas correlacionou-se positivamente com o peso de 1000 grãos, com o número de grãos por espiga, o número total de folhas no florescimento e o rendimento de grãos. Concordando com este resultado, a senescência foliar foi correlacionada negativamente com a matéria seca foliar.

Os dados da análise de componentes principais (PCA) podem ser visualizados na Figura 4, sendo que, quanto maiores os vetores, maior a influência da variá-



**Figura 4.** Análise dos componentes principais (PCA) F1 e F2, relacionando o rendimento de grãos e outras características agronômicas em tratamentos com e sem inoculação de *Azospirillum*.

**Tabela 1.** Correlação de spearman ( $p < 0.05$ ) entre características agrônômicas e componentes do rendimento de grãos em tratamentos com e sem inoculação de *Azospirillum*

Variáveis	Nº grãos/espiga	Peso grãos/espiga	Peso de 1000 grãos	Matéria seca (parte aérea)	N (parte aérea)	Teor rel. de clorofila ( $R_1-R_2$ )	Nº total de folhas em $R_1$	Altura das plantas ( $R_1$ )	Senescência %	Rendimento de grãos	Sem inoculação	Com inoculação
Nº grãos/espiga	<b>1.00</b>	<b>0.87</b>	0.22	0.23	0.27	-0.08	<b>0.41</b>	0.35	<b>-0.46</b>	<b>0.69</b>	0.11	-0.11
Peso grãos/espiga	<b>0.87</b>	<b>1.00</b>	<b>0.62</b>	<b>0.44</b>	0.25	0.01	<b>0.55</b>	0.36	<b>-0.67</b>	<b>0.85</b>	-0.07	0.07
Peso de 1000 grãos	0.22	<b>0.62</b>	<b>1.00</b>	<b>0.51</b>	0.14	0.08	<b>0.64</b>	0.32	<b>-0.67</b>	<b>0.58</b>	-0.28	0.28
Matéria seca (parte aérea)	0.23	<b>0.44</b>	<b>0.51</b>	<b>1.00</b>	0.15	0.27	<b>0.68</b>	0.28	<b>-0.70</b>	<b>0.58</b>	-0.33	0.33
N (parte aérea)	0.27	0.25	0.14	0.15	<b>1.00</b>	<b>0.44</b>	0.15	0.32	-0.17	0.35	<b>-0.51</b>	<b>0.51</b>
Teor rel. de clorofila ( $R_1-R_2$ )	-0.08	0.01	0.08	0.27	<b>0.44</b>	<b>1.00</b>	0.10	0.26	-0.23	0.19	<b>-0.77</b>	<b>0.77</b>
Nº total de folhas em $R_1$	<b>0.41</b>	<b>0.55</b>	<b>0.64</b>	<b>0.68</b>	0.15	0.10	<b>1.00</b>	<b>0.48</b>	<b>-0.84</b>	<b>0.60</b>	-0.27	0.27
Altura das plantas ( $R_1$ )	0.35	0.36	0.32	0.28	0.32	0.26	<b>0.48</b>	<b>1.00</b>	<b>-0.53</b>	<b>0.45</b>	-0.18	0.18
Senescência %	<b>-0.46</b>	<b>-0.67</b>	<b>-0.67</b>	<b>-0.70</b>	-0.17	-0.23	<b>-0.84</b>	<b>-0.53</b>	<b>1.00</b>	<b>-0.69</b>	0.33	-0.33
Rendimento de grãos	<b>0.69</b>	<b>0.85</b>	<b>0.58</b>	<b>0.58</b>	0.35	0.19	<b>0.60</b>	<b>0.45</b>	<b>-0.69</b>	<b>1.00</b>	-0.25	0.25
Sem inoculação	0.11	-0.07	-0.28	-0.33	<b>-0.51</b>	<b>-0.77</b>	-0.27	-0.18	0.33	-0.25	<b>1.00</b>	<b>-1.00</b>
Com inoculação	-0.11	0.07	0.28	0.33	<b>0.51</b>	<b>0.77</b>	0.27	0.18	-0.33	0.25	<b>-1.00</b>	<b>1.00</b>

Valores em negrito são diferentes de zero ( $p < 0.05$ ).

vel e, quanto mais agrupadas as variáveis, maior a correlação entre elas ( $p < 0.05$ ). É possível observar que a inoculação apresentou associação com o aumento do teor de N na parte aérea e com o teor relativo de clorofila nas folhas das plantas. As variáveis dos componentes de rendimento e as características agrônômicas da cultura agruparam-se com a variável inoculação. As variáveis senescência foliar e controle não se agruparam com nenhuma outra variável, o que era esperado, visto que a senescência das folhas está opostamente relacionada com o aumento dos valores dos componentes de rendimento de grãos.

É comprovado que a inoculação estimula uma série de reações bioquímicas entre raiz e bactéria (milho e *Azospirillum*), envolvendo a produção de vários metabólitos secundários, produzidos tanto pelas plantas como pelas bactérias inoculadas (Walker *et al.*, 2011; Arsac *et al.*, 1990; Jacoud *et al.*, 1998; Ribaud *et al.*, 2001). A inoculação de *Azospirillum* em milho pode estimular o desenvolvimento de plantas no período vegetativo, aumentando a probabilidade de se obter um estande de plantas uniforme, maior resistência ao estresse hídrico e maior teor de clorofila nas folhas. Neste trabalho, observou-se que os três híbridos estudados responderam de forma diferente à inoculação de *Azospirillum*, sugerindo que o genótipo da planta desempenha papel importante na colonização pelas bactérias, o que deve estar relacionado com a relação rizosfera/

bactéria e, por isto, faz-se necessário o estudo de híbridos de milho que tenham boa resposta agrônômica à inoculação. A atividade benéfica dessas bactérias é bem estudada; porém, sua interação com diferentes genótipos de milho ainda necessita ser mais pesquisada, assim como feitas mais comparações em diferentes regiões edafoclimáticas, visto que, alterando-se o tipo de solo ou o clima, alteram-se também os fatores que afetam a relação planta/bactéria.

## CONCLUSÕES

A inoculação de *Azospirillum* em milho aumentou o teor relativo de clorofila e o rendimento da matéria seca da parte aérea dos híbridos AS 1575 e SHS 5050, o peso de 1000 grãos do híbrido P32R48 e a estatura de planta do híbrido AS 1575. As bactérias inoculadas permaneceram em quantidade viável nas raízes até o final do ciclo do milho, demonstrando uma boa sobrevivência pós-inoculação. Para algumas características agrônômicas, a resposta do milho à inoculação depende do híbrido testado.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e aos Departamentos de Solos e de Plantas de Lavoura, da Faculdade de Agronomia da UFRGS.



## REFERÊNCIAS

- Alexandre G, René R, René B (1999) A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:4701-4704.
- Ardakani MR, Mazaheri D, Mafakheri S, Moghaddam A (2011) Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17:181-192.
- Arsac JF, Lamothe C, Mulard D, Fages J (1990) Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie*, 10:649-654.
- Bashan Y & Bashan LE (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. *Advances in agronomy*, 108:77-136.
- Bashan Y & Holguin G (1995) Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. *Microbial Ecology*, 29:269-281.
- Bashan Y & Holguin G (1997) Review: *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990 - 1996). *Canadian Journal of Microbiology*, 43:103-121.
- Bashan Y & Levanony H (1990) Review: Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, 36:591-603.
- Bashan Y, Holguin G, De-Bashan LE (2004) Review: *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50:521-577.
- Casanovas EM, Barassi CA, Sueldo RJ (2002) *Azospirillum* inoculation mitigates water stress effects in maize seedlings. *Cereal Research Communications*, 30:343-350.
- Chapman SC & Barreto HJ (1997) Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. *Agronomy Journal*, 89:557-562.
- Chotte J, Schwartzmann A, Bally R & Monrozier LJ (2002) Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 10 years of natural fallow. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1083-1092.
- Chubatsu LS, Monteiro RA, De Souza EM, De Oliveira MAS, Yates MG, Wassem R, Bonatto AC, Huergo LF, Steffens MBR, Rigo LU, Pedrosa FO (2012) Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, no prelo. DOI 10.1007/s11104-011-0819-6.
- Creus C, Sueldo RJ, Barassi CA (1996) *Azospirillum* Inoculation in pre-germinating wheat seeds. *Canadian Journal of Microbiology*, 42:83-86.
- Döbereiner J, Baldani VLD & Baldani JI (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. *Seropédica*, Embrapa-SPI. 60p.
- Gopalswamy G & Vidhyasekaran P (1988) Effect of *Azospirillum lipoferum* inoculation and inorganic nitrogen on wetland rice. *Oryza*, 26:378-380.
- Hartmann A, Mahavir S, Kligmaller W (1983) Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indole acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 29:916-922.
- Hauwaerts D, Alexandre G, Das SK, Vanderleyden J, Zhulin IB (2002) A major chemotaxis gene cluster in *Azospirillum brasilense* and relationships between chemotaxis operons in Alfa-Proteobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 208:61-67.
- Hungria M, Campo RJ, Souza, EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331:413-425.
- Jacoud C, Faure D, Wadoux P, Bally R (1998) Development of a strain-specific probe to follow inoculated *Azospirillum lipoferum* crtI under field conditions and enhancement of maize root development by inoculation. *FEMS Microbiology Ecology*, 27:43-51.
- James EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, 65:197-209.
- Kannan T & Ponmurugan P (2010) Response of Paddy (*Oryza sativa* L.) varieties to *Azospirillum brasilense* inoculation. *Journal of Phytology*, 2:08-13.
- Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskés ML (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better explored. *Soil Biology and Biochemistry*, 36:1229-1244.
- National Center for Biotechnology Information (2012) Taxonomy Browser. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>>. Acessado em: 11 de fevereiro de 2012.
- NCBI - National Center for Biotechnology Information (2013) Taxonomy Browser. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html>>. Acessado em: 14 de maio de 2013.
- Novakowisk JH, Sandini IE, Falbo MK, de Moraes A, Novakowiski JH, Cheng NC (2011) Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Semina: Ciências Agrárias*, 32:1687-1698.
- Okon Y & Vanderleyden J (1997) Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *American Society of Microbiology News*, 63:366-370.
- Reis Junior FB, Machado, CTT, Machado AT, Sodek L (2008) Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32:1139-1146.
- Ribaudo CM, Rondanini DP, Curá JA, Frascina AA (2001) Response of *Zea mays* to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. *Biologia Plantarum*, 44:631-634.
- Ritchie SW, Hanway JJ, Benson GO (1993) How a corn plant grows. Iowa, Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service Ames. 22p. (Special report, 48).
- Roesch LFW, Quadros PDQ, Camargo FAO, Triplett EW (2007) Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:1377-1383.
- Schadchina TM & Dmitrieva VV (1995) Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. *Journal of Plant Nutrition*, 18:1427-1437.
- Smeal D & Zhang H (1994) Chlorophyll meter evaluation for nitrogen management in corn. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25:1495-1503.

- Streck EV, Kämpf N, Dalmolin RSD, Klamt E, Nascimento PC, Schneider P, Giasson E, Pinto LFS (2008) Solos do Rio Grande do Sul. 2ª ed. Porto Alegre, Emater. 222p.
- Swedrzynska D & Sawicha A (2000) Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of maize (*Zea mays* ssp. *saccharata* L.) under different cultivation conditions. Polish Journal of Environmental Studies, 9:505-509.
- Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA (1995) Análise de solo, plantas e outros materiais. 2ª ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 174p.
- Walker V, Bertrand C, Bellvert F, Moëgne-Loccoz Y, Bally R, Comte C (2011) Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. New Phytologist, 189:494-506.
- Zemrany H, Cortet J, Lutz MP, Chabert A, Baudoin E, Haurat J, Maughan N, Félix D, Défago G, Bally R, Moëgne-Loccoz Y (2006) Field survival of the phyto-stimulator *Azospirillum lipoferum* crt1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilization. Soil Biology & Biochemistry, 38:1712-1726.