

Desenvolvimento Inicial de Plantas de Milho em Função da Inoculação das Sementes com Diferentes Volumes de Inoculante

João Alexandre Lopes Dranski¹; Artur Soares Pinto Junior¹; Jucenei Frandoloso¹; Vandeir Francisco Guimarães¹; Renan Felipe Bellé¹; Luan Fernando Ormond Sobreira Rodrigues¹; Janaina Dartora¹; Maria Isabel Stets²; Luíza Maria Araujo²; Leonardo Magalhães Cruz²; Wylliam Pozzebom³

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR. vandeirfg@yahoo.com.br; artur_bio@hotmail.com e renan_belle@hotmail.com ²Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR. Simbiose Indústria e Comercio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos LTDA, Cruz Alta, RS

RESUMO – O objetivo do presente estudo foi o de avaliar a influência da inoculação de sementes de milho com diferentes volumes de inoculante contendo a estirpe Ab-V5 da bactéria *Azospirillum brasilense*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e cinco tratamentos: 0, 2, 4, 6 e 8 mL de inoculante para 1000 sementes. A variedade de milho utilizada foi a Ocepar 202, sendo que após a aplicação dos tratamentos, as sementes foram semeadas em bandejas preenchidas com areia esterilizada e aos sete dias após semeadura as plântulas foram transplantadas para vasos preenchidos com vermiculita. Para a nutrição das plântulas foram realizadas regas a cada três dias com solução nutritiva sem nitrogênio. As variáveis analisadas foram: altura de planta, diâmetro de colmo, massa seca da parte aérea e de raízes, índice de clorofila SPAD e teor de nitrogênio. Observou-se que houve influência da inoculação das sementes com *A. brasilense* no desenvolvimento das plantas, em função dessas terem resultado em maior diâmetro do colmo, maior massa de matéria seca da parte aérea, maior índice de clorofila (SPAD) e maior acúmulo de nitrogênio em função dos diferentes volumes de inoculante aplicado.

Palavras-chave: *Zea mays* L., AbV5, bactérias diazotróficas, fixação biológica de nitrogênio.

Introdução

A cultura do milho é de grande representatividade no Brasil e no mundo de maneira geral, sendo que na safra 2010/2011 o país produziu cerca de 57.406 mil toneladas e a produção esperada para a safra 2011/2012 é em torno de 61.703 mil toneladas (CONAB, 2012). Para que elevados níveis de produção sejam atingidos, vêm se adotando a adubação pesada com nitrogênio que quando aplicado sob condições inadequadas, grande parte é perdida por fatores biogeoquímicos que ocorrem naturalmente como fixação por microrganismos do solo, erosão, lixiviação e volatilização (REIS, 2006).

No intuito de minimizar os problemas da aplicação em demasia de nitrogênio, nos últimos anos várias tecnologias vêm sendo pesquisadas, entre elas a utilização de bactérias diazotróficas. Essas bactérias possuem o complexo da enzima nitrogenase, capaz de reduzir o nitrogênio molecular (N₂ atmosférico) em amônia (NH₃) que, em pH celular rapidamente se converte em amônio (NH₄), o qual é então assimilado pela planta para constituir clorofilas,

aminoácidos, entre outros compostos orgânicos (EPSTEIN e BLOOM, 2006; REIS et al., 2006; TAIZ e ZEIGER, 2006).

Conforme Baldani et al. (1997), dentre os gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio em estudo *Azospirillum* é o mais freqüente, pois engloba seis espécies diazotróficas tais como *A. lipoferum* e *A. brasilense* que são associativas de raízes, e outras descritas como endofíticas que geralmente se encontram no interior de raízes e outros órgãos da planta.

Além de realizar a fixação biológica de nitrogênio, alguns outros fatores têm sido notados em bactérias diazotróficas, como o aumento da atividade da nitrato redutase observado por Salomone & Döbereiner (1996) com uma mistura de estirpes de *Azospirillum* na inoculação de milho, e liberação de ácido 3-indolacético em meio de cultivo JNFb verificado por Radwan et al. (2004).

Apesar dos vários experimentos envolvendo a utilização de estirpes de *Azospirillum brasilense* como fonte de nitrogênio para espécies não leguminosas, pouco tem se discutido a respeito das dosagens para inoculação capazes de proporcionarem resultados mais promissores. Possivelmente maiores volumes do inoculante podem acarretar melhores resultados morfológicos na cultura do milho.

Assim, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar a influência de diferentes volumes de inoculante à base de *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5 no desenvolvimento inicial da cultura do milho.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na estação de horticultura e cultivo protegido “Professor Mario César Lopes” pertencente ao núcleo de estações experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste. A estação está localizada nas coordenadas 54° 22’ W, 24° 46’S e altitude de 420 m. O material vegetal utilizado foram sementes de milho da variedade Ocepar 202.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições e cinco tratamentos, os quais consistiram das dosagens de 0 (testemunha), 2, 4, 6 e 8 mL para 1000 sementes de milho, do inoculante à base de *Azospirillum brasilense* estirpe AbV5 contendo 1×10^8 UFC mL⁻¹, fornecido pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT de fixação biológica de nitrogênio, com sede no departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná.

Após a inoculação das sementes com os diferentes volumes do inoculante testado,

essas foram semeadas em bandejas plásticas medindo 47 cm x 32 cm contendo como substrato areia esterilizada. Após sete dias da semeadura as plântulas foram transplantadas para vasos com volume de 1,0 L, preenchidos com vermiculita de granulometria média.

O substrato foi irrigado a cada três dias com 100 mL por vaso da solução nutritiva descrita por Hoagland & Arnon (1950), excluindo-se o nitrogênio, sendo estes mantidos por 21 dias após o transplante das plântulas. Após esse período foram realizadas as seguintes avaliações: altura de planta, diâmetro de colmo, massa seca da parte aérea e de raízes, índice de clorofila SPAD e teor de nitrogênio.

Os dados foram tabulados e em seguida submetidos à análise de variância pela estimativa F de Fisher-Snedecor e quando detectadas diferenças significativas, procedeu-se com o teste de comparação de médias por Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

A partir da estimativa F de Fisher-Snedecor puderam se observar diferenças significativas a 5% de probabilidade para quase todas as variáveis analisadas, excetuando-se a massa seca das raízes e por isso foram apresentadas apenas as figuras comparativas das médias.

Pode se observar na figura 1, que a inoculação das sementes de milho indiferentemente do volume de inoculante utilizado resultou no maior incremento em diâmetro do colmo das plântulas quando comparados com o tratamento sem inoculação (testemunha). Quanto a variável altura de plantas, pode-se inferir que os volumes de inoculante de 4, 6 e 8 ml 1000 sementes⁻¹ de milho promoveram maior altura das plântulas em relação aos demais tratamentos, o que relacionando com o aumento do diâmetro, pode formar plantas com arquitetura que promove um suporte adequado para produtividades elevadas.

Ao contrário do observado nesse trabalho com relação à altura de plantas, Cavallet et al. (2000) avaliando o efeito de inoculante à base de *Azospirillum* spp. em Toledo-PR, verificaram que apesar da produtividade ter sido acrescida pela inoculação, a altura de plantas não foi alterada. Esse resultado provavelmente foi devido ao volume do inoculante utilizado para este experimento, visto que diferenças significativas em altura são expressas apenas a partir de 4 mL 1000 sementes⁻¹.

A massa seca da parte aérea foi superior nos volumes de 6 e 8 mL 1000 sementes⁻¹ do inoculante sendo que esta última foi a única que atingiu o nível superior às quatro demais, portanto o maior volume de inoculante proporcionou plantas de milho com porte aéreo mais

elevado, onde se considera também a massa das folhas.

Não houve diferenças significativas para a massa seca de raízes (Figura 1), porém com os valores obtidos para diâmetro de colmo, altura de plantas e massa seca da parte aérea, é possível prever que a inoculação das sementes de milho forneceu subsídios para que as plantas em fase inicial de desenvolvimento acumulassem de maneira geral maior incremento em massa seca da parte aérea

Na figura 2 verifica-se que o teor de clorofila obtido pelo índice SPAD foi superior nos maiores volumes, sendo que apenas à 8 mL 1000 sementes⁻¹ que se obtêm níveis diferentes estatisticamente em relação aos tratamentos sem inoculação (testemunha) e ao volume de 2 ml de inoculante.

Conforme observado por Argenta et al. (2001) com a finalidade de validar o uso de SPAD como parâmetro para o teor de clorofila, e também como descrito por Taiz & Zeiger (2006), Reis (2006) e Epstein & Bloom (2006), o teor de clorofila foliar está fortemente correlacionado com o teor de nitrogênio absorvido pela planta.

Assim como nesses trabalhos, a quantidade de nitrogênio foliar apresenta boa relação com o teor de clorofila, pois se avaliando o teor de nitrogênio em plantas de milho em fase inicial de desenvolvimento (Figura 2B), foi observada diferença significativa apenas quando se utilizou o maior volume do inoculante em estudo, assim como o maior nível de índice SPAD. Resultados em concordância aos esperados, visto que grande parte do nitrogênio assimilado é utilizado para constituição de clorofilas.

De qualquer forma a inoculação com AbV5 promoveu a fixação biológica de nitrogênio nas plantas de milho, visto que essas se apresentavam com 28 dias após a semeadura e portanto a reserva da semente foi totalmente utilizada anteriormente e mesmo que estivessem sendo consumidas, isso não explicaria as diferenças no teor de nitrogênio foliar. A forma de condução do experimento em vermiculita, com irrigação de solução nutritiva excluindo-se o nitrogênio, é um forte argumento para a contribuição da fixação biológica no teor desse nutriente na planta.

Rambo et al. (2011) verificaram que o teor relativo de clorofila nas folhas, juntamente com o teor de nitrogênio no estágio V6 de ontogenia do milho, além de estar fortemente associados a produção da cultura, são os indicadores mais precisos para determinação de adubação nitrogenada de cobertura.

Conclusão

A inoculação das sementes de milho com a estipe AbV5 (*Azospirillum brasilense*) demonstrou efeito positivo em relação ao ganho de massa da parte aérea das plantas, bem como, maior acúmulo de clorofila e nitrogênio nas folhas.

Agradecimentos

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fixação Biológica de Nitrogênio-INCT.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia molecular da Universidade Federal do Paraná-UFPR.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNOESTE.

Literatura Citada

ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F. da; BORTOLINI, C.G.; FORSTHOFER, E.L.; STRIEDER, M.L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. R. Bras. Fisiol. Veg., v.13, n.2, p.158-167, 2001.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.V.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biology and Biochemistry, v.29, p.911-922, 1997.

CAVALLET, L.E.; PESSOA, A.C.S.; HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R.; OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. Rev. bras. eng. agríc. ambient., v.4, n.1, 2000.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, sexto levantamento, agosto 2011. Brasília, 2012. 36 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_03_13_11_04_08_boletim_marco_2012.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2012.

DOURADO NETO, D.; PALHARES, M.; VIEIRA, P.A.; MANFRON, P.A.; MEDEIROS, S.L.P.; ROMANO, M.R. Efeito da população de plantas e do espaçamento sobre a produtividade de milho. Revista brasileira de milho e sorgo, v. 2, n. 3, p. 63-77, 2003.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. 2. ed. Tradução de Maria Edna Tenório Nunes. Londrina: Ed Planta, 2006. 403 p. Título original: Mineral nutrition of plants.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.T. The water culture method for growing plants without soil. Berkely: California Agriculture Experiment Station, 1950. 32p. (University of California. Circular 347).

RADWAN, 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, p. 1687-1698, 2004.

RAMBO, L.; SILVA, P.R.F. da; STRIEDER, M.L. SILVA, A.A. da; SANGOI, L.; VIEIRA, V.M. Índices nutricionais de N e produtividade de milho em diferentes níveis de manejo e de adubação nitrogenada. *Pesq. agropec. bras.*, v.46, n.4, p.390-397, 2011.

REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L de M. de; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2006. p. 153-174.

SALOMONE, I.G. de; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.21, n.3, p.193-196. 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2006, 719p.

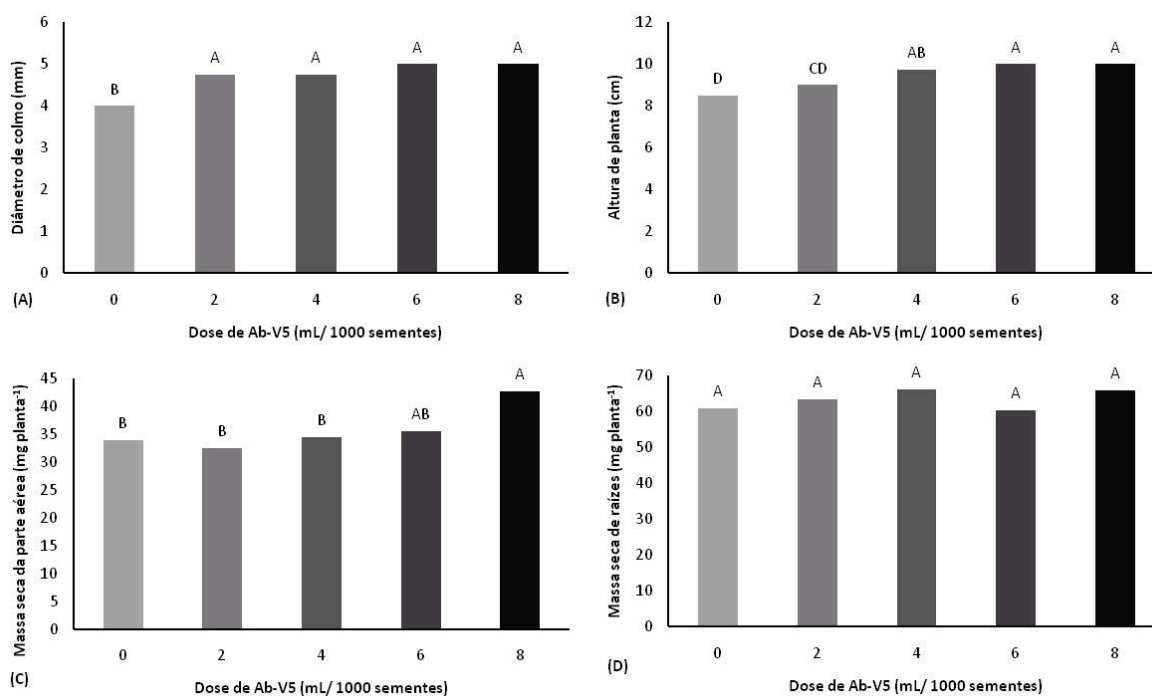


Figura 1. Diâmetro de colmo (A), altura de planta (B), massa seca da parte aérea (C) e das raízes (D), de plantas de milho da variedade INCAPER em função dos diferentes volumes de inoculante testados, Marechal Cândido Rondon, 2012. *Barras com as mesmas letras não se diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

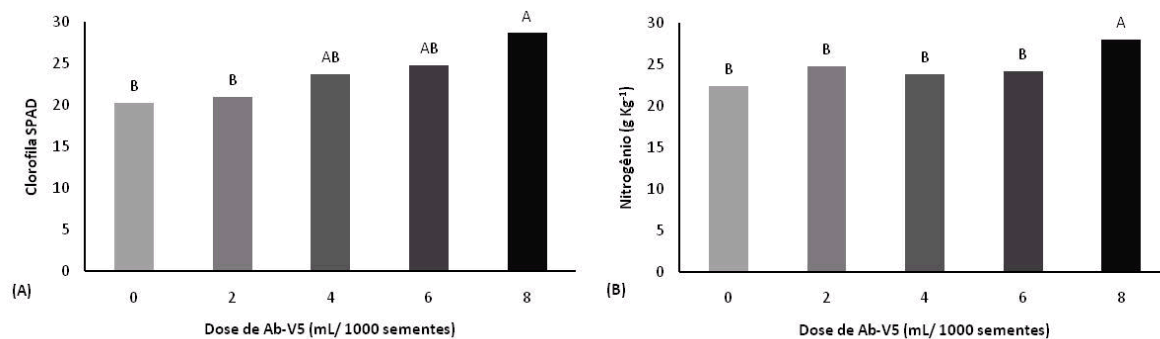


Figura 2. Índice relativo de clorofila SPAD (A) e teor de nitrogênio (B) em plantas de milho da variedade INCAPER em função dos diferentes volumes de inoculante testados, Marechal Cândido Rondon, 2012.

*Barras com as mesmas letras não se diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.