

## **Efeito de Doses de Inoculante Líquido no Desempenho das Trocas Gasosas de dois Genótipos de Milho**

Jucenei Frandoloso<sup>1</sup>; João Alexandre Lopes Dranski<sup>1</sup>; Artur Soares Pinto Junior<sup>1</sup>; Vandeir Francisco Guimarães<sup>1</sup>; Jeferson Klein<sup>2</sup>; Luan Fernando Ormond Sobreira Rodrigues<sup>1</sup>; Maria Isabel Stets<sup>3</sup>; Luíza Maria Araujo<sup>3</sup>; Leonardo Magalhães Cruz<sup>3</sup>; Wylliam Pozzebom<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidades Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR. [vandeirfg@yahoo.com.br](mailto:vandeirfg@yahoo.com.br); [artur\\_bio@hotmail.com](mailto:artur_bio@hotmail.com). <sup>2</sup>Bolsista de Pós doutorado CAPES/PNPD, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste, PR [jefersonklein@yahoo.com.br](mailto:jefersonklein@yahoo.com.br). <sup>3</sup>Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR. <sup>4</sup>Simbiose Indústria e Comercio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos LTDA, Cruz Alta, RS

**RESUMO** – O objetivo do presente estudo foi o de avaliar o efeito de doses de inoculante líquido no desempenho das trocas gasosas em dois genótipos de milho. 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. As variedades de milho utilizadas foram a OCEPAR 202 e INCAPAR 203, 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. Aos 21 dias após o transplante (DAT), as trocas gasosas foram avaliadas por meio de um sistema aberto portátil de fotossíntese (LI-6400, Li-Cor Inc., NE, USA). Utilizaram-se folhas de plantas com o limbo completamente expandido, localizadas no terço superior das plantas, em quatro plantas por tratamento, no período das 9:00 às 11:00 horas; a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos foi fixada no aparelho em  $1800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Foram avaliada a taxa fotossintética ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ) e eficiência do uso da água ( $EUA$ ). Pode se concluir com este experimento que o a partir do volume de 6 (mL / 1000 sementes) de inoculante à base de *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5, há melhores condições para as trocas gasosas de folhas de milho independentemente do genótipo utilizado.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., doses de Ab-V5, bactérias diazotróficas, fixação biológica de nitrogênio.

### **Introdução**

De modo geral, o cultivo de milho apresenta elevada representatividade tanto para o Brasil quanto aos demais países. Somente na safra de 2010/2011 a produção nacional de milho foi superior a  $5,7 \cdot 10^7$  toneladas, onde o mesmo apresenta projeções para a safra 2011/2012 uma produção em torno de  $6,1 \cdot 10^7$  toneladas (CONAB, 2012). No entanto, para que os elevados níveis continuem sejam atingidos, vêm se adotando técnicas de aplicação de altos níveis de adubação com nitrogênio. Este elemento, quando aplicado sob condições inadequadas, pode proporcionar perdas por fatores biogeoquímicos que podem ocorrer naturalmente como a 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 um complexo da enzima nitrogenase, com capacidade de reduzir o nitrogênio molecular ( $N_2$  atmosférico) em amônia ( $NH_3$ ). Esta molécula em pH celular rapidamente se converte em amônio ( $NH_4$ ), podendo ser assimilado pela planta com fazendo parte de moléculas orgânicas como clorofilas, aminoácidos (EPSTEIN e BLOOM, 2006; REIS et al., 2006; TAIZ e ZEIGER, 2010).

Conforme Baldani et al. (1997), de todos os gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio em estudo, *Azospirillum* pode ser considerado o mais frequente, pois engloba atualmente seis espécies tais como *A. lipoferum* e *A. brasilense*. Estas bactérias segundo os mesmos autores podem ser obtidas na forma associativa com raízes, e em outras descritas como endofíticas que geralmente se encontram no interior de raízes ou em 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 e 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).

O uso de diferentes genótipos de milho com tolerância à deficiência de N ou eficientes no alcance deste elemento constitui uma estratégia importante (REIS JUNIOR et al., 2008). Principalmente quando estes elementos químicos apresentam potencial de interação com bactérias diazotróficas.

Porém, dos experimentos envolvendo o uso de estirpes de *A. brasilense* como mecanismo de fixação de nitrogênio em espécies não leguminosas, pouco tem se discutido a respeito das dosagens de bactérias presentes nos inoculantes capazes de proporcionarem resultados mais promissores. Da mesma forma, raros são os relatos sobre o efeito destas interações nos comportamentos fisiológicas de folhas vivas das plantas de milho tais como abertura e fechamento estomático. Estas variáveis podem apontar indícios do status fisiológico das folhas das plantas quanto às trocas gasosas que ocorrem entre a folha e o ar.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes volumes de inoculante à base de *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5 nos trocas gasosas de dois genótipos de 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 duas variedades de milho INCAPER 203 e OCEPAR 202.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições e cinco tratamentos, descritos a seguir: 0, 2, 4, 6 e 8 mL para 1000 sementes de milho, do inoculante à base de *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5 contendo  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, 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, as sementes foram semeadas em bandejas 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 e Arnon (1950), excluindo-se o nitrogênio, sendo estes mantidos por 21 dias após o transplante das plântulas. Aos 21 dias após o transplante (DAT), as trocas gasosas foram avaliadas por meio de um sistema aberto portátil de fotossíntese (LI-6400, Li-Cor Inc., NE, USA). Utilizou-se folhas de plantas com o limbo completamente expandido, localizadas no terço superior das plantas, em quatro plantas por tratamento, no período das 9:00 às 11:00 horas; a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos foi fixada no aparelho em  $1800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Foram avaliada a taxa fotossintética (*A*), condutância estomática (*gs*), transpiração (*E*) e eficiência do uso da água (*EUA*).

Os dados foram 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 foram observadas diferenças significativas ao

nível 5% de probabilidade nas trocas gasosas de folhas de plantas de milho de dois diferentes genótipos realizadas aos 28 dias após a inoculação com bactérias *Azospirillum brasilense* Ab-V5. Tais resultados demonstram que, excetuando-se as variáveis de condutância estomática e transpiração para o genótipo INCAPAR 203, e eficiência do uso da água para o genótipo OCEPAR 202, conforme a figura 1, todas as demais variáveis apresentaram diferença entre os tratamentos.

Nas figuras 1A e 1B é possível verificar que a concentração de 6 mL de inoculante foi suficiente para promover maior valor médios da taxa assimilatória líquida de dióxido de carbono assimilado quando comparado aos 2 e 0 mL de inoculante fornecidos as sementes de plantas de INCAPAR 203 e OCEPAR 202 respectivamente.

Esse comportamento provavelmente é devido ao volume do inoculante utilizado, visto que diferenças significativas em função de algumas variáveis são expressas apenas a partir de 4 mL por 1000 sementes<sup>-1</sup>.

Pois segundo Ferreira et al. (2010) plantas não-leguminosas, apresentam um processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) não tão eficiente comparado aquele obtido na cultura de plantas leguminosas e o aumento na concentração elevaria a chance de bactérias diazotróficas interagirem aos tecidos das plantas. Além disso, a interação positiva entre estas bactérias e o milho já tem sido confirmada por diversos autores principalmente com relação a *Azospirillum* (REIS JUNIOR et al., 2008).

Fato possivelmente também causado devido à produção de hormônios exercida pela bactéria (ZAIED et al., 2003). Visto que a bactéria pode estimular ou inibir a produção de alguns reguladores de crescimento tais como auxina (HUNGRIA, 2011). Tal estímulo poderia estar acelerando o desenvolvimento inicial da planta fazendo com que a mesma busca-se com mais eficiência os poucos nutrientes disponíveis no substrato que por consequência favoreceria as trocas gasosas.

Nota-se também, que a condutância estomática das plantas que receberam o volume de 8 mL de inoculante aplicado nas sementes de milho apresentaram valores médios maiores para a abertura estomática nestas folhas para o genótipo OCEPAR 202 (figura 1D).

Da mesma forma ainda, valores médios da taxa de transpiração obtidos nas folhas das plantas de milho genótipo OCEPAR 202 com a dose de 8 mL de inoculante, apresentou valores superiores aqueles plantas que não receberam inoculação.

Já a eficiência do uso da água das folhas de INCAPAR 203 foi maior para as plantas que receberam 6 mL de inoculante (figura 1G).

De qualquer forma, a presença de elevadas concentrações de inoculação com Ab-V5 promoveu melhor o desempenho de algumas variáveis fisiológicas. Sendo a FBN ocorrida nestas plantas de milho uma opção interessante, visto que a possibilidade de haver bactérias diazotróficas junto aos tecidos vegetais como raízes, colmo ou folhas após 28 dias da semeadura é alta.

A literatura aponta que até este período de avaliação as taxas de sobrevivência de bactérias presente junto aos tecidos vegetais proveniente da inoculação de sementes são elevadas (FERREIRA et al. 2010).

Pode-se afirmar que os melhores resultados não estariam relacionados somente com a reserva da semente, pois a mesma já haveria sido totalmente utilizada anteriormente e mesmo que estivessem sendo consumida, 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.

#### Conclusões

Neste experimento, a partir do volume de 6 (mL / 1000 sementes) de inoculante à base de *Azospirillum brasilense* estirpe AbV5, há melhores condições para as trocas gasosas em plantulas de milho para os dois genótipos utilizados.

#### Agradecimentos

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fixação Biológica de Nitrogênio-INCT; à Fundação Araucária, Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná e à SETI, Secretaria do Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino superior do Estado do Paraná; ao Departamento de Bioquímica e Biologia molecular da Universidade Federal do Paraná-UFPR, Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste e CAPES/PNPD.

#### Literatura Citada

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.

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](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_03_13_11_04_08_boletim_marco_2012.pdf)>. Acesso em: 15 mar. 2012.

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.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. *Acta Scientiarum*, V. 3, N. 1, p. 179-185, 2010.

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).

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011, 20 p. (Documentos, 325).

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.

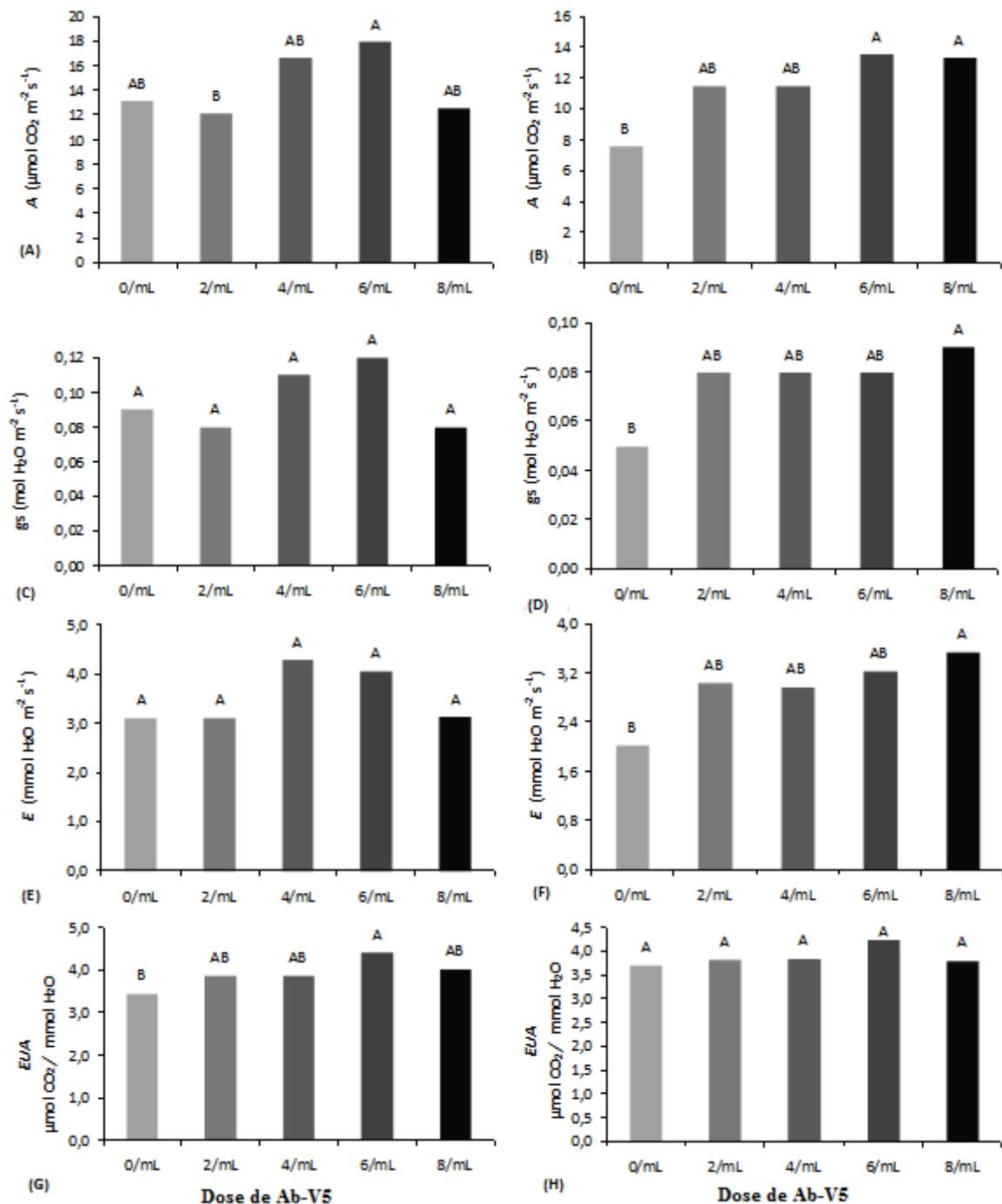
REIS JUNIOR, F. B. dos.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, I. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *R. Bras. Ci. Solo*, n.32, v.1, p.1139-1146, 2008.

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. *Plant Physiology*, 5.ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc. Publishers, 2010. 782p.

ZAIED, K.A.; EL-HADY, A.H.; AFIFY, A.H.; NASSEF, M.A. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.4, n.2, p.344-358, 2003.



**Figure 1.** Valores médios de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A e B), condutância estomática (C e D), e transpiração (E e F) e índice de eficiência do uso de água (G e H), em folhas de duas cultivares (INCAPER 203 A, C, E, G e OCEPAR 202 B, D, F, H) de milho em função de doses de inoculante.