

DESENVOLVIMENTO INICIAL DE CULTIVARES DE MILHO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INOCULAÇÃO EM TRATAMENTO DE SEMENTES COM AZOSPIRILLUM BRASILIENSE SOB DOIS NÍVEIS DE N MINERAL

Lígia Maria Maraschi da Silva Piletti¹, Luís Sangoi², Izidro dos Santos de Lima Junior¹ e Antonio Luiz Viegas Neto¹

¹ Instituto Federal de Mato Grosso do Sul, Campus Ponta Porã, Rodovia BR-463, km 14, s/n, Ponta Porã, MS. E-mail: ligia.piletti@ifms.edu.br; izidro.lima@ifms.edu.br; antonio.viegas@ifms.edu.br.

² Universidade do Estado de Santa Catarina, Av. Luís de Camões, 2090, Lages, Santa Catarina, Brasil. E-mail: luis.sangoi@udesc.br

RESUMO: O maior crescimento inicial pode incrementar o aproveitamento da radiação solar disponível nas primeiras etapas do ciclo do milho. A utilização de organismos que favoreçam o crescimento inicial de plantas pode ser uma ferramenta útil para alcançar maiores produtividades. Bactérias promotoras de crescimento de plantas podem ser uma alternativa, destacando-se o gênero *Azospirillum*. Conduziu-se este experimento em casa de vegetação, objetivando avaliar a influência da inoculação no desenvolvimento inicial de duas cultivares de milho, sob dois níveis de nitrogênio mineral. Utilizou-se esquema fatorial 2x2x2 com três repetições; duas cultivares de milho (a variedade de polinização aberta SCS 155 Catarina e o híbrido simples P30R50), duas doses de nitrogênio (0 e 100 kg N ha⁻¹) e presença ou ausência de inoculação com *Azospirillum brasiliense*. Avaliou-se a área foliar, estatura de plantas, teor de clorofila e estágio fenológico aos 7, 14, 21 e 28 dias após a semeadura. Aos 28 dias após a semeadura, quando as plantas estavam em V5-V6 efetuou-se a colheita, e determinada massa seca de raiz e parte aérea. A inoculação com *Azospirillum brasiliense* e a aplicação de nitrogênio mineral não estimularam o desenvolvimento inicial das. SCS 155 Catarina apresentou maior velocidade de desenvolvimento inicial do que o P30R50.

PALAVRAS-CHAVE: crescimento; nitrogênio; bactérias diazotróficas.

MAIZE CULTIVARS EARLY GROWTH IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF SEED INOCULATION WITH *Azospirillum brasiliense* UNDER TWO LEVELS OF MINERAL N

ABSTRACT: The higher initial growth can increase the use of solar radiation in the beginning of maize cycle. The use of organisms that enhance maize initial growth can also be a useful tool to achieve higher yields. The bacteria that promote plant growth (BPCP), such as *Azospirillum*, may be an alternative to accomplish this goal. This work was carried out aiming to evaluate the influence of inoculation on the early development of two maize cultivars with and without mineral nitrogen application. A 2x2x2 factorial design with three replications was used, testing two cultivars (the open-pollinated variety SCS 155 Catarina and the single-cross hybrid P30R50), two nitrogen levels (0 and 100 kg N ha⁻¹) and presence or absence of inoculation with *Azospirillum brasiliense*. The experiment was conducted in a greenhouse. Leaf area, plant height, chlorophyll content and phenological stage at 7, 14, 21 and 28 days after sowing were evaluated. Harvest was performed 28 days after sowing. Shoots and roots were separated and dried to assess plant dry mass production. Inoculation with *Azospirillum brasiliense* and fertilization with mineral N did not increase the cultivar's initial development. The VPA SCS 155 Catarina showed a higher rate of early development than the single cross hybrid P30R50.

KEY-WORDS: growth; nitrogen; diazotrophic bacteria.

INTRODUÇÃO

O maior crescimento inicial pode incrementar o aproveitamento da radiação solar disponível no início do ciclo do milho, aumentando a disponibilidade de carboidratos para a diferenciação de um maior número de espigas por planta.

No período semeadura-emergência, o desenvolvimento das plântulas pode ser limitado por deficiência hídrica, compactação do solo, temperatura baixa, fitotoxicidade de herbicidas, além de ataques de pragas e patógenos. Quanto mais rapidamente ocorrer a emergência e estabelecimento da cultura, menor será o tempo de exposição das sementes à pragas e patógenos de solo. Isto é importante para garantir o número de plantas almejado, que interferirá diretamente no número de espigas produzidas por área, o primeiro componente do rendimento de grãos (Sangoi et al., 2010). Além disto, o estabelecimento rápido e uniforme do estande reduz o período crítico de competição com plantas daninhas.

Os trabalhos conduzidos por Rocher et al. (1989), Rood et al. (1990) e Causse et al. (1995) reforçam a hipótese de que o crescimento inicial é uma característica importante para a capacidade produtiva das plantas, estando correlacionado com algumas enzimas chaves no processo de fixação e distribuição dos fotoassimilados na planta.

A germinação e emergência rápida e uniforme são duas características importantes para alcançar altos rendimentos de grãos com a cultura do milho, em função da baixa capacidade de compensação de espaços desta espécie e da sua alta eficiência de conversão da energia luminosa em energia química (Tollenaar e Wu, 1999). A definição do estande final da lavoura é afetada pela interação de diversos fatores e pode ser garantida através de medidas preventivas, tais como o tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas. A utilização de organismos que favoreçam o crescimento inicial de plantas também pode ser uma ferramenta útil para alcançar maiores produtividades.

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) correspondem a um grupo de microrganismos benéficos às plantas devido à capacidade de colonizar a superfície de suas raízes, rizosfera e tecidos internos (Davison, 1988; Kloepper et al., 1989).

As bactérias que colonizam a rizosfera apresentam mecanismos de ação direta e indireta na promoção do crescimento vegetal (Oliveira et al., 2003). Dentre os mecanismos de ação direta pode-se citar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, aumento na atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas, produção de fitohormônios como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, solubilização de fosfato. Indiretamente, elas atuam nos mecanismos de indução de resistência sistêmica das plantas, antagonismo a

patógenos, aumento da resistência das plantas a situações de estresse e produção de antibióticos (Cattelan e Hartel, 2000).

Elas podem também promover aumento da área de absorção radicular, melhoria dos parâmetros fotossintéticos das folhas, tais como o teor de clorofila e condutância estomática, maior teor de prolina na parte aérea e raízes, melhoria no potencial hídrico, incremento no teor de água do apoplasto, maior elasticidade da parede celular, maior altura de planta e maior produção de biomassa (Barassi et al., 2008).

Estima-se que a inoculação com estas bactérias promova maior crescimento inicial das plantas por uma combinação de todos esses mecanismos (Dobbelaere et al., 2003). Vários trabalhos têm demonstrado resultados eficientes da inoculação de BPCP em gramíneas, destacando-se o gênero *Azospirillum*, que apresenta capacidade de induzir respostas à planta em melhorar o aproveitamento dos recursos disponíveis no ambiente (Bergamaschi et al., 2006).

Gonçalves et al. (2012) constataram que plantas de milho inoculadas com *A.brasilense* se recuperaram de estresse hídrico mais rapidamente quando comparadas com as que não foram inoculadas, evidenciando que a bactéria contribuiu positivamente para que a planta pudesse elevar o seu conteúdo relativo de água na folha com mais eficiência, gastando menos tempo e menos energia.

A partir de trabalhos realizados com plantas de milho inoculadas *Azospirillum* sp Ribaud et al. (2001) reportaram que plantas de milho inoculadas apresentaram maior concentração de N nas folhas, raízes mais longas, maior estatura de planta e maior produção de biomassa duas a três semanas após a semeadura. Dobbelaere et al. (2003) também verificou que a inoculação com *Azospirillum* promoveu uma antecipação no crescimento de parte aérea e das raízes de plantas de milho e trigo sob fertilização moderada de nitrogênio.

Corroborando esses resultados, Diaz-Zorita (2012) constatou que o tratamento biológico das sementes com bactérias diazotróficas traz uma contribuição importante para o crescimento vegetativo das plantas. O autor cita ainda que esta contribuição foi menor durante o período de enchimento de grãos.

Apesar de muitos benefícios já terem sido reportados na literatura, a utilização de inoculação com *Azospirillum* não é uma prática agrícola consolidada e muitas dúvidas ainda surgem a este respeito. Em função disto conduziu-se este trabalho, objetivando avaliar a influência da inoculação no desenvolvimento inicial de duas cultivares de milho com e sem a aplicação de nitrogênio mineral.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no município de Lages, SC. Foram utilizados 24 baldes plásticos com 5 kg de solo. Cada balde foi considerado uma unidade experimental. O solo utilizado é classificado como NITOSSOLO VERMELHO Distrófico típico (Embrapa, 2006). Ele foi coletado do Distrito de Santa Terezinha do Salto, pertencente ao município de Lages. Os resultados da análise química do solo realizada em 2010 podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características químicas e granulométricas do solo utilizado no experimento na profundidade de 0 – 10 cm

pH	P	M.O.	Ca	K	Mg	Al	CTC
H ₂ O	mg dm ⁻³	g kg ⁻¹	-----	-----	cmol _c dm ⁻³ -----	-----	-----
5,6	5	50,0	6,0	0,5	2,8	0,3	15,3
Análise granulométrica							
Argila							
-----g kg ⁻¹ -----							
420							

Os tratamentos do experimento foram os seguintes: duas cultivares de milho (o híbrido simples P30R50H e a variedade de polinização aberta SCS 155 Catarina); duas doses nitrogênio mineral (0 e 100 kg ha⁻¹) e duas doses de inoculação com a bactéria diazotrófica *Azospirillum*, produto comercial Masterfix Gramíneas® (0 e 100 mL para 20 kg de sementes). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado arranjado num esquema fatorial 2 x 2 x 2 com três repetições por tratamento.

A semeadura foi realizada no dia 13/01/2012. O solo foi mantido na capacidade de campo por ocasião da semeadura e durante todo o período do experimento. A capacidade de campo foi determinada pesando o solo seco e inundando-o com 1,5 kg de água. O solo foi pesado todos os dias até apresentar estabilidade e pouca variação de peso, demonstrando então que para que atingisse a capacidade de campo era necessário acrescentar 500 g de água. Portanto no decorrer do experimento o solo foi monitorado, pesado diariamente e irrigado quando necessário.

A adubação foi determinada proporcionalmente à área de cada balde e realizada algumas horas antes da semeadura, incorporando os fertilizantes nitrogenados, fosfatados e no solo. Foram aplicados 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 100 kg ha⁻¹ de K₂O para todos os tratamentos. As

fontes de N, P e K foram uréia, super-fosfato triplo e cloreto de potássio. As sementes foram inoculadas com *Azospirillum brasiliense* dez minutos antes da semeadura. A dose foi calculada proporcionalmente, a inoculação foi realizada em béquer adicionando 2,5 mL de inoculante nos tratamentos com *A. brasiliense*. Não houve tratamento químico com fungicidas e inseticidas das sementes utilizadas. Foram semeadas oito sementes por balde.

A partir do terceiro dia após a semeadura estimou-se a percentagem de plantas emergidas por unidade experimental, contando-se o número de plântulas com o coleóptilo visível acima da superfície do solo e confrontando este valor com o número de sementes semeadas em cada balde. Esta avaliação foi feita até que mais de 90% das sementes estivessem emergidas. Logo após a emergência de todas as plantas foi realizado desbaste deixando quatro plantas por balde.

Foram avaliadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a semeadura as seguintes variáveis: altura de plantas, estágio fenológico, área foliar e teor de clorofila. A estatura da planta foi estimada medindo-se a distância do solo até a extremidade da última folha visível da planta dentro do cartucho.

Para estimativa do teor relativo de clorofila foi utilizado o clorofilômetro SPAD 502 Plus, marca Minolta utilizando sempre a média de seis amostras da última folha expandida. A área foliar foi obtida utilizando a metodologia descrita por Tollenaar (1992). Mediu-se com uma régua o comprimento (C) e a maior largura (L) de todas as folhas fotossinteticamente ativas, com pelo menos 50% de área foliar verde, de acordo com critério utilizado por Borrás et al. (2003). A área foliar (A), expressa em cm², foi estimada utilizando-se a expressão: $A = C \times L \times 0,75$; onde 0,75 é um coeficiente de correção.

O estágio fenológico foi avaliado conforme escala proposta por Ritchie et al. (1993). Segundo esta escala, os estádios vegetativos são identificados pela letra V e por um número que varia de 1 a n. Este número indica o número de folhas completamente expandidas apresentado pela planta. A folha foi considerada expandida quando ela apresentava a região do colar, que separa a bainha da lâmina foliar, totalmente visível.

Aos 28 dias após a semeadura, quando as plantas começaram a ter seu crescimento limitado devido à falta de espaço no balde, efetuou-se a colheita da parte aérea. Nesta ocasião, a parte aérea e as raízes foram lavadas e acondicionadas em sacos de papel. Elas foram levadas separadamente à estufa para secagem, onde foram deixadas por sete dias a 60°C até atingir massa constante. Posteriormente foram pesadas para determinação da massa seca de parte aérea e raízes.

Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% ($p < 0,05$) de significância. Quando atingida significância estatística pelo teste F, as médias foram submetidas ao Teste de Tukey, também a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Temperatura e umidade relativa do ar na casa de vegetação

A Figura 1 apresenta a variação da temperatura média do ar e a umidade relativa do ar dentro da casa de vegetação durante período de 21 dias, os quais corresponderam a parte do período em que foi conduzido o experimento. A partir da análise dos gráficos, é perceptível que não há muita variação de temperatura e umidade relativa do ar dentro da casa de vegetação. A variação da temperatura foi de 22,7 °C a 24,4 °C (Figura 1A) e 73 a 84% de umidade relativa do ar (Figura 1B).

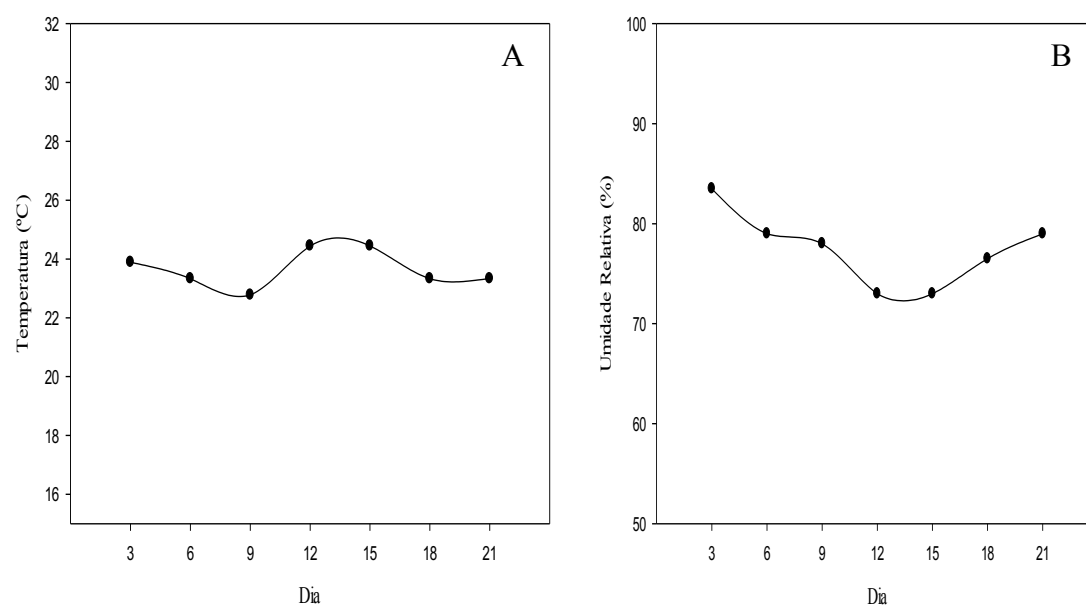


Figura 1 - Temperatura média (A) e Umidade relativa do ar (B) na casa de vegetação durante o mês de janeiro de 2012, período de condução do experimento de concentração de inóculo. Lages, SC, 2013.

Emergência e Estádio Fenológico

A emergência de plântulas iniciou no quarto dia após a semeadura e terminou no sexto dia após a semeadura quando todas as plântulas do experimento encontravam-se emergidas. O HS apresentou maior percentagem de plântulas emergidas do que a VPA nas avaliações feitas quatro e cinco dias após a semeadura (Tabela 2). Não houve efeito significativo da aplicação de nitrogênio mineral e da inoculação com *Azospirillum brasiliense* sobre a percentagem de plântulas emergidas.

Tabela 2 - Porcentagem de emergência de plântulas de milho em função de cultivar, dose de N e inoculação com *Azospirillum brasiliense*. Lages, SC, 2012

			Emergência (%)	
Cultivar	Dose N	<i>Azospirillum</i>	4 DAS	5 DAS
VPA	0	SEM	45	87
		COM	50	100
	100	SEM	41	87
		COM	37	95
HS	0	SEM	95	100
		COM	100	100
	100	SEM	95	100
		COM	91	95
Médias	CULTIVAR	VPA	43*	92 ^{ns}
		HS	95	98
	<i>Azospirillum</i>	SEM	69 ^{ns}	93 ^{ns}
		COM	69	97
	DOSE N	0	72 ^{ns}	96 ^{ns}
		100	66	94
CV (%):			20,68	7,53

¹ 7, 14, 21 e 28 Dias Após a Semeadura

*Diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de Probabilidade

^{ns} Não diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de Probabilidade

Na Tabela 3 são apresentados os estádios fenológicos em que se encontravam as plantas sete, 14, 21 e 28 dias após a semeadura. Aos sete dias após a semeadura, as plantas de todos os tratamentos encontravam-se no estágio fenológico V1, segundo escala proposta por Ritchie et al. (1993), contendo uma folha completamente expandida. Aos 14 dias após a semeadura, algumas plantas se encontravam em V2 e outras em V3, dependendo do tratamento. No 21º dia após a semeadura, todas as plantas estavam em V4 e no 28º dia após a semeadura as plantas alcançaram os estádios fenológicos de V5 e V6, dependendo do tratamento.

Tabela 3 - Estádio fenológico do milho, de acordo com escala proposta por Ritchie et al. (1993), aos 7, 14, 21 e 28 dias após a semeadura em função de cultivar, dose de N e inoculação com *A. brasiliense*. Lages, SC, 2012

Cultivar	Dose N	<i>Azospirillum</i>	Estádio			
			7 DAS	14 DAS	21 DAS	28 DAS
VPA	0	SEM	V1	V2	V4	V5
		COM	V1	V3	V4	V5
	100	SEM	V1	V3	V4	V6
		COM	V1	V3	V4	V6
HS	0	SEM	V1	V3	V4	V5
		COM	V1	V3	V4	V5
	100	SEM	V1	V2	V4	V5
		COM	V1	V3	V4	V5

Área Foliar

As plantas inoculadas com *Azospirillum* apresentaram na maior parte das avaliações maiores valores numéricos de área foliar do que as plantas que não foram inoculadas (Tabela 4). Apesar de haver uma diferença numérica que alcançou 34 cm² na avaliação realizada 28 dias após a semeadura, esta não foi suficiente para apresentar-se significativa estatisticamente.

Houve efeito significativo durante todo o período avaliado apenas do fator cultivar. Em todas as datas de avaliação, a VPA SCS 155 Catarina obteve área foliar superior ao Híbrido Simples P30R50H, corroborando os resultados reportados por Vieira et al. (2012), que também observou maior área foliar desta VPA quando comparada ao HS.

Não houve efeito significativo da aplicação de nitrogênio mineral sobre a área foliar nas quatro épocas de avaliação (Tabela 4). O nitrogênio atua diretamente nas regiões meristemáticas da planta, estimulando a divisão celular (Taiz e Zeiger, 2004). Este efeito não foi constatado no presente trabalho provavelmente porque no momento da colheita a área foliar era inferior a 500 cm² em todos os tratamentos. Uma planta de milho apresenta na floração de 6.000 a 9.000 cm² de área foliar (Sangoi et al., 2010). Portanto, menos de 10% da superfície fotossinteticamente ativa da planta havia se expandido na última avaliação realizada, o que atenuou os benefícios da inoculação e da fertilização nitrogenada sobre a dimensão do aparato fotossintético do milho.

Tabela 4 - Área Foliar de plantas de milho em função de cultivar, dose de N e inoculação com *Azospirillum brasiliense*. Lages, SC, 2012

Azospirillum brasilense: Eages, SC, 2012						
CULTIVAR	DOSE N	Azospirillum	ÁREA FOLIAR (cm²)			
			7 DAS	14 DAS	21 DAS	28 DAS¹
VPA	0	SEM	10	75	177	307
		COM	10	78	181	360
	100	SEM	9	77	173	397
		COM	10	76	175	448
HS	0	SEM	7	55	141	293
		COM	7	56	146	303
	100	SEM	7	52	136	288
		COM	7	57	148	311
Médias	CULTIVAR	VPA	10*	77*	177*	378*
		HS	7	55	143	299
	Azospirillum	SEM	8 ^{ns}	65 ^{ns}	157 ^{ns}	321 ^{ns}
		COM	8	67	163	356
	DOSE N	0	9 ^{ns}	66 ^{ns}	161 ^{ns}	316 ^{ns}
		100	8	66	158	361
CV (%):			8,65	7,53	8,89	17,75

¹ 7, 14, 21 e 28 Dias Após a Semeadura

*Diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de Probabilidade

^{ns} Não diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de Probabilidade

A Figura 2 apresenta a análise de regressão da área foliar das plantas de milho em função da data de avaliação após a semeadura. As duas cultivares apresentaram incremento linear da área foliar dos 7 aos 28 dias após a semeadura nas parcelas inoculadas e não inoculadas, tanto na dose 0 quanto na de 100 kg de N ha⁻¹.

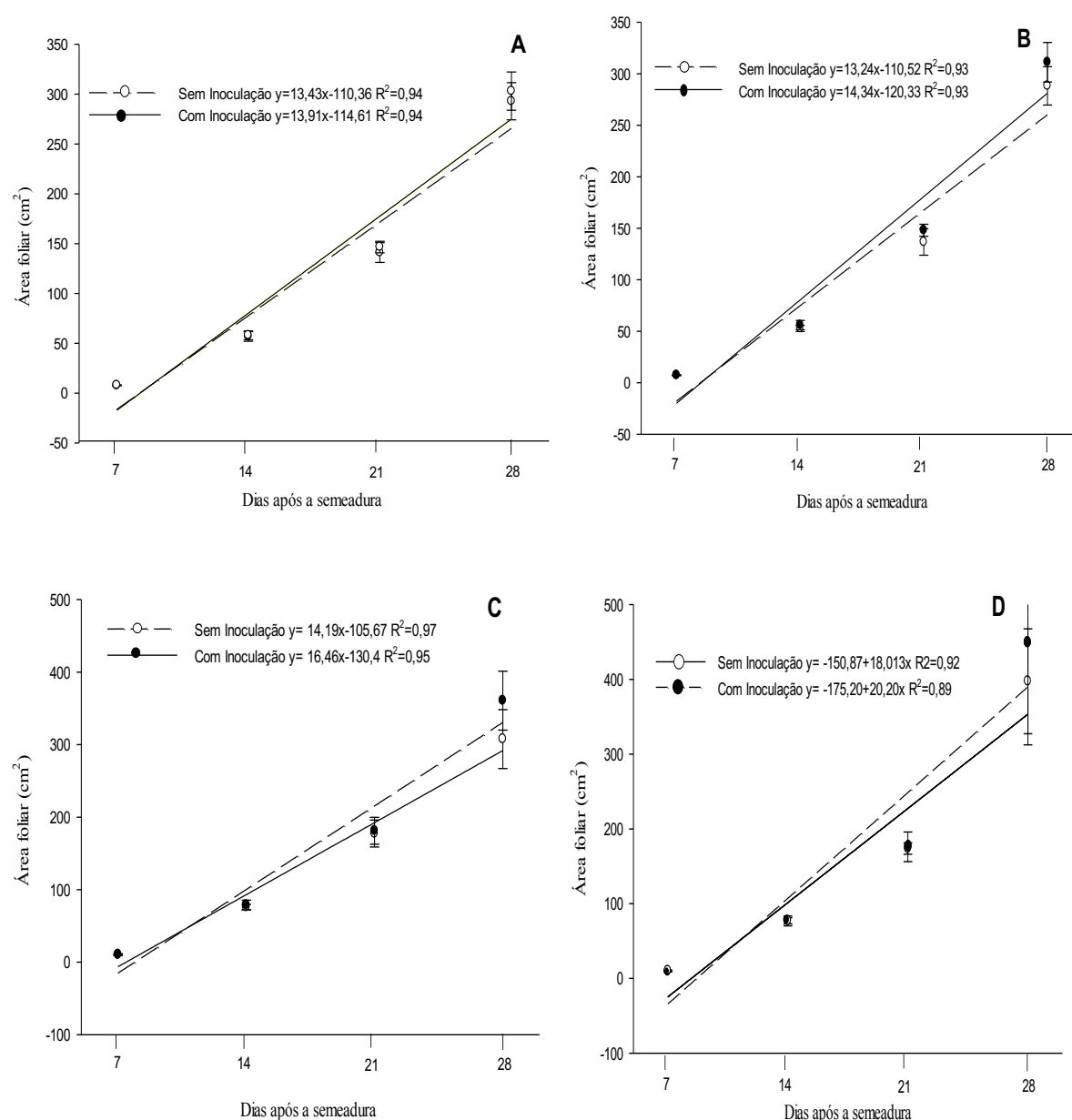


Figura 2 - Área foliar de cultivares de milho aos 7, 14, 21 e 28 dias após a semeadura. Híbrido simples com dose zero de nitrogênio (A), híbrido simples com dose 100 de nitrogênio (B), VPA com dose zero de nitrogênio (C) e VPA com dose 100 de nitrogênio (D).

Altura de planta

Houve efeito significativo da cultivar sobre a altura de planta aos 7, 14 e 21 dias após a semeadura (Tabela 5). Nestas épocas de avaliação, a VPA apresentou maior altura de planta do que o HS. A maior diferença de estatura entre as cultivares foi registrada na avaliação feita aos 21 dias após a semeadura, quando as plantas da VPA foram 8,0 cm mais altas do que as do HS.

O comportamento da estatura de planta confirmou o maior vigor inicial da VPA SCS 155 Catarina, em relação ao HS P30R50 reportado por Vieira (2012).

Não houve efeito significativo da aplicação de nitrogênio mineral sobre a estatura de planta para nenhuma época de avaliação. Os valores de altura de plantas para as doses 0 e 100 foram muito semelhantes. A maior diferença encontrada entre as doses foi na avaliação feita 28 dias após a semeadura, quando as plantas fertilizadas com 100 kg ha⁻¹ de N foram 4,0 cm mais altas do que aquelas que não receberam nitrogênio mineral na semeadura (Tabela 5). O nitrogênio atua diretamente nos meristemas de planta, estimulando a divisão celular e o crescimento em estatura. A ausência de diferença na estatura das plantas com e sem N provavelmente se deve ao fato de que o período de maior expansão de entre-nós e crescimento em altura do milho ocorre entre V6 e VT, após a diferenciação do pendão floral (Sangoi et al., 2010). Como as plantas foram colhidas entre V5 e V6, não houve tempo suficiente para que o fertilizante nitrogenado fomentasse o crescimento em estatura das plantas.

Tabela 5 - Altura de plantas de milho em função de cultivar, dose de N e inoculação com *Azospirillum brasiliense*. Lages, SC, 2012

CULTIVAR	DOSE N	<i>Azospirillum</i>	ALTURA (cm)			
			7 DAS	14 DAS	21 DAS	28 DAS
VPA	0	SEM	19	43	71	95
		COM	21	47	75	102
	100	SEM	20	46	78	110
		COM	20	47	79	105
HS	0	SEM	18	39	70	103
		COM	18	38	66	102
	100	SEM	17	36	59	97
		COM	18	41	76	106
Médias	CULTIVAR	VPA	20*	46*	76*	103 ^{ns}
		HS	18	39	68	102
	<i>Azospirillum</i>	SEM	18 ^{ns}	41 ^{ns}	70 ^{ns}	101 ^{ns}
		COM	19	43	74	104
	DOSE N	0	19 ^{ns}	42 ^{ns}	71 ^{ns}	100 ^{ns}
		100	19	43	73	104
<i>CV (%)</i> :			5,34	6,92	10,63	6,72

¹ 7, 14, 21 e 28 Dias Após a Semeadura.

*Diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de Probabilidade

^{ns} Não diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de Probabilidade

Os valores numéricos da altura de plantas foram maiores nas parcelas inoculadas com *Azospirillum* do que nas não inoculadas em todas as épocas de avaliação. Contudo, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas. Os resultados deste trabalho diferem dos

reportados por Dranski et al. (2012) que observaram incrementos na estatura de plantas quando as sementes de milho foram inoculadas com *Azospirillum brasiliense*. Por outro lado, eles confirmam os dados obtidos por Cavallet et al. (2000), que avaliando o efeito de inoculante à base de *Azospirillum brasiliense* no tratamento de sementes, verificaram que apesar da produtividade ter sido acrescida pela inoculação, a altura de plantas não foi alterada.

Índice do Teor Relativo de Clorofila

A inoculação com *Azospirillum brasiliense* propiciou maior índice do teor relativo de clorofila nas folhas 21 dias após a semeadura quando as plantas inoculadas tiveram valor de 37,2 e as não inoculadas 34,9 (Tabela 6). Nas avaliações feitas aos 14 e 28 dias após a semeadura, as parcelas inoculadas também apresentaram maiores valores numéricos de teor relativo de clorofila do que as não inoculadas, mas as diferenças não foram significativas. Jordão et al. (2010) observaram diferença significativa entre os tratamentos em relação ao teor de clorofila nas folhas no milho, medido com o clorofilômetro SPAD. Estes mesmos autores concluíram que as médias de clorofila total de todos os tratamentos que receberam a inoculação das sementes com *Azospirillum brasiliense* foram maiores que os tratamentos não inoculados.

Tabela 6 - Índice do teor relativo de clorofila de plantas de milho estimado pelo clorofilômetro em função de cultivar, dose de N e inoculação com *Azospirillum brasiliense*. Lages, SC, 2012

HÍBRIDO	DOSE N	<i>Azospirillum</i>	CLOROFILA			
			7 DAS	14 DAS	21 DAS	28 DAS
VPA	0	SEM	43,2	34,1	36,4	34,1
		COM	42,0	31,2	39,5	31,2
	100	SEM	45,5	37,3	30,0	37,3
		COM	43,3	39,3	36,1	39,3
HS	100	SEM	45,6	36,1	39,0	33,4
		COM	50,5	37,7	38,4	37,6
	0	SEM	45,6	38,6	34,1	36,8
		COM	43,3	35,5	34,6	34,6
Médias	CULTIVAR	VPA	43,5 ^{ns}	37,1 ^{ns}	35,5 ^{ns}	35,5 ^{ns}
		HS	46,2	36,9	36,5	35,6
	INOCULAÇÃO	SEM	44,9 ^{ns}	36,2 ^{ns}	34,9*	35,4 ^{ns}
		COM	44,8	37,9	37,1	35,7
	DOSE N	0	43,5 ^{ns}	36,8 ^{ns}	36,1 ^{ns}	34,2*
		100	46,2	37,3	35,9	36,9
<i>CV (%)</i> :			7,11	9,04	7,08	5,37

¹ 7, 14, 21 e 28 Dias após a Semeadura

*Diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de Probabilidade

^{ns} Não diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de Probabilidade

Quando se comparou as doses de N, houve diferença significativa apenas para a avaliação realizada 28 DAS, quando a dose 100 foi superior à dose 0. Não houve diferenças significativas entre cultivares quanto ao teor de clorofila nas folhas nas épocas de avaliação.

A análise do teor de clorofila é um importante parâmetro para o desenvolvimento da planta, servindo para diferenciar as plantas com deficiência de N das que apresentam níveis adequados de N (Rambo et al., 2004). O uso do clorofilômetro para esta avaliação é adequado, pois é um método mais rápido do que os laboratoriais, com baixo custo, e não implica na destruição das folhas (Argenta et al., 2001). Além disto, o clorofilômetro tem sido utilizado para determinar o teor de N da folha, visto que a clorofila e o nitrogênio se correlacionam positivamente nas plantas (Malavolta et al., 1997).

Produção de Fitomassa

A massa seca da parte aérea não foi afetada significativamente pelos tratamentos testados no trabalho (Tabela 7). Por outro lado, houve diferenças significativas entre cultivares na massa seca de raízes. A VPA SCS 155 produziu maior massa seca radicular do que o HS, na média das parcelas inoculadas e não inoculadas e dos níveis de N. Vieira (2012) também observou maior desenvolvimento inicial da VPA SCS 155, em relação aos híbridos P30R50H e P30B30, corroborando os resultados do presente trabalho.

Tabela 7 - Massa seca de parte aérea e raiz de plantas de milho em função da cultivar, dose de N e inoculação com *Azospirillum brasiliense*. Lages, SC, 2012.

			MASSA SECA (g)	
CULTIVAR	DOSE N (kg ha ⁻¹)	<i>Azospirillum</i>	RAIZ	PARTE AÉREA
VPA	0	SEM	5,3 ^{ns}	11,7 ^{ns}
		COM	8,2	12,8
	100	SEM	9,0	15,5
		COM	9,4 ^{ns}	16,5 ^{ns}
HS	0	SEM	6,5 ^{ns}	15,1 ^{ns}
		COM	4,1	10,6
	100	SEM	4,5 ^{ns}	10,1 ^{ns}
		COM	6,1	14,9
Média	CULTIVAR	VPA	8,0*	14,1 ^{ns}
		HS	5,3	12,7
	<i>Azospirillum</i>	SEM	6,3 ^{ns}	13,1 ^{ns}
		COM	7,0	13,7
	DOSE N	0	6,0 ^{ns}	12,6 ^{ns}
		100	7,3	14,3
CV (%):			36,23	27,07

*Diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de Probabilidade

^{ns} Não diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de Probabilidade

A inoculação com a bactéria diazotrófica *Azospirillum brasiliense* e aplicação de nitrogênio mineral propiciaram incrementos numéricos na massa seca radicular e de parte aérea. Contudo, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

O comportamento da massa seca de parte aérea e raízes observado no trabalho difere do reportado por Dranski et al (2012). Estes autores observaram incrementos nas duas variáveis com a utilização de doses crescentes de inoculante com *A. brasiliense* (0, 2, 4, 6 e 8 mL para 1000 g de sementes de milho). Conceição et al. (2008) trabalhando com recobrimento de sementes de milho com *Herbaspirillum seropedicae* observaram que com a inoculação com bactérias diazotróficas houve aumento no desenvolvimento da parte aérea das plantas, sem promover aumento da massa seca. Isto provavelmente ocorreu devido à ação das bactérias sobre o alongamento celular, pela turgescência vacuolar.

É possível que a falta de efeito significativo da inoculação e do fertilizante nitrogenado sobre a massa seca de parte aérea e raízes das cultivares avaliadas se deva a época de colheita do ensaio. Aproximadamente 75% da absorção de nitrogênio pelo milho ocorre entre a diferenciação do primórdio floral masculino e o florescimento (Sangoi et al., 2010). A maior parte das cultivares de milho transforma o meristema apical vegetativo num primórdio de pendão floral quando a planta tem cinco a seis folhas expandidas (Ritchie et al., 1993). Como as plantas estavam entre V5 e V6 no momento da colheita do ensaio (Tabela 3), o período de maior demanda da planta por nitrogênio ainda não havia sido alcançado. Isto provavelmente mitigou os benefícios da inoculação e da fertilização nitrogenada sobre a área foliar (Tabela 4), estatura de plantas (Tabela 5) e produção de massa seca da parte aérea (Tabela 7).

CONCLUSÕES

A inoculação com *Azospirillum brasiliense* via tratamento de sementes não aumenta a área foliar e a produção de fitomassa inicial no cultivo do milho.

A VPA SCS 155 Catarina apresenta maior velocidade de desenvolvimento inicial do que o híbrido simples P30R50, produzindo maior área foliar, plantas mais altas e maior massa seca de raízes.

REFERÊNCIAS

- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F.; 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. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.13, n.2, p.158-167, 2001.
- BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizer el crecimiento vegetal bajo

condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina***. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.49-59.

BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas às raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G. Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Tópicos em Ciência do Solo**, Campinas, v.1, p. 213-234, 2000.

CAUSSE, M. ROCHER, J., PELLESCI, S., Sucrose phosphate synthase: an enzyme with heterotrophic activity correlated with maize growth. **Crop Science**, Madison, v.35, n.4, p.995-1011, 1995.

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. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.4, n.1, p.129-132, 2000.

CONCEIÇÃO, P.M.; VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; JÚNIOR, R.B.M; OLIVARES, F.B. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.4, p.545-548, 2008.

DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. **Bio Technology**, London, v.6, p.282- 286, 1988.

DÍAZ-ZORITA, M. Avaliação da produção de milho (*Zea Mays* L.) inoculado com *Azospirillum brasiliense* na Argentina. In: **Diversidade e inovações na cadeia produtiva de milho e sorgo na era dos transgênicos**. Instituto Agronômico de Campinas. Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2012. p. 529-536.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Science**, Elsevier, v. 22, p. 107-149. 2003.

DRANSKI, J.A.L.; PINTO-JUNIOR, A. S.; FRANDOLOSO, J.; GUIMARÃES, V.F.; RENAN FELIPE BELLÉ, R.F.; RODRIGUES, L.F.O.S.; DARTORA, J.; STETS, M.I.; ARAUJO, L.M.; CRUZ, L.M.; POZZEBOM, W. Desenvolvimento Inicial de Plantas de Milho em Função da Inoculação das Sementes com Diferentes Volumes de Inoculante. In: XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2012, Águas de Lindóia. **Anais...** Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2012. p. 226-232.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Brasília, 2006. 306 p.

GONÇALVES, E.D.V.; RODRIGUES, L.F.O.S.; SILVA, M.B.; MATIELLO, V.M.; BERTÉ, L.N.; MEINERZ, C.C.; GUIMARÃES, V.F. Influência Da Inoculação de *Azospirillum* brasilense em Milho Submetido a Condições de Déficit Hídrico. In: XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2012, Águas de Lindóia. **Anais...** Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2012. p. 0267-0274.

JORDÃO, L. T.; LIMA, F. F.; LIMA, R. S.; MORETTI, P. A. E. M.; PEREIRA, H. V.; MUNIZ, A. S.; OLIVEIRA, M. C. N.. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária. In: Reunião Brasileira De Fertilidade Do Solo E Nutrição De Plantas, 29 Reunião Brasileira Sobre Micorrizas, 13 Simpósio Brasileiro De Microbiologia Do Solo, 11 Reunião Brasileira De Biologia Do Solo, 2010, Guarapari. **Anais...** Viçosa: SBCS, 2010. p.4.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**. Oxford, v.7, p.39-43, 1989.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas, princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: Editora Potafós, 1997. 319p.

OLIVEIRA, A. L. M. de; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: CNPAB. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161). 2003.

RAMBO, L.; SILVA, P. R. F.; ARGENTA, G.; SANGOI, L. Parâmetros de plantas para aprimorar o manejo da adubação nitrogenada de cobertura em milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1637-1645, 2004.

RIBAUDO, C.M.; RONDANINI, D.; CURA J.A.; FRASCHINA A. Response of *Zea mays* to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 44, p. 631-634, 2001.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **How a corn plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, Special Report, v. 48, 1993. 26 p.

ROCHER, J.P.; J. L. PRIOUL, A. LECHARNY, A. REYSS, AND M. JOUSSAUME. Genetic variability in carbon fixation, sucrose-P-synthase and ADP glucose pyrophosphorylase in maize plants of differing growth rate. **Plant Physiology**, Lancaster, v.89, n.2, p. 416-420, 1989.

ROOD, S.B.; BUZZELL, R. I.; MAJOR, D. J.; PHARIS, R. P. Gibberellins and heterosis in maize quantitative relationships. **Crop Science**, Madison, v.30, n.1, p.281-286, 1990.

SANGOI, L.; SILVA, P. R. F.; ARGENTA, G., RAMBO, L. **Ecofisiologia da cultura do milho para altos rendimentos**. Lages: Graphel, 2010. 32p.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TOLLENAAR, M. Is low plant density a stress in maize? **Maydica**, v.37, p.305-311, 1992.

TOLLENAAR, M.; WU, J. Yield improvement in temperate maize is attributable to greater stress tolerance. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1597-1604, 1999.

VIEIRA, J. **Tolerância à desfolha em diferentes estádios fenológicos de cultivares de milho com bases genéticas contrastantes**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal – Área: Fisiologia e Manejo de Plantas) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2012. 83 p.