

Desenvolvimento inicial do milho em resposta à associação com bactérias diazotróficas e níveis de acidez do solo⁽¹⁾

Adriano Mitio Inagaki⁽²⁾; Vandeir Francisco Guimarães⁽³⁾; Maria do Carmo Lana⁽³⁾; Luan Fernando Ormond Sobreira Rodrigues⁽²⁾; Marla Sílvia Diamante⁽²⁾; Mônica Bartira da Silva⁽²⁾.

⁽¹⁾Trabalho executado com recursos da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de ensino Superior (CAPES).

⁽²⁾Mestrando em Produção Vegetal; Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Uniãoeste; Marechal Cândido Rondon-PR. ⁽³⁾Professor associado, Centro de Ciências Agrárias – CCA/UNIOESTE, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE - Marechal Cândido Rondon-PR. Rua Pernambuco, 1777, 85960-000; Marechal Cândido Rondon-PR.

RESUMO: Objetivou-se neste trabalho verificar a influência da associação de bactérias diazotróficas e níveis de acidez do solo no desenvolvimento inicial do milho. Foi realizado experimento em casa de vegetação, em vasos de 13 dm³, com o híbrido 30F53H. O delineamento foi de blocos ao acaso esquema fatorial 3x4, sendo um fator os níveis de acidez do solo (pH (CaCl₂) de 4,5; 5,0 e 5,5) e outro a associação com bactérias (sem inoculação; *Azospirillum brasilense* (AbV5), *Herbaspirillum seropedicae* (SmR1) e mistura das estirpes (AbV5+SmR1). A inoculação foi realizada via sementes antes da semeadura. Aos 41 DAS avaliou-se a altura de plantas (ALT), massa seca dos diversos órgãos, área foliar (AF) e teores foliares de N, P e K. A massa seca de raízes (MSR) e a ALT foi inferior em pH 4,5 resultando em maior teor foliar de P. A associação com as bactérias não influenciou a ALT, MSR e os teores foliares de N, P e K, contudo, a AF foi superior em plantas inoculadas com a mistura das estirpes (AbV5+SmR1).

Termos de indexação: *Zea mays* L, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense*.

INTRODUÇÃO

A cultura do milho apresenta destaque no Paraná. Em 2012, a região foi responsável pela produção de mais de 16 mil toneladas de milho, superando o Mato Grosso e Goiás (IBGE, 2013).

Sabe-se que para atingir elevada produtividade, o fornecimento de fertilizantes nitrogenados é de grande importância, porém eleva os custos de produção (COELHO, 2007). A utilização de bactérias diazotróficas tem sido uma alternativa na nutrição nitrogenada em diversas gramíneas, como o milho, podendo suprir parcialmente este nutriente (DÖBEREINER, 1997).

Entre as espécies de bactérias diazotróficas mais estudadas atualmente, que se associam a gramíneas destacam-se o *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* (REIS et al., 2000). Diversos são os estudos realizados para entender a capacidade de

sinergismo entre estas bactérias e espécies de gramíneas, sendo que as bactérias do gênero *Azospirillum*, são endofíticas facultativas e colonizam tanto no interior quanto nas superfícies das raízes de milho, trigo, arroz, sorgo e aveia (BALDANI et al., 1997).

Além da variabilidade de genótipos das plantas cultivadas e dos grupos endofíticos promotores de crescimento, também há outros fatores que podem influenciar neste processo, como o pH do solo. Solos mais ácidos como os de regiões de clima tropical, podem afetar a microbiota do solo, em especial os microrganismos diazotróficos. Estes enfrentam dificuldades em sobreviver, especialmente pela incapacidade em manter o pH intracelular, a fim de proteger os componentes internos das células (MACCIÓ et al., 2002).

Face ao exposto, e considerando que ainda existem poucos estudos sobre a interação da associação de bactérias diazotróficas e o pH do solo, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência da associação de bactérias diazotróficas e níveis de acidez do solo no desenvolvimento inicial do milho.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido "Prof. Dr. Mário César Lopes", no município de Marechal Cândido Rondon/PR, com as coordenadas geográficas de 54° 22' W e 24° 46' S, e altitude de 420 m.

Utilizou-se terra proveniente do horizonte A de um Argissolo Amarelo distrófico coletado no município de Iporã/PR na camada 0-20 cm. De acordo com o laudo de análise química e física do solo, tem-se: P = 4,21 mg dm⁻³; MO = 8,20 g dm⁻³; pH em CaCl₂ = 4,52; H+Al = 2,75 cmol_c dm⁻³; Al³⁺ = 0,35 cmol_c dm⁻³; K⁺ = 0,60 cmol_c dm⁻³; Ca²⁺ = 1,50 cmol_c dm⁻³; Mg²⁺ = 0,41 cmol_c dm⁻³; CTC = 5,26 cmol_c dm⁻³; V% = 47,72; Cu = 2,5 mg dm⁻³; Zn = 1,30 mg dm⁻³; Mn = 11,00 mg dm⁻³; Fe = 48,40 mg dm⁻³; 20,15% de argila, 10,57% de silte e 69,28% de areia. Para adubação do solo, não foi realizada

aplicação de nitrogênio, e em relação aos demais nutrientes foi adubado conforme Alvarez (1974).

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial 3x4, com quatro repetições. O primeiro fator foram três níveis de acidez do solo (pH (CaCl₂) 4,5; 5,0 e 5,5) e o segundo a associação com bactérias diazotróficas (sem inoculação; sementes do híbrido 30F53H inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5), sementes inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* (SmR1) e mistura das duas bactérias *A. brasilense*+*H. seropedicae* (Ab-V5+SmR1). Cada vaso de 13 dm³, com três plantas, foi considerado uma parcela experimental totalizando 48 parcelas, que foram conduzidos até 41 dias após a semeadura.

Foi realizada a curva de incubação do solo para a neutralização de 0, 30, 60, 90 e 120% da acidez potencial utilizando-se calcário com PRNT de 79,78%. Amostras de 0,25 dm³ de solos foram incubadas em sacos plásticos, por 21 dias, com teor de umidade de 80% da capacidade de campo. Após esse período foi aferido o pH e obtido os seguintes valores: pH₀= 4,39, pH₃₀= 5,75, pH₆₀= 6,90, pH₉₀= 7,51, pH₁₂₀= 7,66. Ajustou-se um modelo linear ($y = 0,0277x + 4,782$ e $R^2 = 0,91$). Para a obtenção dos tratamentos de pH (CaCl₂) do solo (4,5, 5,0 e 5,5) foram adicionados 0; 0,256 e 0,589 g dm⁻³ de calcário, respectivamente, em função da equação de regressão.

As estirpes *A. brasilense* e *H. seropedicae* foram fornecidas pelo laboratório de Bioquímica e Biologia molecular da UFPR, campus de Curitiba. Foi seguido a recomendação do volume da solução inoculadora de 4 mL para 1000 sementes, tendo a solução 10⁷ unidades formadoras de colônias mL⁻¹ (UFC mL⁻¹).

Avaliou-se a altura de plantas, com o auxílio de uma régua graduada; área foliar a partir do recorte de uma área conhecida utilizando cinco folhas por parcela; e a matéria seca dos diferentes órgãos da planta. Para tanto, as amostras foram colocadas em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 horas. Então as massas foram obtidas com auxílio de uma balança de precisão (0,0001g). Posteriormente as amostras de folhas foram moídas em moinho do tipo Willye e foram determinados os teores de N, P e K (EMBRAPA, 2009).

Os dados foram tabulados e submetidos à análise de variância pelo teste F. Quando houve efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$), com o auxílio do software SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Tabela 1** são apresentados os quadrados médios das variáveis avaliadas. Verifica-se que não houve interação significativa entre os fatores inoculação e pH do solo para nenhuma das variáveis avaliadas. A associação com as bactérias diazotróficas afetou significativamente apenas a área foliar das plantas, enquanto o pH do solo teve efeito significativo para a altura de plantas, massa seca de raízes e teor foliar de P.

Verifica-se nas figuras **1.a e 1.b** que o pH de 4,5 reduziu significativamente a massa seca de raízes e alturas das plantas de milho, enquanto o teor foliar de P foi estatisticamente superior para as plantas cultivadas nesta condição (**Figura 2.b**). Estes resultados podem ser devido à ausência da correção da acidez do solo (pH 4,5), ao ponto que, a inoculação de bactérias diazotróficas em pH mais ácido (4,5) não contribuiu para o incremento de massa seca das raízes e altura de plantas durante a fase de desenvolvimento inicial do milho. Para Siqueira e Franco (1988), as bactérias fixadoras de N₂ são pouco tolerantes a acidez, tanto no solo, como nos meios de cultura, com exceção do gênero *Acetobacter* que é capaz de se desenvolver em meio extremamente ácido (pH abaixo de 3,0).

Stamford et al., (2004) após o cultivo de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) observou redução no pH e aumento no P disponível quando aplicados os biofertilizantes de fósforo com *Acidithiobacillus*, provavelmente devido à atuação do *Acidithiobacillus* que promoveu produção de ácido sulfúrico suficiente para solubilizar fósforo da rocha fosfatada. Neste sentido, há necessidade de pesquisas em relação à utilização de bactérias diazotróficas na solubilização de fósforo no pH mais ácido tornando o fósforo mais disponível às raízes. Além disso, vale destacar que o menor desenvolvimento das plantas em pH mais baixo (4,5) pode ter resultado em maior teor de P nestes tecidos foliares desta planta.

Os teores foliares de N e K não foram influenciados significativamente com a variação dos níveis de pH do solo no presente ensaio (**Figuras 2.a e 2.c**).

Vale destaca que o teor foliar de N do milho neste ensaio não sofreu influência significativa da inoculação das sementes com bactérias diazotróficas. Roesch et al. (2006) verificaram que as bactérias diazotróficas foram inibidas por altas doses de N durante os primeiros estádios de crescimento. No entanto, a ausência total de adubação nitrogenada, como é o caso do presente estudo, também pode ter influenciado na absorção do N disponível no solo, sendo evidenciado pelo baixo teor de MO (8,20 g dm⁻³). Por outro lado o *Azospirillum* sp. desempenha papel essencial na

promoção do crescimento excretando ácido indolacético (AIA) (BASHAN et al., 2004), que pode melhorar a absorção de nutrientes e elevar a eficiência do uso do nutriente disponível (HUNGRIA, et al., 2010).

Plantas que tiveram suas sementes inoculadas com a mistura de estirpes (AbV5 (*A. brasilense*) e SmR1 (*H. seropedicae*)), apresentaram maior área foliar, principalmente quando comparada à inoculação com apenas SmR1 (**Figura 1.c**). Dartora et al. (2012) utilizando o mesmo híbrido 30F53H, encontraram resultados positivos com a inoculação de *A. brasilense*. De forma que o rendimento em massa seca por plantas inoculadas pode ser devido à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias (REIS JÚNIOR et al. 2008).

CONCLUSÕES

A massa seca de raízes e a altura de plantas foi inferior em pH 4,5 resultando em maior teor foliar de P nesta condição;

A associação com as bactérias diazotróficas não influenciou a altura de plantas, massa seca de raízes e os teores foliares de N, P e K, contudo, a área foliar foi superior em plantas inoculadas com a mistura das estirpes (AbV5+SmR1).

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsas de estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), aos INCT – Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas e à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA), pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ V. V. H. Equilíbrio de formas disponíveis de fósforo e enxofre em dois latossolos de Minas Gerais. (Dissertação) Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, p. 125, 1974.

BALDANI J. I. CARUSO, L., BALDANI, V. L. D., GOI, S., DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.911-922, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. & DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 50: 521-577, 2004.

COELHO, A. M. Manejo da Adubação Nitrogenada na Cultura do Milho. Embrapa Milho e Sorgo (Circular Técnica 96). Sete Lagoas-MG. p. 11, 2007.

DARTORA J.; GUIMARÃES, V. F. & MARINI, D.; GONÇALVES, E. D. V.; SANDER, G.; PAULETTI, D. R.; PINTO JÚNIOR, A. S. Influência de *Azospirillum brasilense* em Associação a Adubação Nitrogenada em Genótipos de Milho. Poster. In XXIX Congresso Nacional De Milho e Sorgo, Águas de Lindóia, p. 1608-1613, 2012.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economics contributions. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, p. 771-774, 1997.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2.ed. Brasília, Informação Tecnológica, p.628, 2009.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M. S. & PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, Netherlands, 331: 413-425, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Levantamento sistemático da Produção Agrícola março de 2013. Rio de Janeiro 26: 1-84, 2013.

MACCIÓ, D.; FABRA, A. & CASTRO, S. Acidity and calcium interaction affect the growth of *Bradyrhizobium* sp. and the attachment to peanut roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 201-208, 2002.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In...45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p.255-258, jun. 2000.

REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Critical Review in Plant Sciences*, Amsterdam, 19: 227-247, 2000.

REIS JÚNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; BALDANI, A. T. & SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32: 1139-1146, 2008.

ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L.; PASSAGLIA, L. P. M.; SELBACH, P. A.; SÁ, E.L.S d& CAMARGO, F. A. O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Dordrecht, 22: 967-974, 2006.

SIQUEIRA, J. O. & FRANCO, A. A. Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS, Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236p.

STAMFORD N. P.; SANTOS C. E. R. S.; STAMFORD JÚNIOR, W. P. & DIAS, S. L. Biofertilizantes de rocha fosfatada com *Acidithiobacillus* como adubação



XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO

28 de julho a 2 de agosto de 2013 | Costão do Santinho Resort | Florianópolis | SC

alternativa de caupi em solo com baixo P disponível.
Analytica, 9: p.48-53, 2004.

Tabela 1 - Resumo das análises de variâncias de variáveis biométricas e teores foliares de N, P e K de plantas de milho (30F53H), aos 41 dias após a semeadura, em resposta à associação de bactérias diazotróficas e a níveis de pH do solo. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012.

FV	GL	Quadrados médios						
		ALT	AF	MSF	MSR	N	P	K
Bloco	3	97,23	19,98	0,51	1,30	1,33	0,10	3,73
(I)	3	13,67 ^{ns}	103,48*	0,51 ^{ns}	0,26 ^{ns}	2,27 ^{ns}	0,08 ^{ns}	6,32 ^{ns}
(pH)	2	30,97*	15,56 ^{ns}	0,22 ^{ns}	3,51**	0,55 ^{ns}	0,80**	2,12 ^{ns}
(I) x (pH)	6	8,00 ^{ns}	23,79 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,48 ^{ns}	1,31 ^{ns}	0,12 ^{ns}	14,57 ^{ns}
Resíduo	33	7,16	34,24	0,42	0,38	1,18	0,08	7,24
CV		4,59	21,20	15,73	13,78	15,34	14,87	11,16

FV = fonte de variação; I = inoculação; GL = graus de liberdade; AF = área foliar; ALT = altura de plantas; MSF = massa seca de folhas; MSR = massa seca de raízes; N = Nitrogênio; P = Fósforo; K = Potássio. ^{ns} não significativo; * significativo (p ≤ 0,05); ** significativo (p ≤ 0,05).

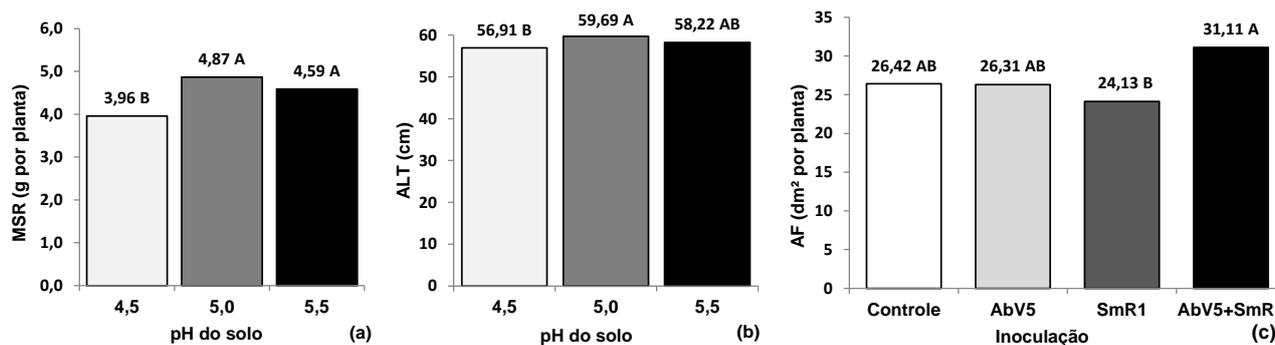


Figura 1 – Massa seca de raízes (a), altura de plantas (b) e área foliar (c) de plantas de milho (30F53H), aos 41 dias após a semeadura, em resposta à associação de bactérias diazotróficas e a níveis de pH do solo. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012.

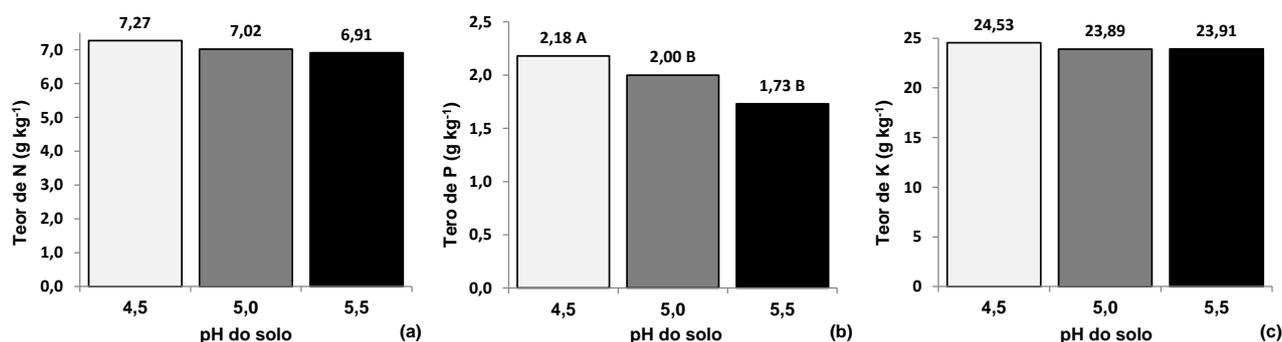


Figura 2 - Teor foliar de nitrogênio (a), fósforo (b) e potássio (c) de plantas de milho (30F53H), aos 41 dias após a semeadura, em resposta aos níveis de pH do solo. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2012.