

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**MILHO RESISTENTE AO GLIFOSATO INOCULADO  
COM *Azospirillum* sp.**

ALLAN MICHEL PEREIRA CORREIA

**DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**MILHO RESISTENTE AO GLIFOSATO INOCULADO  
COM *Azospirillum* sp.**

ALLAN MICHEL PEREIRA CORREIA

**DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL  
2017**

**MILHO RESISTENTE AO GLIFOSATO INOCULADO COM  
*Azospirillum* sp.**

ALLAN MICHEL PEREIRA CORREIA  
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> MARLENE ESTEVÃO MARCHETTI

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Dourados  
Mato Grosso do Sul  
2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

C824m Correia, Allan Michel Pereira

Milho resistente ao glifosato inoculado com *Azospirillum* sp. / Allan Michel Pereira Correia -- Dourados: UFGD, 2017.

88f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Marlene Estevão Marchetti

Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias,  
Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. *Zea mays*. 2. fixação biológica do nitrogênio. 3. herbicidas. 4. nutrição de plantas. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

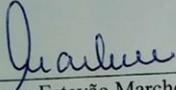
**MILHO RESISTENTE AO GLIFOSATO INOCULADO COM  
*Azospirillum* sp.**

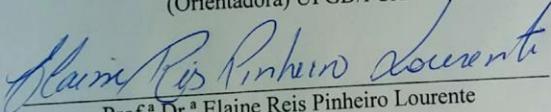
por

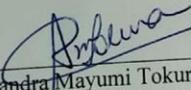
ALLAN MICHEL PEREIRA CORREIA

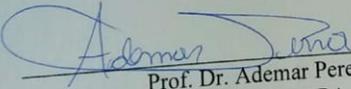
Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de  
DOUTOR EM AGRONOMIA

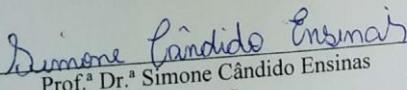
Aprovado em: / /

  
Prof.ª Dr.ª Marlene Estevão Marchetti  
(Orientadora) UFGD/FCA

  
Prof.ª Dr.ª Elaine Reis Pinheiro Lourente  
UFGD/FCA

  
Prof.ª Dr.ª Alessandra Mayumi Tokura Alovise  
UFGD/FCA

  
Prof. Dr. Ademar Pereira Serra  
EMBRAPA

  
Prof.ª Dr.ª Simone Cândido Ensinas  
UEMS

**DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais Emanuel Correia Neto e Márcia Aparecida Pereira Correia, pelo apoio e compreensão, em especial à minha mãe pela força de vontade e determinação, sem as quais nada seria realizado.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem eu sirvo e amo acima de tudo, por iluminar meus caminhos e conceder forças para lutar por meus objetivos.

A Universidade Federal da Grande Dourados, em especial a Faculdade de Ciências Agrárias pela formação acadêmica e oportunidade de realização do curso de graduação, mestrado e doutorado.

À professora Dr.<sup>a</sup> Marlene Estevão Marchetti, pela orientação e todos os ensinamentos ao longo desses onze anos, sendo um exemplo a ser seguido por toda sua competência e profissionalismo. Agradeço por toda a amizade, paciência e confiança.

Ao pesquisador Dr. Fábio Martins Mercante (*in memorian*), pela participação e colaboração na co-orientação desde a época do estágio supervisionado e mestrado, mas que infelizmente acabou nos deixando. Uma pessoa incrível, que certamente nos fará falta, descanse em paz.

Aos colegas e funcionários da Embrapa Agropecuária Oeste, pela ajuda nos trabalhos de laboratório.

Aos funcionários da Universidade Federal da Grande Dourados, pela colaboração e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela bolsa concedida que possibilitou o sustento financeiro necessário para realização deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a execução deste trabalho e minha formação, o meu reconhecimento e gratidão.

## **BIOGRAFIA**

Allan Michel Pereira Correia, filho de Emanuel Correia Neto e Márcia Aparecida Pereira Correia, nasceu em 12 de novembro de 1987, em Tupã-SP.

Ingressou no curso de Agronomia em 2006, na Universidade Federal da Grande Dourados, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo, em 2010.

Ingressou na Pós-graduação em Agronomia, na Universidade Federal da Grande Dourados, área de concentração de Produção Vegetal, obtendo o título de Mestre, em 2012.

Ingressou na Pós-graduação em Agronomia, área de concentração de Produção Vegetal, nível de doutorado, em 2013, na Universidade Federal da Grande Dourados.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	1
GENERAL ABSTRACT .....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
Referências Bibliográficas .....	6
REVISÃO DE LITERATURA.....	9
A cultura do milho .....	9
Funções e importância do N.....	10
Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas.....	12
Bactérias diazotróficas .....	13
Gênero <i>Azospirillum</i> .....	15
Benefícios da inoculação para a cultura do milho .....	16
Glifosato, inibidor da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) .....	17
Interferência do glifosato em plantas-bactérias-solo .....	19
Referências Bibliográficas .....	22
CAPÍTULO 1: Híbridos de milho resistente ao glifosato inoculados com <i>Azospirillum</i> sp.....	30
Resumo.....	30
Abstract .....	31
Introdução .....	32
Material e Métodos .....	34
Resultados e Discussão .....	38
Conclusões .....	51
Referências Bibliográficas .....	52
CAPÍTULO 2: Milho resistente ao glifosato inoculado com <i>Azospirillum</i> sp submetido à doses de glifosato .....	57
Resumo.....	57
Abstract .....	58
Introdução .....	59

Material e Métodos .....	61
Resultados e Discussão .....	65
Conclusões .....	73
Referências Bibliográficas .....	74
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1: Híbridos de milho resistente ao glifosato inoculados com <i>Azospirillum</i> sp.....	30
QUADRO 1. Atributos químicos e granulometria do solo.....	34
QUADRO 2. Nutrientes, concentrações requeridas, fontes e quantidades das mesmas, utilizadas na adubação básica do solo.....	35
QUADRO 3. Valores médios referentes as trocas gasosas e eficiência fotossintética [índice SPAD (CL), taxa fotossintética (A), transpiração (E), condutância estomática (Gs) e concentração interna de CO <sub>2</sub> (Ci), eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci), eficiência intrínseca do uso da água (A/Gs)] em função de híbridos de milho resistente ao glifosato <sup>2</sup> , inoculado e não inoculado <sup>1</sup> .....	39
QUADRO 4. Valores médios referentes a híbridos de milho resistente ao glifosato <sup>2</sup> , inoculado e não inoculado <sup>1</sup> , em função de comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA).....	43
QUADRO 5. Valores médios de massa seca de raiz (MSR, em g planta <sup>-1</sup> ) e massa seca da parte aérea (MSPA, em g planta <sup>-1</sup> ) de híbridos de milho resistente ao glifosato em função de híbridos e inoculação.....	45
QUADRO 6. Valores médios das concentrações foliares dos seis híbridos de milho resistente ao glifosato <sup>2</sup> , inoculado e não inoculado <sup>1</sup> , para N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Mn, Fe e Zn. ....	47
QUADRO 7. Valores médios das concentrações foliares de N, P, Fe e Zn de milho resistente ao glifosato em função de híbridos e inoculação.....	49
CAPÍTULO 2: Milho resistente ao glifosato inoculado com <i>Azospirillum</i> sp. submetido à doses de glifosato.....	57
QUADRO 1. Atributos químicos e granulometria do solo.....	61
QUADRO 2. Nutrientes, concentrações requeridas, fontes e quantidades das mesmas, utilizadas na adubação básica do solo.....	62
QUADRO 3. Valores médios referentes as trocas gasosas e eficiência fotossintética [índice SPAD (CL), taxa fotossintética (A), transpiração (E), condutância estomática (Gs) e concentração interna de CO <sub>2</sub> (Ci), eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci), eficiência intrínseca do uso da água (A/Gs)] em função de milho resistente ao glifosato, inoculado e não inoculado.....	65
QUADRO 4. Comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR) e massa seca da parte aérea (MSPA) em função de milho resistente ao glifosato inoculado e não inoculado.....	66
QUADRO 5. Concentrações foliares de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Mn, Fe e Zn em função de milho resistente ao glifosato inoculado e não inoculado.....	69

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2: Milho resistente ao glifosato inoculado com <i>Azospirillum</i> sp submetido à doses de glifosato .....	57
FIGURA 1. Massa seca da parte aérea de plantas de milho (g planta <sup>-1</sup> ), híbrido Status, no estágio fenológico R2, em função das doses de glifosato (kg i.a. ha <sup>-1</sup> ) .....	67
FIGURA 2. Conteúdo total de Mn (mg planta <sup>-1</sup> ) em plantas de milho, cultivar Status, no estágio fenológico R2, em função das doses de glifosato (kg i.a. ha <sup>-1</sup> ) .....	70
FIGURA 3. Conteúdo total de Fe (mg planta <sup>-1</sup> ) em plantas de milho, cultivar Status, no estágio fenológico R2, em função das doses de glifosato (kg i.a. ha <sup>-1</sup> ) .....	71

## RESUMO GERAL

CORREIA, A.M.P. **Milho resistente ao glifosato inoculado com *Azospirillum* sp.** Março de 2017. 88 f. Tese (Doutorado em Agronomia Produção Vegetal) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.

O milho é um dos principais cereais cultivados no mundo, porém apresenta desafios quanto ao correto manejo de herbicidas e da adubação. A intensidade da competição por plantas daninhas e o uso de adubos nitrogenados têm sido um dos principais responsáveis pelas excessivas doses de herbicidas e fertilizantes nitrogenados aplicados na cultura. Bactérias diazotróficas podem fixar nitrogênio atmosférico, produzir substâncias promotoras do crescimento, podendo reduzir a utilização de fertilizantes nitrogenados na cultura do milho. Para testar essa hipótese, foi realizado dois experimentos, o primeiro experimento teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de glifosato em cultivares de milho resistente ao glifosato, inoculados com *Azospirillum* sp. e no segundo avaliar o efeito das doses de glifosato sob a inoculação. Os trabalhos foram realizados em casa de vegetação. O delineamento experimental adotado no primeiro experimento foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo que os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 6 x 2, referentes à seis cultivares de milho resistente ao glifosato (Nidera 90, Nidera 92, Dekalb 330, Dekalb 340, Impacto e Status) com e sem o uso de bactérias *Azospirillum* sp., com cinco repetições. No segundo experimento o delineamento experimental adotado também foi o inteiramente casualizado, sendo que os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 5 x 2, referentes à cinco doses de glifosato (0, 0,96, 1,92, 2,88 e 3,84 kg i.a. ha<sup>-1</sup>), com e sem uso de inoculação com bactérias *Azospirillum* sp., com cinco repetições. A cultivar utilizada no experimento foi o híbrido simples Status. No estágio de pleno florescimento, 45 dias após a emergência (DAE), estágio fenológico R2, as avaliações do índice de clorofila e fotossíntese foram realizadas. Após a avaliação, as plantas foram cortadas rente ao solo, separando-se parte aérea e raízes. Foram medidos o comprimento e volume de raiz. Quantificou-se as concentrações foliares de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn. Os sintomas visíveis de fitotoxidez foram observados nas plantas, no dia seguinte à aplicação, com amarelecimento das folhas novas, nos dois experimentos. Quando houve a inoculação nas cultivares estudadas aumentaram o volume de raiz, massa seca de raiz, taxa fotossintética da cultivar Status e absorção de N, P e Fe. No segundo experimento as avaliações das trocas gasosas e a eficiência fotossintética não foram significativas para as doses avaliadas no entanto a inoculação promoveu aumento no comprimento de raiz, volume de raiz, massa seca de raiz e concentração foliar de Mn quando as plantas foram inoculadas. O glifosato quando aplicado em doses elevadas proporcionou redução da massa seca da parte aérea, teor foliar de Fe e Mn. A inoculação com a bactéria *Azospirillum* promoveu aumento dos componentes radiculares, não influenciou na fixação do N e o glifosato induziu a imobilização de Fe e Mn nas plantas, além de reduzir a massa seca da parte aérea.

**Palavras-chave:** *Zea mays*; fixação biológica do nitrogênio; herbicidas; nutrição de plantas.

## GENERAL ABSTRACT

CORREIA, A.M.P. **Glyphosate resistant maize inoculated with *Azospirillum* sp.** March 2017. 88 p. Dissertation (PhD in Agronomist) – University Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.

Maize is one of the world's major cereals, but presents challenges for the correct management of herbicides and fertilization. The intensity of weed competition and the use of nitrogen fertilizers have been one of the main factors responsible for the excessive rates of herbicides and nitrogen fertilizers applied in the crop. Diazotrophic bacteria can fix atmospheric, produce growth promoting substances, and may reduce the use of nitrogen fertilizers in corn. To test this hypothesis, this first work had the objective of evaluating the effect of glyphosate application on glyphosate resistant maize cultivars inoculated with *Azospirillum* sp. and in the second experiment to evaluate the effect of doses of glyphosate under inoculation. The work was carried out under greenhouse conditions. The treatments were arranged in 6 x 2 factorial scheme for the six glyphosate resistant maize hybrids (Nidera 90, Nidera 92, Dekalb 330, Dekalb 340, Impact and Status) with and without the use of *Azospirillum* sp. bacteria, with five replicates. In the second experiment, the experimental design was also completely randomized, and the treatments were arranged in 5 x 2 factorial scheme for five doses of glyphosate (0, 0,96, 1,92, 2,88 and 3,84 Kg a.i. ha<sup>-1</sup>), with and without inoculation with bacteria *Azospirillum* sp., five replicates. The cultivar used in the experiment was the simple hybrid Status. In the full flowering stage 45 days after emergence (DAE), phenological stage R2, chlorophyll index and photosynthesis were evaluated, after the evaluation the plants were cut close to the soil, separating aerial part and roots. Root length and volume were measured. It was quantified the leaf nutrient concentration N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn and Zn. The visible symptoms of phytotoxicity were observed in the plants, the day after the application, with yellowing of the new leaves, in both experiments. The application of glyphosate in the studied hybrids increased root volume, root dry mass, photosynthetic rate of Status hybrid and N, P, Fe uptake when inoculated. In the second experiment the gas exchange and photosynthetic efficiency were not significant, however, what promoted increasing in root length, root volume, root dry mass and leaf Mn concentration when the plants were inoculated, there was a reduction of the mass dry matter, leaf content of Fe and Mn, when glyphosate doses were high. The inoculation of the *Azospirillum* bacterium promoted increase of the root components did not have effect in the fixation of the N and the glyphosate induced the immobilization of Fe and Mn in the plants, besides reducing the dry mass of the aerial part.

**Key-words:** *Zea mays*; biological nitrogen fixation; herbicides; plants nutrition.

## INTRODUÇÃO GERAL

Com a necessidade de diminuir o uso de herbicidas e da possibilidade de obtenção de plantas menos susceptíveis a condições de estresse causadas pelos herbicidas, em 2008 ocorreu a liberação do cultivo de milho resistente ao glifosato no Brasil (CORREIA e SANTOS, 2013). No ano de 2014, a maior utilização de cultivos transgênicos ocorreu nos Estados Unidos, com área em torno de 73,1 milhões de hectares. O Brasil ocupou o segundo lugar com área de 42,2 milhões de hectares, sendo que deste total, foram cultivados 12,5 milhões de hectares com milho transgênico (JAMES, 2014).

A rápida difusão do milho (*Zea mays* L.) geneticamente modificado, resistente ao glifosato [N-(phosphonomethyl)glycine], levou ao seu cultivo em larga escala, proporcionando, assim, aumento considerável na utilização e no número de aplicações do herbicida glifosato, principalmente em pós-emergência, com três a quatro pulverizações, durante o ciclo do milho, podendo repercutir de forma negativa, inibindo a atividade da enzima nitrato redutase, reduzindo a absorção, a translocação e/ou o metabolismo de nutrientes pelas plantas tratadas. (CORREIA e SANTOS, 2013). Estima-se que o uso de herbicidas abrange aproximadamente 65% de toda a área cultivada com esse cereal no Brasil (KARAM e GAMA, 2008).

O expressivo e rápido aumento do cultivo de culturas transgênicas resistente ao glifosato é devido, principalmente, ao fato de que esta tecnologia simplifica o processo de controle de plantas daninhas e apresenta baixo custo em relação às demais opções de controle (BENBROOK, 2016).

No Brasil esta tecnologia na cultura do milho foi aprovada em 2008 pela CTNBio, apresentando grande potencial de aceitabilidade pelos agricultores, pois proporciona algumas facilidades no controle de plantas daninhas. Porém, pelo fato da liberação desta tecnologia, para utilização pelos produtores, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos que o glifosato pode causar a esta cultura, mesmo ela sendo tolerante a este herbicida (CORREIA e SANTOS, 2013).

Apesar dos benefícios proporcionados pela tecnologia do milho resistente ao glifosato, há relatos de que o glifosato interfere negativamente na eficiência nutricional de plantas que possuem o gene de resistência inserido, como a soja. Além de causar sintomas de fitotoxidez nas folhas dessa cultura, 24 horas após a aplicação de glifosato na dose de 1,95 kg i.a. ha<sup>-1</sup>, ocasionando redução na formação de

nódulos e nas concentrações totais de N, Mn, Cu, Zn e Fe (SERRA et al., 2011). O mesmo ocorreu em outro trabalho para as concentrações foliares de N, Ca, Fe e Cu (SANTOS et al., 2007). Zobiolo et al. (2010b) relatam que o glifosato pode afetar a fixação biológica do N, devido à redução da concentração de níquel, sendo esse micronutriente essencial para os micro-organismos simbióticos. O glifosato afeta a absorção e a translocação desses nutrientes, possivelmente, pela ligação e formação de complexos insolúveis com o herbicida, imobilizando os elementos (CAKMAK et al., 2009).

Na cultura do milho, também foram observados sintomas de fitotoxidez, deficiências nutricionais e redução na produtividade ocasionada pela aplicação de glifosato em híbridos resistentes ao glifosato. Correia e Santos (2013) trabalhando com herbicidas registrados para o milho, observaram redução na concentração de Fe foliar, menor massa seca de grãos e redução na produtividade, sem haver redução na concentração de Mn.

Em experimento onde se avaliou a produtividade de milho resistente ao glifosato, Reddy et al. (2010) verificaram redução da atividade da redutase do nitrato, entre 5-19%, e quando se aplicava duas vezes a dose de glifosato, esses valores variaram entre 8-42%, evidenciando que a concentração de glifosato reduz a atividade dessa enzima que é responsável pela redução do N na planta.

No Brasil, a inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas, especialmente em plantas de milho, aparece como alternativa complementar no suprimento de nitrogênio necessário à cultura, além de diminuir os custos de produção devido ao processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (FIGUEIREDO et al., 2009; BARTCHECHEN, et al., 2010; MARKS et al., 2015; FUKAMI et al., 2016).

Uma das principais limitações à utilização do *Azospirillum* na cultura do milho é a inconsistência dos resultados de pesquisa, que variam de acordo com a cultivar, as condições edafoclimáticas e a metodologia de condução dos ensaios (BARTCHECHEN et al., 2010).

Ainda que não tenha sido claramente evidenciada especificidade entre as plantas e as bactérias, há relatos de que estirpes de *A. brasilense* resultaram em incrementos no rendimento de grãos de 24% a 30% em relação ao controle não inoculado (HUNGRIA, 2010).

Seguindo relatos de que a aplicação de glifosato pode diminuir a nutrição e a inoculação de bactérias em culturas resistentes a este herbicida, objetivou-se com a realização desse trabalho avaliar o efeito da inoculação com *Azospirillum* sp. em milho resistente ao glifosato.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTCHECHEN, A.; FIORI, C. C. L.; WATANABE, S. H.; GUARIDO, R. C. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L.). **Campo Digital**, v. 5, p. 56-59, 2010.
- BENBROOK, C. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe** v. 28, n. 3, p. 1-15, 2016.
- BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; PICCININ, G. G.; ALBRECHT, L. P.; BARBOSA, M. C. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, Associated with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 58-64, 2012.
- CAKMAK, I.; YAZICI, A.; TUTUS, Y.; OZTURK, L. Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in nonglyphosate resistant soybean. **European Journal of Agronomy**, Montpellier, v. 31, n. 3, p. 114-119, 2009.
- CORREIA, N. M.; SANTOS, E. A. Teores foliares de macro e micronutrientes em milho tolerante ao glyphosate submetido à herbicidas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 3165-3172, 2013.
- DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v.17, n.10, p.1023-1029, 2013.
- DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio, **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 3, p.376-382, 2010.
- DUKE, S. O.; REDDY, K. N.; BU, K.; CIZDZIEL, J. V. Effects of glyphosate on the mineral content of glyphosate-resistant soybeans (*Glycine max*). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6764-6771, 2012.
- EKER, S.; OZTURK, L.; YAZICI, A.; ERENOGLU, B.; ROMHELD, V.; CAKMAK, I. Foliar-applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 26, p. 10019-10025, 2006.
- JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. **ISAAA**, n. 49, p. 30-46, 2014.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, n.1-2, p.413-425, 2010.

LANA, M. C.; DARTORA, J.; MARINI, M.; HANN, J. E. Inoculation with *Azospirillum* associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, n.3, p. 399-405, 2012.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Editora Ceres, 2006. 631p.

MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; OLLERO, F. J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitooligosaccharides (LCOs). **AMB Express**, v. 5, n. 71, p. 1-11, 2015.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano setorial de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas para a consolidação de uma economia de baixa emissão de carbono na agricultura: plano ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono)**. Brasília: MAPA/ACS, 2012. 173 p.

NANDULA, V. K.; REDDY, K. N.; RIMANDO, A. N.; DUKE, S. O.; POSTON, D. H. Glyphosate-resistant and-susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.55, n.9, p.3540-3545, 2007.

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODECK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1139-1146, 2008.

SANTOS, J. B.; PROCÓPIO, S. O.; JACQUES, R. J. S.; KASUYA, M. C. M.; SILVA, A. A. Comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. sob efeito de componentes do glyphosate potássico. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 34, n. 2, p. 201-206, 2003.

SANTOS, J. B.; JACQUES, R. J. S.; PROCÓPIO, S. O.; KASUYA, M. C. M.; SILVA, A. A.; SANTOS, E. A. Efeitos de diferentes formulações comerciais de glyphosate sobre estirpes de *Bradyrhizobium*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 2, p. 293-299, 2004.

SANTOS, J. S.; VIANA, T. O.; JESUS, C. M.; BALDANI, V. L. D.; FERREIRA, J. S. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 78-85, 2015.

SERRA, A. P.; MARCHETTI, M. E.; CANDIDO, A. C. S.; DIAS, A. C. S.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Influência do glifosato na eficiência nutricional do

nitrogênio, manganês, ferro, cobre e zinco em soja resistente ao glifosato. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 77- 84, 2011.

SILVA, A. C.; SANTOS, J. B.; KASUYA, M. C. M.; SILVA, A. A.; MANABE, A. Micorrização e épocas de dessecação de *Brachiaria brizantha* no desenvolvimento da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, p. 271-277, 2006.

TUFFI SANTOS, L. D.; FERREIRA, F. A.; BARROS, N. F.; SIQUEIRA, C. H.; SANTOS, I. C.; MACHADO, A. F. L. Exsudação radicular do glyphosate por *Brachiaria decumbens* e seus efeitos em plantas de eucalipto e na respiração microbiana do solo. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 143-152, 2005.

TUFFI SANTOS, L. D.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, F. A.; OLIVEIRA, J. A.; BENTIVENHA, S.; MACHADO, A. F. L. Exsudação radicular de glyphosate por *Brachiaria decumbens* e seus efeitos em plantas de eucalipto. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 369-374, 2008.

VINHAL-FREITAS, I. C.; RODRIGUES, M. B. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. **Agropecuária Técnica**, v. 31, n. 2, p. 143-154, 2010.

VOGEL; G. F.; MARTINKOSKI, L.; RUZICKI, M. Efeitos da utilização de *Azospirillum brasilense* em poáceas forrageiras: Importâncias e resultados. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 10, n. 1, p. 01-06, 2014.

## REVISÃO DE LITERATURA

### A cultura do milho

O Brasil ocupa a terceira posição no ranking em produção de grãos de milho, sendo superado apenas por EUA e China. A estimativa de área plantada com milho na safra 2016/2017 foi de 16,5 milhões de hectares com uma produção de 87,4 milhões de toneladas de milho, 31,4% superior a safra passada (CONAB, 2017).

O milho é um dos cereais mais cultivado no mundo, após trigo e arroz. A cultura apresenta ampla possibilidade de usos, sendo as principais destinações: nutrição animal, alimentação humana, indústria química e produção de etanol (AWIKA, 2011).

A cultura do milho apresenta elevada variabilidade genética que lhe confere adaptabilidade às diversas condições climáticas, podendo ser cultivado do sul ao norte do Brasil, em regiões de baixa altitude até acima de 2500 m (TEIXEIRA et al., 2002). A seleção de materiais genéticos adaptados à região de cultivo é determinante ao sucesso da lavoura, pois cerca de 50% do rendimento final de grãos está em função da escolha adequada do cultivar (GODOY et al., 2013).

Na região Centro-Oeste, o Estado de Mato Grosso do Sul apresentou produtividade média de 5.198 kg ha<sup>-1</sup>, produtividade superior ao ano anterior que foi de 3.730 kg ha<sup>-1</sup>. A boa expectativa de preços do cereal e o baixo estoque do produto no mercado estadual impulsionaram o plantio, aliado à maior disponibilidade de cultivares adaptadas, alto potencial produtivo e o maior aporte tecnológico para a cultura, contribuíram para esse aumento da produtividade do cereal no Estado (CONAB, 2017). Além desta expressiva área cultivada no território brasileiro, a cultura gera empregos no setor agrícola e tem grande importância pela utilização tanto na alimentação humana, nutrição animal e indústria química.

A baixa produtividade do milho pode ser atribuída à escolha de híbridos inadequados à região produtora, às condições climáticas, ao baixo capital investido pelos produtores e à má utilização das tecnologias disponíveis, incluindo controle de pragas e doenças, espaçamento e densidade de plantas, manejo de fertilidade do solo, por meio de correção da acidez e adubação de semeadura e cobertura, além da época de semeadura e colheita (GOMES et al., 2007), levando dessa forma o produtor

buscar ações que visem aumentar a produtividade, como a utilização de micro-organismos capazes de disponibilizar nutrientes para a planta, por exemplo, o *Azospirillum* sp.

Outro fator associado a redução de produtividade é a fertilidade do solo, sendo o nitrogênio um dos elementos essenciais e requerido em maior quantidade pela cultura do milho, sendo necessários 17 kg ha<sup>-1</sup> de N para produção de 1 tonelada de grãos, considerando alta produção (12 t ha<sup>-1</sup>) (CANTARELLA et al., 2007). Tendo em vista a produção nacional da safra 2016/2017 de 87,4 milhões de toneladas, seriam necessários 1,48 milhões de toneladas de N.

O Brasil apresenta grande dependência externa para aquisição de fertilizantes, assim, alternativas que melhorem esse cenário ou minimizem o uso deste insumo, são extremamente importantes para o setor agrícola (FONSECA, 2014).

Visando a redução na aplicação e aumento na eficiência de utilização do N, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) aparece como alternativa para o suprimento de nitrogênio necessário à cultura (BARTCHECHEN, et al., 2010; HUNGRIA, 2010).

### **Funções e importância do N**

A exigência de nitrogênio (N) pelas plantas é consequência da sua função estrutural, visto que, este nutriente faz parte da molécula de compostos orgânicos, como os aminoácidos e proteínas, sendo ainda ativador de muitas enzimas (MALAVOLTA, 2006). A planta também depende do N para realização de diversos processos vitais, como síntese de proteína, absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular (MARSCHNER, 2012; MALAVOLTA, 2006), aumento da área foliar e nos teores de proteínas das plantas, rápido crescimento e auxílio no fornecimento de energia aos micro-organismos do solo para a decomposição da matéria orgânica (MALAVOLTA, 2006).

Tendo em vista os custos ambientais e econômicos e o fato de que o Brasil importa atualmente 75% do N utilizado na agricultura (HUNGRIA et al., 2010), se faz necessário encontrar alternativas viáveis que visem à redução no seu uso. Programas do governo têm incentivado a redução das emissões de gases de

efeito estufa oriundas das atividades agropecuárias por meio de diversas práticas, dentre elas o estímulo ao uso da fixação biológica do N (FBN) pelo Programa ABC (Agricultura de Baixo Custo) (MAPA, 2012).

As bactérias fixadoras de N e/ou promotoras do crescimento de plantas podem desempenhar um papel relevante e estratégico para garantir altas produtividades a baixo custo e com menor dependência de importação de insumos. Estima-se que a economia resultante pela inoculação com essas bactérias em gramíneas possa ser na ordem de 2 bilhões de dólares por ano (HUNGRIA et al., 2010).

A cultura do milho exporta grandes quantidades de N do solo, por isso requer maior uso de adubação nitrogenada, sendo recomendado o seu parcelamento, principalmente no milho primavera/verão, para maior eficiência de utilização, o que onera os custos de produção (MÜLLER, 2016), podendo representar de 15 a 40% dos custos variáveis da lavoura (QUEIROZ et al., 2011).

A absorção da energia radiante, pelos pigmentos fotossintéticos, a presença de gás carbônico atmosférico, água e as demais reações responsáveis pela produção de moléculas orgânicas dependem de elementos minerais, especialmente o N. A medição da clorofila é um importante parâmetro de absorção de N, pois a sua molécula apresenta quatro átomos de N no núcleo central, onde ocorre a absorção de radiação solar (TAIZ e ZEIGER, 2013). O teor de clorofila na folha é utilizado para prever o nível nutricional de N em plantas, devido ao fato da quantidade desse pigmento correlacionar-se positivamente com teor de N, pode ser medida por meio do índice SPAD (JESUS e MARENCO, 2008). Este pigmento absorve radiação na faixa de 400 a 700 nm (exceto a faixa da cor verde), e está diretamente associada ao potencial de atividade fotossintética, assim como o estado nutricional das plantas está associado, geralmente, a quantidade e qualidade da clorofila (ZOTARELLI et al., 2003).

Por ter essas características, o N é o elemento que causa maiores efeitos no aumento de produção da cultura do milho, conforme comprovado por Duete et al. (2008), Biscaro et al. (2011) e Müller et al., (2016). Além do seu efeito sobre a produtividade, o N interfere em diversas outras características da planta relacionadas ao crescimento e desenvolvimento, as quais, direta ou indiretamente, afetam a produtividade da cultura.

A quantidade necessária de N pela cultura do milho varia de acordo com estágio de desenvolvimento da planta, sendo menor no início do desenvolvimento e tendo o ápice durante o florescimento até a formação de grãos (BISCARO et al., 2011; OKUMURA et al., 2011).

### **Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas**

Embora o nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) constitua 78% dos gases atmosféricos, nenhum animal ou vegetal consegue utilizá-lo como nutriente, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos de  $N_2$ , que é uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza (HUNGRIA et al., 2010). O grupo de bactérias, que tem a capacidade de fixar  $N_2$  e convertê-lo em amônia é denominado diazotrófico e o mecanismo responsável pela incorporação de N à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (VINHAL-FREITAS e RODRIGUES, 2010).

Nas associações de gramíneas com bactérias fixadoras de N, não há formação de nódulos como acontece nas leguminosas. O que ocorre é a colonização da superfície e/ou do interior das raízes e interior da parte aérea da planta. Essas bactérias fixam o N e, posteriormente, o disponibilizam para a planta (LIN et al., 2016).

Para ocorrer a FBN, a ligação tripla de N precisa ser rompida e, em seguida, três átomos de H são ligados a cada N, formando-se  $2NH_3$  (amônia). Para isso, a planta hospedeira cede carboidrato ao micro-organismo, e esse, através de um sistema bioquímico (complexo da nitrogenase), realiza a quebra da ligação tripla do  $N_2$ , fornecendo em troca a amônia ( $NH_3$ ) à planta. Após a reação de redução, a amônia é rapidamente convertida a amônio ( $NH_4^+$ ), que é assimilado pela célula vegetal sob a forma de glutamina (HIRSCH e MAUCLINE, 2015).

Acredita-se que a redução biológica do  $N_2$  processa-se em três etapas: 1) a redução da Fe-proteína I por ferredoxinas; 2) a transferência de elétrons da Fe-proteína I para Fe-Mo proteína II; e 3) a redução propriamente dita do substrato no sítio ativo da Fe-Mo proteína (em que o  $N_2$  se liga na presença dos elétrons que serão utilizados para quebrar a tripla ligação) (HIRSCH e MAUCLINE, 2015; VINHAL-FREITAS e RODRIGUES, 2010).

Bactérias diazotróficas associadas a gramíneas excretam somente uma parte do N fixado diretamente para a planta associada; posteriormente a mineralização da matéria orgânica pode contribuir com aportes adicionais de N para as plantas. Desse modo, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias em associação com gramíneas consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas em N sendo necessário realizar adubação para atender as exigências da planta (MARKS et al., 2015). O que de acordo com Hungria et al. (2010) e Moreira et al. (2010) para a cultura do milho, mesmo se for considerada uma substituição parcial de 50% de fertilizantes nitrogenados por biofertilizantes, pode-se conseguir uma economia de cerca 52 kg ha<sup>-1</sup> de N.

### **Bactérias diazotróficas**

Na família *Poaceae*, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) é conhecida desde que a bactéria *Beijerinckia fluminensis* foi isolada da rizosfera de cana-de-açúcar. Contudo, foi somente após a descoberta de bactérias do gênero *Azospirillum* sp. que aumentou o interesse pelo estudo da FBN em gramíneas (BALDANI e BALDANI, 2005), apresentando grande potencial para serem utilizadas nos inoculantes como fonte de N (LIN et al., 2016).

As bactérias são classificadas como diazotróficas (capazes de fixar o N atmosférico) e se encontram em associações endofíticas facultativas com as gramíneas, são capazes de promover um maior crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, promovendo então melhor absorção de água e nutrientes, o que pode ocasionar incrementos na massa da parte aérea quanto de produtividade (BALDANI e BALDANI, 2005; DE-BASHAN et al. 2012).

Esses micro-organismos apresentam metabolismo de Carbono (C) e Nitrogênio (N) bem diversificado, o que aumenta suas condições de competitividade durante o processo de colonização. Quanto às fontes de C, elas apresentam uma preferência por ácidos orgânicos, como malato, piruvato e succinato, assim como uma preferência de frutose sobre glucose (QUADROS, 2009). No que se refere ao N, as principais fontes são amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>) (LIN et al., 2016).

Essas bactérias contêm o complexo enzimático da nitrogenase, sendo capazes de quebrar a tripla ligação que une os dois átomos de N e fazer a redução do  $N_2$  à amônia ( $NH_3$ ) (VOGEL et al., 2014).

O modo de ação dessas bactérias ainda não é totalmente conhecido. Existem diversos trabalhos publicados que afirmam que bactérias diazotróficas também podem aumentar a atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas (CASSÁN et al., 2008); produzir hormônios como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno (DOBBELAERE et al., 2003; RADWAN et al., 2004), os quais estimulam o crescimento principalmente de raízes, aumentando a densidade de pelos radiculares e a taxa de aparecimento de raízes secundárias, sendo que este incremento resulta numa melhora na absorção de água e nutrientes, aumentando a capacidade da planta de produzir e tolerar estresses ambientais (BALDANI et al., 2005; DOBBELAERE et al., 2003). Podem atuar, ainda, na solubilização de fosfatos e óxidos de zinco (RODRIGUEZ et al., 2004; BALDOTTO et al., 2010), onde esses micro-organismos excretam ácidos orgânicos e seus prótons associados, que atuam dissolvendo diretamente o material fosfático e os óxidos de zinco, podendo posteriormente ser disponibilizado às plantas, uma vez que esses íons são solúveis em meio ácido (VASSILEV e VASSILEVA, 2003; VESSEY, 2003).

De forma indireta essas bactérias podem atuar no controle biológico de patógenos (TORTORA et al. 2011) através de vários mecanismos como produção de chitinases, glucanases e antibiose; síntese de sideróforos, onde os sideróforos são moléculas secretadas pelos micro-organismos que sequestram Fe de baixo peso molecular e o disponibilizam para as plantas na forma de complexo sideróforo- $Fe^{3+}$ , atuando no crescimento vegetal e imobilizando o Fe que estaria disponível para a proliferação de fitopatógenos (VESSEY, 2003).

Bactérias diazotróficas, dos mais diferentes gêneros e espécies, têm sido relatadas em associação com um grande número de gramíneas (milho, trigo, arroz, cana-de-açúcar), tanto de clima tropical como em clima temperado (REIS JUNIOR et al., 2008; VINHAL-FREITAS e RODRIGUES, 2010), sendo que a possibilidade da ocorrência de aumentos significativos na produtividade e na disponibilidade de N por meio da FBN na cultura do milho tem sido descrita amplamente (BARTCHECHEN et al., 2010; HUNGRIA et al., 2010; DOTTO et al., 2010; LANA et al., 2012; BRACCINI et al., 2012; DARTORA et al., 2013; SANTOS et al., 2015).

Em geral, acredita-se que as bactérias promotoras de crescimento (BPCPs) beneficiam o crescimento das plantas pela combinação de todos esses mecanismos (DOBBELAERE et al., 2003).

### **Gênero *Azospirillum***

Discute-se que de 30 a 90% das amostras de solo coletadas no planeta contenham *A. brasilense* ou *A. lipoferum*. O potencial para uso na agricultura do gênero *Azospirillum* já foi bastante estudado, assim como sua ecofisiologia (BASHAN et al., 2004).

O gênero atualmente possui quatorze espécies identificadas: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (TARRAND et al., 1978); *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983); *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987); *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989); *A. largomobile* (DEKHILL et al., 1997); *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001); *A. oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005); *A. melinis* (PENG et al., 2006); *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007a); *A. zae* (MEHNAZ et al., 2007b); *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008); *A. picis* (LIN et al., 2009) e *A. thiophilum* (LAVRINENKO et al., 2010).

Algumas bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> ocorrem na superfície de raízes, já as espécies do gênero *Azospirillum* podem ocorrer no interior das raízes, entre os espaços intercelulares ou até dentro de algumas células da raiz, como no protoxilema, que pode ser completamente preenchido pela bactéria (FUKAMI et al., 2016). As bactérias diazotróficas *Azospirillum* sp. tem a capacidade de colonizar, além do sistema radicial, o colmo das gramíneas. Dentro das raízes a bactéria fica protegida dos estresses do solo, como competição com outros organismos, acidez do solo e deficiência de fósforo (FUKAMI et al., 2016). O fator intrínseco que determinará a maior mobilidade no solo e nas plantas será a presença de flagelos (DE WEERT et al., 2002).

Tem sido verificado que a sobrevivência do gênero *Azospirillum* no solo, na ausência das plantas hospedeiras, está relacionada a vários mecanismos fisiológicos de proteção. Tais mecanismos permitem classificar os representantes deste gênero em bactérias rizocompetentes (DEL GALLO e FENDRIK, 1994), dentre eles: produção de melanina, poli-β-hidroxibutirato (PHB) e polissacarídeos

(DEL GALLO e FENDRIK, 1994), formação de cistos (agregados celulares) e mudança na forma da célula. Segundo trabalho realizado por Bashan (2004), em plantas de sorgo que não foram submetidas ao estresse hídrico, o *Azospirillum* ocorria na forma vário, enquanto nas plantas que foram submetidas ao estresse, eles ocorriam na forma cística, preferencialmente. Quando as condições de estresse foram removidas, as células bacterianas reverteram-se para formas vário com concomitante crescimento da população. Aparentemente, a forma cística é a resposta da bactéria ao estresse hídrico na rizosfera. Os representantes do gênero *Azospirillum* são considerados bactérias endofíticas facultativas e apresentam alta sobrevivência no solo (BALDANI et al., 2005).

### **Benefícios da inoculação para a cultura do milho**

Na maioria dos casos, a inoculação com *Azospirillum* proporciona aumento de massa seca, de produção de grãos e de acúmulo de N nas plantas, particularmente quando relacionada a genótipos não melhorados em presença de baixa disponibilidade de N (MARINI et al., 2015; OSÓRIO et al., 2015; SANGOI et al., 2015).

As alterações morfológicas proporcionam a alongação da zona para formação de raízes e promovem dessa maneira, aumento total do tamanho da raiz e da planta e maior desenvolvimento (SILVA et al., 2004).

Silva et al. (2004) trabalhando com trigo e cevada inoculados com *Azospirillum*, observaram aumento na superfície das raízes, descrevendo diferenças entre a densidade de raízes secundárias e o surgimento das principais. As secundárias em plantas inoculadas apresentaram menor número, no entanto, maior superfície de contato.

Ocorrem importantes efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de milho. Reis Junior et al. (2008) constataram que a inoculação com *Azospirillum amazonense* proporcionou aumento significativo na produção de matéria seca e conteúdo de N nas raízes de plantas de milho cultivadas em casa de vegetação e colhidas 25 dias após o plantio. Braccini et al. (2012) verificaram relativo aumento na produção de massa seca com a inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense*. Dobbelaere et al. (2003) observaram aumento nos

teores de N, P e K nas folhas de milho ao trabalharem com bactérias do gênero *Azospirillum*.

O número de trabalhos com inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas cresceu muito nos últimos anos, e, apesar dos resultados animadores, a utilização de inoculantes contendo essas bactérias como uma prática usual na agricultura requer análise crítica cuidadosa devido à alta variabilidade observada, geralmente, na resposta de plantas de diferentes genótipos sob condições edafoclimáticas distintas (OLIVEIRA et al., 2006).

### **Glifosato, inibidor da EPSPs da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs)**

Os herbicidas inibidores da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) agem inibindo esta enzima na rota de síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais fenilalanina, tirosina e triptofano, que são precursores de outros produtos, como a lignina, alcaloides, flavanóides e ácidos benzóicos.

O mecanismo de ação do glifosato está ligado à inibição da enzima EPSPs (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), necessária na via do ácido chiquímico, que é usada na síntese de vários metabólitos das plantas (NANDULA et al., 2007). Essas moléculas inibem a EPSPs por competição com o substrato PEP (fosfoenolpiruvato), impedindo a transformação do chiquimato em corismato (DUKE e POWLES et al., 2008).

Apresentam amplo espectro de controle, praticamente não há seletividade, sistêmico, com exceção das culturas modificadas geneticamente ou com tolerância ao produto. Os inibidores de EPSPs são aplicados em pós-emergência, por não apresentarem atividade no solo, devido à adsorção aos colóides do solo e degradação microbiana (DUKE e POWLES et al., 2008).

A resistência do milho ao herbicida glifosato é devido à expressão da enzima EPSPs, extraído da estirpe CP4 *Agrobacterium* sp, mesmo método realizado na cultura da soja (PADGETTE et al., 1995). As plantas transgênicas têm menor afinidade à ação do herbicida porque expressam a mesma capacidade da enzima de ser resistente ao glifosato, no entanto é tóxico aos micro-organismos que realizam a fixação biológica do N<sub>2</sub> (FBN), pois as bactérias diazotróficas são desprovidos da

resistência adquirida por meio dessa enzima, reduzindo até mesmo a quantidade desse nutriente assimilado pela planta (ZABLOTOWICZ e REDDY, 2007).

Ainda, a utilização de glifosato e de sua característica em formar quelatos tanto no solo como nas plantas (EKER et al., 2006), tem sido relacionada com a imobilização de nutrientes. A frequente aplicação desse herbicida induziu a deficiência de N, Fe, Zn, Cu e Mn em plantas resistentes ao glifosato, como a soja (CAKMAK et al., 2009; SERRA et al., 2011; DUKE et al., 2012).

A aplicação de herbicida pode interferir negativamente sobre alguns micro-organismos do solo, associados diretamente às plantas (particularmente fungos formadores de micorrizas e bactérias fixadoras de nitrogênio), e que, no solo, desenvolvem papel importante, livres ou quando em simbiose com espécies vegetais (SANTOS et al., 2003, 2004; SILVA et al., 2006); além de causar sintomas de fitotoxidez na planta-alvo (invasora) e na planta-não alvo (cultura econômica) adjacente; afeta a atividade microbiana ao atingir o solo, podendo entrar em contato com a planta por meio das raízes e dos exsudatos liberados pelas plantas (TUFFI SANTOS et al., 2005, 2008).

Investigando o potencial de transferência do glifosato, via aplicação foliar, liberado de raízes de plantas resistentes e não-resistentes para folhas de plantas suscetíveis em sistema de hidroponia e em solo, Neumann et al. (2006) observaram que o uso do herbicida, em pós-emergência, induziu o aumento de concentração de chiquimato, reduzindo o teor de clorofila das folhas.

Outros trabalhos em soja RR indicam que o aumento da dose do herbicida pode provocar reduções da taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática (ZOBIOLE et al., 2010abc) e clorofila (ZOBIOLE et al., 2011).

O glifosato é recomendado na cultura do milho resistente ao glifosato de 15 a 30 dias após a emergência, no estágio V3-V4, pois se aplicado antes deste período pode afetar a germinação da semente e a emergência das plântulas de milho, provocando assim, a morte das plantas (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2003) e perdas no rendimento de 10 a 90% (KOZLOWSKI et al., 2009).

A partir da formação do corismato, vários outros metabolitos secundários são formados, entre estes temos tetrahydrofolato (THF), ubiquinona e vitamina K, que são essenciais para a vida da planta. A fenilalanina, além de participar da biossíntese de proteínas, é também substrato para a via do fenilpropanóide que produz numerosos produtos secundários de plantas, tais como antocianinas, lignina,

promotores e inibidores de crescimento e compostos fenólicos. Muitos destes, implicados na defesa da planta contra doenças e pragas. O triptofano é precursor do ácido indolilacético (IAA), hormônio vegetal necessário para expansão celular, manutenção da dominância apical e muitos outros processos regulatórios (RADWAN, et al., 2004).

### **Interferência do glifosato em plantas-bactérias-solo**

De modo geral, o herbicida não é metabolizado pela planta, sendo assim a maior parte da concentração do glifosato chega ao solo em sua forma primária (TONI et al., 2006). Por ele não ser metabolizado nas plantas, sua principal degradação é feita por micro-organismos, tendo seu principal metabólito o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (RUBIO et al., 2016).

O glifosato entra no solo através da pulverização direta e, quando aplicado, espera-se que após sua ação o composto seja completamente degradado e eliminado do ambiente. Parte do composto que não atinge o alvo é depositado no solo e desse modo, ocorrem processos que determinam seu destino final (MORAES e ROSSI, 2010). Para o glifosato no solo os processos mais importantes incluem: formação de complexos em água com íons metálicos de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , absorção e metabolismo por plantas, biodegradação por micro-organismos e sorção com sedimentos ou partículas suspensas em água e solo (PRATA et al., 2003).

A sorção é um processo físico-químico de interação praguicida-sedimento-água que varia de acordo com o tipo de sólidos no solo e características físico-químicas do praguicida. Sabe-se que, quanto menor a solubilidade de uma molécula em água, maior é sua capacidade de sorção no solo. Entretanto, o comportamento do glifosato contraria esta regra, por ser um composto altamente solúvel em água, mas com grande capacidade de sorção (MORAES e ROSSI, 2010). A sorção desse composto se apresenta em duas fases: a primeira é rápida, correspondendo a maior parte da retenção do glifosato, seguida por um longo período de degradação (MORAES e ROSSI, 2010).

Esse fenômeno de adsorção reduz parte de sua ação potencial levando ao aumento das quantidades de glifosato utilizadas. Uma vez adsorvido, o glifosato pode permanecer como resíduo no ambiente até sua completa mineralização,

processo que pode durar dias ou meses, dependendo das características do solo, como textura, pH, conteúdo de carbono orgânico, entre outras (TONI et al., 2006).

A aplicação de herbicidas sobre culturas que realizam simbiose com bactérias fixadoras de N atmosférico pode prejudicar a eficiência na assimilação desse nutriente (SANTOS et al., 2005). Esses prejuízos devem-se à interferência do herbicida no metabolismo do microssimbionte, na planta hospedeira ou em ambos, quando em associação (ARRUDA et al., 2001). Santos e Flores (1995) observaram que o herbicida glifosato ocasionou redução no tamanho das células de *Azotobacter vinelandii* e *Azotobacter chroococcum*.

Procópio et al. (2011) avaliando a toxicidade de 18 herbicidas registrados para a cultura da cana-de-açúcar inoculado à bactéria *Azospirillum*, observaram redução na velocidade de crescimento (maior tempo de geração), mas não alterando a FBN. O trabalho foi realizado in vitro, o que em solo, provavelmente, esse contato do herbicida com a bactéria não interfira.

Essa interferência que o glifosato proporciona ocorre quando ele age sobre a biossíntese de aminoácidos ou rotas metabólicas comuns a micro-organismos e plantas (ARRUDA et al., 2001; SANTOS et al., 2006). O glifosato pode gerar efeito fitotóxico, podendo afetar a eficiência no uso da água, atividade fisiológica e o balanço nutricional (ZOBIOLE et al., 2010a; SERRA et al. 2011). Até mesmo o acúmulo de compostos da degradação na planta, pode afetar a produtividade da cultura e à qualidade das sementes, seja fisiológica ou sanitária (DUKE et al., 2003).

Qualquer estresse causado às plantas, conforme salientado por Taiz e Zeiger (2013), acarreta efeito negativo sobre o crescimento e desenvolvimento normal das espécies vegetais. O efeito fitotóxico mencionado poderia levar ao menor incremento na massa das sementes, o que promoveria sementes mal formadas e deficientes, afetando o seu desempenho fisiológico após a colheita (MARCOS FILHO, 2005).

Zablotowicz e Reddy (2007) observaram redução da biomassa de raízes de soja RR com aplicação de dose de glifosato entre 20-25% quando comparadas ao controle. Outros autores também obtiveram resultados negativos, com diferentes doses de glifosato (REDDY et al., 2000; KING et al., 2001), promovendo reduções na massa da parte aérea e massa seca de raiz. Zobiolo et al. (2010a), trabalhando com aplicação de glifosato em diferentes estádios de desenvolvimento em soja RR,

observaram que a aplicação antecipada (V2), foi mais afetada do que aplicações tardias (V4 e V6), havendo diminuição da massa seca de raiz.

A toxicidade do glifosato às células de bactérias fixadoras de nitrogênio pode ser atribuída a três efeitos: a) inibição da enzima EPSPs e consequente inabilidade celular para a síntese de aminoácidos aromáticos; b) gasto excessivo de energia (adenosina trifosfato e fosfoenolpiruvato) para a produção de ácidos hidroxibenzóicos, como forma de “consumo” do chiquimato acumulado na célula; e c) toxicidade dos ácidos hidroxibenzóicos produzidos a partir do chiquimato (ZABLOTOWICZ e REDDY, 2007).

Assim, a redução da atividade da EPSPs pelo glifosato diminui a produção de triptofano, tirosina e fenilalanina, o que compromete a síntese de proteínas e, por consequência, o crescimento celular (RADWAN, 2004). Esse efeito é comprovado quando a adição desses aminoácidos ao meio de cultura contendo o glifosato permite que as células retomem o crescimento (LIU et al., 2006).

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; MOURA, A. B. Behavior of *Bradyrhizobium japonicum* strains under different herbicide concentrations. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 19, n. 1, p. 111-117, 2001.

AWIKA, J. M. Major cereal grains production and use around the world. In: AWIKA, J. M.; PIRONEN, V.; BEAN, S. (eds.). Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion. Washington: ACS Symposium Series: **American Chemical Society**, v. 1089, p.1-13, 2011.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 77, n.3, 2005.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; PIO VIANA, A.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar vitória durante aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 349-360, 2010.

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

BARTCHECHEN, A.; FIORI, C. C. L.; WATANABE, S. H.; GUARIDO, R. C. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L.). **Campo Digital**, v. 5, p. 56-59, 2010.

BISCARO, G. A.; MOTOMIYA, A. V. A.; RANZI, R.; VAZ, M. A. B.; DO PRADO, E. A. F.; SILVEIRA, B. L. R. Desempenho do milho safrinha irrigado submetido a diferentes doses de nitrogênio via solo e foliar. **Revista Agrarian**, Dourados-MS, v.4, n.11, p.10-19, 2011.

BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; PICCININ, G. G.; ALBRECHT, L. P.; BARBOSA, M. C. Seed inoculation with *Azospirillum brasiliense*, Associated with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 58-64, 2012.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (eds.). **Fertilidade do Solo**, Viçosa: SBCS, cap. 7, p 375-470, 2007.

CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2008. 276 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, v. 4 Safra 2016/17 - Quinto levantamento**. Brasília: CONAB, 2017. 166 p.

DE-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ J-P, BASHAN Y. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation-a comprehensive evaluation. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 171-89, 2012.

DE WEERT, S.; VERMEIREN, H.; MULDER, I. H.; KUIPER I.; HENDRICKX, N.; BLOEMBERG, G. V.; VANDERLEYDEN, J.; DE MOT R.; LUGTENBERG, B. J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 1173-1180, 2002.

DEL GALLO, M.; FENDRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: Okon, Y. (Ed.). *Azospirillum* plant association. **CGC Critical Reviews in Plant Science**. Boca Raton, p. 57-7, 1994.

DEKILL, S.B., CAHILL, M., STACKBRANDT, E. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 72-77, 1997.

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

DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C.; TRIVELIN, P. C. O.; AMBROSANO, E. J. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (<sup>15</sup>N) pelo milho em LATOSSOLO VERMELHO. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 161-171, 2008.

DUKE, S. O.; RIMANDO, A. M.; PACE, P. F.; REDDY, N. K.; SMEDA, R. J. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 51, p. 340-344, 2003.

DUKE, S. O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**. v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

ECKERT, B., WEBER, O. B., KIRCHHOF, G., HALBRITTER, A., STOFFELS, M., HARTMANN, A. *Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 17-26, 2001.

FONSECA, L. M. F. **Inoculação com estirpes de *Azospirillum* e adubação nitrogenada no acúmulo de nutrientes e produtividade de milho**. 2014. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas, 2014. 47 f.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 3, p. 1-15, 2016.

GODOY, C. L.; MIRANDA, G. V.; DeLIMA, R. O.; SOUZA, L. V.; GALVÃO, J. C. C.; SANTOS, I. C. Methods to classify maize cultivars in use efficiency and response to nitrogen. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 5, p. 699-705, 2013.

GOMES, R. F.; SILVA, A. G.; ASSIS, R. L.; PIRES, F. R. Efeito de níveis e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agronômicos da cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 931-938, 2007.

HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H. The Importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition. **Advances in Applied Microbiology**, v. 93, p. 45-71, 2015.

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 Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

JESUS, S. V.; MARENCO, R. A. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 38, n. 4, dez. 2008.

KHAMMAS, K. M., AGERON, E., GRIMONT, P. A., KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov. a nitrogenfixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, v. 140, p. 679-693, 1989.

KING, C. A.; PURCELL, L. C.; VORIES, E. D. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. **Agronomy Journal**, Madison, v. 93, p. 176-186, 2001.

KOZLOWSKI, L. A.; KOEHLER, H. S.; PITELLI, R. A. Épocas e extensões do período de convivência das plantas daninhas interferindo na produtividade da cultura do milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, p. 481-490, 2009.

LAVRINENKO K., CHERNOUSOVA, E., GRIDNEVA, E., DUBININA, G. AKIMOV, V., KUEVER, J., LYSENKO, A., GRABOVICH, M. *Azospirillum thiophilum* sp. a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 2832-2837, 2010.

LIN, S. Y., YOUNG, C. C., HUPFER, H., SIERING, C., ARUN, A. B., CHEN, W. M., LAI, W. A., SHEN, F. T., REKHA, P. D., YASSIN, A. F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 761-765, 2009.

LIN, SY.; LIU, YC.; HAMEED, A.; HSU, YH.; HUANG, HI.; LAI, WA.; YOUNG, CC. *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 1453-1458, 2016.

- LIU, P. W.; IVANOV, I. I.; FILLEUR, S.; GAN, Y.; REMANS, T.; FORDE, B. G. Review Nitrogen Regulation of Root Branching. **Annals of Botany**, London, v. 97, p. 875-881, 2006.
- LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D.; GARCÍA y GARCÍA, A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Seletividade de herbicidas para a cultura de milho (*Zea mays*) aplicados em diferentes estádios fenológicos da cultura. **Planta Daninha**, Viçosa, v.21, n.3, p.413-419, 2003.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; HARI, K.; SARAVANAN, V. S.; SA, T. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Pesticides Biochemistry Physiology**, v. 84, n. 2, p. 143-154, 2006.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.
- MAGALHÃES, F. M. M, SOUTO, S. M., KUYKENDALL J. R., DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 417-430, 1983.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.
- MARINI, D.; GUIMARÃES, V. F.; DARTORA, J.; LANA, M. C.; PINTO JÚNIOR, A. S. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasiliense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n.1, p. 117-123, 2015.
- MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; OLLERO, F. J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasiliense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitooligosaccharides (LCOs). **AMB Express**, v. 5, n. 71, p. 1-11, 2015.
- MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3.ed., London: Academic Press, 2012. 672p.
- MEHNAZ, S. WESELOWSKI, B., LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogenfixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 620-624, 2007a.
- MEHNAZ, S. WESELOWSKI, B., LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2805-2809, 2007b.
- MORAES, P. V. D.; ROSSI, P. Comportamento ambiental do glifosato. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, n. 3, p. 22-35, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

MÜLLER, T. M.; SANDIN, I. E.; RODRIGUES, J. D.; NOVAKOWISKI, J. H.; BASI, S.; KAMINSKI, T. H. Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases corn yield. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p.210-215, 2016.

NEUMANN, G.; KOHLS, S.; LANDSBERG, E.; STOCK-OLIVEIRA SOUZA, K.; YAMADA, T.; RÖMHELD, V. Relevance of glyphosate transfer to non-target plants via the rhizosphere. **Journal for Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v. 20, p. 963-969, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, J. I.; URQUIAGUA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugar cane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria, **Plant and Soil**, v.284, p.23-32, 2006.

OSÓRIO, C. R. W. S.; BARDIVIESSO, D. M.; SOUZA, E. I. S.; LEITE, R. C.; LEAL, A. J. F.; SOUZA, H. M. Milho RR submetido a diferentes manejos de herbicidas e adubação foliar. **Nativa**, v. 3, n. 2, p. 78-82, 2015.

OKUMURA, R. S.; MARIANO, D. C.; ZACCHEO, P. V. C. Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 2, p. 226-244, 2011.

PADGETTE, S.R. KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D. B.; LAVALLEE, B. J.; TINUS, C. N.; RHODES, W. K.; OTERO, Y. I.; BARRY, G. F.; EICHHOLTZ, D. A.; PESCHKE, V. M.; NIDA, D. L.; TAYLOR, N. B.; KISHORE, G. M. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1451-1461, 1995.

PENG, G., WANG, H., ZHANG, G., HOU, W., LIU, Y., WANG, E. T., TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses Grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1263-1267, 2006.

PRATA, F.; CARDINALI, V. C. B.; LAVORENTI, A.; TORNISIELO, V. L.; REGITANO, J. B. Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorus levels. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 1, p. 175-180, 2003.

PROCÓPIO, S. O.; FERNANDES, M. F.; TELES, D. A.; SENA FILHO, J. G.; CARGNELUTTI FILHO, A.; VARGAS, L.; SANT'ANNA, S. A. C. Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 29, p. 1079-1089, 2011.

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

QUEIROZ, A. M.; SOUZA, C. H. E.; MACHADO, V. J.; LANA, R. M. Q.; KORNDORFER, G. H.; SILVA, A. A. Avaliação de diferentes fontes e doses de nitrogênio na adubação da cultura do milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, n.3, p. 257-266, 2011.

RADWAN, T. E. S. E. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, p.987-994, 2004.

REDDY, K. N.; HOAGLAND, R. E., ZABLOTOWICZ, R. M. Effect of glyphosate on growth, chlorophyll, and nodulation in glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) varieties. **Journal of New Seeds**, Londres, v. 2, n. 3, p. 37-52, 2000.

REINHOLD, B., HUREK, T., FENDRIK, I., POT, B., GILLIS, M., KERSTERS, K., THIELEMANS, S., DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. a nitrogenfixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 43-51, 1987.

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODECK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1139-1146, 2008.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum spp.* **Naturwissenschaften**, v.91, p.552-555, 2004.

RUBIO, A. J.; BERGAMASCO, R.; YAMAGUCHI, N. U. Remoção do herbicida glifosato utilizando carvão ativado impregnado com compostos metálicos de prata e cobre para a melhoria da qualidade da água. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 20, n. 1, p. 450-455, 2016.

SANGOI, L.; DA SILVA, L. M. M.; MOTA, M. R.; PANISON, F.; SCHMITT, A.; DE SOUZA, N. M.; GIORDANI, W.; SCHENATTO, D. E. Desempenho agrônômico do milho em razão do tratamento de sementes com *Azospirillum sp.* e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 39, p. 1141-1150, 2015.

SANTOS, A.; FLORES, M. Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 349-352, 1995.

SANTOS, J. B.; FERREIRA, E. A.; KASUYA, M. C. M.; DA SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O. Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. **Crop Protection**, v. 24, n. 6, p. 543-547, 2005.

SANTOS, J. B.; SILVA, A. A. COSTA, M. D.; JAKELAITIS, A.; VIVIAN, R.; SANTOS, E. A. Ação de herbicidas sobre o crescimento de estirpes de *Rhizobium tropici*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 457-465, 2006.

SERRA, A. P.; MARCHETTI, M. E.; CANDIDO, A. C. S.; DIAS, A. C. S.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Influência do glifosato na eficiência nutricional do nitrogênio, manganês, ferro, cobre e zinco em soja resistente ao glifosato. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 77- 84, 2011.

SILVA, A. A. O.; FELIPE, T. A.; BACH, E. E. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Conscientiae Saúde**, São Paulo, v. 3, p. 29-35, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artemed, 2013. 954 p.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967-980, 1978.

TEIXEIRA, F. F.; ANDRADE, R. V.; OLIVEIRA, A. C.; FERREIRA, A. S.; SANTOS, M. X. Diversidade no germoplasma de milho coletado na região nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.1, n. 3, p. 59-67, 2002.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 829-833, 2006.

TORTORA M, DIAZ-RICCI JC, PEDRAZA R. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n.4, p. 275-286, 2011.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, n.5-6, p.435-440, 2003.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VINHAL-FREITAS, I. C.; RODRIGUES, M. B. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. **Agropecuária Técnica**, v. 31, n. 2, p. 143-154, 2010.

XIE, C., YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1435-1438, 2005.

YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W. A.; REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, M. H.; CHEN, W. M.; YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 959–963, 2008.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean. **Crop Protection**, Stoneville, v. 26, p. 370-376, 2007.

ZOBIOLE, L. H. S.; KREMER, R. J.; OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J. Glyphosate affects photosynthesis in first and second generation of glyphosate-resistant soybeans. **Plant Soil**, Crawley, v. 336, p. 251-265, 2010a.

ZOBIOLE, L. H. S.; OLIVEIRA JR., R. S.; KREMER, R. J.; CONSTANTIN, J.; YAMADA, T.; CASTRO, C.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA JR., A. Effect of glyphosate on symbiotic N<sub>2</sub> fixation and nickel concentration in glyphosate resistant soybeans. **Applied Soil Ecology**, Stillwater, v. 44, p. 176-180, 2010b.

ZOBIOLE, L. H. S.; OLIVEIRA JR., R. S.; HUBER, D. M.; CONSTANTIN, J.; CASTRO, C.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA JR., A. Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans. **Plant Soil**, v. 328, p. 57-69, 2010c.

ZOBIOLE, L. H. S.; KREMER, R. J.; OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J. Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 53-60, 2011.

ZOTARELLI, L.; CARDOSO, E. G.; PICCININ, J. L.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; TORRES, E.; ALVES, B. J. Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1117-1122, 2003.

## CAPÍTULO 1: HÍBRIDOS DE MILHO RESISTENTE AO GLIFOSATO INOCULADOS COM *Azospirillum* sp.

### RESUMO

A bactéria *Azospirillum brasilense* produz hormônios para as plantas e também é capaz de fixar nitrogênio atmosférico e, quando inoculada na cultura do milho torna-se uma prática promissora para o desenvolvimento da planta e para o incremento de produtividade. O efeito do glifosato sobre esses micro-organismos ainda não é claro, embora ele apresente característica quelante podendo ocasionar a imobilização de nutrientes como Fe e Mn. Objetivou-se com a realização deste experimento avaliar o efeito da aplicação de glifosato em híbridos de milho resistente ao glifosato, inoculados com *Azospirillum* sp. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo que os tratamentos consistiram de seis híbridos de milho resistente ao glifosato (Nidera 90, Nidera 92, Dekalb 330, Dekalb 340, Impacto e Status), com e sem uso de inoculação com bactérias *Azospirillum* sp., com cinco repetições. Os vasos plásticos de 5 dm<sup>3</sup> foram preenchidos com solo previamente peneirado. No estágio de pleno florescimento, 45 dias após a emergência (DAE), estágio fenológico R2, avaliações do índice de clorofila e fotossíntese foram realizadas. Após a avaliação as plantas foram cortadas rente ao solo, separando-se parte aérea e raízes. Foram medidas o comprimento e volume de raiz. Houve a quantificação das concentrações foliares de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn. Os sintomas visíveis de fitotoxidez foram observados nas plantas, no dia seguinte à aplicação, com amarelecimento das folhas novas. Os híbridos utilizados apresentaram diferenças para as características avaliadas (volume de raiz, massa seca de raiz e massa seca da parte aérea), destacando-se o híbrido Status. No geral, as plantas que foram inoculadas foram superiores as não inoculadas, em todas as características avaliadas. A inoculação da bactéria *Azospirillum* promoveu aumento dos componentes radiculares, não influenciou na fixação do N e o glifosato induziu a imobilização de Fe e Mn nas plantas, além de reduzir a massa seca da parte aérea.

**Palavras-chave:** *Zea mays*; fixação biológica do nitrogênio; bactérias diazotróficas; herbicidas.

## CHAPTER 1: GLYPHOSATE-RESISTANT MAIZE HYBRIDS INOCULATED WITH *Azospirillum* sp.

### ABSTRACT

The bacterium *Azospirillum brasilense* produces hormones for plants and is also capable of fixing atmospheric nitrogen, which when inoculated in maize cultivation becomes a promising practice for the development of the plant and for increasing productivity. The effect of glyphosate on these microorganisms is not yet clear, although it has a chelating characteristic that can cause the immobilization of nutrients such as Fe and Mn. To test this hypothesis, the experiment aimed to evaluate the effect of glyphosate application on glyphosate resistant maize hybrids inoculated with *Azospirillum* sp. the treatments consisted of six hybrids of glyphosate resistant maize (Nidera 90, Nidera 92, Dekalb 330, Dekalb 340, Impact and Status), with and without the use of inoculation with bacteria *Azospirillum* sp., with five replicates. The 5 dm<sup>3</sup> plastic vessels were filled with previously sifted soil. At the full flowering stage, 45 days after emergence (DAE), R2 phenological stage, chlorophyll index and photosynthesis were evaluated. After the evaluation the plants were cut close to the soil, separating the shoots and roots. Root length and volume were measured. There were quantification of the foliar concentrations of N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn and Zn. The visible symptoms of phytotoxicity were observed in the plants, the day after the application, with yellowing of the new leaves. The hybrids used showed differences for the evaluated characteristics (root volume, root dry mass and dry shoot mass), with emphasis on the hybrid Status. In general, the plants that were inoculated were superior to those not inoculated, in all evaluated characteristics. The inoculation of the *Azospirillum* bacterium promoted increase of root components, did not influence N fixation and glyphosate induced immobilization of Fe and Mn in the plants, besides reducing the dry mass of the shoot.

**Key-words:** *Zea mays*; biological nitrogen fixation; diazotrophic bacterias; herbicides.

## INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivado no mundo. O Brasil é responsável por apenas 8,7% da produção mundial de milho (equivalente a 91,5 mil toneladas de milho em 2017) e ocupa a terceira colocação entre os países produtores, atrás apenas dos Estados Unidos e China. O Estado de Mato Grosso do Sul contribui com 15% da produção nacional (USDA, 2017).

Pertencente à família Poaceae, o milho é originário de regiões tropicais e possui metabolismo C4 de assimilação de carbono e, portanto, alta eficiência fotossintética, menor ponto de compensação de CO<sub>2</sub> e necessita de maior consumo de ATP (Adenosina trifosfato) para fixar o CO<sub>2</sub> (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Para suprir essa demanda de energia e alcançar altos rendimentos de grãos é necessário o uso de alguns recursos, um destes é o investimento na nutrição das plantas, de forma a suprir suas necessidades. Neste contexto, o nitrogênio (N) é um dos elementos necessários em maior quantidade para o funcionamento adequado das plantas, pois faz parte, por exemplo, de nucleosídeos de fosfato e aminoácidos, que compõe a estrutura dos ácidos nucléicos e das proteínas (TAIZ e ZEIGER, 2013).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada pelas bactérias diazotróficas, também vem sendo utilizada como recurso adicional na adubação nitrogenada (biofertilizantes) e tem recebido destaque nas práticas de adubação. Este N fixado pode ser disponibilizado para a cultura, melhorando a nutrição da planta, aumentando sua produção e minimizando os custos (QUEIROZ, 2014).

Um exemplo destas bactérias são as do gênero *Azospirillum*, que tem sido utilizado na agricultura, como promotoras do crescimento de plantas (BPCP), em busca de uma combinação entre maior suprimento de nitrogênio e aumentos na produção vegetal (FUKAMI et al, 2016). Essa combinação se dá através de alterações no sistema radicular, como aumento do comprimento e volume das raízes (CASSÁN et al., 2009; DARTORA et al., 2013), maior formação de pelos radiculares (CASSÁN et al., 2009), hormonais (CHOIX et al., 2014) e de suprimento de nitrogênio (FLORES et al., 2010), contribuindo para elevar o acúmulo de biomassa na parte aérea, além de alta produtividade (RODRIGUES et al., 2014).

Com a introdução do sistema de plantio direto no Brasil, a implementação de culturas resistentes ao glifosato, juntamente com aplicações estratégicas do herbicida não-seletivo glifosato [N-(phosphonomethyl)glycine] para controlar as plantas daninhas, facilitou a adoção de práticas conservacionistas dentro das áreas produtoras e tornou-se um método genérico de manejo de controle (JENKINS et al., 2017).

As aplicações de glifosato tornaram-se cada vez mais constantes no manejo de plantas daninhas, além de apresentar alta adsorção dentro do solo (meia-vida de 1,7 a 142 dias). Deste modo, o glifosato é detectado, assim como o seu metabolito secundário, o Aminometilfosfônico (AMPA), em águas superficiais de regiões onde ocorrem aplicações regularmente. Assim, a detecção de glifosato e AMPA em águas superficiais implica que, por estar presente na água do solo, ele interage com a rizosfera e as comunidades microbianas do solo e suas enzimas extracelulares, que estão envolvidas nos passos iniciais da degradação dos restos culturais (JENKINS et al., 2017).

No Brasil, poucos estudos têm focado as interações entre genótipos de milho, bactérias diazotróficas e uso de glifosato. Em muitos casos, a ausência de resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas tem sido atribuída ao uso de linhagens inadequadas. Há consenso de que o genótipo da planta é o fator-chave para obtenção dos benefícios oriundos da FBN, aliado à seleção de estirpes eficientes (FUKAMI et al., 2016).

Apesar de muitos anos de pesquisa, ainda se observam respostas muito variáveis, um número baixo dessas bactérias no solo e sua baixa utilização pelos agricultores, o que mostra a importância e justifica a realização de experimentos, visando elucidar todas essas variáveis. Dessa forma, com a realização desse trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação de glifosato em híbridos de milho resistentes ao glifosato, inoculados com *Azospirillum* sp.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido durante o período de janeiro a abril de 2014, sob condições controladas em casa de vegetação, na Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO), localizada no município de Dourados-MS, nas coordenadas de latitude 22° 11' 45" S, longitude de 54° 55' 18" W e com 446 metros de altitude.

A unidade experimental foi constituída de vasos com capacidade de 5,0 dm<sup>3</sup> de solo, que após a coleta foi seco ao ar e peneirado em malha de 5 mm para eliminação dos torrões. O solo utilizado é classificado como Latossolo Vermelho Distroférico (SANTOS et al., 2014) de textura muito argilosa, o qual foi coletado na camada de 0 a 20 cm, em área sem cultivo por dois anos, localizada próximo a área experimental da CPAO. O solo foi analisado para a quantificação dos atributos químicos e granulometria, segundo Claessen (1997) (Quadro 1).

QUADRO 1. Atributos químicos e granulometria do solo.

pH	M.O	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	m
CaCl <sub>2</sub>	g kg <sup>-1</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----							-----%-----	
5,1	41,44	8,8	0,44	8,7	2,7	0,0	5,8	11,84	17,7	67	0
Areia					Silte			Argila			
-----					g kg <sup>-1</sup> -----						
129					198			673			

M.O. (Método TOC); P, K, Cu, Fe, Mn e Zn (Método Mehlich); Ca, Mg e Al (Método KCl); H+Al (acidez potencial); SB (soma de bases trocáveis); CTC (capacidade de troca de cátions a pH 7,0); V (porcentagem de saturação por bases da CTC a pH 7,0); m (porcentagem de saturação por alumínio).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo que os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 6 x 2, referentes à seis cultivares de milho resistente ao glifosato (Nidera 90, Nidera 92, Dekalb 330, Dekalb 340, Impacto e Status) com e sem inoculação com bactérias *Azospirillum* sp., com cinco repetições.

A inoculação das sementes com o *Azospirillum* sp. foi realizada na semeadura, sendo utilizada a dose de 100 mL ha<sup>-1</sup> (100 mL/15 kg de semente) de inoculante, cuja concentração da bactéria por mililitros é de 2x10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia (UFC). As cepas da bactéria foram: AbV5 e AbV6. Após a semeadura realizou-se a adubação com solução nutritiva modificada de Norris et al.,

(1964) (Quadro 2). Em relação ao N fertilizante, foi fornecida uma dose inicial de 15 mg dm<sup>-3</sup> de N na semeadura e 30 mg dm<sup>-3</sup> de N em cobertura, tendo como fonte a uréia.

Foram semeadas cinco sementes por vaso, que foram previamente desinfestadas com hipoclorito e, sete dias após a emergência das plantas foi realizado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso, uniformes e equidistantes.

QUADRO 2. Nutrientes, concentrações requeridas, fontes e quantidades das mesmas, utilizadas na adubação básica do solo.

Nutriente		
Tipo	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Fonte
P	0,05	Fosfato de potássio Dibásico Anidro - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (18,4%P)
P	0,1	Fosfato monopotássico - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (11,5%P)
K	0,15	Cloreto de potássio - KCl (49,8%K)
Ca	0,34	Sulfato de cálcio - CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (18%Ca)
Mg	0,49	Sulfato de magnésio - MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (9,5%Mg)
B	0,04	Ácido bórico - H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (17%B)
Cu	0,001	Sulfato de cobre* - CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (25%Cu e 13%S)
Fe	0,12	Sulfato ferroso* - FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (19%Fe e 12%S)
Mn	0,01	Sulfato de manganês* - MnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (27,8 %Mn)
Mo	0,001	Molibdato de amônio* - (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O (39%Mo)
Zn	0,44	Sulfato de zinco* - ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (21%Zn e 11%S)

Norris et al. (1964), modificado.

\* Reagentes p.a.

Os vasos foram mantidos úmidos, por meio de irrigação com água destilada, para manter a saturação de água próxima à 70% da capacidade de campo. O volume de água aplicado foi estimado com base na densidade aparente (Dap) e no volume de poros (Vp). A solução nutritiva foi aplicada duas vezes por semana (EMBRAPA, 1997).

No momento da aplicação do herbicida glifosato, os vasos foram colocados no exterior da estufa, sendo aplicado 0,96 kg i.a. ha<sup>-1</sup> em todos os tratamentos, formulado com o sal de isopropilamina de glifosato (480 g i.a L<sup>-1</sup>). Na operação de aplicação de herbicida no experimento, foi utilizado pulverizador costal pressurizado com CO<sub>2</sub>, à pressão constante de 2,5 kgf cm<sup>-2</sup>, acoplado a barra de pulverização, composta de quatro bicos tipo cone, trabalhando com volume de calda de equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup>. As condições externas eram: temperatura do ar de 25,8 a 27,8°C, umidade relativa do ar de 87 a 80%, nebulosidade de 60 a 40%, sem vento. As plantas de milho tinham de três a quatro folhas totalmente desenvolvidas (V3) no momento da aplicação.

A quantificação do índice de clorofila por meio do índice SPAD (CL) foi realizada no estágio de pleno florescimento aos 45 DAE (V18), por meio de leituras com o clorofilômetro da marca Minolta, modelo SPAD 502. As leituras foram realizadas em folhas situadas no terço médio da planta, sendo determinado em três pontos situados no meio da folha amostrada, e a 2 cm de uma das margens da folha, no período da manhã, entre 8 e 10h (ARGENTA et al., 2001).

Nas avaliações das trocas gasosas e eficiência fotossintética foram avaliadas as seguintes características: taxa fotossintética (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs) e concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci). As medidas foram realizadas utilizando-se analisador de gases no infravermelho (IRGA), marca ADC, modelo LCA PRO (Analytical Development Co. Ltd, Hoddesdon, UK). As avaliações foram realizadas no período da manhã, entre 8 e 11h, amostrando-se folhas completamente expandidas e localizadas no terço médio do colmo, sendo considerado apenas os dados medidos quando o fluxo fotossintético de fótons (FFF) era entre 400-700 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, isto é, quando em níveis saturantes para a fotossíntese. A partir dos dados de trocas gasosas foram calculadas as seguintes relações: eficiência intrínseca do uso de água (A Gs<sup>-1</sup>) e eficiência instantânea de carboxilação (A Ci<sup>-1</sup>) (ZHANG et al., 2001).

Após as avaliações do índice de clorofila e fotossíntese, as plantas foram cortadas rente ao solo, separando-se parte aérea e raízes, que foram lavadas em água destilada sobre uma peneira, para avaliações agronômicas. Foram determinados o comprimento de raiz utilizando régua graduada em milímetros para a medida da maior raiz e o volume de raiz foi obtido através do método de deslocamento de água. Para tal utilizou-se uma proveta graduada, onde acrescentou-se um volume de água

conhecido e em seguida mergulharam-se as raízes na proveta com água, sendo o volume radicular correspondente ao volume de água deslocado na proveta, expresso em  $\text{cm}^3$  (MARTINS et al., 2011).

Após a determinação do comprimento e volume de raiz, a parte aérea e as raízes foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a  $65^\circ\text{C}$ , até peso constante e, em seguida, os materiais foram pesados para quantificar a massa seca da parte aérea e da raiz. As partes aéreas foram moídas em moinho tipo Willey e acondicionada em sacos, para a quantificação dos teores de N, que foram submetidas à digestão sulfúrica (método micro Kjeldahl). Para os demais nutrientes (P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn) foi realizado digestão nitroperclórica, segundo metodologia proposta por Malavolta et al. (1997).

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico R commander e os pressupostos do modelo foram confirmados pelos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade de variâncias (Hartley) (R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2010). Quando os valores de F foram significativos ( $p \leq 0,05$ ), as médias das inoculações foram comparadas pelo teste F e as médias das cultivares foram comparadas pelo teste de Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliações das trocas gasosas e taxa fotossintética

Nas avaliações das trocas gasosas e eficiência fotossintética, o uso de *Azospirillum* aumentou a taxa fotossintética (A), transpiração (E) e a concentração interna de CO<sub>2</sub> (Quadro 3). As demais variáveis não foram influenciadas.

O índice de clorofila (CL), transpiração (E), condutância estomática (Gs) e eficiência intrínseca do uso da água (A/Gs) das plantas de milho foram semelhantes entre os híbridos avaliados. Entretanto, a taxa fotossintética (A), a concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci) e eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci) foram influenciados diferentemente pelo uso do glifosato.

Embora nesse experimento não tenha apresentado resultados significativos dos híbridos e da inoculação das plantas para o índice de clorofila tanto, Jordão et al. (2010) avaliando o teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum brasiliense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo de *Brachiaria ruziziensis*, observaram diferença para o índice de clorofila. Por outro lado, Morais (2016), avaliando a resposta de plantas de milho à inoculação de *A.brasiliense*, não encontraram diferença no teor relativo de clorofila.

O efeito do glifosato sobre a taxa fotossintética (A) depende do híbrido estudado, porém, o efeito da inoculação sobre esta variável não depende do híbrido. O híbrido Status (7,98  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) apresentou taxa fotossintética 54,05% maior que o Nidera 92 (5,18  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Quadro 3). Em relação à inoculação das plantas de milho, as plantas que receberam inoculação apresentaram taxa fotossintética superior em 18,16% quando comparadas as plantas que não receberam inoculação, proporcionando maior crescimento e desenvolvimento da planta, contribuindo para um maior índice de área foliar e acúmulo de carboidratos em função da fotossíntese (MALAVOLTA, 2006).

QUADRO 3. Valores médios referentes às trocas gasosas e eficiência fotossintética [índice SPAD (CL), taxa fotossintética (A), transpiração (E), condutância estomática (Gs) e concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci), eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci), eficiência intrínseca do uso da água (A/Gs)], em função de híbridos de milho resistente ao glifosato<sup>2</sup>, inoculado e não inoculado<sup>1</sup>.

Tratamento	CL	A	E	Gs	Ci	A/Ci	A/Gs
	índice spad	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	vpm	$\frac{\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}}{\text{vpm}}$	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{mol}}$
<i>Inoculação</i>							
Não Inoculado	59,11 <sup>ns</sup>	6,00 B	1,08 B	0,05 <sup>ns</sup>	160,80 B	0,04 <sup>ns</sup>	165,35 <sup>ns</sup>
Inoculado	61,14	7,09 A	1,39 A	0,06	185,13 A	0,04	128,42
<i>Híbridos</i>							
NS 90	61,87 <sup>ns</sup>	6,48 AB	1,08 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>	173,00 AB	0,04 AB	161,37 <sup>ns</sup>
NS 92	57,87	5,18 B	1,11	0,04	189,60 A	0,03 B	134,78
DK 330	58,32	7,08 AB	1,19	0,05	168,40 B	0,05 A	149,72
DK 340	58,01	6,23 AB	1,36	0,07	173,30 AB	0,04 AB	134,22
IMPACTO	61,41	6,30 AB	1,29	0,07	162,30 B	0,04 AB	108,45
STATUS	63,27	7,98 A	1,40	0,06	171,50 AB	0,05 A	193,10
Média	60,13	6,54	1,24	0,06	173,02	0,04	146,89
CV%	10,21	22,22	22,98	51,88	8,60	27,12	76,50

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra para inoculação, nas colunas, não diferem entre si pelo teste F a 5%.

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra para os híbridos, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

O aumento na taxa fotossintética nas plantas inoculadas está relacionado com a capacidade de suporte do crescimento das bactérias mesmo na presença de herbicidas, pois a planta utiliza com maior eficiência os recursos presentes no meio. Em condições de estresse, parte da energia disponível ao organismo é despendida para manter mecanismos celulares e bioquímicos de tolerância ao estressor, em detrimento do crescimento, reduzindo o coeficiente de rendimento microbiano (SCHIMEL et al., 2007; JACQUES et al., 2010).

Os híbridos de milho não apresentaram efeito significativo para ( $p \geq 0,05$ ) para a transpiração das folhas (E), com média de  $1,24 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , houve efeito significativo da inoculação das plantas (Quadro 3). Quando as plantas foram inoculadas a taxa de transpiração das plantas aumentou em 28,70% em relação às plantas sem inoculação, demonstrando que apresentaram seus estômatos abertos.

A planta, quando em maiores níveis de luminosidade e água disponível, tende a aumentar sua transpiração, gerando uma diferença de potencial de água entre a planta e o solo, possibilitando a entrada de água, mantendo o fluxo constante dentro dos vasos condutores e, conseqüentemente, a turgidez, além de garantir também adequada nutrição mineral. Outro ponto importante no processo transpiratório é o resfriamento foliar, garantindo abertura estomática para entrada de CO<sub>2</sub> e manutenção da fotossíntese (BULEGON et al., 2016).

Em condições adversas ocorre à perda de solutos das células-guarda, que provoca perda de água e redução da turgidez, causando o fechamento estomático ou pelo aumento dos níveis de ácido abscísico, provocado pela desidratação moderada do mesófilo, que induz o fechamento dos estômatos e como consequência reduz a transpiração, fotossíntese e o consumo de assimilados nas folhas (TAIZ e ZEIGER, 2013), as plantas inoculadas apresentaram maior volume e massa seca de raiz, o que permite explorar melhor a água e nutrientes disponíveis no solo, permitindo que seus estômatos permanecessem abertos.

Verifica-se a inoculação das plantas e a interação não apresentaram efeito significativo ( $p \geq 0,05$ ) para condutância estomática (Gs) dos híbridos. Isso geralmente ocorre pela abertura dos estômatos, o qual é influenciado por diversos fatores, como disponibilidade hídrica, luz/energia, poluição e herbicidas usados no controle de plantas daninhas que, conseqüentemente, reduz a taxa de transpiração (TAIZ e ZEIGER, 2013).

A inoculação não influenciou os valores de transpiração (E) e condutância estomática (Gs), e estas respostas podem estar relacionadas à menor hidratação das plantas, visto que, nestas condições há menor volume de raiz e massa seca de raiz das plantas.

Segundo Bucci et al. (2008), a redução da transpiração, portanto seria uma estratégia da planta para se adequar a restrição de água. No entanto, em função do fechamento dos estômatos, ocorrem decréscimos na assimilação de gás carbônico e no rendimento quântico do fotossistema II (MARIANO et al., 2009).

Os híbridos e a inoculação apresentaram resposta significativa ( $p \leq 0,05$ ) para a concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci), não apresentando efeito da interação. O híbrido Nidera 92 apresentou diferença estatística entre os Dekalb 330 e Impacto, não apresentando diferença significativa entre os demais híbridos. Plantas inoculadas

com a bactéria foram superiores às plantas não inoculadas quanto à concentração interna de CO<sub>2</sub>.

A avaliação da Ci em estudos com inoculação é de suma importância, pois plantas colonizadas por bactérias demandam cerca de 20% mais CO<sub>2</sub>, podendo gerar concorrência com a fotossíntese e demais funções (BUNCE, 2014; KASCHUK et al., 2009, 2012). Menores taxas de CO<sub>2</sub> interno podem representar menor atividade da enzima PEP carboxilase (fosfoenolpiruvato carboxilase), levando a menor eficiência fotossintética da planta (TAIZ e ZEIGER, 2013). Essa maior demanda de CO<sub>2</sub> foi encontrada no presente estudo, principalmente quando houve a inoculação das bactérias.

A elevação na Ci remete a duas condições dentro da planta, sendo uma de forma benéfica e outra indesejada, relacionado com *A. brasiliense*. Quando se observa a manutenção da fotossíntese o aumento na Ci é desejado, mostrando que o aparato fotossintético está funcional. Porém, quando a fotossíntese está abaixo dos valores normais, representa uma deficiência no aparato fotossintético da planta, pois com o fechamento estomático causado pelo estresse eleva-se o teor de CO<sub>2</sub> na câmara subestomática, contudo a PEP carboxilase não está em plena atividade, assim o CO<sub>2</sub> não é carboxilado e incorporado no ciclo de Calvin, desta forma elevando a Ci (BULEGON et al., 2016).

Os resultados encontrados para Ci sugerem que o decréscimo na taxa fotossintética não foi consequência do seu aumento, que seria ocasionado pela queda da condutância estomática. Diversos autores relatam que a queda na taxa fotossintética foi decorrente tanto de fatores relacionados com o estômato como com o metabolismo fotossintético (AKAYA e TAKENAKA, 2001; PEIXOTO et al., 2002; BULEGON et al., 2016).

Os híbridos apresentaram efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) para eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci), no qual os híbridos Dekalb 330 e Status diferiram apenas do híbrido Nidera 92, que também apresentou menor taxa fotossintética, não diferindo dos demais, estas observações indicam que A/Ci variou de acordo com cada híbrido estudado, mesmo assim valores adequados para a cultura do milho (COELHO, 2015). A inoculação da bactéria *Azospirillum* não apresentou efeito significativo, obtendo valor médio de  $0,04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{vpm}^{-1}$ , não corroborando com resultados obtidos por Bulegon et al. (2016), que obtiveram a maior eficiência de carboxilação para o *A. brasiliense* utilizado de forma isolada. Os

autores atribuíram esse estímulo à fixação de CO<sub>2</sub> por essa bactéria, mesmo em menores concentrações internas.

A redução da taxa fotossintética em plantas não inoculadas pode ter ocorrido pelo elevado gasto energético do vegetal no processo de fixação de N, que necessita cerca de 16 ATPs para cada molécula de N<sub>2</sub> reduzida (TAIZ; ZEIGER, 2013), teoricamente demandando maiores taxas fotossintéticas e os eventos ocorridos nos tilacóides podem ser afetados pela aplicação de glifosato, interferindo na eficiência da fotossíntese, inativando o fotossistema II (P680) e a cadeia transportadora de elétrons que dará origem ao ATP e NADPH (KRAUSE e WEISS, 1991). A exposição prolongada de plantas ou organelas a condições de estresse pode resultar na foto-destruição dos pigmentos fotossintetizantes, fenômeno normalmente denominado de fotooxidação, resultando na diminuição dos teores desses pigmentos podendo levar a morte da célula ou do organismo (ARAUJO e DEMINICIS, 2009).

Não se observou efeito significativo dos híbridos e inoculação para a relação A/Gs, sendo uma característica que demonstra o quanto a planta consegue utilizar da água absorvida e converte-la em biomassa vegetal, apresentando valores médios de 146,89  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , indicando que o conteúdo hídrico disponível foi suficiente para as plantas a nível celular, não provocando danos às células guardas dos estômatos.

A queda de Gs contribui para a queda de A em plantas submetidas a estresse nutricional de Al (PEIXOTO et al., 2002), todavia outros fatores como o metabolismo fotossintético (limitação bioquímica) e transporte eletrônico (limitação fotoquímica) podem contribuir para queda de A em plantas (PEIXOTO et al., 2002; AKAYA e TAKENAKA, 2001).

### **Avaliações agronômicas dos híbridos**

Os híbridos utilizados apresentaram diferenças significativas para o volume de raiz, massa seca de raiz e massa seca da parte aérea a 5% de probabilidade, Para o comprimento de raiz não foi encontrado efeito significativo. Em relação à inoculação, houve efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) para volume de raiz e massa seca de raiz (Quadro 4). Foram ainda verificados resultados significativos

entre a interação híbridos x inoculação para as características avaliadas de MSR e MSPA.

QUADRO 4. Valores médios referentes a híbridos de milho resistente ao glifosato<sup>2</sup>, inoculado e não inoculado<sup>1</sup>, em função de comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA).

Tratamento	CR	VR	MSR	MSPA
	cm	cm <sup>3</sup>	g planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>
<i>Inoculação</i>				
Não Inoculado	16,95 <sup>ns</sup>	37,79 B	16,94 B	31,43 <sup>ns</sup>
Inoculado	18,04	46,76 A	22,57 A	32,65
<i>Híbridos</i>				
Nidera 90	18,36 <sup>ns</sup>	39,81 B	17,86 B	29,50 BC
Nidera 92	16,25	40,59 AB	19,82 B	33,93 AB
Dekalb 330	16,48	37,82 B	18,09 B	32,54 AB
Dekalb 340	17,96	44,67 AB	19,85 B	25,79 C
Impacto	16,40	40,01 B	17,94 B	34,11 A
Status	19,50	50,75 A	24,98 A	36,37 A
Média	17,49	42,27	19,76	32,04
CV%	14,49	18,35	16,69	10,63

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra para inoculação, nas colunas, não diferem entre si pelo teste F a 5%.

<sup>2</sup>Médias seguidas de mesma letra para os híbridos, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

Apesar de não ter sido observado aumento no comprimento de raízes (17,49 cm), houve aumento no volume de raízes. A produção de raízes secundárias foi observada em plantas de trigo em detrimento do comprimento de raízes (RADWAN et al., 2004). Segundo esses autores, a produção de auxina, nestas plantas, induziu o crescimento de raízes secundárias, favorecendo a absorção de água e nutrientes.

Soares et al. (2009), selecionando linhagens de milho inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio quanto à utilização de nitrogênio, por meio da avaliação de características do sistema radicular, observaram que o comprimento, volume de raiz e superfície radicular foram prejudicados quando havia baixa disponibilidade de nitrogênio, favorecendo seu crescimento nesse ambiente,

principalmente na presença de triptofano, que é precursor da biossíntese de auxinas por estas bactérias.

Os híbridos diferiram para o volume de raiz, destacando-se o híbrido Status, mas que não diferiu dos híbridos Nidera 92 e Dekalb 340. A média obtida para o híbrido Status ( $50,75 \text{ cm}^{-3}$ ) apresentou diferença de 34,19% quando comparada com o menor volume de raiz do híbrido Dekalb 330 ( $37,82 \text{ cm}^{-3}$ ) (Quadro 4), sendo um ponto importante em condições de estresse climático e falta de umidade no solo.

A quantidade do fertilizante nitrogenado aplicado foi elevada, o que prejudicou o desenvolvimento das plantas de milho para essa variável considerada e o híbrido Status foi mais tolerante do que as demais a esse efeito. Segundo Taiz e Zeiger (2013), a alta concentração de sais próxima às sementes ou raízes pode inibir a absorção de água pelas plantas, devido ao aumento da pressão osmótica que reduz o potencial osmótico e, conseqüentemente, o potencial hídrico.

Além do que a população de *Azospirillum* varia de cultivar para cultivar, em função das diferenças na composição química (quimiotaxia), visto que, cada cultivar tem um genótipo distinto, com quantidade e qualidade de exsudatos radiculares diferenciáveis (QUADROS, 2009).

Observou-se, também, que nos tratamentos inoculados o volume de raízes ( $46,76 \text{ cm}^{-3}$ ) foram estatisticamente superiores aos tratamentos não inoculados ( $37,79 \text{ cm}^{-3}$ ), representando uma diferença de 23,74%. Resultados semelhantes foram encontrados por Quadros (2009), que atribuiu este efeito à produção de auxinas pelas bactérias, que estimularam o volume de raízes, aproximadamente, de 60-80% maiores em relação aos tratamentos não inoculados, porém, nesse trabalho foram utilizadas cultivares mais e menos aptas à associação com as bactérias, além do que foram utilizadas três espécies de *Azospirillum*, que beneficiaria o processo de produção de auxinas.

Ao se desdobrar a interação híbridos x inoculação para massa seca de raiz (Quadro 5), verifica-se que os híbridos Nidera 90 e Nidera 92 tiveram o mesmo comportamento com ou sem inoculação. A inoculação, portanto, não interferiu na massa seca de raiz desses híbridos, o que indica que, a bactéria *Azospirillum* não promoveu efeito estimulante para essa característica. Os demais híbridos apresentaram diferença significativa nos tratamentos com e sem inoculação, chegando a apresentar diferença de até 83,17%, do híbrido Dekalb 340, sugerindo

que a eficiência dessas cultivares estaria relacionado à presença de um volume de raízes muito finas eficientes na absorção de nitrogênio do solo (SOARES et al., 2009).

Para a massa seca de raiz (MSR) houve efeito significativo entre os híbridos quando estes foram inoculados (Quadro 5), no qual o híbrido Status diferiu significativamente dos híbridos Nidera 90, Nidera 92 e Impacto, não diferindo estatisticamente dos híbridos Dekalb 330 e Dekalb 340. Já no tratamento sem inoculação, o híbrido Status também se destacou dos demais híbridos, só não apresentando diferença significativa entre o híbrido Nidera 92, provavelmente, está relacionada à sua adaptação às características edafoclimáticas e maior afinidade entre a bactéria-hospedeiro, permitindo maior desenvolvimento radicular e, conseqüentemente, maiores massas (REIS, 2007).

QUADRO 5. Valores médios de massa seca de raiz (MSR, em g planta<sup>-1</sup>) e massa seca da parte aérea (MSPA, em g planta<sup>-1</sup>) de híbridos de milho resistente ao glifosato em função de híbridos e inoculação.

Híbridos	MSR (g planta <sup>-1</sup> )		MSPA (g planta <sup>-1</sup> )	
	Inoculações		Inoculações	
	COM	SEM	COM	SEM
Nidera 90	19,66 Ba	16,06 Ba	28,32 BCa	30,67 ABCa
Nidera 92	20,96 Ba	18,68 ABa	34,25 ABa	33,60 BCa
Dekalb 330	21,40 ABa	14,78 Bb	36,68 Aa	28,40 BCb
Dekalb 340	25,68 ABa	14,02 Bb	25,33 Ca	26,24 Ca
Impacto	20,16 Ba	15,72 Bb	34,20 ABa	34,02 ABa
Status	27,56 Aa	22,40 Ab	37,11 Aa	35,63 Aa

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

Os resultados obtidos para massa seca da parte aérea demonstraram que apenas o híbrido Dekalb 330 aumentou o aporte de massa seca da parte aérea na presença da bactéria. Esta resposta pode estar relacionada à capacidade de a bactéria disponibilizar para a planta parte do N<sub>2</sub> fixado, ou ainda, ao acesso da planta ao N disponível no solo, em virtude da mineralização da matéria orgânica e também o N proveniente da adubação mineral. Haja vista que o nitrogênio é muito demandado pela cultura do milho, uma vez que é constituinte de aminoácidos, proteínas,

clorofila, sua maior disponibilização para a cultura pode promover incrementos no acúmulo de carboidratos pela planta (KERBAUY, 2012) (Quadro 5).

Resultados semelhantes de fitotoxidez também foram relatados por Portugal (2013), onde ele avaliou a fitotoxicidade de herbicidas pós-emergentes em dois híbridos de milho, estendendo-se até os 21 dias após a aplicação (DAA), demonstrando que nos estádios iniciais de desenvolvimento, plantas de milho apresentam maior capacidade de metabolização dos herbicidas do que nos estádios avançados de desenvolvimento vegetativo, devendo a aplicação ser realizada entre duas a seis folhas expandidas (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2003), como foi realizada nesse experimento, onde as plantas apresentavam três a quatro folhas expandidas (V3).

Como todas as plantas de milho seguem um mesmo padrão de desenvolvimento, porém o intervalo de tempo específico entre os estádios e o número total de folhas desenvolvidas podem variar entre híbridos diferentes, ano agrícola, data de plantio e local, levando até um maior período de recuperação quando aparece alguma fitotoxidez (BARRIUSO et al., 2011).

A inoculação proporcionou efeito significativo para a massa seca da parte aérea entre os híbridos (Quadro 5). O híbrido de menor massa seca da parte aérea foi a Dekalb 340 (25,33 g planta<sup>-1</sup>) que só não diferiu do híbrido Nidera 90. Esta redução pode ter sido com maior intensidade nesse híbrido em função das injúrias que apareceram no dia seguinte da aplicação de glifosato e permaneceram por 20 dias, ocasionando um estresse fisiológico nas plantas.

Segundo Chun et al. (2005), plantas sob estresse podem resultar em crescimento reduzido da biomassa da parte aérea, com ou sem aumento da biomassa radicular, podendo, assim, ser uma resposta adaptativa apresentada pela planta, maximizando a habilidade em adquirir uma quantidade maior de N do solo quando esse elemento se encontra em baixa disponibilidade, o que não ocorreu neste experimento.

Para o tratamento sem inoculação, o híbrido Status apresentou aumento na MSPA, que diferiu dos híbridos Nidera 92, Dekalb 330 e Dekalb 340, não diferindo dos híbridos Nidera 90 e Impacto. Outros trabalhos citam os benefícios da inoculação com *Azospirillum* no desenvolvimento de plantas em decorrência da produção de fitormônios por essas bactérias, essa resposta estaria ligada mais ao genótipo do que com a bactéria (QUEIROZ, 2014; MORAIS, 2016).

Os resultados obtidos confirmam que as características intrínsecas da planta e da bactéria fixadora de nitrogênio são de grande relevância para o sucesso da inoculação (MORAES et al., 2010). Dessa forma, os genótipos de milho influenciam nos resultados da simbiose (FONSECA, 2011).

### Avaliações nutricionais dos híbridos

Nas avaliações nutricionais dos híbridos de milho, apenas o manganês (Mn) e o zinco (Zn) apresentaram valores significativos ( $p \leq 0,05$ ), os demais nutrientes não foram significativos (Quadro 6). Independente do híbrido utilizado, a inoculação aumentou as concentrações foliares de nitrogênio (N), fósforo (P), manganês (Mn) e ferro (Fe), os demais nutrientes não apresentaram diferenças significativas. Foram verificados resultados significativos da interação híbridos x inoculação para os nutrientes nitrogênio, fósforo, ferro e zinco.

QUADRO 6. Valores médios das concentrações foliares dos seis híbridos de milho resistente ao glifosato<sup>2</sup>, inoculado e não inoculado<sup>1</sup>, para N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Mn, Fe e Zn.

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Fe	Zn
	g planta <sup>-1</sup>						mg planta <sup>-1</sup>			
<i>Inoculação</i>										
Não Inoculado	29,37 B	2,87 B	19,84	2,70	1,73	2,37	7,10	42,23 B	309,02 B	12,06
Inoculado	31,25 A	3,39 A	20,25	2,71	1,68	2,41	6,58	47,83 A	337,53 A	12,31
<i>Híbridos</i>										
Nidera 90	30,20	3,48	20,10	2,70	1,73	2,43	7,32	46,72 AB	299,60	13,40 A
Nidera 92	29,26	3,00	19,83	2,71	1,72	2,41	6,42	50,87 A	316,47	12,03 AB
Dekalb 330	31,07	2,76	20,30	2,68	1,73	2,36	7,08	48,25 A	347,46	12,84 AB
Dekalb 340	31,19	3,44	20,50	2,65	1,70	2,33	7,32	47,80 A	312,18	12,78 AB
Impacto	29,12	2,92	19,59	2,76	1,60	2,43	6,30	41,44 B	355,88	11,73 BC
Status	31,08	3,16	19,95	2,75	1,75	2,41	6,60	35,09 C	308,07	10,33 C
Média	30,32	3,13	20,05	2,71	1,71	2,39	6,84	45,03	323,28	12,19
CV%	8,33	21,75	7,49	5,70	6,77	5,63	23,99	9,38	14,95	8,83

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra para inoculação, nas colunas, não diferem entre si pelo teste F a 5%.

<sup>2</sup>Médias seguidas de mesma letra para os híbridos, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

A não ocorrência de efeito dos tratamentos nas concentrações foliares das plantas de milho para alguns nutrientes podem estar relacionados com a concentração disponível no solo destes elementos. Conforme análise química do solo utilizado nos vasos (Quadro 1), as concentrações para K, Ca, Mg foram de 0,44; 8,7; 2,7  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ , respectivamente, que são considerados adequados, em relação as concentrações de referência (SOUZA e LOBATO, 2004).

Correia e Santos (2013), avaliando as concentrações foliares de macro e micronutrientes em milho resistente ao glifosato submetido a herbicidas, verificaram que os tratamentos estudados também não afetaram as concentrações foliares da maioria dos nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Mn e Zn), apenas Fe e Cu foram afetados.

Os híbridos de milho Nidera 92, Dekalb 330 e Dekalb 340 apresentaram maiores concentrações foliares de Mn, não diferindo estatisticamente do híbrido Nidera 90, que por sua vez também não se diferiu do híbrido Impacto e, o híbrido Status apresentou o menor valor foliar (35,09  $\text{g planta}^{-1}$ ).

No desdobramento da interação híbridos x inoculação, verifica-se que os híbridos Impacto e Status não tiveram o mesmo comportamento com ou sem inoculação para concentração foliar de N (Quadro 7). A inoculação, portanto, aumentou a concentração foliar de N desses híbridos, o que indica que, para elas, a bactéria *Azospirillum* promoveu incrementos na fixação biológica do nitrogênio (FBN). Os demais híbridos absorveram relativamente à mesma quantidade de N, só que não reverteram esse nutriente em energia para crescimento da parte aérea e sim acumularam o nitrogênio, principalmente nos vacúolos contidos no interior das células vegetais, não apresentando especificidade pelo genótipo (DE CARVALHO, 2012).

A fixação biológica do N pode variar em razão das estirpes do inóculo do solo, condições ambientais e também com o híbrido utilizado. Trabalhos realizados em laboratório indicaram que o glifosato pode afetar as bactérias fixadoras do N, porém, quando se aplicam concentrações de glifosato muito acima daquelas utilizadas em condições de campo, o que poderia explicar as menores concentrações de N nos híbridos Impacto e Status (MALTY et al., 2006).

QUADRO 7. Valores médios das concentrações foliares de N, P, Fe e Zn de milho resistente ao glifosato em função de híbridos e inoculação.

Híbridos	N		P		Fe		Zn	
	g planta <sup>-1</sup>				mg planta <sup>-1</sup>			
	Inoculações		Inoculações		Inoculações		Inoculações	
	COM	SEM	COM	SEM	COM	SEM	COM	SEM
NS 90	30,24 Aa	27,99 Aa	3,76 Aa	3,20 Aa	287,26 ABa	311,94 Aa	14,20 Ab	12,60 Aa
NS 92	30,28 Aa	28,23 Aa	3,20 ABa	2,80 Aa	294,86 Ca	338,08 Aa	12,26 ABa	11,80 Aa
DK 330	32,62 Aa	29,53 Aa	2,48 Ba	3,04 Aa	384,68 Aa	310,24 Ab	13,38 ABa	12,30 Aa
DK 340	31,90 Aa	30,25 Aa	3,52 ABa	3,36 Aa	320,48 ABa	303,88 Aa	12,74 ABa	12,82 Aa
IMPACTO	32,30 Aa	28,11 Ab	3,52 ABa	2,32 Ab	374,74 ABa	337,02 Aa	11,86 Aa	11,60 Aa
STATUS	33,27 Aa	29,06 Ab	3,84 Aa	2,48 Ab	363,16 ABa	252,98 Ab	9,40 Bb	11,26 Aa

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

De forma semelhante a inoculação apresentou diferença para os mesmos híbridos Impacto e Status, para concentração foliar de P, sendo superiores em plantas que receberam inoculação do que as que não receberam. A inoculação, portanto, aumentou a concentração foliar de P desses híbridos, o que indica que, os benefícios da inoculação com *Azospirillum* vão além da fixação biológica do N, razão pela qual as bactérias são classificadas como promotoras do crescimento de plantas. Os demais híbridos não apresentaram diferença nos tratamentos com e sem inoculação.

Quando as plantas de milho foram inoculadas houve diferença dos híbridos Nidera 90 e Status, que apresentaram maior concentração de P nas folhas, quando comparadas com o híbrido Dekalb 330, não diferindo dos híbridos Nidera 92, Dekalb 340 e Impacto, o que poderia estar relacionado com o genótipo.

Os resultados obtidos dessa interação demonstraram que a concentração de Fe nos híbridos Dekalb 330 e Status aumentaram na presença da bactéria, indicando que a bactéria *Azospirillum* promoveu maior absorção desse nutriente nas plantas (Quadro 7). Provavelmente pelo fato da adoção da inoculação levar a uma sensibilidade enzimática ou fisiológica até mesmo em plantas resistentes ao glifosato, promovendo o estoque de Fe na forma de ferritina dentro das células (KOVÁCS et al., 2016).

No tratamento sem inoculação não houve efeito significativo dos híbridos, já no tratamento com inoculação o híbrido Nidera 92 foi o único que apresentou menor absorção na concentração foliar de Fe, demonstrando ser menos eficiente no acúmulo desse nutriente em suas folhas, principalmente na presença da

bactéria *Azospirillum*, que tem a capacidade de absorver outros nutrientes presentes em sua rizosfera (KOVÁCS et al., 2016).

A disponibilidade de Fe está relacionada com a capacidade de cada híbrido em acumular Fe na forma de ferritina, que é uma proteína de armazenamento de Fe encontrada em plantas, animais e bactérias (ZHAO, 2010). Estas proteínas tem a capacidade de armazenar uma quantidade maior de Fe na planta sem que este seja tóxico, sendo então liberado para atender as necessidades metabólicas das células em situação de deficiência da planta (LI et al., 2012; KOVÁCS et al., 2016). Nesta situação, a interferência de glifosato como imobilizador de Fe pode apresentar menor importância devido ao fornecimento de Fe através do complexo formado pela ferritina.

Para a interação de híbridos x inoculação, houve diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) para concentração foliar de Zn, no qual os híbridos Nidera 90 e Status apresentaram menor concentração foliar de Zn na presença da bactéria do que sem a presença dela, indicando que a bactéria *Azospirillum* promoveu menor absorção desse nutriente nas plantas (Quadro 7). Nonato (2016) trabalhando com inoculação de *Azospirillum* associado a concentrações crescentes de regulador vegetal, observou resultados semelhantes, onde as concentrações foliares de Zn apresentaram efeito crescente, sem a inoculação da bactéria, enquanto que os tratamentos inoculados, apresentaram uma redução do acúmulo deste nutriente.

Avaliando os híbridos, observou-se que não houve diferença significativa quando estes não foram inoculados. Embora, os híbridos Nidera 90 e Impacto apresentaram as maiores médias na concentração foliar de Zn, diferindo apenas do híbrido Status, quando houve a inoculação. Coutinho et al. (2007) trabalhando com diferentes cultivares de milho quanto à eficiência de uso em Zn, observaram que a interação de Zn x cultivar também foi significativa, indicando que os cultivares tiveram variadas necessidades de Zn para expressarem seu potencial máximo de crescimento. Sugerindo até que o requerimento de Zn para o adequado crescimento das cultivares varia com a classe tecnológica. A classificação do cultivar em classes tecnológicas deve corresponder a seu potencial genético de produção e, portanto, a sua exigência nos fatores de produção.

## CONCLUSÕES

As plantas de milho resistente ao glifosato inoculadas com *Azospirillum brasilense* mantiveram suas taxas fotossintéticas e a concentração interna de CO<sub>2</sub> mais elevadas mesmo quando submetidas ao glifosato.

Plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense*, independente do híbrido utilizado, antecipam o fechamento estomático quando comparadas às não inoculadas, reduzindo a perda de água por transpiração.

O uso de *Azospirillum brasilense* aumenta o volume de raiz, massa seca de raiz e concentração foliar de N, P, Mn e Fe.

Dentre os híbridos utilizados, o Status foi o que se destacou dos demais, apresentando maior volume de raiz, massa seca de raiz e massa seca da parte aérea, porém acumulou menores concentrações de Mn e Zn.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- AKAYA, M.; TAKENAKA, C. Effects of aluminum stress on photosynthesis of *Quercus glauca* Thunb. **Plant and Soil**, London, v.237, p.137-146, 2001.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 4, p. 463-472, 2009.
- BARRIUSO, J.; VALVERDE, J. R.; MELLADO, R. P. Effect of the herbicide glyphosate on the culturable fraction of glyphosate-tolerant maize rhizobacterial communities using two different growth media. **Microbes and Environments**. v. 26, n. 4, p. 332-338, 2011.
- BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; EGEWARTH, V. A.; SANTOS, M. G.; HELING, A. L.; FERREIRA, S. D.; WENGRAT, A. P. G. S.; BATTISTUS, A. G. Crescimento e trocas gasosas no período vegetativo da soja inoculada com bactérias diazotróficas. **Nativa**, Sinop, v.4, n.5, p.277-286, 2016.
- BUCCI, S. J.; SCHOLZ, F. G.; GOLDSTEIN, G.; MEINZER, F. D.; FRANCO, A. C.; ZHANG, Y.; HAO, G. Water relations and hydraulic architecture in Cerrado trees: adjustments to seasonal changes in water availability and evaporative demand. **Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 3, p. 233-245, 2008.
- BUNCE, J. A. Limitations to soybean photosynthesis at elevated carbondioxide in free-air enrichment and open top chamber systems. **Plant Science**, Limerick, v. 226, p. 131-135, 2014.
- CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2009.
- CLAESSEN, M. E. C. (Org.). **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. 212 p.
- COELHO, A. E. **Efeitos do *Azospirillum brasilense* em plantas de milho e trigo sob déficit hídrico**. 2015. 40 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia), Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos-SC, 2015.
- CORREIA, N. M.; SANTOS, E. A. Teores foliares de macro e micronutrientes em milho tolerante ao glyphosate submetido à herbicidas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 1, p. 3165-3172, 2013.

CHOIX, F. J.; BASHAN, Y.; MENDOZA, A.; DE-BASHAN, L. E. Enhanced activity of ADP glucose pyrophosphorylase and formation of starch induced by *Azospirillum brasilense* in *Chlorella vulgaris*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 177, p. 22-34, 2014.

CHUN, L.; MI, G.; LI, J.; CHEN, F.; ZHANG, F. Genetic analysis of maize root characteristics in response to low nitrogen stress. **Plant and Soil**, The Hague, v. 276, p.369-382, 2005.

COUTINHO, E. L. M.; DA SILVA, E. J.; DA SILVA, A. R. Crescimento diferencial e eficiência de uso em zinco de cultivares de milho submetidos a doses de zinco em um Latossolo Vermelho. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 29, n. 2, p. 227-234, 2007.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; PINTO JUNIOR, A. S.; CRUZ, L. M.; MENSCH, R. Influência do tratamento de sementes no desenvolvimento inicial de plântulas de milho e trigo inoculados com *Azospirillum brasilense*. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 12, n. 3, p. 175-181, 2013.

DE CARVALHO, R. P.; PINHO, R. G. V.; DAVIDE, L. M. C. Eficiência de cultivares de milho na absorção e uso de nitrogênio em ambiente de casa de vegetação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2125-2136, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de métodos de análises de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997. 214p.

FLORES, P.; FENOLL, J.; HELLIN, P.; APARICIO-TEJO, P. Isotopic evidence of significant assimilation of atmospheric-derived nitrogen fixed by *Azospirillum brasilense* co-inoculated with phosphate-solubilising *Pantoea dispersa* in pepper seedling. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 335-340, 2010.

FONSECA, G. G. **Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio em Minas Gerais**. 2011. 166 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal da Lavras, Lavras-MG, 2011.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 3, p. 1-15, 2016.

JACQUES, R. J. S.; PROCÓPIO, S. O.; DOS SANTOS, J. B.; KASUYA, M. C. M.; DA SILVA, A. A. Sensibilidade de estirpes de *Bradyrhizobium* ao glyphosate. **Revista Ceres**, v. 57, n.1, p. 028-033, 2010.

JENKINS, M. B.; LOCKE, M. A.; REDDY, K. N.; MCCHESENEY, D. S.; STEINRIEDE, R.W. Impact of glyphosate-resistant corn, glyphosate applications and tillage on soil nutrient ratios, exoenzyme activities and nutrient acquisition ratios. **Pest Management Science**, v. 73, p. 78-86, 2017.

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, 8., 2010, Guarapari. **Anais...** Viçosa, MG: SBCS, 2010.

KASCHUK, G.; KUYPER, T. W.; LEFFELAAR, P. a.; HUNGRIA, M.; GILLER, K. E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 41, n. 6, p.1233-1244, 2009.

KASCHUK, G.; YIN, X.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P. a.; GILLER, K. E.; KUYPER, T. W. Photosynthetic adaptation of soybean due to varying effectiveness of N<sub>2</sub> fixation by two distinct *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 76, p. 1-6, 2012.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431 p.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review Plant Physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313-349, 1991.

KOVÁCS, K.; KAMNEV, A. A.; PECHOUŠEK, J.; TUGAROVA, A. V.; KUZMANN, E.; MACHALA, L.; ZBOŘIL, R.; HOMONNAY, Z.; LÁZÁR, K. Evidence for ferritin as dominant iron-bearing species in the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 provided by low-temperature/in-field Mössbauer spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 6, p.1565-1571, 2016.

LI, M.; JIA, X.; YANG, J.; DENG, J.; ZHAO, G. Effect of tannic acid on properties of soybean (*Glycine max*) seed ferritin: a model for interaction between naturally-occurring components in foodstuffs. **Food Chemistry**, Reading, v. 133, n. 2, p. 410-415, 2012.

LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D.; GARCÍA y GARCÍA, A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Seletividade de herbicidas para a cultura de milho (*Zea mays*) aplicados em diferentes estádios fenológicos da cultura. **Planta Daninha**, Viçosa, v.21, n.3, p.413-419, 2003.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba, POTAFOS, p. 232-258, 1997.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MALTY, J. S.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.285-291, 2006.

MARIANO, K. R.; BARRETO, L. S.; SILVA, A. H. B.; NEIVA, G. K. P.; AMORIM, S. Fotossíntese e tolerância protoplasmática foliar em *Myracrodruon urundeuva* FR. ALL. submetida ao déficit hídrico. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 1, p. 72-77, 2009.

MARTINS, L. D.; RODRIGUES, W. N.; TOMAZ, M. A.; SOUZA, A. F. DE; JESUS JUNIOR, W. C. Função de crescimento vegetativo de mudas de cafeeiro conilon a níveis de ciproconazol+tiametoxam e nitrogênio. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 220-228, 2011.

MORAIS, T. P.; BRITO, C. H.; BRANDÃO, A. M.; REZENDE, W. S. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 2, p. 290-298, 2016.

MORAES, W. B.; MARTINS FILHO, S.; GARCIA, G. DE O.; CAETANO, S. DE P.; MORAES, W. B.; COSMI, F. C. Avaliação da fixação biológica do nitrogênio em genótipos de feijoeiros tolerantes a seca. **Idesia**, Arica, v. 28, n. 1, p. 61-68, 2010.

NONATO, J. J. **Nutrição, fisiologia e produtividade de soja inoculada com *Azospirillum brasilense* e reguladores vegetais**. 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava-PR, 2016.

NORRIS, O. D. Some concepts and methods in sub tropical pasture research. **Commonwealth Bureau of Pasture and Field Crops**, Maidenhead, 1964. 65p. Bulletin, 47.

PEIXOTO, P. H. P.; MATTA, F. M.; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, p. 821-832, 2002.

PORTUGAL, L. V. **Fitotoxicidade de herbicidas pós-emergentes em híbridos de milho**. 2013. 53 p. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Produção na Agropecuária), Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas-MG, 2013.

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2009.

QUEIROZ, I. D. S. **Implicações da inoculação com *Azospirillum brasiliense* e de níveis de N em milho transgênico no Cerrado**. 2014. 49f. Dissertação (Mestrado em Solos), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2014.

R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **R**: A language and environment for statistical computing. 2010. Disponível em:

<<http://softlibre.unizar.es/manuales/aplicaciones/r/fullrefman.pdf>>. Acesso em: 02 out. 2014.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Documentos n. 232, Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007.

RODRIGUES, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B.; JUNIOR, A. S. P.; KLEIN, J.; COSTA, A. C. P. R. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 31-37, 2014.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 4ª ed. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 376 p.

SCHIMEL, J. P.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1386-1394, 2007.

SOARES, M. O.; MARRIEL, I. E.; MAGALHÃES, P. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; CANTÃO, F. R. O.; DA ROCHA, M. C.; JÚNIOR, G. A. C.; MIRANDA, G. V. Discriminação de linhagens de milho quanto à utilização de nitrogênio, por meio da avaliação de características do sistema radicular. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.8 n.1, p. 93-103, 2009.

SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2 ed. Brasília: Embrapa Cerrados, 2004. 416 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artemed, 2013. 954 p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World agricultural supply and demand estimates**. Washington D. C.: World Agricultural Outlook Board, v. 563, 2017. 40 p.

ZHANG, S.; LI, Q.; MA, K.; CHEN, L. Temperature dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO<sub>2</sub> assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday higher irradiance. **Photosynthetica**, Prague, v. 39, p. 383-388, 2001.

ZHAO, G. Phytoferritin and its implications for human health and nutrition. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1800, n. 8, p. 815-823, 2010.

## CAPÍTULO 2: MILHO RESISTENTE AO GLIFOSATO INOCULADO COM *Azospirillum* sp. SUBMETIDO À DOSES DE GLIFOSATO

### RESUMO

Apesar dos benefícios proporcionados pela introdução de plantas resistentes ao glifosato, a bactéria *Azospirillum brasilense* pode sofrer o efeito do glifosato que afeta micro-organismos na rizosfera, embora ele apresente característica quelante e altamente adsorvido no solo, pode ocasionar a imobilização de nutrientes como Fe e Mn. Objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de doses de glifosato em milho resistente ao glifosato, inoculado com *Azospirillum* sp. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, sendo que os tratamentos consistiram de cinco doses de glifosato (0; 1,92; 2,88; e 3,84 kg i.a. ha<sup>-1</sup>), com e sem uso de inoculação com bactérias *Azospirillum* sp., com cinco repetições. Os vasos plásticos de 8 dm<sup>3</sup> foram preenchidos com solo previamente peneirado. No estágio de pleno florescimento, 45 dias após a emergência (DAE), estágio fenológico R2, avaliações do índice de clorofila e fotossíntese foram realizadas. Após a avaliação as plantas foram cortadas rente ao solo, separando-se parte aérea e raízes. Foram medidas o comprimento e volume de raiz. Houve a quantificação das concentrações foliares de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn. Os sintomas visíveis de fitotoxidez foram observados nas plantas, no dia seguinte à aplicação, com amarelecimento das folhas novas. As avaliações das trocas gasosas e a eficiência fotossintética não foram significativas para as doses avaliadas, no entanto a inoculação promoveu aumento no comprimento de raiz, volume de raiz, massa seca de raiz e concentração foliar de Mn quando as plantas foram inoculadas. O glifosato quando aplicado em doses elevadas proporcionou redução da massa seca da parte aérea, teor foliar de Fe e Mn. A inoculação com a bactéria *Azospirillum* promoveu aumento dos componentes radiculares, não influenciou na fixação do N e o glifosato induziu a imobilização de Fe e Mn nas plantas, além de reduzir a massa seca da parte aérea.

**Palavras-chave:** *Zea mays*; fixação biológica do nitrogênio; bactérias diazotróficas; herbicidas.

## CHAPTER 2: GLYPHOSATE-RESISTANT MAIZE INOCULATED WITH *Azospirillum* sp. SUBMITTED TO GLYPHOSATE DOSES

### ABSTRACT

Despite the benefits of introducing glyphosate-resistant plants, the bacterium *Azospirillum brasilense* can undergo the effect of glyphosate that affects microorganisms in the rhizosphere, although it has a chelating and highly adsorbed characteristic in the soil, can cause the immobilization of nutrients such as Fe and Mn. The objective of this study was to evaluate the effect of glyphosate doses on glyphosate resistant corn inoculated with *Azospirillum* sp. The experimental design was completely randomized, and the treatments consisted of five doses of glyphosate (0, 1.92, 2.88, and 3.84 kg ia ha<sup>-1</sup>), with and without inoculation with *Azospirillum* bacteria, with five replicates. The plastic vessels of 8 dm<sup>3</sup> were filled with previously sifted soil. At the full flowering stage, 45 days after emergence (DAE), R2 phenological stage, chlorophyll index and photosynthesis were evaluated. After the evaluation the plants were cut close to the soil, separating the shoots and roots. Root length and volume were measured. There were quantification of the foliar concentrations of N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn and Zn. The visible symptoms of phytotoxicity were observed in the plants, the day after the application, with yellowing of the new leaves. The gas exchange and photosynthetic efficiency were not significant for the evaluated doses; however, the inoculation promoted increase in root length, root volume, root dry mass and Mn foliar concentration when the plants were inoculated. Glyphosate, when applied in high doses, resulted in a reduction of dry mass of the shoot, leaf content of Fe and Mn. The inoculation with the *Azospirillum* bacterium promoted increase of the root components, did not influence the N fixation and glyphosate induced immobilization of Fe and Mn in the plants, besides reducing the dry mass of the aerial part.

**Key-words:** *Zea mays*; biological nitrogen fixation; diazotrophic bacterias; herbicides.

## INTRODUÇÃO

A cultura do milho atingiu aumentos expressivos de produtividade nos últimos anos, principalmente pelo uso de tecnologias recentes de melhoramento (PORTUGAL, 2013). O uso da engenharia genética, tornou viável a inserção de genes de resistência em plantas, sendo possível o desenvolvimento de plantas resistentes, a diferentes herbicidas (OSÓRIO et al., 2015).

A tecnologia de resistência de plantas ao glifosato apresenta grande importância, pois esta tecnologia insere um “*primer*” proveniente da bactéria (*Agrobacterium sp.*, cepa CP4), na qual codifica uma variante da enzima 5 enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) tornando a planta insensível a aplicação de glifosato (PADGETTE et al., 1995). Segundo Correia e Santos (2013) o milho resistente ao glifosato foi liberado no país no ano de 2010, aumentando o portfólio de ingredientes ativos registrados para o milho como a atrazina, mesotrione, nicosulfuron e tembotrione para o controle de plantas daninhas.

Apesar dos benefícios proporcionados pela introdução dessa tecnologia, têm sido relatados alguns efeitos indesejados que a aplicação de glifosato em pós-emergência pode causar em plantas que possuem o gene de resistência inserido, como influenciar o balanço nutricional, gerar efeitos fitotóxicos, afetar a eficiência no uso da água, a fotossíntese, a rizosfera, o acúmulo de biomassa, a síntese de aminoácidos e compostos secundários e, também afetar a qualidade das sementes e grãos produzidos (ZABLOTOWICZ e REDDY, 2007; SERRA et al., 2011; ZOBIOLE et al., 2010; CORREIA e SANTOS, 2013; OSÓRIO et al., 2015).

Na cultura do milho, foram observados sintomas de fitotoxidez, deficiências nutricionais e redução na produtividade ocasionada pela aplicação de glifosato em híbridos resistentes ao glifosato. Correia e Santos (2013), analisando diversos herbicidas registrados para o milho, entre eles o glifosato, notaram redução na concentração foliar de Fe, menor massa de grãos e redução na produtividade, sem haver redução na concentração de Mn.

Assim, uma das alternativas para se atingir um equilíbrio nutricional para a planta de milho resistente ao glifosato, seria a adoção de inoculantes contendo micro-organismos fixadores de nitrogênio (*Azospirillum brasiliense*). Essa técnica

vem apresentando acréscimos de absorção de N e na produtividade da cultura do milho (MARKS et al., 2015).

Seguindo relatos de que a aplicação de glifosato pode afetar culturas resistentes a este herbicida, objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de doses de glifosato em milho resistente ao glifosato, inoculado com *Azospirillum* sp.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido durante o período de outubro a janeiro de 2015, sob condições controladas em casa de vegetação, na Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO), localizada no município de Dourados-MS, nas coordenadas de latitude 22° 11' 45" S, longitude de 54° 55' 18" W e com 446 metros de altitude.

A unidade experimental foi constituída de vasos com capacidade de 8,0 dm<sup>3</sup> de solo, que após a coleta foi seco ao ar e peneirado em malha de 5 mm para eliminação dos torrões. O solo utilizado no presente estudo foi o mesmo do primeiro experimento, sendo classificado como Latossolo Vermelho Distroférico (SANTOS et al., 2014) de textura muito argilosa, o qual foi coletado na camada de 0 a 20 cm, em uma área sem cultivo por dois anos, localizada próximo a área experimental da CPAO. A análise dos atributos químicos e granulometria do solo, segundo Claessen (1997) encontram-se no Quadro 1.

QUADRO 1. Atributos químicos e granulometria do solo.

pH	M.O	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	m
CaCl <sub>2</sub>	g kg <sup>-1</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----							-----%-----	
5,1	41,44	8,8	0,44	8,7	2,7	0,0	5,8	11,84	17,7	67	0
Areia			Silte			Argila					
-----			g kg <sup>-1</sup> -----								
129			198			673					

M.O. (Método TOC); P, K, Cu, Fe, Mn e Zn (Método Mehlich); Ca, Mg e Al (Método KCl); H+Al (acidez potencial); SB (soma de bases trocáveis); CTC (capacidade de troca de cátions a pH 7,0); V (porcentagem de saturação por bases da CTC a pH 7,0); m (porcentagem de saturação por alumínio).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo que os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 5 x 2, referentes à cinco doses de glifosato (0; 0,96; 1,92; 2,88 e 3,84 kg i.a. ha<sup>-1</sup>) e com e sem uso de inoculação da bactéria *Azospirillum* sp., com cinco repetições. A cultivar utilizada foi o híbrido simples Status, em função do seu desempenho apresentado no experimento anterior.

A inoculação das sementes com o *Azospirillum* sp. foi realizada na semeadura, sendo utilizada a dose de 100 mL ha<sup>-1</sup> (100 mL / 15 kg de semente) de

inoculante, cuja concentração da bactéria por mililitros é de  $2 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC). As cepas da bactéria foram: AbV5 e AbV6. Após a semeadura realizou-se a adubação com solução nutritiva modificada de Norris et al., (1964) (Quadro 4). Em relação ao N fertilizante, foi fornecida uma dose inicial de  $15 \text{ mg dm}^{-3}$  de N na semeadura e  $30 \text{ mg dm}^{-3}$  de N em cobertura, tendo como fonte a uréia.

QUADRO 2. Nutrientes, concentrações requeridas, fontes e quantidades das mesmas, utilizadas na adubação básica do solo.

Nutriente		
Tipo	Concentração ( $\text{g L}^{-1}$ )	Fonte
P	0,05	Fosfato de potássio Dibásico Anidro - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (18,4%P)
P	0,1	Fosfato monopotássico - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (11,5%P)
K	0,15	Cloreto de potássio - $\text{KCl}$ (49,8%K)
Ca	0,34	Sulfato de cálcio - $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (18%Ca)
Mg	0,49	Sulfato de magnésio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (9,5%Mg)
B	0,04	Ácido bórico - $\text{H}_3\text{BO}_3$ (17%B)
Cu	0,001	Sulfato de cobre* - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (25%Cu e 13%S)
Fe	0,12	Sulfato ferroso* - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (19%Fe e 12%S)
Mn	0,01	Sulfato de manganês* - $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (27,8 %Mn)
Mo	0,001	Molibdato de amônio* - $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (39%Mo)
Zn	0,44	Sulfato de zinco* - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (21%Zn e 11%S)

Norris et al. (1964), modificado.

\* Reagentes p.a.

Foram semeadas cinco sementes por vaso, que foram previamente desinfestadas com hipoclorito; sete dias após a emergência das plantas foi realizado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso, uniformes e equidistantes.

Os vasos foram mantidos úmidos, por meio de irrigação com água destilada, para manter a saturação de água próxima à 70% da capacidade de campo. O volume de água aplicado foi estimado com base na densidade aparente (Dap) e no

volume de poros ( $V_p$ ), a solução nutritiva foi aplicada duas vezes por semana (EMBRAPA, 1997).

No momento da aplicação do herbicida glifosato, os vasos foram colocados no exterior da estufa para a aplicação das doses do herbicida glifosato, 0; 0,96; 1,92; 2,88 e 3,84 kg i.a.  $ha^{-1}$ , formulado com o sal de isopropilamina de glifosato (480 g i.a  $L^{-1}$ ). Na operação de aplicação de herbicida no experimento, foi utilizado um pulverizador costal pressurizado com  $CO_2$ , à pressão constante de 2,5  $kgf\ cm^{-2}$ , acoplado a uma barra de pulverização, composta de quatro bicos tipo cone, trabalhando com um volume de calda de equivalente a 200  $L\ ha^{-1}$ . As condições externas eram: temperatura do ar de 25,5 a 27,6°C, umidade relativa do ar de 88 a 81%, nebulosidade de 30 a 20%, sem vento. As plantas de milho tinham de três a quatro folhas totalmente desenvolvidas (V3).

A quantificação do índice de clorofila por meio do índice SPAD (CL) foi realizada no estágio de pleno florescimento aos 45 DAE (V18), por meio de leituras com o clorofilômetro da marca Minolta, modelo SPAD 502. As leituras foram realizadas em folhas situadas no terço médio da planta, sendo determinado em três pontos situados no meio da folha amostrada e a 2 cm de uma das margens da folha, no período da manhã, entre 8 e 10h (ARGENTA et al., 2001).

Nas avaliações das trocas gasosas e eficiência fotossintética foram avaliadas as seguintes características: taxa fotossintética (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs) e concentração interna de  $CO_2$  (Ci). As medidas foram realizadas utilizando-se analisador de gases no infravermelho (IRGA), marca ADC, modelo LCA PRO (Analytical Development Co. Ltd, Hoddesdon, UK). As avaliações foram realizadas no período da manhã, entre 8 e 11h, amostrando-se folhas completamente expandidas e localizadas no terço médio do colmo, sendo considerado apenas os dados medidos quando o fluxo fotossintético de fótons (FFF) era entre 400-700  $mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$ , isto é, quando em níveis saturantes para a fotossíntese. A partir dos dados de trocas gasosas foram calculadas as seguintes relações: eficiência intrínseca do uso de água ( $A\ Gs^{-1}$ ) e eficiência instantânea de carboxilação ( $A\ Ci^{-1}$ ) (ZHANG et al., 2001).

Após as avaliações do índice de clorofila e fotossíntese, as plantas foram cortadas rente ao solo, separando-se parte aérea e raízes, que foram lavadas em água destilada sobre uma peneira. Foram determinados o comprimento de raiz utilizando régua graduada em milímetros para a medida da maior raiz e o volume de raiz foi

obtido através do método de deslocamento de água. Para tal utilizou-se uma proveta graduada, onde acrescentou-se um volume de água conhecido e em seguida mergulhou-se as raízes na proveta com água, sendo o volume radicular correspondente ao volume de água deslocado na proveta, expresso em  $\text{cm}^3$  (MARTINS et al., 2011).

Após a determinação do comprimento e volume de raiz, a parte aérea as raízes foram secadas em estufa com circulação forçada de ar, a  $65^\circ\text{C}$ , até peso constante e, em seguida, os materiais foram pesados para quantificar a massa seca da parte aérea e da raiz. As partes aéreas foram moídas em moinho tipo Willey e acondicionada em sacos, para a quantificação dos teores de N, que foram submetidas à digestão sulfúrica (método micro Kjeldahl). Para os demais nutrientes (P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn) foi realizado digestão nitroperclórica, segundo metodologia proposta por Malavolta et al. (1997).

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico R commander e os pressupostos do modelo foram confirmados pelos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade de variâncias (Hartley) (R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2010). Quando os valores de F foram significativos ( $p \leq 0,05$ ), as médias das inoculações foram comparadas pelo teste F e realizou-se equações de regressão para as doses que foram ajustadas pelo programa R.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliações das trocas gasosas e taxa fotossintética

A inoculação das plantas ou a aplicação de doses de glifosato não afetaram as variáveis fotossintéticas avaliadas (CL, A, E, Gs, Ci, A/Ci, A/Gs). Esses resultados indicam que, independente se a planta for inoculada ou não, a aplicação de glifosato não altera as trocas gasosas da planta de milho (Quadro 3).

QUADRO 3. Valores médios referentes às trocas gasosas e eficiência fotossintética [índice SPAD (CL), taxa fotossintética (A), transpiração (E), condutância estomática (Gs) e concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci), eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci), eficiência intrínseca do uso da água (A/Gs)] em função de milho resistente ao glifosato, inoculado e não inoculado.

Tratamento	CL	A	E	Gs	Ci	A/Ci	A/Gs
	índice spad	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	vpm	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{vpm}^{-1}$	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
<i>Inoculação</i>							
Não Inoculado	47,96 <sup>ns</sup>	7,50 <sup>ns</sup>	1,37 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	190,84 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>	157,91 <sup>ns</sup>
Inoculado	47,57	7,62	1,39	0,05	193,24	0,04	213,62
<i>Glifosato kg i.a ha<sup>-1</sup></i>							
0	47,02	7,74	1,33	0,04	195,90	0,04	248,29
0,96	47,94	7,28	1,30	0,05	185,20	0,04	199,32
1,92	48,94	8,00	1,40	0,06	192,40	0,04	167,95
2,88	47,38	7,61	1,45	0,07	193,90	0,04	123,81
3,84	47,55	7,18	1,43	0,06	192,80	0,04	189,48
Média	47,76	7,56	1,38	0,05	192,04	0,04	185,77
CV%	11,05	14,48	14,16	54,74	5,94	16,05	67,79

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ )

Apesar de as plantas terem apresentado sintomas de fitotoxidez (clorose), logo após a aplicação elas se recuperaram depois de 18 dias, resultado da formação de compostos fitotóxicos (AMPA), isso não repercutiu nos componentes fotossintéticos da planta. Estudo realizado por Ding et al. (2011), apontou a mesma resposta de recuperação das plantas induzido pelo herbicida após 28 dias do tratamento pós-emergente, recomendando aplicações de herbicida na planta em sua

fase inicial, como no estágio V3, o que propiciaria à planta, tempo ótimo para recuperação, minimizando perdas na produtividade.

Os sintomas cloróticos visuais, observados após a aplicação do herbicida, são considerados não-persistentes e possuem tendência de desaparecimento dentro das primeiras duas semanas após a sua aplicação (REDDY e ZABLOTOWICZ, 2003).

### Avaliações agronômicas dos híbridos

Não houve efeito significativo ( $p \geq 0,05$ ) para a interação entre as doses de glifosato x inoculação de plantas para o comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR) e massa seca da parte aérea (MSPA). Verificou-se efeito da inoculação de plantas para a variável CR, VR e MSR. Para a variável da MSPA verificou-se efeito para as doses de glifosato (Quadro 4). Dessa forma, ajustaram-se equações de regressão para MSPA, que pode ser estimada pela regressão linear decrescente.

QUADRO 4. Valores médios referentes ao comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR) e massa seca da parte aérea (MSPA) em função de milho resistente ao glifosato, inoculado e não inoculado.

Tratamento	CR	VR	MSR	MSPA
	cm	cm <sup>3</sup>	g planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>
<i>Inoculação</i>				
Não Inoculado	20,59 B	35,05 B	16,58 B	28,88 <sup>ns</sup>
Inoculado	21,82 A	44,08 A	18,29 A	29,74
<i>Glifosato kg i.a ha<sup>-1</sup></i>				
0	21,20	41,58	19,14	34,62
0,96	20,30	40,29	17,43	32,46
1,92	22,38	39,78	16,44	28,28
2,88	21,73	38,69	16,47	26,06
3,84	20,42	37,52	17,69	25,13
Média	21,21	39,57	17,43	29,30
CV%	8,82	15,14	13,19	10,09

Médias seguidas de mesma letra para inoculação, nas colunas, não diferem entre si pelo teste F a 5%.  
<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

Não houve efeito significativo da interação (inoculação x doses de glifosato) ( $p \geq 0,05$ ) para massa seca da parte aérea, mas houve efeito para as doses de glifosato aplicadas. À medida que aumentou as doses de glifosato, ocorreu diminuição da massa seca da parte aérea, observando-se resposta linear da característica (Figura 1). A massa seca da parte aérea reduziu de 34,62 para 25,13 g planta<sup>-1</sup>, indicando que para cada kg i.a de glifosato ha<sup>-1</sup>, houve redução de 2,64 g, representando 37,76% de redução da massa seca da parte aérea. Esta redução pode ter sido ocasionada em função dos sintomas de fitotoxidez que apareceram no dia seguinte da aplicação de glifosato e permaneceram por 18 dias, até as plantas se recuperarem totalmente, ocasionando estresse fisiológico nas plantas.

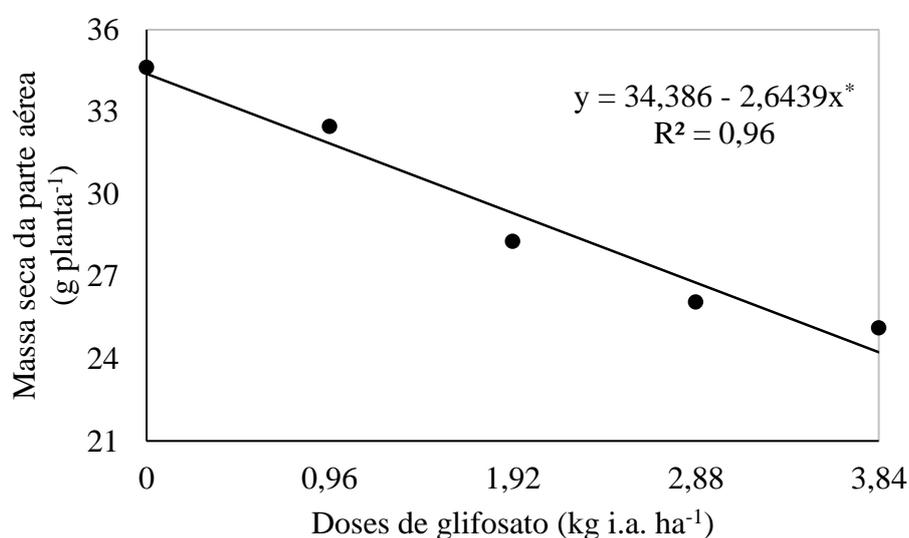


FIGURA 1. Massa seca da parte aérea de plantas de milho (g planta<sup>-1</sup>), híbrido Status, no estágio fenológico R2, em função das doses de glifosato (kg i.a. ha<sup>-1</sup>).

Serra et al. (2011) relataram estresse fisiológico ocasionado nas plantas pelo glifosato, logo após a sua aplicação, e mesmo se recuperando, ainda assim provocou menor produção de massa seca da parte aérea. Bellaloui et al. (2006) também observaram sintomas de fitotoxidez, porém, em todos os estádios de desenvolvimento das plantas. De acordo com Reddy e Zablotowicz (2003), a fitotoxidez provocada nas plantas são causadas pela porção de sal presente na formulação comercial do herbicida e não pelo herbicida em si, que resulta na

formação do ácido aminometilfosfônico, (AMPA), um composto secundário, formado pelo processo de degradação do herbicida dentro da planta (REDDY et al., 2004; DUKE, 2011).

A cultura do milho, quando submetida a baixas intensidades luminosas ou a fatores que reduzam a eficiência do aparato fotossintético, como os herbicidas, pode apresentar menores taxas de fitomassa, de crescimento, de assimilação líquida (OSÓRIO et al., 2015).

Os resultados obtidos indicam que plantas inoculadas têm seu comprimento de raiz estimulado pela bactéria *Azospirillum*, independente da dose de glifosato aplicada, sendo 6% maior que as plantas não inoculadas. Em relação ao gênero *Azospirillum* há estudos que demonstram a biossíntese de fitormônios, sobretudo auxinas e este aspecto fitoestimulante pode favorecer o crescimento e o desenvolvimento das plantas (MARTÍNEZ-MORALES et al., 2003).

As plantas por meio do balanceamento hormonal entre auxinas e citocininas determina o maior crescimento da raiz ou parte aérea. Quando o balanço tende para maior concentração de auxinas há indução do crescimento radicular, ao passo que, a maior concentração de citocininas favorece o crescimento da parte aérea (SPAEPEN et al., 2009), o que pode ter ocorrido nesse experimento, apresentando crescimento radicular e não da parte aérea.

Deve-se ainda destacar que o estímulo de biossíntese de auxinas nas raízes das plantas é de extrema relevância, pois este fitormônio se tratando de um composto que estimula a divisão e o crescimento celular, a área superficial de raízes pode aumentar e, conseqüentemente melhora a capacidade de absorção de água e nutrientes (MELLO, 2012).

O aumento do volume de raiz em plantas inoculadas foi de 25,76% em relação a plantas sem inoculação. Além de modificar o sistema radicular, a inoculação incrementa o número de radículas, o diâmetro das raízes laterais e adventícias, como já mencionado, pela presença de substâncias promotoras do crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas, e não somente pela fixação biológica do nitrogênio (CAVALLET et al., 2000). Essa produção de fitormônios interfere no crescimento das plantas e das raízes de modo que possibilite maior volume de exploração do solo (MELLO, 2012).

Da mesma forma, as plantas que foram inoculadas com a bactéria também apresentaram incremento para massa seca de raiz, com aumento de 10,31%

quando comparadas às plantas que não foram inoculadas, mostrando que as aplicações de doses crescentes de glifosato não afetaram o crescimento radicular.

Como não houve redução dos componentes radiculares avaliados, a presença do glifosato, que poderia prejudicar o efeito simbiótico não foi constatada, praticamente não houve contato entre *A. brasilense* e o glifosato, pois, esse herbicida apresenta alta adsorção no solo.

### Avaliações nutricionais dos híbridos

Para as concentrações foliares dos nutrientes não houve efeito significativo ( $p \geq 0,05$ ) para interação (inoculação x doses de glifosato); a inoculação das plantas apresentou valores significativos apenas para o manganês (Mn) e as doses de glifosato reduziram a absorção dos nutrientes Mn e Fe (Quadro 5).

QUADRO 5. Concentrações foliares de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Mn, Fe e Zn em função de milho resistente ao glifosato, inoculado e não inoculado.

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Fe	Zn
	g planta <sup>-1</sup>						mg planta <sup>-1</sup>			
<i>Inoculação</i>										
Não Inoculado	29,08 <sup>ns</sup>	2,71 <sup>ns</sup>	19,81 <sup>ns</sup>	2,70 <sup>ns</sup>	1,73 <sup>ns</sup>	2,37 <sup>ns</sup>	7,16 <sup>ns</sup>	44,63 B	320,23 <sup>ns</sup>	12,54 <sup>ns</sup>
Inoculado	30,08	2,62	20,42	2,70	1,69	2,39	6,79	48,88 A	308,05	12,97
<i>Glifosato kg i.a ha<sup>-1</sup></i>										
0	30,86	2,64	19,68	2,73	1,77	2,37	6,81	50,68 A	360,85 A	12,63
0,96	30,14	2,72	19,85	2,69	1,70	2,46	6,48	49,72 A	315,36 AB	12,43
1,92	29,14	2,60	20,55	2,69	1,74	2,35	7,98	47,33 A	303,40 AB	13,51
2,88	28,82	2,88	20,50	2,61	1,71	2,37	6,69	45,51 AB	295,57 B	12,52
3,84	28,95	2,50	19,99	2,77	1,63	2,37	6,93	40,55 B	295,53 B	12,69
Média	29,58	2,67	20,11	2,70	1,71	2,38	6,98	46,76	323,28	12,75
CV%	6,74	14,68	7,64	5,93	7,28	5,73	24,67	10,76	14,95	7,78

Médias seguidas de mesma letra para inoculação, nas colunas, não diferem entre si pelo teste F a 5%.  
<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

A não ocorrência de efeito significativo da inoculação nas concentrações foliares das plantas de milho para alguns nutrientes podem estar relacionados com a concentração disponível no solo destes nutrientes. Conforme análise química do solo

utilizado nos vasos (Quadro 1), as concentrações para K, Ca, Mg foram de 0,44; 8,7; 2,7  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ , respectivamente, que são considerados adequados, em relação as concentrações de referência (SOUZA e LOBATO, 2004).

As doses de glifosato também apresentaram efeito significativo para concentração foliar de Mn e, na análise de regressão, o modelo linear foi o que melhor se ajustou aos dados de Mn, sendo que reduziu de 50,68 para 40,55  $\text{g planta}^{-1}$ . Para cada kg i.a de glifosato  $\text{ha}^{-1}$ , houve redução de 2,55 g, representando 24,98% de redução (Figura 2).

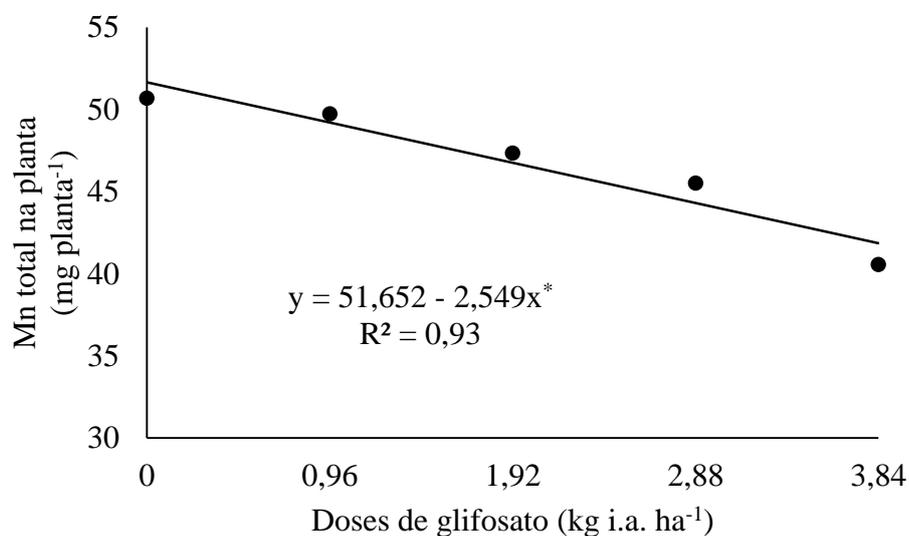


FIGURA 2. Conteúdo total de Mn ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) em plantas de milho, cultivar STATUS, no estágio fenológico R2, em função das doses de glifosato ( $\text{kg i.a. ha}^{-1}$ ).

Wagner e Merotto Júnior (2014) avaliando os parâmetros fisiológicos e nutricionais de cultivares de soja resistentes ao glifosato em comparação com cultivares isogênicas próximas, concluíram que o efeito do herbicida glifosato não alterou a dinâmica dos micronutrientes Fe e Mn nas cultivares ‘BRS Tertúlia RR’ e ‘Fepagro 37RR’, apenas a cultivar ‘BRS Taura RR’ apresentou menor acúmulo de Fe foliar, em comparação com a sua linha isogênica ‘BRS 154’.

Da mesma forma a concentração Fe também apresentou efeito significativo para doses de glifosato e o modelo quadrático foi o que melhor se

ajustou aos dados, para cada kg i.a de glifosato ha<sup>-1</sup>, houve redução de 14,73 g, representando 22,10% de diminuição (Figura 3). Com a dose de 2,98 kg i.a. ha<sup>-1</sup>, foi obtido a menor concentração foliar de Fe nas plantas (292,23 mg planta<sup>-1</sup>).

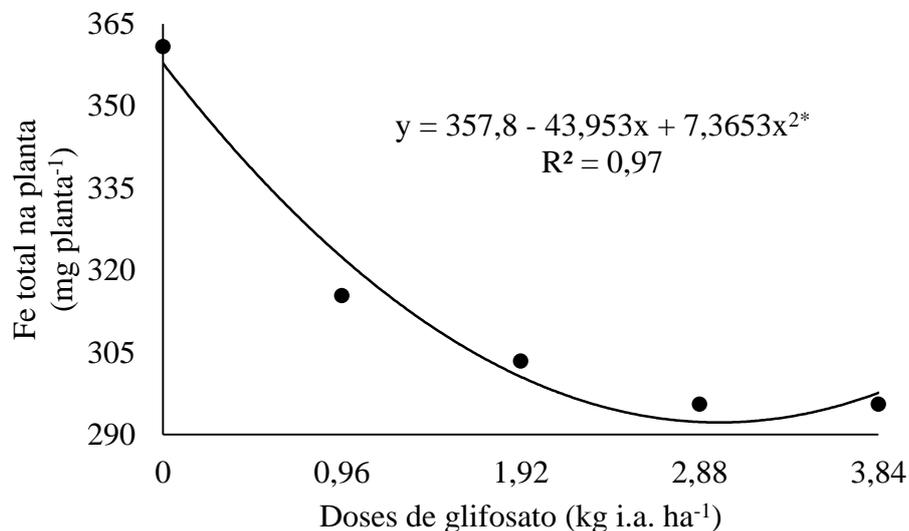


FIGURA 3. Conteúdo total de Fe (mg planta<sup>-1</sup>) em plantas de milho, cultivar STATUS, no estágio fenológico R2, em função das doses de glifosato (kg i.a. ha<sup>-1</sup>).

Essa diminuição pode ter ocorrido porque o glifosato sendo um ácido fosfônico acaba atuando como agente quelante, formando complexo estável com cátions de metais divalente e trivalente. Esse efeito quelante imobiliza micronutrientes essenciais como ferro e manganês, componentes necessários que atuam como co-fatores e reguladores de funções fisiológicas na planta (ZOBIOLE et al., 2010).

Osório et al. (2015), também constataram redução nas concentrações de Fe nas folhas de milho resistente ao glifosato submetidos a diferentes manejos de herbicidas, incluindo o uso do glifosato, verificaram que quando se realizava duas aplicações de glifosato na dose de 1,44 kg i.a. ha<sup>-1</sup>, reduziu 20,67% a concentração foliar de Fe quando comparado a dose única do herbicida.

Correia e Santos (2013) analisando concentrações de nutrientes foliares, após a aplicação de diversos herbicidas registrados para a cultura do milho, notaram que os tratamentos contendo glifosato apresentaram redução na concentração de Fe e

aumento na concentração de Cu. Segundo Bellaloui et al. (2009) a aplicação de glifosato em plantas de soja resistente ao glifosato, reduz a atividade e a eficiência da enzima redutase-ferrica presente na raiz, repercutindo em menor concentração foliar de Fe, os autores também não descartam a possibilidade da presença do metabolito secundário (AMPA) atuar de forma indireta no processo de absorção e translocação de nutrientes, como o do Fe.

## CONCLUSÕES

A inoculação das plantas com as bactérias *Azospirillum brasiliense* ou a aplicação de doses de glifosato não afetaram as trocas gasosas e a taxa fotossintética.

A bactéria *Azospirillum brasiliense* inoculada em plantas de milho resistente ao glifosato apresentaram maiores comprimento de raiz, volume de raiz e massa seca de raiz.

O uso de inoculante em plantas de milho resistente ao glifosato aumentou a absorção apenas do manganês.

As doses de glifosato reduziram a massa seca da parte aérea e a concentração foliar dos nutrientes Mn e Fe.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BELLALLOUI, N. REDDY, K. N.; ZABLOTOWICZ, MENGISTU, A. Simulated glyphosate drift influences nitrate assimilation and nitrogen fixation in non-glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Stoneville, v. 57, p. 9569- 9574, 2006.
- BELLALLOUI, N.; REDDY, K. N.; ZABLOTOWICZ, R. M.; ABBAS, H. K.; ABEL, C. A. Effects of glyphosate application on seed iron and root Ferric(III) reductase in soybean cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9569-9574, 2009.
- 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* sp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.
- CLAESSEN, M. E. C. (Org.). **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. 212 p.
- CORREIA, N. M.; SANTOS, E. A. Teores foliares de macro e micronutrientes em milho tolerante ao glyphosate submetido à herbicidas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 1, p. 3165-3172, 2013.
- DING, W.; REDDY, K. N.; ZABLOTOWICZ, R. M.; BELLALLOUI, N.; BRUNS, H. A. Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate-sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate. **Chemosphere**, v. 83, P. 593-598, 2011.
- DUKE, S. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and - susceptible crops and weeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Stoneville, v. 59, p. 5835-5841, 2011.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de métodos de análises de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997. 214p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba, POTAFOS, p. 232-258, 1997.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; OLLERO, F. J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitooligosaccharides (LCOs). **AMB Express**, v. 5, n. 71, p. 1-11, 2015.

MARTÍNEZ-MORALES, L. J et al. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 167-173, 2003.

MARTINS, L. D.; RODRIGUES, W. N.; TOMAZ, M. A.; SOUZA, A. F. DE; JESUS JUNIOR, W. C. Função de crescimento vegetativo de mudas de cafeeiro conilon a níveis de ciproconazol+tiametoxam e nitrogênio. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 220-228, 2011.

MELLO, N. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho e trigo**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo-RS, 2012.

NORRIS, O. D. Some concepts and methods in sub tropical pasture research. **Commonwealth Bureau of Pasture and Field Crops**, Maidenhead, 1964. 65p. Bulletin, 47.

OSÓRIO, C. R. W. S.; BARDIVIESSO, D. M.; SOUZA, E. I. S.; LEITE, R. C.; LEAL, A. J. F.; SOUZA, H. M. Milho RR submetido a diferentes manejos de herbicidas e adubação foliar. **Nativa**, v. 3, n. 2, p. 78-82, 2015.

PADGETTE, S.R. KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D. B.; LAVALLEE, B. J.; TINIUS, C. N.; RHODES, W. K.; OTERO, Y. I.; BARRY, G. F.; EICHHOLTZ, D. A.; PESCHKE, V. M.; NIDA, D. L.; TAYLOR, N. B.; KISHORE, G. M. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1451-1461, 1995.

PORTUGAL, L. V. **Fitotoxicidade de herbicidas pós-emergentes em híbridos de milho**. 2013. 53 p. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Produção na Agropecuária), Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas-MG, 2013.

R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **R: A language and environment for statistical computing**. 2010. Disponível em: <<http://softlibre.unizar.es/manuales/aplicaciones/r/fullrefman.pdf>>. Acesso em: 02 out. 2014.

REDDY, K. N.; ZABLOTOWICZ, R. M. Glyphosate-resistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Science**, Lawrence, v. 51, n. 4, p. 496-502, 2003.

REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 52, p. 5139-5143, 2004.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 4. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 376 p.

SERRA, A. P.; MARCHETTI, M. E.; CANDIDO, A. C. S.; DIAS, A. C. S.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Influência do glifosato na eficiência nutricional do nitrogênio, manganês, ferro, cobre e zinco em soja resistente ao glifosato. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 77- 84, 2011.

SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2 ed. Brasília: Embrapa Cerrados, 2004. 416 p.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y.; LOON, L. C. Plant Growth-Promoting Actions of *Rhizobacteria*. **Advances in Botanical Research**, v.51, Burlington: Academic Press, p. 283-320, 2009.

WAGNER, J. F.; MEROTTO JÚNIOR, A. Parâmetros fisiológicos e nutricionais de cultivares de soja resistentes ao glifosato em comparação com cultivares isogênicas próximas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 393-399, 2014.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean. **Crop Protection**, Stoneville, v. 26, p. 370-376, 2007.

ZHANG, S.; LI, Q.; MA, K.; CHEN, L. Temperature dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO<sub>2</sub> assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday higher irradiance. **Photosynthetica**, Prague, v. 39, p. 383-388, 2001.

ZOBIOLE, L. H. S.; OLIVEIRA JR, R. S; VISENTAINER, J. V.; KREMER, R. J. BALLALOU, N.; YAMADA, T. Glyphosate affects seed composition in glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4517-4522, 2010.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à possibilidade de danos oriundo do uso do glifosato sobre plantas de milho resistente ao glifosato, supõe-se que interferências possam acontecer no âmbito da parte vegetativa e nutricional da planta. No entanto, o resultado do impacto do uso de glifosato, aplicado isolado ou em misturas com outros herbicidas, ou em diferentes formulações, ou ainda em altas doses, associado a inoculação de *Azospirillum*, carece de informações mais amplas, referentes ao efeito sobre os componentes vegetativos e nutricionais e das possíveis consequências.

As explicações plausíveis de possíveis danos as plantas de milho resistente ao glifosato, em virtude do uso de glifosato em pós-emergência, são oriundas, da possibilidade de desarranjos metabólicos/fisiológicos, que acarretariam na redução da parte vegetativa e, conseqüentemente, diminuição das trocas gasosas e da taxa fotossintética, teores de clorofila. Ou de sintomas de fitotoxidez, como as provocadas pelo AMPA, que poderiam levar a anormalidades no desempenho da plântula.

Portanto, a visão sobre a problemática deve envolver inúmeros fatores e quesitos. O dilema não é meramente especulativo, já que existem fatos e argumentos científicos utilizados de ambos os espectros, seja, corroborando ou não com a interferência na cultura. Somente o futuro, acompanhado pelo progresso nas pesquisas na busca de resposta para essa questão, elucidará todas as incógnitas, de forma mais consistente.