

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Marlo Adriano Bison Pinto

**TRATAMENTO QUÍMICO, USO DE ADITIVOS, *Azospirillum brasilense*
E pH DO SOLO NA CULTURA DO TRIGO**

Santa Maria, RS, Brasil
2019

Marlo Adriano Bison Pinto

**TRATAMENTO QUÍMICO, USO DE ADITIVOS, *Azospirillum brasilense* E pH DO
SOLO NA CULTURA DO TRIGO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dr. Thomas Newton Martin

Santa Maria, RS, Brasil
2019

PINTO, MARLO ADRIANO BISON
TRATAMENTO QUÍMICO, USO DE ADITIVOS, Azospirillum
brasiliense E pH DO SOLO NA CULTURA DO TRIGO / MARLO
ADRIANO BISON PINTO.- 2019.
73 p.; 30 cm

Orientador: THOMAS NEWTON MARTIN
Coorientadores: ISABEL LAGO, LUCIANE ALMERI TABALDI
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2019

1. Azospirillum brasiliense 2. pH do solo 3. Parâmetros
radiculares 4. Estresse oxidativo I. MARTIN, THOMAS
NEWTON II. LAGO, ISABEL III. TABALDI, LUCIANE ALMERI IV.
Título.

Marlo Adriano Bison Pinto

TRATAMENTO QUÍMICO, USO DE ADITIVOS, *Azospirillum brasilense* E pH DO SOLO NA CULTURA DO TRIGO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Agronomia**

Aprovado em 08 de março de 2019:

Thomas Newton Martin, Dr. (UFSM)
Presidente/Orientador

Rodrigo Josemar Seminotti Jacques, Dr. (UFSM)

Giovani Benin, Dr. (UTFPR) - Videoconferência

Frederico Costa Beber Vieira, Dr. (Unipampa) - Videoconferência

Luciane Almeri Tabaldi, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS, Brasil
2019

DEDICATÓRIA

*Dedico os frutos deste trabalho ao meu amado pai **Nilo Martins Pinto** e minha amada mãe **Marise Bison Pinto**, os quais sempre acreditaram em mim. Vocês são meu porto seguro e minha inspiração, exemplos de perseverança e honestidade, qualidades as quais sempre levarei junto de mim... Meu reconhecimento e gratidão pela paciência, compreensão e apoio durante toda minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A concretização desta tese se deu graças ao auxílio, dedicação e compreensão de várias pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma se doaram para a conclusão deste estudo.

De uma forma particular, sou grato:

- a Deus, pela graça da vida, o qual com sua luz me possibilitou obter êxito em todos os momentos pelos quais passei.

- à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

- ao meu orientador Thomas Newton Martin, pelas orientações, conselhos, confiança e pelo exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino superior.

- à professora Luciane Almeri Tabaldi pelas orientações e pela sua ajuda na realização das análises.

- a minha namorada, Jéssica Volpatto, pelo apoio, paciência e compreensão.

- aos colegas de Pós-Graduação: Evandro Deak, Glauber Fipke, Giovane Burg, Jéssica Stecca, José Wink, Matheus Ferreira e Vinícius Cunha pelas conversas e pela ajuda na execução deste trabalho.

- aos bolsistas de iniciação científica: Gustavo Posser, Pedro Aléssio, Guilherme Barrichelo, Lucas Bruning pelo auxílio na execução das coletas e análises laboratoriais.

- à Daniele Bernardy e Mirian Berger, sempre bem humoradas e dispostas a ajudar.

Enfim, a todos os demais que, mesmo não citados nominalmente, torceram por mim e me apoiaram durante todo esse tempo.

MUITO OBRIGADO!

*O conhecimento serve para encantar as pessoas, não
para humilhá-las.*

(Mário Sergio Cortella)

RESUMO

TRATAMENTO QUÍMICO, USO DE ADITIVOS, *Azospirillum brasilense* E pH DO SOLO NA CULTURA DO TRIGO

AUTOR: Marlo Adriano Bison Pinto
ORIENTADOR: Thomas Newton Martin

A resposta à inoculação de sementes de trigo com *Azospirillum brasilense* é variável e dependente de fatores relacionados ao manejo na inoculação e ao ambiente de cultivo. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito do pH do solo de cultivo, tratamento de sementes, uso de osmoprotetor e a presença de nitrogênio mineral, sobre a atividade da *A. brasilense* e, os efeitos da bactéria sobre a qualidade fisiológica de sementes, crescimento e fisiologia de plantas e a produtividade do trigo. Para isso foram realizados três experimentos utilizando-se a cultivar TBIO Toruk. O primeiro, conduzido no delineamento inteiramente casualizado e em laboratório, teve seus tratamentos organizados em um bifatorial 2x8, com quatro repetições. O primeiro fator constituiu-se nos níveis de pH da solução de embebição (4,8 e 6,5) e o segundo, aos tratamentos aplicados via semente, sendo eles: controle (sem tratamento químico, aditivo osmoprotetor e *A. brasilense*), inoculação com *A. brasilense* (A), tratamento químico (TS), aditivo osmoprotetor (O), A+O, A+TS, O+TS e A+O+TS, onde se avaliou a resposta dos tratamentos sobre a qualidade fisiológica de sementes. Para isolar os efeitos dos fatores (tratamento fitossanitário, aditivo osmoprotetor, nitrogênio na solução, pH da solução de embebição e *A. brasilense*) sobre o crescimento de plântulas; o segundo estudo foi subdividido em quatro subestudos, conduzidos em sistema hidropônico, sob delineamento inteiramente casualizado, com tratamentos distribuídos em um bifatorial 2x2, com quatro repetições. O terceiro estudo caracterizou os efeitos dos fatores sobre parâmetros fisiológicos de plantas e a produtividade do trigo. O mesmo foi conduzido no delineamento de blocos casualizados e em condições de campo, com os seus tratamentos distribuídos em um bifatorial 2x8, com quatro repetições. O primeiro fator referiu-se aos níveis de pH do solo e o segundo, aos tratamentos aplicados via semente, sendo eles: controle, inoculação com *A. brasilense* (A), tratamento químico (TS), aditivo osmoprotetor (O), A+O, A+TS, O+TS e A+O+TS. O número de plântulas normais não é influenciado pelo pH da solução de embebição e pelos tratamentos aplicados via semente, entretanto, há redução do vigor de plântulas com a utilização do tratamento químico ou aditivo osmoprotetor (Estudo 1). O pH da solução de embebição e a presença de nitrogênio, nos valores testados, não influenciam sobre os efeitos observados com a inoculação da *A. brasilense*. Com a utilização do tratamento químico e do osmoprotetor não há efeito da *A. brasilense* no crescimento de plântulas de trigo (Estudo 2). O pH do solo corrigido e a inoculação com *A. brasilense* incrementam a atividade da enzima nitrato redutase. Em solo com acidez corrigida a inoculação com *A. brasilense* incrementa a produtividade de grãos da cultura do trigo. A utilização do tratamento químico influi negativamente sobre a resposta à inoculação na cultura do trigo, onde a utilização do osmoprotetor não atenua seus efeitos, os quais influem negativamente sobre a resposta à inoculação com *A. brasilense* (Estudo 3). Assim, a inoculação com *A. brasilense* na ausência de tratamento químico e em condições sem acidez do solo justifica-se como uma tecnologia eficiente para incrementar a produtividade da cultura do trigo.

Palavras-chave: Solução de embebição. Parâmetros radiculares. Hidroponia. Estresse oxidativo. Nitrato redutase. Acidez do solo.

ABSTRACT

CHEMICAL TREATMENT, USE OF ADDITIVES, *Azospirillum brasilense* AND SOIL pH IN WHEAT CULTURE

AUTHOR: Marlo Adriano Bison Pinto

ADVISER: Thomas Newton Martin

The response to inoculation of wheat seeds with *Azospirillum brasilense* is variable and depends on factors related to the inoculation and the growing environment. The objective of this research was to evaluate the effect of soil pH, seed treatment, osmoprotective use and the presence of mineral nitrogen on the activity of *A. brasilense* and the effects of the bacteria on the physiological quality of seeds, growth and physiology of plants and wheat yield. For this, three experiments were carried out using the cultivar TBIO Toruk. The first, conducted in a completely randomized design and in the laboratory, had its treatments organized in a 2x8 bifactorial, with four replicates. The first factor was constituted in the pH levels of the imbibition solution (4.8 and 6.5) and the second, to the treatments applied by seed, being: control (without chemical treatment, additive osmoprotect and *A. brasilense*), inoculation with *A. brasilense* (A), chemical treatment (TS), additive osmoprotector (O), A + O, A + TS, O + TS and A + O + TS, where the response of the treatments on the physiological quality of seeds. To isolate the effects of the factors (phytosanitary treatment, osmoprotective additive, nitrogen in the solution, pH of the imbibition solution and *A. brasilense*) on seedling growth; The second study was subdivided into four substudies, conducted under a hydroponic system, under a completely randomized design, with treatments distributed in a 2x2 bifactorial, with four replications. The third study characterized the effects of factors on plant physiological parameters and wheat yield. The experiment was conducted in a randomized complete block design and field conditions, with its treatments distributed in a 2x8 two-factorial, with four replications. The first factor was the soil pH and the second, to the treatments applied by seed, being: control, inoculation with *A. brasilense* (A), chemical treatment (TS), osmoprotective additive (O), A + O, A + TS, O + TS and A + O + TS. The number of normal seedlings is not influenced by the pH of the imbibition solution and by the treatments applied by seed, however, there is a reduction of seedling vigor with the use of the chemical treatment or osmoprotective additive (Study 1). The pH of the imbibition solution and the presence of nitrogen in the values tested did not influence the effects observed with the inoculation of *A. brasilense*. With the use of the chemical treatment and the osmoprotector there is no effect of *A. brasilense* on the growth of wheat seedlings (Study 2). Corrected soil pH and inoculation with *A. brasilense* increase the activity of the enzyme nitrate reductase. In soil with corrected acidity the inoculation with *A. brasilense* increases the grain yield of the wheat crop. The use of the chemical treatment has a negative effect on the response to inoculation in the wheat crop, where the use of the osmoprotectant does not attenuate its effects, which negatively influence the response to inoculation with *A. brasilense* (Study 3). Thus, inoculation with *A. brasilense* in the absence of chemical treatment and in conditions without soil acidity is justified as an efficient technology to increase wheat crop productivity.

Keywords: Imbibition solution. Root parameters. Hydroponics. Oxidative stress. Nitrate reductase. Acidity of soil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

- Figura 1 - Efeito dos tratamentos aplicados via sementes sobre a primeira contagem de germinação (A.), comprimento da parte aérea e radicular (B.) e massa seca de plântulas (C.) do trigo. 30
- Figura 2 - Resposta da inoculação com *A. brasilense* sobre a massa seca de raízes (A.) e volume radicular (B.) de plântulas de trigo aos 28 DAS 31
- Figura 3 - Efeito da aplicação do tratamento químico sobre a área foliar (A.), massa seca da parte aérea e raízes (B.), diâmetro médio de raízes (C.), comprimento radicular (D.), volume radicular (E.) e área superficial (F.) do trigo aos 28 DAS 33
- Figura 4 - Efeito da utilização de aditivo osmoprotetor sobre a massa seca da parte aérea (A.), comprimento radicular (B.), volume radicular (C.) e área superficial (D.) de plântulas de trigo aos 28 DAS 34
- Figura 5 - Efeito da inoculação de sementes com *A. brasilense* sobre a massa seca da parte aérea (A.), comprimento radicular (B.), volume de raízes laterais (C.) e área superficial radicular (D.) de plântulas de trigo aos 28 DAS 35
- Figura 6 - Efeito do nitrogênio na solução nutritiva sobre a massa seca de parte aérea (A), área superficial (B), comprimento radicular (C) e volume radicular (D) de plântulas de trigo aos 28 DAS 37

ARTIGO 2

- Figura 1 - Precipitação pluviométrica e temperatura média do ar durante o período de condução do experimento 44
- Figura 2 - Conteúdo de clorofila total no aphilamento (A.), clorofila *b* no florescimento (B.) e atividade da enzima nitrato redutase no aphilamento (C.) e florescimento (D.) do trigo, em função dos tratamentos aplicados via semente 49
- Figura 3 - Estande inicial de plantas (A.), número de espigas por metro quadrado (B.), número de espiguetas por espiga (C.) e número de grãos por espiga (D.) do trigo, em função dos tratamentos aplicados via semente e pH do solo de cultivo 51
- Figura 4 - Massa de mil grãos do trigo em função dos tratamentos aplicados via semente e pH do solo de cultivo 54
- Figura 5 - Massa de hectolitro e produtividade de grãos do trigo em função dos tratamentos aplicados via semente e pH do solo de cultivo 55

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos de acordo com sua subdivisão..... 26

ARTIGO 2

Tabela 1 - Atributos químicos do solo 45

Tabela 2 - Atividade da enzima nitrato redutase (NR) nos estádios de afilamento e
floreescimento do trigo, em função do pH do solo de cultivo50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 TRITICULTURA E A UTILIZAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i>	13
2.2 TRATAMENTO QUÍMICO DE SEMENTES	15
2.3 “ADITIVOS” OSMOPROTETORES	17
2.4 ACIDEZ DO SOLO.....	18
3 ARTIGO 1 - TRATAMENTO QUÍMICO, ADITIVO OSMOPROTETOR E <i>Azospirillum brasilense</i> NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DA CULTURA DO TRIGO	21
4 ARTIGO 2 - FISIOLOGIA DE PLANTAS E PRODUTIVIDADE DO TRIGO INOCULADO E CULTIVADO EM DIFERENTES pH’S DE SOLO	41
5 DISCUSSÃO GERAL	61
5.1 VIABILIDADE ECONÔMICA	65
6 CONCLUSÃO GERAL	66
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO GERAL

Fonte de proteínas e carboidratos, o trigo (*Triticum aestivum* L.) é a cultura de inverno de maior importância econômica no sul do Brasil. Seu valor dentro do sistema de produção tem implicação direta na intensificação de estudos sobre o cereal. Merecem ser considerados, dentre os inúmeros avanços já alcançados, a obtenção de cultivares resistentes ao acamamento, genótipos com menor percentual de germinação na espiga, e, principalmente, a administração adequada da adubação.

O nitrogênio quando deficiente no solo impõe a maior limitação à produtividade, uma vez que é o macroelemento absorvido em maior quantidade pela cultura. Além de redução do perfilhamento, a deficiência desse nutriente implica em plantas com folhas de limbo e capacidade fotossintética reduzida. No entanto, sabe-se que o seu aproveitamento é limitado pelo caráter dinâmico desse nutriente no solo.

No que diz respeito aos aspectos técnicos da produção de trigo, manejar a cultura de forma adequada para maximização da produção, potencializa a possibilidade de incrementos econômicos. Primar pela obtenção de plântulas de trigo com crescimento superior, estande homogêneo e vigoroso com maior volume radicular (absorção de nutrientes e água) e, conseqüente, redução dos eventos de oxidação e redução no interior das células, aumenta a probabilidade de incremento da produtividade de grãos.

Na cultura do trigo a inoculação com *Azospirillum brasilense* não substituiu a adubação nitrogenada. No entanto, com a inoculação há maior absorção de N e de outros elementos minerais, uma vez que a auxina excretada pela bactéria na associação com a planta resulta em aumento do volume e do número de pelos radiculares. Assim, a inoculação tem melhorado o crescimento e a produtividade da cultura em muitos ambientes.

Ainda que se saiba muito sobre a *A. brasilense*, o efeito dessa bactéria promotora do crescimento de plantas no campo é limitado por fatores que influenciam na sobrevivência bacteriana e sua atividade na rizosfera. Respostas em crescimento de plantas e produtividade de grãos estão associadas à obtenção de condicionantes edafoclimáticos favoráveis para os processos de sobrevivência bacteriana, associação e estímulo aos processos de produção de fitohormônios.

A evidência atual das aplicações da inoculação no campo nem sempre é consistente. Esta inconsistência pode ser em função da falha dos microrganismos em sobreviver em competição com os microrganismos autóctones do solo, onde estresses bióticos e abióticos podem potencializar esse efeito. Dentre os fatores que podem afetar a interação planta e *A.*

brasilense e necessitam ser mais bem compreendidos está o pH da solução do solo. Condições ácidas do solo nas regiões de cultivo de trigo podem atuar de forma negativa na atividade da *A. brasilense*.

Além do pH ácido, formulações utilizadas no tratamento químico de sementes vêm demonstrando efeitos deletérios sobre a atividade de *Bradyrhizobium japonicum* em soja, o que também poderia ser um fator responsável pela ineficácia da *A. brasilense*, em algumas situações, quando aplicada via semente do trigo. A inoculação pode não ser capaz de oferecer condições de proteção e sobrevivência adequadas à bactéria inoculada, o que torna necessária a utilização de componentes adicionais buscando atenuar os efeitos nocivos da utilização do tratamento químico de sementes sobre *A. brasilense*.

A fixação das bactérias às raízes é uma condição essencial e necessária para o estabelecimento de uma associação eficaz. Assim, a partir dos resultados obtidos poderão ser confirmadas algumas hipóteses, dentre elas: a inoculação com *A. brasilense* promove o enriquecimento da qualidade fisiológica de sementes, incrementando o crescimento de plântulas; o tratamento químico de sementes atenua os efeitos da bactéria sobre a qualidade fisiológica de sementes, crescimento e fisiologia de plantas e a produtividade da cultura do trigo; a utilização de aditivo osmoprotetor junto ao inoculante proporciona maior proteção das células bacterianas, favorecendo o estabelecimento de uma associação eficaz; e, que condições de pH ácido no solo de cultivo atuam de forma negativa sobre a atividade da bactéria *A. brasilense*, reduzindo seus efeitos sobre caracteres produtivos da cultura do trigo.

Dessa forma, considerando o potencial da *A. brasilense* em incrementar o crescimento e a produtividade de plantas, objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito do pH da solução do solo, tratamento químico de sementes, uso de aditivo osmoprotetor e a presença de nitrogênio mineral, sobre a atividade da *Azospirillum brasilense* e, os efeitos da bactéria sobre a qualidade fisiológica de sementes, crescimento e fisiologia de plantas e a produtividade da cultura do trigo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TRITICULTURA E A UTILIZAÇÃO DE *Azospirillum brasilense*

O trigo (*Triticum aestivum*) é uma das culturas mais representativas na produção de grãos de inverno da região sul do Brasil. Os três Estados do sul representam 89% da produção nacional da cultura. Somente o Rio Grande do Sul representa uma produção superior a 3,7 milhões de toneladas de grãos em área aproximadamente igual a 699.000 ha (CONAB, 2018).

Mesmo com estes valores, a produção brasileira foi de aproximadamente 6,7 milhões de toneladas no ano de 2018, insuficiente para suprir a demanda interna de 10,9 milhões de toneladas (CONAB, 2018). Para reduzir a dependência externa há a necessidade de ampliar a produtividade de grãos. Há a necessidade de investimento em tecnologias de manejo que possibilitem o incremento da produtividade assegurando a rentabilidade econômica ao produtor (BRAGAGNOLO et al., 2013).

Em função de características peculiares do trigo, o nitrogênio (N) é o macronutriente que mais comumente limita a produtividade da cultura (FERREIRA et al. 2014; KANEKO et al. 2015). Fontes industrializadas do nutriente (COSTA et al., 2018), mineralização de restos culturais com baixa relação C/N (BERTONCELLI et al., 2017) e da matéria orgânica do solo (ROSA et al., 2017) ou pela fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2016), são as principais fontes de N em solos agrícolas.

O N fornecido via fixação biológica é, entretanto, menos propenso a lixiviação e volatilização, fornecido constantemente e utilizado *in situ* (RODRIGUES et al., 2014). Dentre as bactérias do gênero *Azospirillum* (bactérias diazotróficas associativas não mutualísticas), a *Azospirillum brasilense* é a bactéria promotora de crescimento de plantas mais estudada (BPCP) (BASHAN; BASHAN, 2010), inclusive já sendo comercializados no Brasil inoculantes contendo essa bactéria.

A *A. brasilense* pode gerar diversos estímulos para o crescimento das plantas. Dentre eles a fixação biológica de N (FUKAMI et al., 2018), onde por intermédio da enzima denominada nitrogenase, há a conversão de N_2 presente na atmosfera para a forma gasosa NH_3 (amônia). Dentro da célula bacteriana, à amônia são incorporados íons H^+ , abundantes nas células das bactérias, ocorrendo a formação de íons NH_4^+ (HUERGO et al., 2008). Desta maneira, a fixação biológica disponibiliza NH_4^+ para serem incorporados às células vegetais na forma de nitrogênio orgânico (glutamato e glutamina) (HUNGRIA et al., 2001).

A inoculação do trigo pode suprir, pelo menos em parte, a necessidade de N das plantas, possibilitando, em certos casos, reduzir as doses do nutriente aplicadas em cobertura. São várias as pesquisas que apresentam, quando realizada a inoculação, possibilidade da redução das dosagens de N aplicadas, mantendo-se a produtividade (CORASSA et al., 2013; HUNGRIA et al., 2010). Todavia, mesmo na agricultura menos intensiva, com baixos e médios investimentos em N, a inoculação não apresenta bons resultados em termos de possibilitar a eliminação total do aporte da adubação nitrogenada (DARTORA et al., 2016; MULLER et al., 2015; SANGOI et al., 2015). Fukami et al. (2016) salientam que a substituição total da adubação com N na forma mineral pela inoculação pode não ser viável, todavia, que a inoculação permite uma redução de cerca de 25% do N a ser aplicado no trigo.

Além da fixação biológica de N, a *A. brasilense* apresenta interessantes mecanismos que influem no crescimento e desenvolvimento das plantas. Assim, essas bactérias podem alterar processos hormonais e estruturais das plântulas, incrementando o seu valor adaptativo (CAVALLET et al. 2000; DARTORA et al., 2013).

Em culturas inoculadas com *A. brasilense* as alterações no sistema radicular são provavelmente causadas pela produção e secreção de hormônios de crescimento de plantas, especialmente ácido indolacético (AIA) (HUNGRIA et al., 2011). Essa BPCP tem sido responsabilizada por uma série de mecanismos que agem simultânea e sequencialmente, resultando no crescimento de plantas, com incremento no crescimento celular e na formação de raízes laterais (BASHAN; BASHAN, 2010; BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Esse aumento do sistema radicular possibilita a exploração de um maior volume de solo (ZAIED et al., 2003). Correa et al. (2008) observaram que a associação promove melhorias na absorção da água e minerais, aumentando a tolerância a estresses por salinidade e seca, resultando em maior vigor de plantas e maior produtividade. Para esses autores, as respostas mais expressivas na utilização da bactéria são normalmente observadas em condições subótimas de fertilizantes, especialmente nitrogenados, havendo, nesses casos, um uso mais eficiente do N disponível. Para Cassán et al. (2008), além da captação mais eficiente do N, quando crescem dentro da planta essas bactérias podem aumentar a atividade da enzima nitrato redutase, o que resulta na incorporação de nitrogênio inorgânico de forma mais intensa.

Na cultura do trigo, alguns estudos têm destacado algumas especificidades quanto a época de absorção de N e a influência da inoculação. Didonet et al. (2000) destacaram que plantas infectadas tendem a absorver mais N após a antese quando comparadas com plantas não infectadas e adubadas com a mesma quantidade de N. Em geral, o aumento da absorção

de minerais e de água pelo trigo infectado com *Azospirillum*, tem sido creditado ao efeito hormonal da bactéria na promoção do crescimento radicular (DARTORA et al., 2013; KAZI et al., 2016), onde o N absorvido promove maior afilhamento e percentual de sobrevivência de afilhos (HUNGRIA et al., 2016).

O maior crescimento das raízes e absorção de água também trona as plantas aptas a uma maior absorção dos nutrientes pouco móveis no solo, como exemplo o fósforo (KAZI et al., 2016), macroelemento crucial no metabolismo de plantas, desempenhando papel importante na transferência de energia na célula, na respiração e na fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013). Algumas cepas de *A. brasilense* são capazes de produzir ácido glucônico e podem solubilizar fosfato de rocha (ANDREWS et al., 2010). Chang e Li (1998) isolaram cepas de *A. brasilense* capazes de degradar calcário e fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) *in vitro*.

Segundo Deubel et al. (2000), em plantas de ervilha inoculadas com *A. brasilense* foram observadas modificações nos açúcares dos exsudatos radiculares quando havia deficiência de fósforo, estimulando a capacidade da bactéria em mobilizar fosfato. Ainda segundo esses autores, glicose são parte de exsudatos das raízes de plantas cultivadas em solos deficientes de fósforo, aumentando assim a capacidade de *A. brasilense* a solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ insolúvel. Observou-se ainda que na deficiência de fósforo, o teor de glicose diminuiu, aumentando a galactose, ribose, xilose e frutose nos exsudatos radiculares.

O maior crescimento de raízes em função da inoculação com *A. brasilense* pode implicar em vários outros efeitos (HUNGRIA et al., 2011). Em função do maior e mais constante aporte de N e água, Barassi et al. (2008) relatam a melhoria em parâmetros fotossintéticos, incluindo o teor de clorofila e condutância estomática, com isso é maior a produção de biomassa por plantas inoculadas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Em função do maior aporte de nutrientes, vários autores relatam incrementos nos conteúdos pigmentos fotossintéticos, tais como: clorofila *a*, *b*, e pigmentos fotoprotetivos (violaxantina, zeaxantina e beta-caroteno), que resultariam em plantas mais verdes e menos propensas aos estresses causados pelo ambiente (BARASSI et al., 2008; BASHAN et al., 2006; HUNGRIA et al., 2010).

2.2 TRATAMENTO QUÍMICO DE SEMENTES

No cultivo do trigo, durante o desenvolvimento e a maturação das sementes a campo, pode haver a infestação dos órgãos de propagação por pragas e doenças. Quanto maior for a infestação por patógenos nas sementes por ocasião da colheita, maior poderá ser o número de

plantas de trigo infectadas por doenças na lavoura no próximo cultivo. Um grande número de microrganismos fitopatogênicos pode ser transmitido pelas sementes de trigo, sendo o grupo dos fungos o mais numeroso (DANELLI et al., 2012).

Na ausência de genótipos resistentes ou de outro meio de controle (biológico, cultural, físico ou outro) mais eficiente que venha a interromper o ciclo das doenças e pragas, o controle químico apresenta-se como uma alternativa interessante de modo a diminuir a quantidade de inóculo associado às sementes. A partir de seu uso é possível proporcionar a manutenção do vigor de plântulas, o que resultará em estandes de plantas mais uniformes, em função da maior percentagem de germinação ou da proteção de plântulas contra pragas e doenças (HOSSEN et al., 2014).

Além dos produtos fitossanitários, nos sistemas agrícolas mais tecnificados de cultivo do trigo são utilizados estimulantes (micronutrientes, promotores de crescimento e indutores de resistência) e, mais atualmente, inoculantes com bactérias diazotróficas. Todos esses insumos têm sido utilizados para proteção e ao mesmo tempo visando influenciar sobre as fases de germinação, crescimento e desenvolvimento das plântulas para que se estabeleçam e se desenvolvam da forma mais adequada possível (COSTA et al., 2015; DARTORA et al., 2013; PIRES et al., 2004).

Todavia, a formulação química dos produtos fitossanitários pode afetar negativamente a proliferação de microrganismos benéficos às plântulas, prejudicando o seu crescimento ou mesmo causando sua morte. A incompatibilidade entre determinados fungicidas e o uso de inoculantes tem sido considerada um dos maiores problemas à fixação biológica de nitrogênio (FBN) em soja (ALCÂNTARA NETO et al., 2014; CAMPO et al., 2009). São diversos resultados de pesquisa que demonstram que quando a inoculação é realizada juntamente com o tratamento das sementes ou imediatamente após, a nodulação e a FBN são afetados. Essa incompatibilidade pode se dar em diferentes graus, ao passo que, pode causar alterações bioquímicas, influenciando as taxas de crescimento e propriedades simbióticas ou reduzir a população de *Bradyrhizobium* spp. (BUENO et al., 2003; CAMPO et al., 2009). Ainda com relação à incompatibilidade entre a formulação química dos produtos fitossanitários e o *Bradyrhizobium*, De Polli et al. (1986), observaram que os inseticidas *carbofuram*, *dieldrin*, *endrin* e *clorpirifós* apresentam efeitos prejudiciais a bactéria.

Com relação à toxicidade dos defensivos agrícolas empregados no tratamento de sementes em microrganismos como os diazotróficos de vida livre, as informações disponíveis ainda são restritas. Os compostos químicos podem afetar diferentes aspectos benéficos desses microrganismos, dificultando inferir sobre a compatibilidade entre produtos e inoculantes

(YANG et al., 2011). Há produtos químicos que demonstraram ser muito prejudiciais aos rizóbios (CAMPO et al., 2009) e inofensivos (ELSLAHI et al., 2014) ou muito tóxicos (MOHIUDDIN; MOHAMMED, 2013) às bactérias do gênero *Azospirillum*.

Utilizando *difenoconazole*, Munaretto et al. (2018), observaram que o fungicida reduz o comprimento da parte aérea e raiz e é incompatível com a bactéria *A. brasilense*, fator que pode ser responsável pela ineficácia da bactéria quando aplicada via semente em algumas lavouras. Com relação ao *triadimenol*, Garcia Junior et al. (2008) relatam que o fungicida não influencia na germinação, emergência e velocidade de emergência de plântulas, além de proporcionar excelentes resultados na sanidade de plantas de trigo (REIS et al., 2008). Dessa forma, estudos adicionais são necessários para avaliar a viabilidade de estratégias de inoculação em larga escala (BASHAN et al., 2014). A semeadura do trigo é uma fase crítica em função às restrições climáticas e sazonais da cultura. Somado a isso, o tratamento de sementes com produtos químicos continuará a ser praticado, assim, estratégias de inoculação devem tentar evitar danos às bactérias.

2.3 “ADITIVOS” OSMOPROTETORES

O sucesso da inoculação pode ser influenciado por diversos fatores. Dentre esses, pode-se citar o contato físico do inoculante com as sementes no momento da inoculação, a cepa utilizada no inoculante, a qualidade e quantidade de inoculante utilizada, os fungicidas utilizados no tratamento das sementes e as condições ambientais observadas por ocasião da inoculação e semeadura (KINTSCHEV et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; PEREIRA et al., 2017).

Em função da possível incompatibilidade dos microrganismos inoculados com o tratamento de sementes, as pesquisas têm sido direcionadas para a busca de formulações de produtos os quais garantiriam um acréscimo na vida útil dos microrganismos nas sementes. Como uma técnica recente que, inicialmente, foi adaptada a partir de materiais desenvolvidos para a indústria farmacêutica, tem-se a peliculização com o uso de “aditivos” osmoprotetores (PEREIRA et al., 2010).

Com a peliculização, há maior retenção dos insumos às sementes, assegurando que fungicidas e inseticidas atuem onde realmente são necessários. O uso de aditivo osmoprotetor ainda garante maior segurança durante o seu manuseio, sendo que a redução da exposição aos produtos químicos adicionados às sementes é o principal fator responsável pelo uso da técnica de peliculização (PEREIRA et al., 2010).

Estudando compostos osmoprotetores, Pereira et al. (2005), verificaram que tanto a germinação como a emergência das plântulas e nodulação da soja não foram afetadas. Além disso, esses autores concluíram que o filme utilizado para o revestimento não afetou a eficiência do tratamento com fungicida em soja. No entanto, Duan e Burris (1997), estimaram que o uso de aditivos osmoprotetores sobre sementes de beterraba provocou decréscimo na germinação de algumas cultivares.

Esses osmoprotetores, compostos por polímeros naturais e por um complexo de açúcares, proporcionariam a formação de uma película ao redor das células bacterianas, impedindo o contato direto com os produtos químicos (redução do efeito da dessecação e favorecimento da manutenção do microambiente, reduzindo o estresse oxidativo das membranas celulares) e forneceriam substrato para sobrevivência do inóculo (solução açucarada), sem comprometer a germinação (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006; LIMA; SOUSA, 2011; SUGAWARA et al., 2006).

2.4 ACIDEZ DO SOLO

Boa parte dos solos agrícolas apresentam limitações ao crescimento das culturas em função dos efeitos negativos da acidez, especialmente, aqueles solos de regiões tropicais e subtropicais. Nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, a correção da acidez do solo é imprescindível para se alcançar elevados índices produtivos para a maior parte das espécies cultivadas. Dentre as alterações geradas pela ação antrópica, o combate da erosão e da acidez do solo, além da utilização de adubação são as práticas de manejo que mais alteram a dinâmica de íons na solução do solo (NOLLA; ANGHINONI, 2006; NOLLA et al., 2015).

Em função da complexidade do sistema solo, as práticas de manejo tendem a afetar substancialmente comunidades microbianas, alterando processos de elevada importância para a produtividade e sustentabilidade do sistema produtivo (FENG et al., 2003; NOLLA et al., 2015). Estudos apontam que parâmetros microbiológicos servem de diagnóstico das alterações decorrentes de diferentes manejos do solo e das culturas. O condicionamento da comunidade microbiana nos solos é essencial para promover a preservação da sua biomassa, de maneira a evitar alterações ambientais relacionadas a distúrbios, como manejos não sustentáveis de solos agrícolas (QUADROS et al., 2012; SILVA et al., 2010). Para Hobbs et al. (2007), todas as características físicas, químicas e biológicas do solo são afetadas de acordo com o seu manejo.

O aumento da acidez do solo, dependendo da saturação por alumínio, ocasiona incremento exponencial de Al^{3+} trocável, que é tóxico às plantas (LOPES et al., 2007). Além disso, o pH do solo interfere de modo direto na disponibilidade dos nutrientes K, Ca, Mg e P (NOLLA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2003). Dessa forma, os efeitos da calagem são praticamente dois, uma vez que aumenta a possibilidade de movimento descendente de Ca^{2+} e Mg^{2+} móveis, que acompanham o NO_3^- quando aplicados via superfície (RIDLEY et al., 2001), além reduzir o alumínio tóxico, proporcionando maior disponibilidade de nutrientes às plantas em função do maior crescimento radicular (RAIJ et al., 1977; SANTOS et al., 2017).

Com a captação de NO_3^- pelas raízes há aumento do pH da rizosfera (saída de hidroxilas para manter o equilíbrio de cargas), resultando em melhorias no desenvolvimento das raízes (TANG et al., 2000). Garbuio et al. (2011) concluíram que a calagem aumenta o pH do solo, a biomassa e atividade microbiana e, a relação bactéria/fungo no interior do solo. Esse conjunto de benefícios incrementa a síntese de aminoácidos, formação de substâncias húmicas solúveis em água e, mineralização e nitrificação de N (QUADROS et al., 2012).

O pH do solo tem elevada influência sobre a decomposição da matéria orgânica e sobre a comunidade microbiana do solo (PERSSON et al., 1983). Para Moreira et al. (2010), com a redução do pH do solo, a população de fungos pode aumentar consideravelmente, reduzindo a população de bactérias. Por outro lado, com a elevação do pH do solo a 6,5 há o favorecimento do crescimento de bactérias, as quais são mais eficientes na mineralização da matéria orgânica, em função de todo o Al^{3+} , tóxico, ter sido neutralizado (BISSANI et al., 2008; MOREIRA et al., 2010).

Estudando a população de bactérias diazotróficas em sistema plantio direto com o uso de diferentes doses e modos de aplicação do calcário, Benedetti et al. (2006), observaram que a maior ocorrência de bactérias foi observada nos tratamentos que receberam 100% da dose de calcário recomendada, seguido da recomendação de 50% e 25% da dose. Estes mesmo autores observaram ainda que no tratamento sem calagem a quantidade de bactérias foi menor.

O sucesso da associação entre bactérias diazotróficas e gramíneas é limitado pela taxa de fixação e pela transferência de quantidades fixas de N às plantas. De maneira geral, as bactérias diazotróficas crescem melhor em uma faixa de pH entre 6,0 e 7,0, sendo que poucas estirpes crescem bem em pH menor que 5,0. Estirpes de crescimento rápido (Ab-V₅ e Ab-V₆) são comumente menos tolerantes à acidez do solo do que as de crescimento mais lento (MOREIRA et al., 2010).

A não sobrevivência das bactérias também afeta o sucesso da inoculação (QUADROS et al., 2012). O estágio inicial da infecção ou contato com a radícula é o mais afetado pela acidez do solo. A acidez pode alterar a troca de sinais moleculares entre a bactéria e planta, além de diminuir a aderência às raízes pela alteração dos exsudatos (HUNGRIA; STACEY, 1997).

Assim, mesmo com os inúmeros estudos sobre comunidades microbianas do solo, o conhecimento do comportamento de determinadas espécies ainda é escasso. São necessários estudos que possibilitem promover a evolução das capacidades biotecnológicas de bactérias diazotróficas, especialmente, da *Azospirillum brasilense*, buscando uma agricultura sustentável e, ao mesmo tempo, com maior capacidade competitiva.

3 ARTIGO 1 - TRATAMENTO QUÍMICO, ADITIVO OSMOPROTETOR E *Azospirillum brasilense* NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DA CULTURA DO TRIGO¹

Resumo - Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito do pH da solução de embebição (4,8 e 6,5), tratamento químico (*imidacloprido*, *tiodicarbe* e *triadimenol*), uso de aditivo osmoprotetor (biopolímeros e açúcares) e a presença de nitrogênio mineral, sobre os efeitos da *A. brasilense* na qualidade fisiológica de sementes e crescimento de plântulas de trigo. Os estudos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. A qualidade fisiológica foi avaliada pelos testes de germinação, primeira contagem de germinação, comprimento parte aérea e raiz e massa seca da parte aérea e raiz. O crescimento inicial foi avaliado pela quantificação da área foliar, massa seca da parte aérea e raiz e parâmetros morfológicos do sistema radicular. A germinação não foi influenciada pelos tratamentos testados. Por outro lado, sementes que receberam tratamento químico ou aditivo osmoprotetor, mesmo na presença da *A. brasilense*, apresentaram vigor inferior à testemunha. Os valores de pH da solução e a presença de nitrogênio não influem nos efeitos da *A. brasilense*. Com a utilização do tratamento químico não há efeito da *A. brasilense* no crescimento de plântulas de trigo.

Palavras-chave: solução de embebição; parâmetros radiculares; hidroponia

Treatment chemical and osmoprotective additives: impact on *Azospirillum brasilense* and wheat growth

Abstract - The objective of this research was to evaluate the effect of the pH of the imbibition solution (4.8 and 6.5), chemical treatment (*imidacloprid*, *thiodicarb* and *triadimenol*), use of the osmoprotectant additive (biopolymers and sugars) and the presence of mineral nitrogen, on the effects of *A. brasilense* on the physiological seed quality and growth of wheat seedlings. The studies were conducted in a completely randomized design with four replications. The physiological quality was evaluated by

¹ Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Ciência Agrárias.

tests of germination, first germination count, shoot length and root and dry mass of shoots and roots. The initial growth was evaluated by the quantification of leaf area, dry mass of shoot and root and morphological parameters of the root system. Germination was not influenced by the treatments tested. On the other hand, seeds that received chemical treatment or osmoprotective additive, even in the presence of *A. brasilense*, showed inferior vigor to the control. The pH values of the solution and the presence of nitrogen do not influence the effects of *A. brasilense*. With the use of the chemical treatment there is no effect of *A. brasilense* on the growth of wheat seedlings.

Key words: choking solution; root parameters; hydroponics

INTRODUÇÃO

Dentre as alternativas disponíveis para obtenção de plântulas de trigo com crescimento superior e estande homogêneo e vigoroso há a possibilidade de associação das sementes com bactérias promotoras do crescimento (Hungria et al., 2016). Em gramíneas têm sido observado resultados positivos com inoculação de *Azospirillum brasilense* (Oliveira et al., 2018; Dias et al., 2019). Estas bactérias podem alterar processos hormonais e estruturais das plântulas, incrementando o seu crescimento e valor adaptativo (Dartora et al., 2013).

Entre os fitohormônios produzidos pela bactéria destacam-se o ácido giberélico e o ácido indolacético (Hungria et al., 2010). Os efeitos destes fitohormônios estão presentes em processos como germinação (ativação do crescimento do eixo embrionário e hidrólise e mobilização de reservas do endosperma) e crescimento inicial de plântulas (alongamento celular), onde se ampliam o número de raízes e volume de solo explorado (Dartora et al., 2013; Costa et al., 2015). Assim, são verificadas plantas mais homogêneas e com maior vigor no estabelecimento do estande, com maior interceptação radicular de nutrientes e redução de estresses causados pela falta de água, o que resulta em aumento da produtividade de grãos (Dartora et al., 2013).

O nitrogênio é o nutriente que mais limita o crescimento e desenvolvimento das plantas. No entanto, a maioria das respostas positivas observadas com a inoculação de *A. brasilense*, são, geralmente, observadas em condições subótimas de disponibilidade do nutriente (Hungria et al., 2010; Hungria et al., 2016). Possivelmente, quando em baixas concentrações, fontes como $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e NH_4NO_3 possam estimular a produção de indóis, fazendo com que se induza ao maior crescimento radicular (Radwan et al., 2004).

Todavia, além da presença de nitrogênio, respostas em crescimento e produtividade de grãos estão associadas à obtenção de condicionantes edafoclimáticos favoráveis para os processos de sobrevivência bacteriana, associação e estímulo aos processos de produção de fitohormônios (Hungria et al., 2010). Dentre os fatores que podem afetar a interação planta e *A. brasilense* e necessitam ser mais bem compreendidos está o pH da solução do solo. Com a faixa de pH ideal para a máxima atividade microbiana no solo sendo de 6,0 a 6,5, condições ácidas do solo nas regiões de cultivo de trigo podem atuar de forma negativa na atividade da bactéria *A. brasilense* (Moreira et al., 2010; Dartora et al., 2013).

Além do pH ácido, as moléculas dos ingredientes ativos utilizados no tratamento químico de sementes, em função do seu pH e solventes utilizados nas formulações, vêm demonstrando efeitos deletérios sobre a atividade de *Bradyrhizobium japonicum* em soja (Alcântara Neto et al., 2014). Todavia, com relação a *A. brasilense* esse conhecimento é restrito. Utilizando *difenoconazole* via tratamento de sementes, Munaretto et al. (2018), observaram que o fungicida inibe o comprimento da parte aérea e raiz e é incompatível com a bactéria, outro fator que pode ser responsável pela ineficácia da *A. brasilense* quando aplicada via semente.

Na maioria das vezes o veículo inoculante não é capaz de oferecer condições de proteção e sobrevivência adequadas a bactéria inoculada (Deaker et al., 2004). Como uma alternativa disponibilizada no mercado agrícola há a utilização de “aditivos” osmoprotetores junto ao inoculante. Compostos por polímeros e um complexo de açúcares, em conjunto com o inoculante, os aditivos podem proporcionar a formação de uma película impedindo o contato direto do produto químico com as bactérias (Pires et al., 2004), no entanto, sua eficácia ainda é duvidosa.

Dessa forma, considerando o potencial da *A. brasilense* em estimular a germinação de sementes e o crescimento inicial de plântulas, bem como, a necessidade de uso de determinados produtos para reduzir o inóculo vinculado às sementes, objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito do pH da solução de embebição, tratamento químico de sementes, uso de osmoprotetor e a presença de nitrogênio mineral, sobre a atividade da *Azospirillum brasilense* e, os efeitos da bactéria sobre a qualidade fisiológica de sementes e o crescimento de plântulas de trigo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para caracterizar a resposta à inoculação com *A. brasilense* sobre a qualidade fisiológica de sementes e o crescimento de plântulas de trigo a pesquisa foi dividida em dois estudos. O primeiro estudo avaliou a qualidade fisiológica das sementes em resposta à inoculação com a bactéria e, o segundo estudo, o crescimento de plântulas de trigo.

Qualidade fisiológica de sementes

O experimento foi conduzido no período de fevereiro e março de 2018, no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria - RS. Utilizou-se sementes da cultivar TBio Toruk (Biotrigo Genética Ltda), que apresentavam 13,4% e 41,3 gramas, respectivamente, para teor de água e a massa de mil sementes (Brasil, 2009). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos organizados em um bifatorial 2x8, com quatro repetições. O primeiro fator constituiu-se nos níveis de pH da solução de embebição (4,8 e 6,5) e, o segundo, em tratamentos aplicados via semente, sendo eles: controle (test.), inoculação com *A. brasilense* (A), tratamento químico (TS), aditivo osmoprotetor (O), A+O, A+TS, O+TS e A+O+TS.

No preparo da solução de embebição foi utilizado HCl para ajustar o valor de pH 4,8 e NaOH para valor 6,5 (segundo Moreira et al. (2010), valor considerado ideal para o crescimento bacteriano). Como tratamento químico foram utilizados em mistura *Imidacloprido + Tiodicarbe* (Cropstar®) e *Triadimenol* (Baytan®), ambos na dose de 3 mL.kg⁻¹ de semente. A aplicação do TS foi realizada no dia anterior a instalação do experimento, a partir da homogeneização dos produtos e as sementes dentro de embalagem plástica.

Como inoculante foi utilizado produto contendo estirpes Ab-V₅ e Ab-V₆ da bactéria *Azospirillum brasilense* (2 x 10⁸ Ufc.mL⁻¹), na dose de 100 mL para 40 kg de semente (Azototal[®] líquido). O aditivo osmoprotetor, composto por biopolímeros osmoprotetores encapsulantes e um complexo de açúcares, foi aplicado na dosagem de 100 mL para 40 kg de semente (Protege TS[®]). A aplicação do inoculante e do aditivo foi realizada no dia da instalação do experimento, separadamente ou em mistura conforme o tratamento, a partir da homogeneização dos produtos e as sementes dentro de embalagem plástica.

Para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram realizados os seguintes testes: germinação, considerando oito subamostras de 50 sementes por tratamento,

dispostas em rolos de papel, umedecidos com água destilada e pH ajustado em quantidade correspondente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos fechados e mantidos em BOD regulada à temperatura de 30 °C por 8 dias. A avaliação foi realizada aos oito dias após a instalação do teste e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (Brasil, 2009); primeira contagem de germinação, realizada conjuntamente com o teste de germinação, avaliando-se o número de plântulas normais no quinto dia após o início do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (Brasil, 2009); comprimento de parte aérea e radícula, conduzido juntamente com o teste de primeira contagem de germinação, aferindo-se 10 plântulas por tratamento. Os comprimentos médios da parte aérea e da raiz foram obtidos dividindo-se a soma das medidas observadas nas subamostras pelo número de plântulas, sendo os resultados expressos em cm.plântula^{-1} ; e, massa seca de plântulas, quantificada nas plântulas usadas na determinação do comprimento de parte aérea e raiz. Cada repetição foi acondicionada em sacos de papel e levada a estufa com circulação forçada de ar, mantida à temperatura de 55°C por 72 horas. Após, cada repetição foi pesada em balança de precisão, sendo os resultados expressos em g.plântula^{-1} .

Crescimento de plântulas

Para isolar os efeitos dos fatores estudados sobre o crescimento inicial de plântulas, o segundo estudo foi subdividido em quatro subestudos, conduzidos sob delineamento inteiramente casualizado, com tratamentos distribuídos em um bifatorial 2x2, com quatro repetições (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos tratamentos de acordo com sua subdivisão

Table 1. Description of treatments according to the subdivision, on initial seedling growth

Subdivisões	Trat. Fitos.*	<i>A. brasilense</i>	Aditivo	Nitrogênio	pH
¹ Subestudo 1	Presença Ausência	Presença Ausência	-	-	6,5
² Subestudo 2	Presente	Presença Ausência	Presença Ausência	-	6,5
³ Subestudo 3	Presente	Presença Ausência	-	-	4,8 6,5
⁴ Subestudo 4	-	Presença Ausência	-	Presença Ausência	6,5

*Trat. Fitos.; tratamento químico, *A. brasilense*: inoculação com *Azospirillum brasilense*, Aditivo: aditivo osmoprotetor, Nitrogênio: nitrogênio na solução nutritiva, pH: pH da solução hidropônica.

¹Com o objetivo de avaliar a influência do tratamento químico de sementes sobre a atividade da *A. brasilense* e, os efeitos da bactéria sobre o crescimento inicial de plântulas.

²Com o objetivo de avaliar a utilização do aditivo osmoprotetor como tecnologia de redução do efeito prejudicial causado pelo tratamento químico sobre a atividade da *A. brasilense*.

³Com o objetivo de avaliar em qual valor de pH da solução hidropônica as plantas apresentam maior crescimento e, a bactéria, o melhor efeito sobre o crescimento inicial de plântulas.

⁴Com o objetivo de avaliar a influência do nitrogênio na solução nutritiva sobre a atividade da *A. brasilense* e, os efeitos da bactéria sobre o crescimento inicial de plântulas.

Os experimentos foram conduzidos em sistema hidropônico, no interior de casa de vegetação. Foram utilizadas sementes da cultivar TBio Toruk (Biotrigo Genética Ltda). Inicialmente, as sementes foram dispostas em papel umedecidos com água destilada em quantidade correspondente a 2,5 vezes a massa do papel seco, sendo os rolos de papel acondicionados em sacos plásticos e mantidos em BOD regulada à temperatura de 25 °C por nove dias.

No décimo dia após a sementeira, plântulas uniformes e representativas do conjunto foram selecionadas, destacou-se o cotilédone, sendo as mesmas transferidas para sistema hidropônico. A solução nutritiva dos subestudos um, dois e três era composta por: CaCl_2 : 221,96 mg.L^{-1} ; MgSO_4 : 246,40 mg.L^{-1} ; KH_2PO_4 : 544,40 mg.L^{-1} ; $\text{FeSO}_4/\text{Na-EDTA}$: 13,34 mg.L^{-1} e solução completa de micronutrientes: Mo: 0,09 mg.L^{-1} ; B: 1,54 mg.L^{-1} ; Cu: 0,11 mg.L^{-1} ; Mn: 0,39 mg.L^{-1} ; Zn: 0,57 mg.L^{-1} e Ni: 0,04 mg.L^{-1} . No subestudo quatro, onde foi utilizado N na solução, esta foi composta por: KNO_3 : 101,1 mg L^{-1} ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: 432,2 mg L^{-1} ; MgSO_4 : 246,4 mg L^{-1} ; NH_4NO_3 : 144 mg L^{-1} ; KH_2PO_4 : 408,3 mg L^{-1} ; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: 115,3 mg L^{-1} ; $\text{FeSO}_4/\text{Na-EDTA}$: 13,34 mg L^{-1} , utilizando-se a mesma solução de micronutrientes anteriormente citada. Tendo por base o pH inicial da solução, utilizou-se HCl para ajuste do pH 4,8 e NaOH para 6,5. Como tratamento químico, aditivo osmoprotetor e inoculante foram utilizados os mesmos produtos e modos de aplicação do primeiro estudo.

O sistema hidropônico era composto por bandejas e cada bandeja compreendia uma parcela onde foram cultivadas dez plantas durante 18 dias após o transplante. A substituição da solução nutritiva foi realizada a cada seis dias. No 18º dia as plantas foram coletadas, separou-se parte aérea e raiz e determinou-se: área foliar, massa seca da parte aérea e raízes e parâmetros morfológicos do sistema radicular.

A área foliar e parâmetros morfológicos do sistema radicular: diâmetro médio de raízes, comprimento radicular total, comprimento de raízes axiais, comprimento de raízes laterais, volume total, volume de raízes axiais, volume de raízes laterais e área

superficial foram obtidos por meio de análises de imagens utilizando o software WinRhizo Pro 2013, acoplado a um scanner EPSON Expression 11000 equipado com luz adicional (TPU), na definição de 600 dpi, sendo os valores expressos por planta.

O comprimento, volume e área radicular das raízes axiais e laterais foram extraídos do total das classes de diâmetro obtidas pelo WinRhizo, sendo consideradas raízes axiais aquelas com diâmetro superior a 0,3 mm e laterais aquelas com diâmetro inferior a 0,3 mm (conforme ensaio prévio). Após as avaliações o material foi acondicionado em sacos de papel e seco em estufa com circulação forçada de ar a 40°C, determinando-se a massa seca da parte aérea e raiz, sendo os valores expressos em g.planta⁻¹.

Análise estatística

Os dados coletados, para ambos os estudos, foram submetidos a análise de variância (ANOVA), sendo observada diferença significativa entre os tratamentos foi realizado o teste complementar de separação de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa Sisvar (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

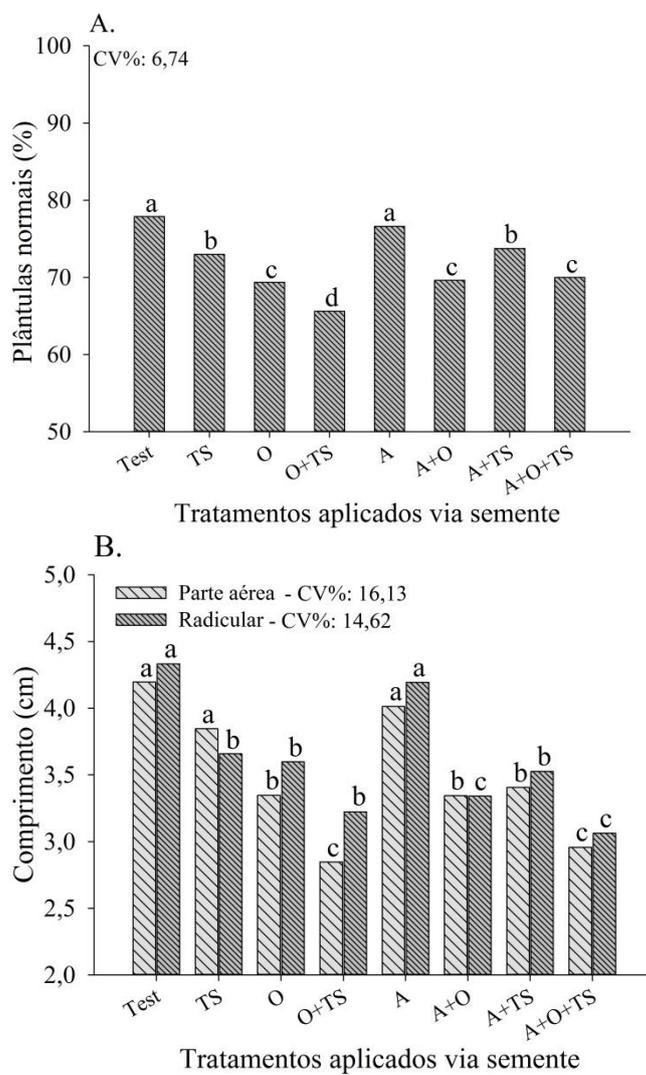
Qualidade fisiológica de sementes

A germinação não foi influenciada pelo pH da solução de embebição ou tratamentos aplicados via semente. Provavelmente, na germinação, o crescimento do eixo embrionário tenha sido modulado em maior grau por recursos adquiridos durante a formação e maturação das sementes (Cotrim et al., 2016). Dessa forma, os reguladores de crescimento secretados pela bactéria que penetraram no tegumento da semente junto a água durante o processo de embebição podem não ter sido capazes de alterar a intensidade das reações relacionadas à germinação (Cassán et al., 2009)

Dessa forma, a ausência de resposta na percentagem de plântulas normais é contrária a observada por Cassán et al. (2009) e Dartora et al. (2013) com a cultura do milho, onde a inoculação de sementes com *A. brasilense* incrementou o percentual germinativo da cultura. Por outro lado, observou-se não haver efeito deletério da *A. brasilense* à germinação do trigo. Sementes que receberam somente a inoculação da bactéria apresentaram percentual de germinação semelhante ao observado na testemunha.

Com relação ao observado na primeira contagem de germinação, sementes que foram somente inoculadas tiveram o vigor de plântulas preservado, com valores semelhantes a testemunha (Figura 1A). Por outro lado, sementes que receberam tratamento químico ou

aditivo osmoprotetor, mesmo na presença da *A. brasilense*, apresentaram valores inferiores tanto à testemunha quanto a inoculação da bactéria de forma isolada. A utilização do TS + aditivo osmoprotetor reduziu em 15,73% o vigor em relação a testemunha.



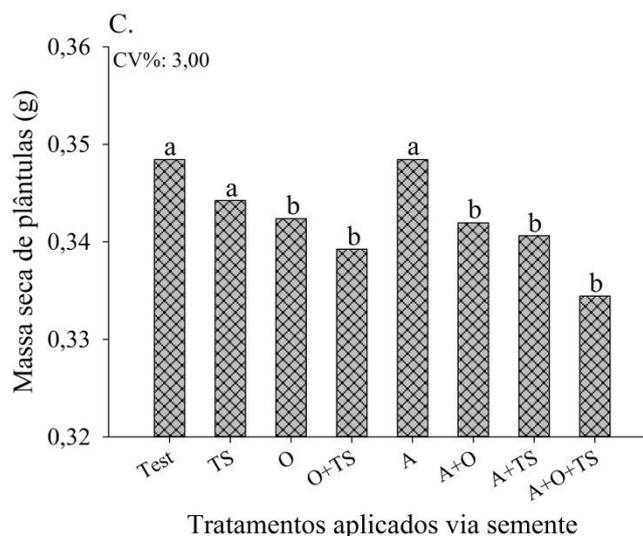


Figura 1. Efeito dos tratamentos aplicados via sementes sobre os valores observados nos testes de primeira contagem de germinação (A.), comprimento da parte aérea e radicular (B.) e massa seca de plântulas (C.) do trigo

Figure 1. Effect of seed treatments on the values observed in the tests of first germination count (A.), shoot and root length (B.) and seedling dry weight (C.) of wheat

*Controle (test.); Inoculação com *A. brasilense* (A); Tratamento químico de sementes (TS); Aditivo osmoprotetor (O). **Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Esses resultados corroboram com os observados por Ludwig et al. (2014), em que os autores relatam efeito fitotóxico do tratamento químico quando se avaliou germinação e crescimento de plântulas em substrato de papel. Em solo essa fitotoxicidade pode não ocorrer, pois parte do produto está sujeito a adsorção aos colóides do solo (Nóbrega et al., 2005) ou ainda ser lixiviado ou diluído na ocorrência de precipitação pluvial.

Com relação ao observado na utilização do aditivo osmoprotetor, supõe-se que o incremento no número de barreiras físicas ao redor das sementes possa ter ocasionado redução na velocidade de embebição e do fluxo de oxigênio para o interior da semente, diminuindo a velocidade das reações metabólicas envolvidas com a germinação. Além disso, o incremento no número de barreiras físicas que o eixo embrionário teve de romper pode ter ocasionado redução na velocidade de germinação (Mendonça et al., 2007).

O comprimento da parte aérea e raiz, semelhante ao observado na primeira contagem de germinação, foi inferior com a aplicação do aditivo osmoprotetor e/ou tratamento químico (Figura 1B). Na parte aérea, a redução em relação à testemunha foi na ordem de 32 e 29%, respectivamente, com a utilização do aditivo osmoprotetor + TS e *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor + TS. No sistema radicular, as reduções mais

substanciais foram de 16 e 29%, entretanto, na utilização do aditivo osmoprotetor + TS e *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor. Como mencionado anteriormente, nesses tratamentos a germinação ocorreu depois, havendo menor tempo para o crescimento das plântulas (Mendonça et al., 2007).

Redução no vigor de plântulas também foi observada através da massa seca de plântulas. À medida que aumentou o número de produtos aplicados sobre as sementes houve redução gradativa da massa seca de plântulas (Figura 1C.). Possivelmente a ausência de incremento no vigor de plântulas pela inoculação seja em função de que a associação entre a bactéria e planta leve um tempo superior a estudado para ser verificada e com isso sejam observados benefícios.

Crescimento de plântulas

Subestudo 1

Não foi observada interação entre os fatores testados. Avaliando os fatores de forma isolada, a inoculação sem o tratamento químico incrementou em 18% a massa seca de raízes e 15% o volume total de raízes em relação ao não inoculado. O maior volume de raízes axiais nas plântulas inoculadas (22%), possivelmente, foi o responsável pelo incremento no volume total e a massa seca de raízes, uma vez que o volume de laterais não foi alterado (Figura 2).

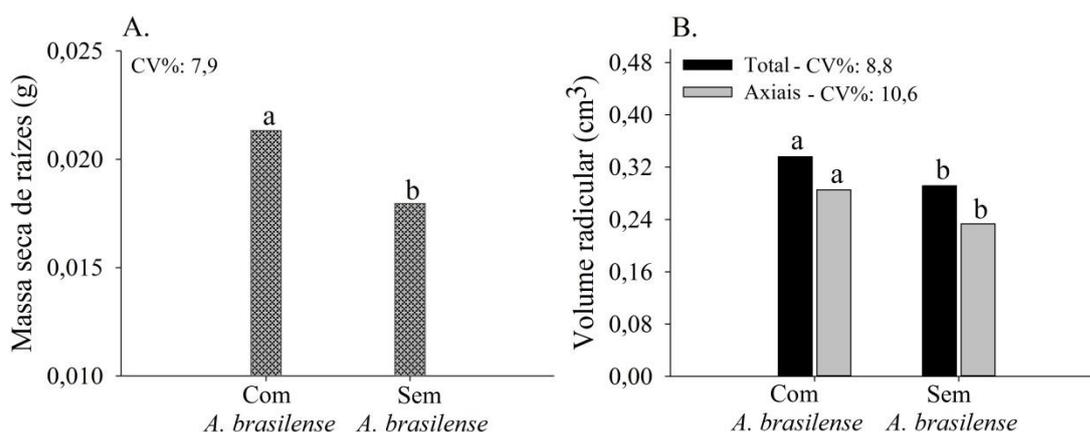


Figura 2. Resposta sobre a massa seca de raízes (A.) e volume radicular (B.) de plântulas de trigo, em função da inoculação com *A. brasilense*, aos 28 dias após a semeadura

Figure 2. Response on dry mass of roots (A.) and root volume (B.) of wheat seedlings, as a function of inoculation with *A. brasilense*, at 28 days after sowing

*Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Ao alterar a morfologia das raízes, as bactérias possibilitam a exploração de um maior volume de solo, aumentando o acesso a nutrientes e assim, possibilitando o incremento do processo de redução assimilatória do nitrato disponível no solo, além da maior fixação biológica do nitrogênio atmosférico, pelo incremento de área rizosférica (Martins et al., 2018). Entre esses mecanismos o incremento do sistema radicular pode ser o mais importante, uma vez que possibilita maior absorção de minerais e água (Cassán et al., 2009; Galindo et al., 2017).

A produção de fitohormônios pelas bactérias pode ser o fator responsável pelo efeito observado no crescimento radicular (Hungria et al., 2010). O principal hormônio produzido por estirpes de *A. brasilense* é o ácido 3-indolacético (AIA) (Radwan et al., 2004; Moreira et al., 2010), sendo o crescimento radicular mais sensível à adição de auxina que células de parte aérea.

Com relação ao tratamento químico de sementes, observou-se que plântulas oriundas de sementes tratadas e sem a inoculação apresentaram redução de 35% na área foliar, 28% na massa seca da parte aérea, 30% na massa seca de raízes, 6% no diâmetro médio radicular, 42% no comprimento de raízes, 32% no volume de raízes e 40% na área superficial em relação às não tratadas e não inoculadas (Figura 3).

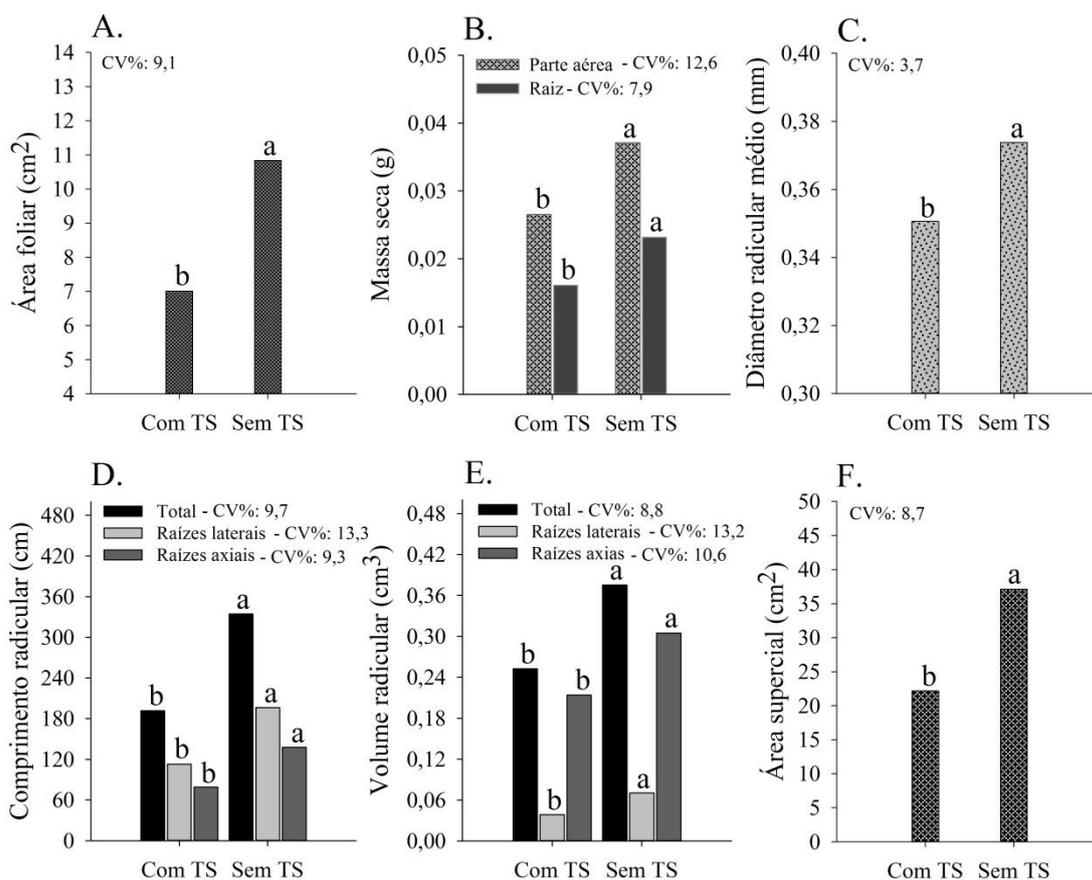


Figura 3. Efeito da aplicação do tratamento químico sobre a área foliar (A.), massa seca da parte aérea e raízes (B.), diâmetro médio de raízes (C.), comprimento radicular (D.), volume radicular (E.) e área superficial (F.) de plântulas de trigo aos 28 dias após a semeadura

Figure 3. Effect of the chemical treatment of seeds on the leaf area (A.), aerial part dry mass and roots (B.), mean root diameter (C.), root length (D.), root volume (E.) surface area (F.) of wheat seedlings at 28 days after sowing

*Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

O fato de plântulas oriundas de sementes sem tratamento químico e inoculadas terem sido superiores às de sementes tratadas e inoculadas pode ser explicado por um possível efeito fitotóxico dos produtos sobre a bactéria e o crescimento das plântulas. Nos estudos de Balardin & Loch (1987), o tratamento das sementes de centeio e aveia com *thiram* inibiu a germinação de sementes de aveia, além de interferir negativamente no comprimento de raiz e coleóptilo das sementes de centeio, indicando uma inibição do crescimento.

Esta redução no vigor das plântulas pode ser esclarecida em função dos efeitos tóxicos exercidos por estes produtos químicos, envolvendo a formação de radicais livres. Além disso, a ausência de interação entre os fatores leva a pressupor que o tratamento químico é tóxico às bactérias, uma vez que não houve diferença entre a presença ou ausência de bactéria quando da utilização do tratamento químico, sendo

esses valores inferiores aos observados em plântulas somente com a inoculação (Figura 2).

Subestudo 2

Não foi observada influência da utilização do aditivo osmoprotetor nas respostas apresentadas pela inoculação com *A. brasilense* sobre o crescimento de plântulas. Por outro lado, houve redução na massa seca da parte aérea e comprimento, volume e área superficial radicular com a utilização do aditivo (Figura 4). Possivelmente, o aditivo aumentou a retenção do tratamento químico sobre a superfície das sementes, aumentando seus efeitos fitotóxicos sobre as plântulas (Balardin & Loch, 1987). Além disso, o incremento no número de barreiras físicas que o eixo embrionário teve de romper pode ter ocasionado redução na velocidade do processo germinativo. Essas sementes germinaram depois, havendo menos tempo para o crescimento das plântulas (Mendonça et al., 2007).

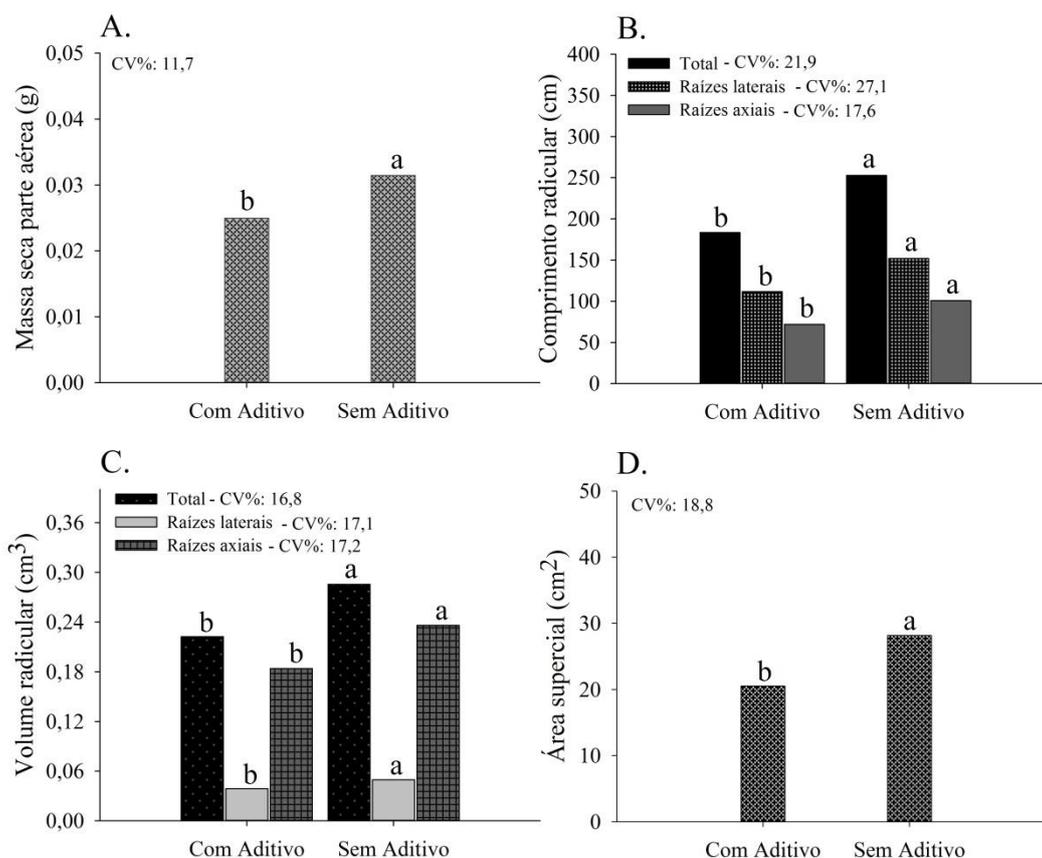


Figura 4. Efeito da utilização de aditivo osmoprotetor sobre a massa seca da parte aérea (A.), comprimento radicular (B.), volume radicular (C.) e área superficial (D.) de plântulas de trigo aos 28 dias após a semeadura

Figure 4. Effect of the use of osmoprotectant additive on the aerial part dry mass (A.), root length (B.), root volume (C.) and surface area (D.) of wheat seedlings at 28 days after sowing

*Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Semelhante ao observado no subestudo 1, quando da utilização da *A. brasilense* observou-se incremento de 21% na massa seca da parte aérea, 44% no comprimento radicular total, 18% no volume de raízes laterais e 38% área superficial (Figura 5).

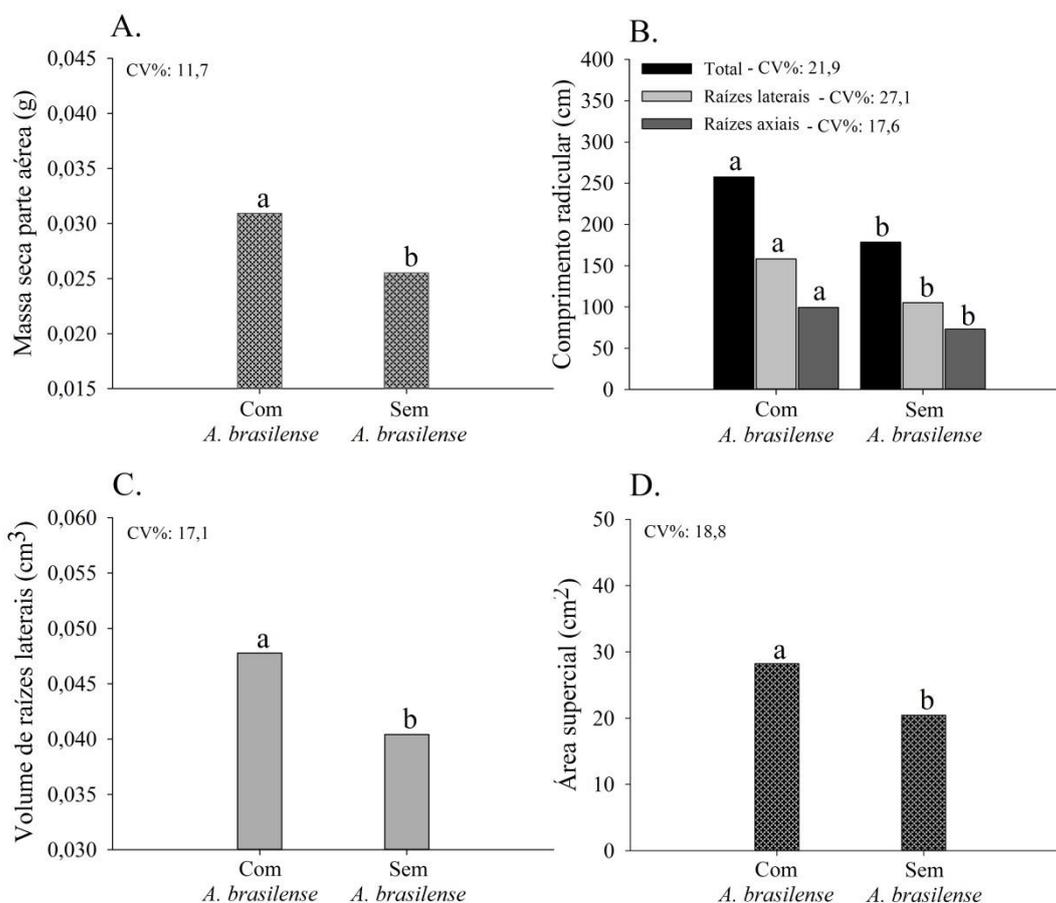


Figura 5. Efeito da inoculação de sementes com *A. brasilense* sobre a massa seca da parte aérea (A.), comprimento radicular (B.), volume de raízes laterais (C.) e área superficial radicular (D.) de plântulas de trigo aos 28 dias após a semeadura

Figure 5. Effect of seed inoculation with *A. brasilense* on aerial part dry mass (A.), root length (B.), lateral root volume (C.) and root surface area (D.) of wheat seedlings at 28 days after sowing

*Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Subestudo 3

Plântulas em solução nutritiva com pH 4,8 apresentaram parâmetros de crescimento com valores estatisticamente iguais aos observados em plântulas mantidas em solução com pH 6,5. A elevada atividade de H^+ na solução (valores de pH iguais ou maiores

que 4,8) parece não ser um fator limitante ao crescimento normal das plantas, desde que para isso haja suprimento adequado de todos os nutrientes, sem a presença de elementos tóxicos.

De maneira semelhante, não se observou alteração da resposta à inoculação da bactéria em função do pH da solução nutritiva. A concentração de íons H^+ , nos valores testados, parece não ter efeito sobre a *A. brasilense*. Entretanto, em solo a influência indireta do pH da solução do solo na disponibilidade de nutrientes e compostos tóxicos às plantas e células microbianas pode restringir o crescimento radicular e reduzir a atividade da *A. brasilense* (Cassán et al., 2009).

Semelhante ao observado nos subestudos anteriores houve efeito da inoculação com *A. brasilense* sobre o crescimento de plântulas, resultando em incremento de 37% na área foliar, 44% na massa seca de parte aérea, 38% massa seca de raízes, 55% na área superficial, 57% no comprimento radicular total e 49% volume radicular total com a utilização da bactéria.

Subestudo 4

Não se observou efeito da interação entre inoculação com *A. brasilense* e utilização do N na composição da solução nutritiva. Todavia, semelhante ao observado nos subestudos anteriores, houve incremento no crescimento de plântulas com a inoculação da bactéria (Figura 6). Possivelmente, na presença do nitrogênio a *A. brasilense* poderia vir a induzir um maior crescimento inicial das plantas, uma vez que as fontes $NH_4H_2PO_4$ e NH_4NO_3 estimulam a produção de indóis, quando em baixas concentrações como nesta condição de estudo (Radwan et al., 2004), o que não foi observado nesse estudo.

A presença de N na solução nutritiva resultou em incremento de 22% na massa seca da parte aérea, 32% no comprimento radicular, 20% no volume radicular e 24% na área superficial (Figura 6). O N está relacionado com a fotossíntese, respiração, crescimento e atividade das raízes, além da absorção iônica de outros nutrientes. Assim, o nitrogênio é um dos nutrientes que promove maiores modificações morfofisiológicas na planta (Nakão et al., 2018).

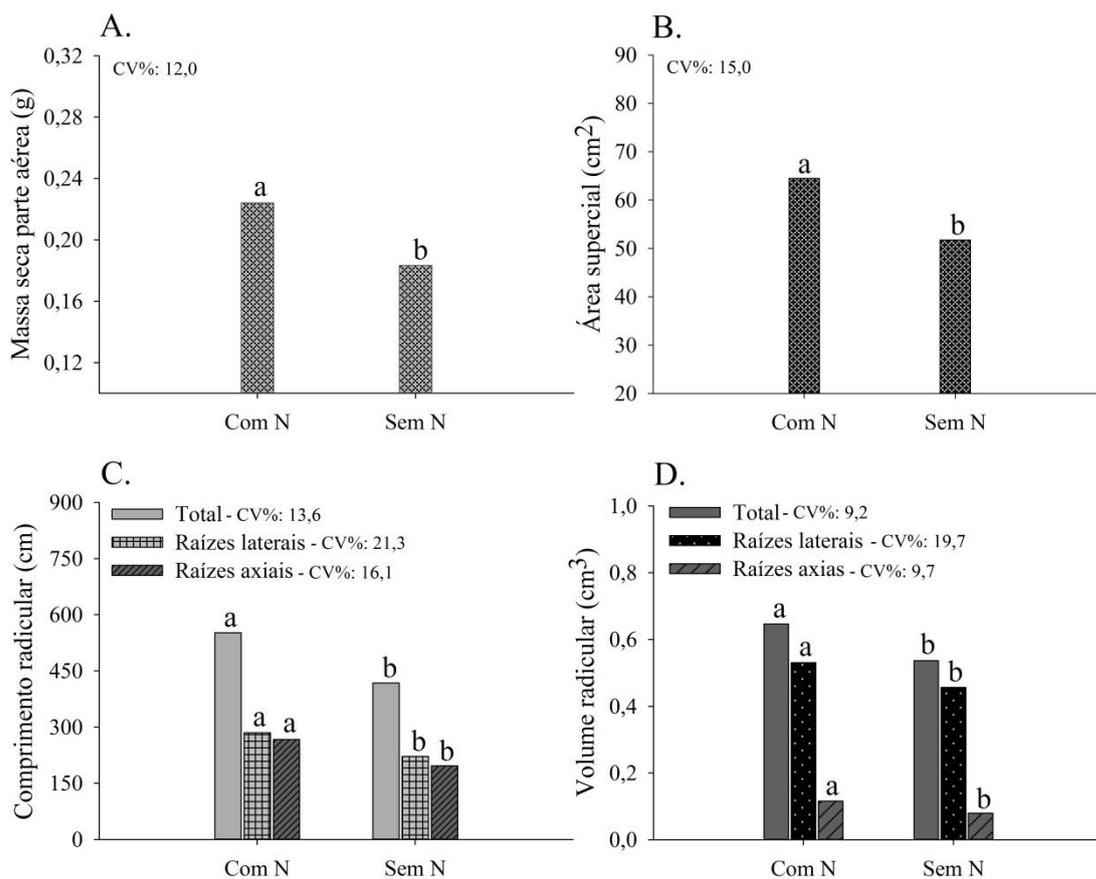


Figura 6. Efeito do nitrogênio na solução nutritiva sobre a massa seca de parte aérea (A), área superficial (B), comprimento radicular (C) e volume radicular (D) de plântulas de trigo aos 28 dias após a semeadura

Figure 6. Effect of nitrogen on nutrient solution on shoot dry mass (A.), surface area (B.), root length (C.) and root volume (D.) of wheat seedlings at 28 days after sowing

*Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

CONCLUSÕES

A germinação não é influenciada pelo pH da solução de embebição e pelos tratamentos aplicados via semente, entretanto, há redução do vigor de plântulas com o acréscimo do tratamento químico e/ou aditivo osmoprotetor.

O pH e a presença de nitrogênio na solução nutritiva, nos valores testados, não influenciam sobre os efeitos observados com a inoculação da *A. brasilense*.

A inoculação incrementa o crescimento radicular, entretanto, com a utilização do tratamento químico e/ou do aditivo osmoprotetor não há efeito da *A. brasilense*.

LITERATURA CITADA

Alcântara Neto, F.; Pacheco, L. P.; de Araújo, A. S. F.; Petter, F. A.; de Almeida, F. A.; de Albuquerque, J. D. A. A. Tempo de contato e de combinações de fungicidas, aditivo

e inoculante sobre a sobrevivência de rizóbios e nodulação da soja. Revista Agroambiente, v.8, n.1, p.149-154, 2014. <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v8i1.1770>

Balardin, R.S.; Loch, L.C. Efeito de *thiram* sobre a germinação de sementes de centeio e aveia. Revista Brasileira de Sementes, v.9, n.1, p.113-117, 1987. <https://www.agrolink.com.br/downloads/88340.pdf>. 13 set. 2018.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

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, v.45, n.1, p.28-35, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005>

Costa, R. R. G. F.; Quirino, G. D. S. F.; de Freitas Naves, D. C.; Santos, C. B.; de Souza Rocha, A. F. Eficiência de inoculante com *Azospirillum brasilense* no crescimento e produtividade de milho de segunda safra. Pesquisa Agropecuária Tropical, v.45, n.3, p.304-311, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632015v4534593>

Cotrim, M. F.; Alvarez, R. C. F.; Seron, A. C. C. Qualidade fisiológica de sementes de trigo em resposta a aplicação de *Azospirillum brasilense* e ácido húmico. Brazilian Journal of Biosystems Engineering, v.10, n.4, p.349-357, 2016. <http://dx.doi.org/10.18011/bioeng2016v10n4p349-357>

Dartora, J.; Marini, D.; Guimarães, V. F.; Pauletti, D. R.; Sander, G. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de milho e trigo inoculadas com estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. Global Science and Technology, v.6, n.3, p.190-201, 2013. <https://doi.org/10.14688/1984-3801.v06n03a20>

Deaker, R.; Roughley, R. J.; Kennedy, I. R. Legume seed inoculation technology - a review. *Soil Biology and Biochemistry*, v.36, n.8, p.1275-1288, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.009>

Dias, V. C.; Peluzio, J. M.; Lima, M. D. Effects of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen dose on oil content of corn grains. *Revista de Agricultura*, v.93, n.3, p.299-312, 2019. <http://www.revistadeagricultura.org.br/index.php/revistadeagricultura/article/view/3264/pdf>. 13 set. 2018.

Ferreira, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

Galindo, F. S.; Teixeira Filho, M. C. M.; Buzetti, S.; Santini, J. M. K.; Alves, C. J.; Ludkiewicz, M. G. Z. Wheat yield in the Cerrado as affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.52, n.9, p.794-805, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2017000900012>

Hungria, M.; Campo, R. J.; Souza, E. M.; Pedrosa, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, v.331, n.2, p.413-425, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>

Hungria, M.; Nogueira, M. A.; Araujo, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v.221, n.1, p.125-131, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>

Ludwig, E. J.; Nunes, U. R.; Mertz, L. M.; da Silva, J. R.; Nunes, S. C. P. Vigor e produção de sementes de crambe tratadas com fungicida, inseticida e polímero. *Científica*, v. 42, n. 3, 271-277, 2014. <http://dx.doi.org/10.15361/1984-5529.2014v42n3p271-277>

Martins, T. G.; Júnior, F.; Paiva, S.; Luz, L. N.; Marco, C. A.; Vásquez, E. M. F. Inoculation efficiency of *Azospirillum brasilense* on economising nitrogen fertiliser in landrace popcorn. *Revista Ciência Agronômica*, v.49, n.2, p.283-290, 2018. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20180032>

Mendonça, E. A. F. D.; Carvalho, N. M. D.; Ramos, N. P. Revestimento de sementes de milho superdoce (SH₂)¹. *Revista Brasileira de Sementes*, v.29, n.2, p.68-79, 2007. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v29n2/v29n2a10>. 13 set. 2018.

Moreira, F. M. D. S.; Da Silva, K.; Nóbrega, R. S. A.; De Carvalho, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, v.2, n.1, p.74-99, 2010. https://www.researchgate.net/profile/Fatima_Moreira/publication/279467287_Diazotrophic_associative_bacteria_Diversity_ecology_and_potential_applications/links/566eb08608ae62b05f0b5bfa.pdf. 13 set. 2018.

Munaretto, J. D.; Martin, T. N.; Müller, T. M.; Nunes, U. R.; da Rosa, G. B.; Grando, L. F. T. Compatibility of *Azospirillum brasilense* with fungicide and insecticide and its effects on the physiological quality of wheat seeds. *Semina: Ciências Agrárias*, v.39, n.2, p.855-864, 2018. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n2p855>

Nakao, A. H.; Andreotti, M.; Soares, D. D. A.; Modesto, V. C.; Dickmann, L. Intercropping *Urochloa brizantha* and *sorghum inoculated* with *Azospirillum brasilense* for silage. *Revista Ciência Agronômica*, v.49, n.3, p.501-511, 2018. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20180057>

Nóbrega, J. C. A.; de Lima, J. M.; Guerreiro, M. C.; Rigitano, R. L. O.; Moreno, S. A. C. Retenção do fungicida triadimenol em Latossolos em razão da calagem e da fosfatagem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, n.5, p.503-511, 2005. <http://www.scielo.br/pdf/%0D/pab/v40n5/24433.pdf>. 13 set. 2018.

Oliveira, R. P.; Lima, S. F.; Alvarez, R. D. C. F.; Baldani, V. L. D.; Oliveira, M. P.; Brasil, M. S. *Azospirillum brasilense* inoculation and management of fertilizer nitrogen in maize. *Revista de Agricultura*, v.93, n.3, p.347-361, 2019.

<http://revistadeagricultura.com.br/index.php/revistadeagricultura/article/view/3246>

Pires, J. L. L.; Bragantini, C.; Costa, J. L. D. Storage of dry bean seeds coated with polymers and treated with fungicides. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, n.1, p.709-715, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004000700013>

Radwan, T.; Mohamed, Z. K.; Reis, V. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. *Symbiosis*, v.32, n.1, p.39-54, 2004.

4 ARTIGO 2 - FISILOGIA DE PLANTAS E PRODUTIVIDADE DO TRIGO INOCULADO E CULTIVADO EM DIFERENTES pH'S DE SOLO²

Resumo - Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito do tratamento químico de sementes, do uso de aditivo ao inoculante e do pH do solo sobre a *Azospirillum brasilense* e, os efeitos da bactéria sobre parâmetros fisiológicos de plantas e a produtividade do trigo. Os tratamentos compreenderam a utilização da *A. brasilense*, aditivo osmoprotetor e tratamento químico de sementes, em solo de cultivo com e sem correção da acidez. Os tratamentos foram organizados no delineamento blocos casualizados, com quatro repetições. Foram avaliados parâmetros fisiológicos nas folhas por ocasião do afilhamento e florescimento da cultura e, componentes de produtividade de grãos na maturação fisiológica. A peroxidação lipídica foi maior em solo sem correção. Maior atividade da enzima nitrato redutase foi observada quando as plantas foram cultivadas em solo com acidez corrigida, assim como, com a inoculação com *A. brasilense*. A utilização do aditivo não atenua os efeitos da utilização do tratamento químico de sementes. Com o tratamento químico não há resposta do trigo à inoculação com *A. brasilense*. Em solo com pH 6,5 a *A. brasilense* incrementa a produtividade de grãos do trigo.

Palavras-chave: estresse oxidativo; nitrato redutase; acidez do solo

Plant physiology and productivity of wheat inoculated and cultivated in different soil pH's

Abstract - The objective of this research was to evaluate the effect of chemical treatment of seeds, the use of additive to the inoculant and soil pH on *A. brasilense*, and the effects of the bacterium on physiological parameters of plants and wheat yield. The treatments included the use of *A. brasilense*, an osmoprotective additive and chemical treatment of seeds, in cultivation soil with and without acidity correction. The treatments were arranged in a randomized complete block design with four replications. Physiological parameters were evaluated in the leaves on the occasion of the

² Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Ciência Agrárias.

afilhamento and flowering of the crop and components of grain yield in the physiological maturation. Lipid peroxidation was higher in soil without correction. Higher activity of the nitrate reductase enzyme was observed when the plants were cultivated in soil with corrected acidity, as well as with inoculation with *A. brasilense*. The use of the additive does not mitigate the effects of using chemical seed treatment. With the chemical treatment there is no response of wheat to inoculation with *A. brasilense*. In soil with pH 6.5 the *A. brasilense* increases the yield of wheat grains.

Key words: oxidative stress; nitrate reductase; soil acidity

INTRODUÇÃO

A disponibilidade de nitrogênio (N) em quantidade adequada à planta é fator determinante da expressão da produtividade potencial da cultura do trigo (Santos et al., 2017). Quando do fornecimento de N em quantidade inadequada ampliam-se os eventos de oxidação e redução de moléculas no interior das células. Com isso, há a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), subprodutos decorrentes da redução parcial do oxigênio molecular (Halliwell & Whiteman, 2004).

As principais formas de EROs produzidos são: radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e oxigênio *singlet* (1O_2). O H_2O_2 , por exemplo, é capaz de promover a quebra do óxido nítrico, onde os subprodutos gerados promovem a diminuição da taxa de aphilamento, redução do número de folhas vivas e baixa produção de massa seca de plantas (Dordas et al., 2009). Para eliminar as EROs as plantas apresentam um complexo sistema antioxidante, entretanto, o desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes caracteriza-se pela instalação do processo de estresse oxidativo (Halliwell & Whiteman, 2004), capaz de interpor limitações à produtividade da cultura.

Nas plantas as necessidades de N podem ser supridas por fontes industrializadas do nutriente (Costa et al., 2018), mineralização de restos culturais com baixa relação C/N (Bertoncelli et al., 2017) e da matéria orgânica do solo (Rosa et al., 2017) ou pela fixação biológica de nitrogênio (Hungria et al., 2016). O N fornecido via fixação biológica é, entretanto, menos propenso a lixiviação e volatilização, sendo utilizado *in situ*, além de ter o fornecimento constante (Rodrigues et al., 2014).

Em gramíneas observam-se bons resultados com a inoculação de *Azospirillum brasilense* (Rodrigues et al., 2014). Essas bactérias promovem o crescimento radicular (Santos et al., 2017), manutenção de maior número de aphilos férteis, translocação mais

eficiente de N para os grãos e incremento na produtividade de grãos (Didonet et al., 2000). Todavia, em função de estarem associadas livremente às plantas tornam-se vulneráveis ao ambiente em que são postas, podendo ter seu crescimento e atividade modulados (Moreira et al., 2010). A acidez do solo nas regiões de cultivo do trigo pode atuar de forma negativa sobre a atividade da *A. brasilense*. Além de que, nesta condição pode ser intensificada a competição com outros microrganismos (fungos) edáficos (Moreira et al., 2010), resultando na alteração de resultados observados em determinados estudos.

O tratamento químico de sementes constitui outro fator a ser observado. Isso é observado em *Bradyrhizobium* spp. inoculadas em soja, onde os processos de simbiose e formação de nódulos são afetados (Alcântara Neto et al., 2014). Todavia, com relação a *A. brasilense* esse conhecimento ainda necessita ser ampliado, podendo ser um dos responsáveis pela alternância e ineficácia da *A. brasilense* em estudos com aplicação da bactéria via semente.

Para minimizar a possível perda de carga/eficiência bacteriana em função do tratamento químico de sementes, uma alternativa pode ser a utilização de “aditivos” osmoprotetores junto ao inoculante. Compostos por polímeros e um complexo de açúcares, em conjunto com o inoculante proporcionam a formação de uma película impedindo o contato direto do produto químico com as bactérias (Pires et al., 2004). Nesta condição, a prática da inoculação poderia ser realizada concomitantemente ao tratamento químico, sem prejuízo aos efeitos da bactéria.

Em função do mencionado, o objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito do tratamento químico de sementes, do uso de aditivo ao inoculante e do pH do solo sobre a *Azospirillum brasilense* e, os efeitos da bactéria sobre parâmetros fisiológicos de plantas e a produtividade do trigo.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida nos anos agrícolas 2016 e 2017. O clima da região é classificado como Cfa (subtropical úmido) conforme Köppen (Peel et al., 2007), sendo a representação da precipitação pluviométrica e temperatura média do ar observadas durante a condução do experimento apresentadas na Figura 1.

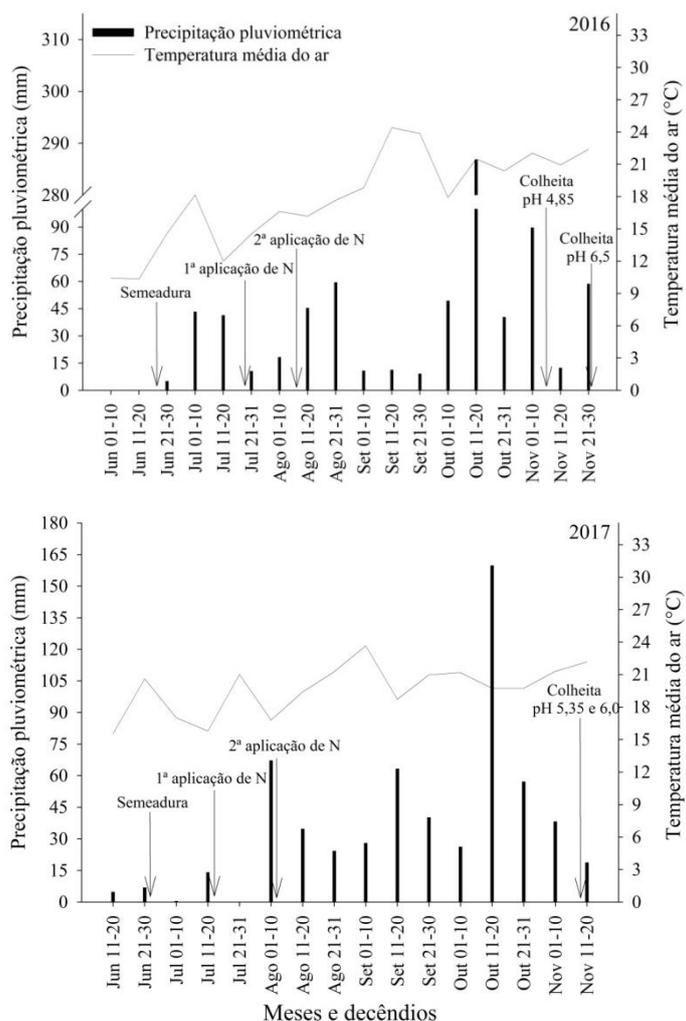


Figura 1. Precipitação pluviométrica e temperatura média do ar no período de condução do experimento

Figure 1. Rainfall and mean air temperature during the conduction period of the experiment

*Dados obtidos da estação automática do INMET, distante 1200 metros da área experimental.

O solo da área é classificado como Argissolo Vermelho distrófico típico (Embrapa, 2013), apresentando os seguintes atributos químicos quantificados na camada de 0,00-0,20 m (Tabela 1).

Tabela 1. Atributos químicos do solo por ocasião da instalação dos experimentos a campo

Table 1. Chemical attributes of the soil during the installation of field experiments

Solo	pH	MO	P _(Melich)	K	Al	Ca	Mg	H+Al	CTC (pH 7)	Índice SMP	V (%)	m (%)
	H ₂ O (1:1)	m/v	-- mg.dm ⁻³	--	----- cmol _c .dm ⁻³ -----							
Ano de 2016												
A ⁽¹⁾	4,85	2,4	10,7 ^{(29%)*}	88	1,6	4,2	1,8	17,5	23,9	4,95	32,9	33,1
B ⁽²⁾	6,5	2,5	12,2 ^{(27%)*}	78	0,0	6,1	2,6	5,3	14,3	6,5	63,1	0,0
Ano de 2017												
A ⁽¹⁾	5,35	2,0	7,0 ^{(27%)*}	56	1,4	5,7	2,4	5,8	14,2	5,75	58,6	14,7
B ⁽²⁾	6,0	2,3	16,0 ^{(20%)*}	62	0,1	6,3	2,8	3,3	12,6	6,35	73,2	2,1

⁽¹⁾Sem correção da acidez. ⁽²⁾Com acidez corrigida. *Teor de argila.

A correção da acidez do solo “B” foi realizada em setembro de 2015, conforme análise química do solo e recomendações da CQFS-RS/SC (2004), sendo o calcário aplicado em superfície e sem incorporação. A fertilidade de ambos os solos e anos agrícolas foi corrigida por ocasião da instalação do experimento, sendo utilizado fertilizante mineral dosado para uma expectativa de produtividade de 3500 kg de grãos.ha⁻¹. Nos dois anos a adubação de cobertura foi realizada no início e final do afileamento, com a aplicação de N na forma de ureia.

A dessecação da área experimental com glifosato (1440 g i.a.ha⁻¹) foi realizada 20 dias antes da instalação dos experimentos, sendo as semeaduras realizadas no dia 16 e 22 de junho, respectivamente, para os anos 2016 e 2017. Utilizou-se de uma semeadora-adubadora provida de sulcador tipo disco para sementes e adubo. Os sulcos foram espaçados em 0,20 m, buscando-se a distribuição de 375 sementes m², na profundidade média de deposição das sementes de 4,5 cm. Os demais manejos e tratos culturais efetuados na cultura seguiram as indicações técnicas para a cultura do trigo (Embrapa, 2016). Foi utilizada a cultivar TBio Toruk nos dois anos agrícolas, a qual é recomendada para regiões RS1 e RS2, que compreendem o local do estudo (Embrapa, 2016).

O delineamento experimental foi de blocos casualizados, sendo os tratamentos distribuídos em um bifatorial 2x8, com quatro repetições. O primeiro fator refere-se aos níveis de pH do solo (acidez corrigida e sem correção) e, o segundo, aos tratamentos aplicados via semente, sendo eles: controle (sem tratamento químico, aditivo e *A. brasilense*), inoculação com *A. brasilense* (A), tratamento químico de sementes (TS), aditivo osmoprotetor (O), A+O, A+TS, O+TS e A+O+TS. As parcelas mediam 7,75 x 2,25 m, tendo parcelas úteis de 5 x 1,2 m (6,0 m²).

Como tratamento químico foram utilizados *Imidacloprido* + *Tiodicarbe* (Cropstar®) e *Triadimenol* (Baytan®), ambos na dose de 3 mL.kg⁻¹ de semente. A aplicação do TS foi realizada no dia anterior a instalação do experimento, a partir da homogeneização dos produtos e as sementes dentro de embalagem plástica. Como inoculante foi utilizado produto contendo estirpes Ab-V₅ e Ab-V₆ da bactéria *Azospirillum brasilense* (2 x 10⁸ UFC.mL⁻¹), na dose de 100 mL para 40 kg de semente (Azototal® líquido). O aditivo osmoprotetor, composto por biopolímeros osmoprotetores encapsulantes e um complexo de açúcares, foi aplicado na dosagem de 100 mL para 40 kg de semente (Protege TS®). A aplicação do inoculante e do aditivo foi realizada no dia da instalação

do experimento, separadamente ou em mistura conforme o tratamento, a partir da homogeneização dos produtos e as sementes dentro de embalagem plástica.

Vinte e um dias após a semeadura, nos dois anos agrícolas, avaliou-se o estande inicial de plantas. Para tanto foi realizada a contagem de plantas emergidas em três metros lineares dentro da parcela útil, sendo os valores apresentados em plantas emergidas m^2 . Para a quantificação dos parâmetros fisiológicos foram coletadas amostras de tecido foliar por ocasião do estágio 3.0 (Afilhamento – quarta folha do colmo principal), anteriormente à aplicação do fertilizante nitrogenado e 10.3 (Florescimento – folha bandeira menos 1) conforme escala proposta por Large (1954) para o desenvolvimento do trigo. Após a coleta, o tecido vegetal foi imediatamente congelado em N líquido e, mantido em *freezer* (-80 °C), até a realização das análises.

Foram quantificados os parâmetros fisiológicos: conteúdo de peróxido de hidrogênio (Loreto & Velikova, 2001), atividade da enzima superóxido dismutase (Giannopolitis & Ries, 1977), peroxidação lipídica (El-Moshaty et al., 1993), conteúdo de carotenoides, conteúdo de clorofila a, b e total (Hiscox & Israelstan, 1979; Lichtenthaler, 1987) e atividade da enzima nitrato redutase (Jaworski, 1971). Os parâmetros fisiológicos foram avaliados em plantas cultivadas no ano de 2016.

As variáveis altura de plantas, número de espigas por metro quadrado e número de espiguetas e grãos por espiga foram avaliadas quando a cultura encontrava-se no estágio 11.4 (Large, 1954). Já por ocasião da colheita foram determinadas: massa de mil grãos; produtividade de grãos (corrigida para 13% de umidade) e massa de hectolitro ($kg.hl^{-1}$), aferida pelo medidor automatizado G650i® (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil).

Os dados coletados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), sendo observada diferença significativa entre os tratamentos foi realizado o teste complementar de separação de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa Sisvar (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fisiologia de plantas

No decorrer da pesquisa não foram observadas adversidades bióticas e abióticas que pudessem ser restritivas à expressão do potencial produtivo do trigo (Figura 1). No entanto, não foi observado efeito da interação pH do solo x tratamentos aplicados via sementes sobre os parâmetros fisiológicos avaliados.

Durante o estágio de afilhamento se observou maior atividade da enzima SOD quando o trigo foi cultivado em solo com pH 4,85 (9,083 U.mg⁻¹ proteína) em comparação ao observado em pH 6,5 (6,967 U.mg⁻¹ proteína). Por participar ativamente da eliminação e quebra de EROs, a ausência de alterações no conteúdo de H₂O₂ e TBars, acompanhada pela maior atividade da SOD quando em pH 4,85 indicam que a enzima foi eficiente na inativação de EROs resultantes da exposição das plantas a condições de estresse causadas pelo solo ácido (Barbosa et al., 2014).

Com a redução do pH do solo para valores inferiores a 5,5 há incremento do conteúdo de Al³⁺ trocável. Nas plantas os efeitos da toxidez de Al³⁺ podem ser observados principalmente no sistema radicular, porém, com reflexos na parte aérea (Bissani et al., 2008). A desorganização dos meristemas, necrose dos tecidos e acúmulo de alumínio no protoplasma e núcleo das células interfere em processos metabólicos como a respiração aeróbica radicular e a produção de EROs. Isso provoca na planta a expressão de mecanismos de defesa antioxidante, dentre eles a produção da enzima SOD (Barbosa et al., 2014).

Diferenças quanto a peroxidação lipídica foram observadas somente no florescimento da cultura. A estimativa da peroxidação de lipídios foi reduzida em função da elevação do pH do solo de cultivo, sendo observados 0,022 nmol MDA.mg⁻¹ de proteína quando em pH 4,85 e 0,020 nmol MDA.mg⁻¹ de proteína quando em pH 6,5. O crescimento radicular reduzido em função da maior disponibilidade de Al³⁺ trocável quando em solo com pH 4,85 pode ter reduzido o volume de solo explorado pelas raízes e, por consequência, o acesso a água. Tal condição leva a uma produção excessiva de EROs e, na ausência de mecanismos eficientes de proteção (enzimáticos ou não), podem ocorrer alterações metabólicas que resultam em danos oxidativos às membranas, reduzindo o crescimento de plantas (Fukami et al., 2018).

O conteúdo de pigmentos foi influenciado pelos tratamentos aplicados via semente tanto no afilhamento quanto no florescimento da cultura. Com exceção do tratamento *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor, os demais tratamentos com a utilização do aditivo apresentaram valores menores para clorofila total no afilhamento da cultura (Figura 2A). O incremento no número de barreiras físicas que o eixo embrionário teve de romper pode ter ocasionado redução na velocidade do processo germinativo e, conseqüentemente, na emissão de raízes, necessárias para a absorção de água e nutrientes (Mendonça et al., 2007), reduzindo o aporte de nitrogênio e, conseqüentemente, a síntese de clorofila.

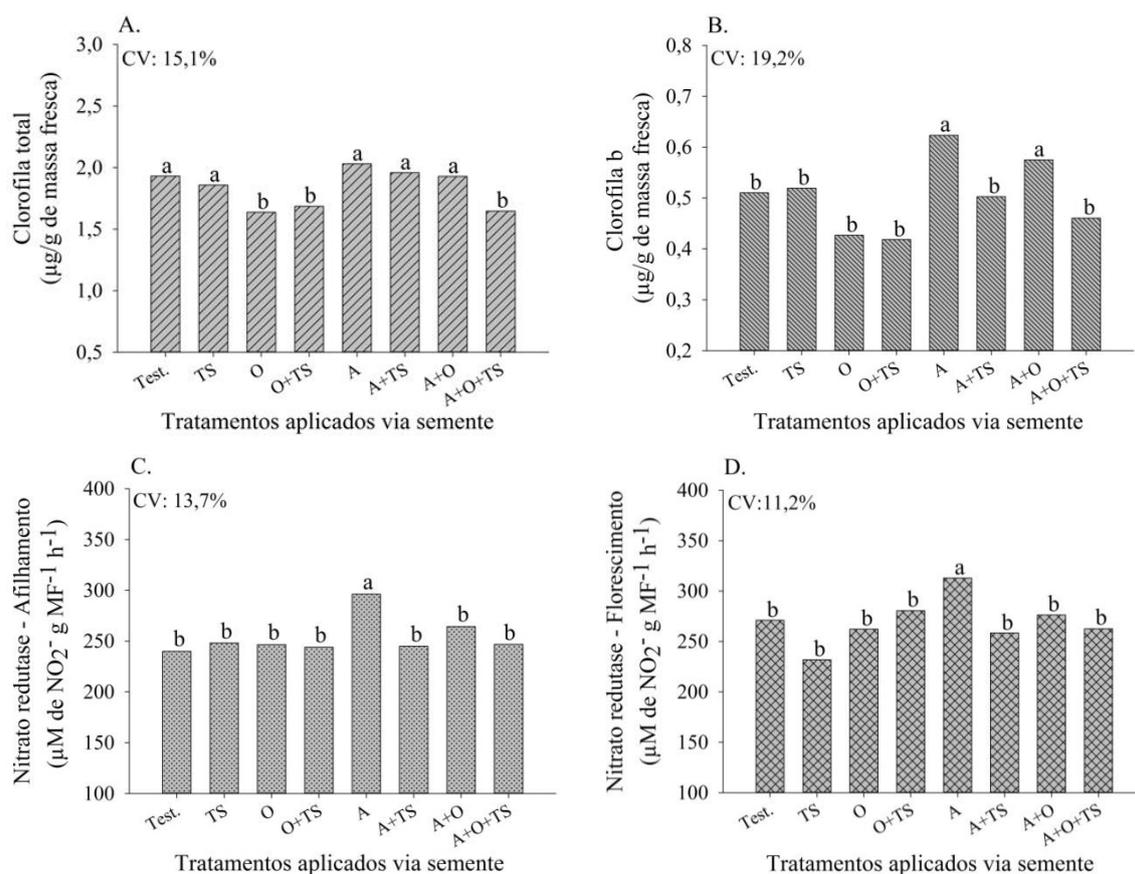


Figura 2. Conteúdo de clorofila total no estágio de afilhamento (A.), clorofila b no estágio de florescimento (B.) e atividade da enzima nitrito redutase no afilhamento (C.) e florescimento (D.) do trigo, em função dos tratamentos aplicados via semente

Figure 2. Total chlorophyll content at the tillering stage (A.), chlorophyll b at the flowering stage (B.) and nitrate reductase enzyme activity in the tillering (C.) and flowering (D.) of wheat, as a function of natural treatments via seed

*Controle (test.); Inoculação com *A. brasilense* (A); Tratamento químico de sementes (TS); Aditivo osmoprotetor (O). **Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

No florescimento, a utilização da inoculação junto ao aditivo também resultou na atenuação do efeito danoso do aditivo, uma vez que, foi observado maior conteúdo de clorofila *b* somente nos tratamentos com a utilização da inoculação e da *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor (Figura 2B). Por possuir degradação mais lenta do que a observada para a clorofila *a*, a maior proporção de clorofila *b* é uma característica importante. O incremento dos teores de clorofila *b* nas folhas aumenta a capacidade de absorção de luz em diferentes comprimentos de onda. Nesse processo a clorofila *b* capta a energia e a transfere para a clorofila *a*, que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese (Rubenich et al., 2015). Provavelmente, essa resposta trata-se de uma adaptação da cultura dado ao aporte de nitrogênio e fitohormônios pela bactéria. A

longevidade de folhas e o uso eficiente de luz são incrementados pela disponibilidade de N, favorecendo a ocorrência de maior produtividade da cultura (Dordas, 2009).

A atividade da NR foi maior quando as plantas foram cultivadas em solo com pH 6,5 em relação ao observado em pH 4,85 (Tabela 2). Provavelmente, o incremento na sua atividade de 18% no estágio de afilhamento e 6% durante o florescimento, quando em solo com acidez corrigida, se devem ao fato que o nitrato passa a ser a principal forma de N disponível para as plantas. Com a elevação do pH do solo é maior também a mineralização do N da matéria orgânica em função da atividade biológica no solo (Bissani et al., 2008). Além disso, o aumento e declínio da atividade da NR nas folhas correspondem às flutuações na concentração do ânion translocado no xilema, sendo que a diferença observada entre os estádios provavelmente se deve à maior disponibilidade do nutriente quando em estádios iniciais (Beevers & Hageman, 1969).

Tabela 2. Atividade da enzima nitrato redutase (NR) nos estádios de afilhamento e florescimento do trigo, em função do pH do solo de cultivo

Table 2. Activity of the enzyme nitrate reductase (NR) in the wheat grading and flowering stages, as a function of soil pH

pH do solo de cultivo		nmol de NO_2^- g MF^{-1} .h ⁻¹
	<i>Afilhamento</i>	
4,85		232,61 b
6,5		274,95 a
	<i>Florescimento</i>	
4,85		260,88 b
6,5		277,98 a

†Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Com relação aos tratamentos aplicados via semente, observou-se maior atividade da enzima NR com a utilização da *A. brasilense*, independente do estágio fenológico observado (Figura 2C e D). As bactérias são capazes de promover o incremento no crescimento de raízes nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta (Santos et al., 2017). Quanto maior o volume de raízes, maior é a exploração do solo e a absorção de água e nutrientes, dentre eles o NO_3^- , estimulando a síntese e atividade da NR (Beevers & Hageman, 1969).

Componentes da produtividade do trigo

O estande inicial de plantas, componentes e a produtividade de grãos do trigo foram influenciados pelo pH do solo de cultivo e os tratamentos aplicados via semente, entretanto, somente a massa de mil grãos, massa de hectolitro e produtividade de grãos responderam ao efeito da interação dos fatores.

Exceto no tratamento com inoculação, nos demais tratamentos o estande inicial de plantas foi inferior ao observado na testemunha, durante os dois anos de cultivo (Figura 3A). As maiores reduções foram de 33 e 28%, respectivamente, para os tratamentos com o aditivo osmoprotetor + TS e aditivo osmoprotetor + *A. brasilense* + TS no ano de 2016 e, 31 e 26%, respectivamente, para os tratamentos com o aditivo osmoprotetor e aditivo osmoprotetor + TS no ano de 2017. Dentre as prováveis causas pode estar a redução na velocidade de embebição causada pelo incremento no número de barreiras físicas ao redor do tegumento. Além disso, o acúmulo de camadas pode dificultar a protrusão das raízes primárias e da parte aérea durante a germinação. O retardar a emergência deixa as plântulas mais suscetíveis a patógenos, aumentando a desuniformidade de germinação e de emergência (Mendonça et al., 2007).

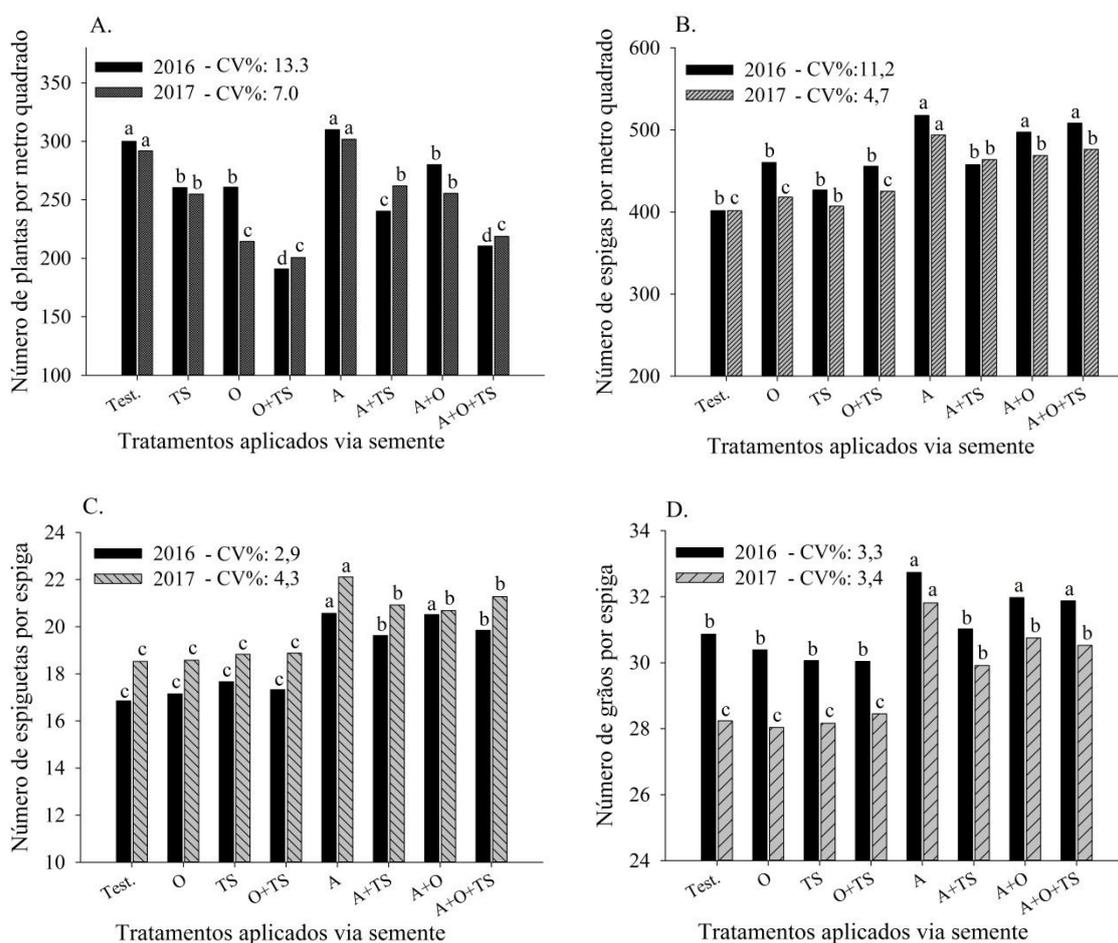


Figura 3. Estande inicial de plantas (A.), número de espigas por metro quadrado (B.), número de espiguetas por espiga (C.) e número de grãos por espiga (D.) do trigo, em função dos tratamentos aplicados via semente e pH do solo de cultivo

Figure 3. Initial stand of plants (A.), number of spikes per square meter (B.), number of spaghetti per spike (C.) and number of grains per spike (D.) of wheat, according to the soil cultivation pH of the cultivation soil

*Controle (test.); Inoculação com *A. brasilense* (A); Tratamento químico de sementes (TS); Aditivo osmoprotetor (O). **Barras com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$).

Não foi observada diferença na altura de plantas (AP) em função dos tratamentos aplicados via semente, o que indica não haver efeito da inoculação neste parâmetro das plantas de trigo. Diferenças quanto a AP foram observadas em resposta ao pH do solo. Plantas cultivadas em solo sem correção da acidez apresentaram altura média de 72,87 e 71,25 cm, respectivamente, para o ano 2016 e 2017, enquanto aquelas cultivadas em solo com acidez corrigida se mostraram maiores, com alturas médias de 74,34 e 74,48 cm. Esses resultados demonstram que a altura de plantas é influenciada em maior grau por outros fatores como a maior disponibilidade de nutrientes como o P e N e maior acesso à água e, não em função da atividade da bactéria (Rodrigues et al., 2014).

Os maiores valores para o número de espigas por metro quadrado (NE) foram observados quando em solo com acidez corrigida, sendo, respectivamente, de 480 e 456 espigas por metro quadrado para o ano 2016 e 2017. Em solo sem correção da acidez esses valores foram inferiores, atingindo 450 e 432 espigas por metro quadrado. Dentre os tratamentos aplicados via semente, os maiores valores foram observados para os tratamentos com *A. brasilense*, *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor e *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor + TS, quando em 2016, já no ano 2017 o tratamento com *A. brasilense* foi o qual apresentou o maior resultado (Figura 3B.).

A utilização da *A. brasilense* incrementou em 116,24 espigas por metro quadrado o NE em relação ao tratamento testemunha no ano de 2016 e em 92,16 espigas em 2017. Entretanto, quando na utilização da *A. brasilense* + TS não foi observado incremento para o NE no ano 2016. No ano 2017 a utilização da *A. brasilense* + TS foi superior ao observado na ausência da bactéria, apesar de não igualar-se à utilização de *A. brasilense* de forma isolada. Isso demonstra a existência de efeito deletério dos componentes utilizados no tratamento químico sobre a *A. brasilense*.

O NE é uma variável dependente do número de filhotes que cada planta produz, mantém e desenvolve até o final do ciclo. Diretamente influenciado pela disponibilidade de N e P durante o estágio de afilhamento, o maior NE foi obtido com o uso da bactéria. Provavelmente, isso se deve ao incremento no desenvolvimento do sistema radicular e, por consequência, do volume de solo explorado durante o desenvolvimento da cultura (Santos et al., 2017).

Quanto ao número de espiguetas por espiga (NEE), observou-se, respectivamente, para os anos 2016 e 2017, o valor de 18 e 19,24 espiguetas por espiga quando o cultivo foi em solo sem correção da acidez e 19,37 e 20,70 espiguetas por espiga, quando em solo corrigido. Isso, provavelmente, se deve a maior disponibilidade de nutrientes em solo com pH próximo a neutralidade (Bissani et al., 2008). Com relação aos tratamentos aplicados via semente, os maiores valores foram observados quando utilizada a inoculação com *A. brasilense* e *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor quando em 2016 e no tratamento com *A. brasilense* em 2017 (Figura 3C.). No ano 2016 os tratamentos anteriormente citados tiveram o NEE incrementado em aproximadamente 20% em relação ao tratamento testemunha, já no ano 2017 a utilização da bactéria incrementou o valor observado em 19%.

Quanto ao número de grãos por espiga (NGE), plantas cultivadas em solo sem a correção da acidez produziram 30,38 e 28,18 grãos por espiga, enquanto aquelas cultivadas em solo com acidez corrigida produziram 31,85 e 30,78 grãos por espiga, respectivamente, nos anos 2016 e 2017. Com exceção do tratamento com *A. brasilense* + TS, nos demais tratamentos com a utilização da bactéria o NGE foi maior do que nos tratamentos onde não se utilizou a *A. brasilense*, quando em 2016 (Figura 3D). No ano 2017, apesar de não ser semelhante à utilização de *A. brasilense* de forma isolada, o tratamento com *A. brasilense* + TS foi superior ao observado nos tratamentos com a ausência da bactéria. Provavelmente, o acréscimo no NGE esteja relacionado também à produção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas pelas bactérias, como auxinas e citocininas, substâncias essas, que junto ao aporte de nitrogênio, atenuaram as perdas no potencial produtivo observadas nos demais tratamentos (Santos et al., 2017).

O pH do solo e os tratamentos aplicados via semente apresentaram interação no efeito observado sobre a massa de mil grãos (MMG) nos dois anos de estudo (Figura 4). No ano de 2016, quando em solo sem correção da acidez, não foi observada diferença entre os tratamentos aplicados via semente, ao passo que, em solo corrigido houve incremento nos valores observados para o tratamento com *A. brasilense* e *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor em relação aos demais, sendo também, valores superiores aos observados no solo sem correção da acidez. No ano 2017, a utilização de *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor não apresentou incremento igual ao observado com a utilização da *A. brasilense* de forma isolada, entretanto, também resultou em incremento na MMG em relação aos demais tratamentos.

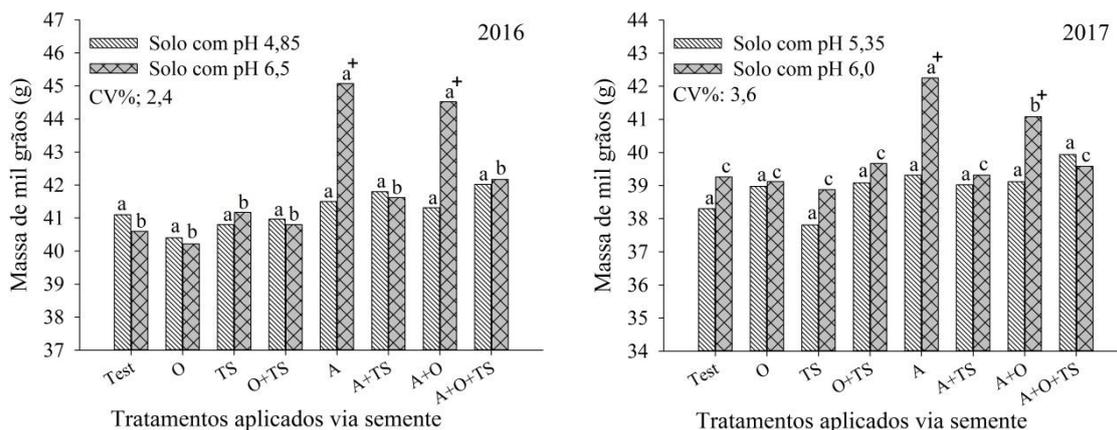


Figura 4. Massa de mil grãos da cultura do trigo em função dos tratamentos aplicados via semente e pH do solo de cultivo

Figure 4. Mass of thousand grains of wheat according to the treatments applied by seed and pH of the cultivation soil

*Controle (test.); Inoculação com *A. brasilense* (A); Tratamento químico de sementes (TS); Aditivo osmoprotetor (O). **Barras e pontos com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$). O sinal “+” representa diferença significativa entre os valor de pH do solo.

Com a elevação do pH do solo a 6,5 há o favorecimento do crescimento de bactérias (Moreira et al., 2010), as quais são mais eficientes na mineralização da matéria orgânica, em função de todo o Al^{3+} trocável ter sido neutralizado (Bissani et al., 2008). Essa condição também beneficia a *A. brasilense*, resultando em maior disponibilidade de N no período de enchimento de grãos, embora não tenham sido realizadas contagens em solo para sustentar essa afirmação. Por outro lado, o aproveitamento *in situ* do N fornecido pela fixação biológica também pode ter incrementado o acúmulo de biomassa na planta e, assim, a translocação para os grãos (Didonet et al., 2000).

Com relação a massa de hectolitro (MH), no ano 2016 a cultura permaneceu mais tempo a campo quando em solo com acidez corrigida (as plantas nesta condição ainda estavam verdes no momento em que foi realizada a colheita da cultura em solo sem correção da acidez). Entretanto, mesmo com a provável ativação da α -amilase e a degradação parcial dos carboidratos acumulados (em função da ocorrência de precipitações pluviais nesse período), observa-se que os maiores valores foram encontrados no tratamento com *A. brasilense* e *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor, sendo o valor observado em solo corrigido superior ao observado em solo sem correção da acidez no tratamento com *A. brasilense* (Figura 5). Em 2017, com exceção do tratamento com a aplicação do aditivo osmoprotetor + TS, os demais tratamentos apresentaram resultados superiores quando em solo com acidez corrigida em relação ao

observado em solo sem correção, sendo os tratamentos com a utilização da bactéria superiores a aqueles na sua ausência quando em solo com acidez corrigida.

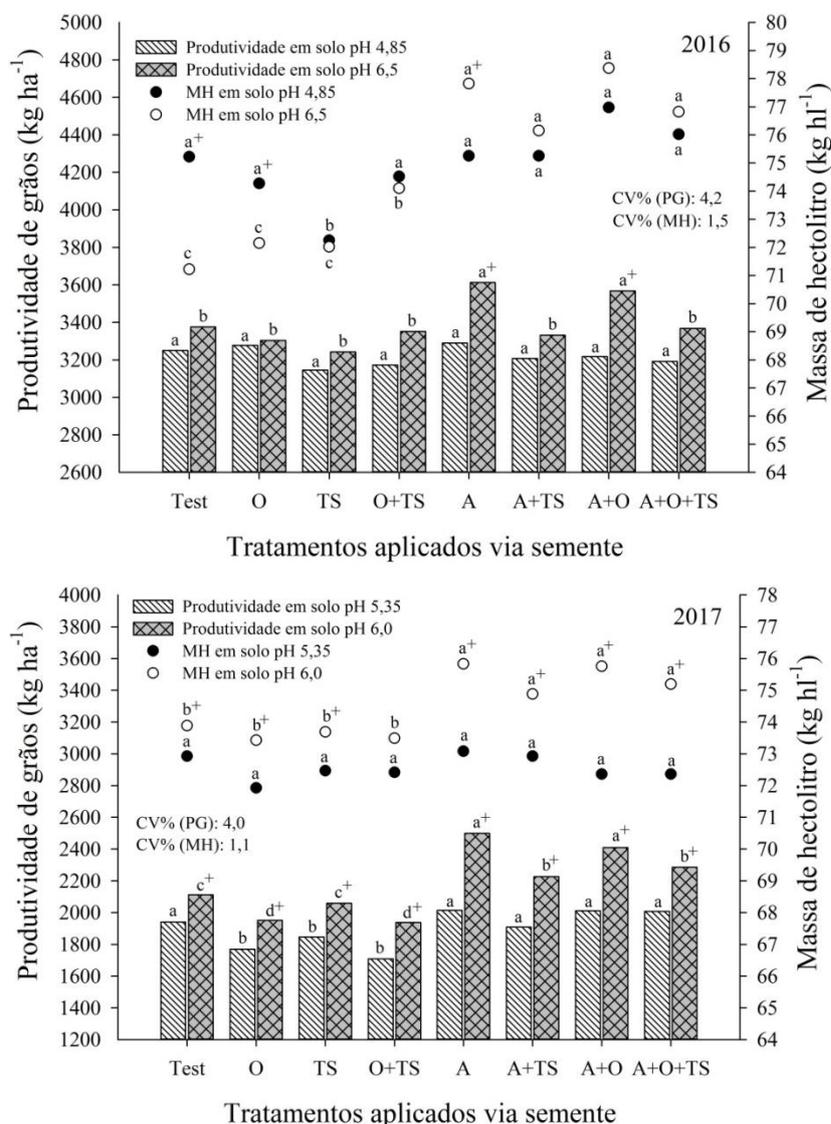


Figura 5. Massa de hectolitro e produtividade de grãos da cultura do trigo em função dos tratamentos aplicados via semente e pH do solo de cultivo

Figure 5. Holsolith mass and wheat grain yield as a function of treatments applied via seed and pH of the growing soil

*Controle (test.); Inoculação com *A. brasilense* (A); Tratamento químico de sementes (TS); Aditivo osmoprotetor (O). **Barras e pontos com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$). O sinal “+” representa diferença significativa entre os valor de pH do solo.

Esses resultados para MH indicam a existência de diferenças fisiológicas importantes no acúmulo de N na parte aérea das plantas e sua remobilização para os grãos quando os tratamentos inoculados são cultivados em solo com acidez corrigida (Didonet et al., 2000). Efeito semelhante da inoculação na assimilação de N pelas plantas de trigo foi observado por Hungria et al. (2016), que demonstraram a ocorrência de um aumento no

N-total maior do que o incremento de massa seca. O aumento na incorporação de N pelas plantas quando inoculadas com *A. brasilense* foi atribuído, por esses autores, ao incremento da atividade da NR, como também é observado neste estudo (Figura 2C e 2D).

Além da maior atividade da NR, o maior crescimento do sistema radicular das plantas inoculadas e o aporte de citocininas podem ter sido o responsável pela permanência dos tecidos verdes por mais tempo quando em solo com acidez corrigida, resultando numa atividade enzimática e fotossintética mais prolongada. Com isso podem ter sido fornecidas quantidades maiores de fotoassimilados, tanto para os grãos como para absorver N do solo, onde condições de maior estresse (como no solo sem correção da acidez) na ausência da bactéria podem ter acelerado a senescência dos tecidos (Didonet et al., 2000). Com a maior atividade da NR e longevidade dos tecidos verdes, possivelmente houve uma maior translocação de fotoassimilados para os grãos e a formação de grãos com maior teor de proteínas e com maior massa (Beevers & Hageman, 1969).

Foi observada interação dos fatores nos dois anos de condução do experimento. Em 2016 a produtividade de grãos foi incrementada em 337,18 e 292,89 kg.ha⁻¹ em relação à testemunha, respectivamente, em função do tratamento com *A. brasilense* e *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor, quando em solo com acidez corrigida (Figura 5). Nesta mesma condição de solo, em relação ao TS estes incrementos foram ainda maiores, sendo de 470,57 e 426,28 kg.ha⁻¹, respectivamente. Em solo sem correção da acidez não foi observada resposta dos tratamentos aplicados via semente sobre a produtividade de grãos.

No ano 2017, em solo sem correção da acidez foi observada resposta dos tratamentos aplicados via semente, sendo que os tratamentos com aditivo osmoprotetor, tratamento químico de sementes ou a aplicação destes de forma conjunta resultaram em produtividade de grãos inferior à observada nos demais tratamentos. No solo com acidez corrigida, os maiores valores para produtividade de grãos foram observados novamente em função da aplicação da *A. brasilense* e *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor. A produtividade de grãos foi incrementada em 386,77 e 297,33 kg.ha⁻¹ em relação à testemunha, respectivamente, em função da aplicação do tratamento com *A. brasilense* e *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor, quando em solo com acidez corrigida. Todavia, o maior incremento na produtividade de grãos foi observado com a

utilização da *A. brasilense* em relação ao tratamento com aditivo osmoprotetor, correspondendo ao incremento de 547,06 kg de grãos.ha⁻¹ (Figura 5).

A ausência de resposta à inoculação quando em solo sem correção da acidez pode estar relacionada ao fato que o valor está abaixo da faixa considerada ideal (6,0 a 6,5) para a máxima atividade microbiana no solo. A *A. brasilense* é predominantemente rizosférica e mais vulnerável a estresses ambientais quando comparada a outros gêneros como a *H. seropedicae* (Moreira et al., 2010;). Em solo ácido a atividade da *A. brasilense* pode ter sido prejudicada não apenas pelo efeito direto da elevada concentração de íons H⁺ na solução do solo. O pH baixo influencia indiretamente a disponibilidade de nutrientes e a disponibilidade e penetração de compostos tóxicos presentes no ambiente edáfico para o interior das células (Moreira et al., 2010).

Com relação ao tratamento *A. brasilense* + TS, semelhante ao observado para NE, NEE, NGE e MMG, houve redução na produtividade de grãos em relação à utilização da *A. brasilense* de forma isolada ou desta mais o aditivo quando em solo com acidez corrigida. No tratamento *A. brasilense* + TS a produtividade de grãos foi igual à apresentada pela testemunha em 2016 e, superior à testemunha, mas inferior ao tratamento com *A. brasilense* em 2017. Observa-se que a utilização do aditivo junto a *A. brasilense*, quando aplicados sobre sementes tratadas, não resultou em incremento de produtividade como observado com a *A. brasilense* quando inoculada em sementes não tratadas. É possível a ocorrência de efeito deletério dos componentes utilizados no tratamento químico de sementes sobre a bactéria, mesmo com a utilização do aditivo.

CONCLUSÕES

A utilização dos produtos *imidacloprido*, *tiodicarbe* e *triadimenol* influi negativamente sobre a resposta à inoculação na cultura do trigo, onde a utilização do aditivo não atenua seus efeitos deletérios sobre a resposta à inoculação com *A. brasilense*.

Em solo com acidez corrigida a inoculação com *A. brasilense* incrementa a produtividade de grãos e massa de hectolitro da cultura do trigo.

LITERATURA CITADA

Alcântara Neto, F. A.; Pacheco, L. P.; de Araújo, A. S. F.; Petter, F. A.; de Almeida, F. A.; de Albuquerque, J. D. A. A. Tempo de contato e de combinações de fungicidas, aditivo e inoculante sobre a sobrevivência de rizóbios e nodulação da soja. Revista

Agroambiente, v.8, n.1, p.149-154, 2014. <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v8i1.1770>

Barbosa, M. R.; Silva, M. m. A.; Willadino, L.; Ulisses, C.; Camara, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, v.44, n.3, p.453-460, 2014. <http://www.redalyc.org/html/331/33130091011>. 7 set. 2018.

Beevers, L.; Hageman, R. H. Nitrate reduction in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, v.20, n.1, p.495-522, 1969. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.20.060169.002431>

Bertoncelli, P.; Martin, T. N.; Stecca, J. D. L.; Deak, E.; Pinto, M. A. B.; Schonell, A. O manejo de inverno e inoculação de sementes influenciam na produtividade e qualidade da silagem de milho sob sistema plantio direto. *Ceres*, v.64, n.5, p. 523-531, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201764050010>

Bissani, C. A.; Gianello, C.; Camargo, F. A. de O.; Tedesco, M. J. Fertilidade dos solos e manejo da adubação das culturas. 2.ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. 344p.

Comissão de química e fertilidade de solo – RS/SC (CQFS RS/SC). Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 10.ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Núcleo Regional Sul, 2004. 400p.

Costa, J. S.; Mantai, R. D.; da Silva, J. A.; Scremin, O. B.; Arenhardt, E. G.; de Lima, A. R. Single and split nitrogen dose in wheat yield indicators. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.22, n.1, p.16-21, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n1p16-21>

Didonet, A. D.; dos Santos Lima, O.; Candaten, A. A.; Rodrigues, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.2, p.401-11, 2000. <http://www.scielo.br/pdf/%0D/pab/v35n2/6886.pdf>. 7 set. 2018.

Dordas, C. Dry matter, nitrogen and phosphorus accumulation, partitioning and remobilization as affected by N and P fertilization and source-sink relations. *European Journal Agronomy*, v.30, n.2, p.129-139, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.09.001>

El-Moshaty, F. B.; Pike, S. M.; Novacky, A. J.; Sehgal, O. P. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.39, n.2, p.109-119, 1993. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1993.1044>

Embrapa. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3.ed. (revisada e ampliada), Brasília: Embrapa, 2013. 353p.

Embrapa. Informações Técnicas para trigo e triticales. Brasília: Embrapa, 2016. 229p. (X Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticales).

Ferreira, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

Fukami, J.; Ollero, F. J.; La Osa, C.; Valderrama-Fernández, R.; Nogueira, M. A.; Megías, M.; Hungria, M. Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Archives of microbiology*, v.200, n.8, p.1191-1203, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1535-x>

Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. Purification and quantitative relationship with watersoluble protein in seedlings. *Journal of Plant Physiology*, v.48, n.59, p.315- 318, 1977.

Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, v.142, n.2, p.231-55, 2004. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>

Hiscox, J. D.; Israelstam, G.F. Method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, v.57, n.12, p.1332-1334, 1979. <https://doi.org/10.1139/b79-163>

Hungria, M.; Nogueira, M. A.; Araujo, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v.221, n.1, p.125-131, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>

Jaworski, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(71\)80010-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(71)80010-4)

Large, E. C. Growth stages in cereals illustration of the Feeks scales. *Plant Pathology*, v.4, n.4, p.22-24, 1954. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1954.tb00716.x>

Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and Carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, v.148, n.1, p.350-382, 1987.

Loreto, F.; Velikova, V. Isoprene produced by leaves protect the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, v.127, n.4, p.1781-1787, 2001. <https://doi.org/10.1104/pp.010497>

Mendonça, E. A. F.; Carvalho, N. M.; Ramos, N. P. Revestimento de sementes de milho superdoce (SH₂)¹. *Revista Brasileira de Sementes*, v.29, n.2, p.68-79, 2007. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v29n2/v29n2a10>. 7 set. 2018.

Moreira, F. M. D. 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. <https://www.researchgate.net/publication/279467287>. 7 set. 2018.

Peel, M. C.; Finlayson, B. L.; McMahon, T. A. Updated world map of the Koppen-Geiger climate classification. *Hydrology Earth System Science*, v.11, n.2, p.1633–1644, 2007.

Pires, J. L. L.; Bragantini, C.; Costa, J. L. D. Storage of dry bean seeds coated with polymers and treated with fungicides. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, n.1, p.709-715, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004000700013>

Rodrigues, L. F.; Guimarães, V. F.; Silva, M. B. D.; Pinto, A. S.; Klein, J.; Costa, A. C. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.18, n.1, p.31-7, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662014000100005>

Rosa, D. M.; Nóbrega, L. H. P.; Mauli, M. M.; de Lima, G. P.; Pacheco, F. P. Substâncias húmicas do solo cultivado com plantas de cobertura em rotação com milho e soja. *Revista Ciência Agronômica*, v.48, n.2, p.221-230, 2017. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20170026>

Rubenich, R.; Schaedler, C. E.; Zandoná, R. R.; de Melo Scalcon, R.; de Lima, P. C.; Chiapinotto, D. M. Efeito da redução de luz na seletividade a herbicidas e rendimento de grãos do trigo. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v.16, n.4, p.296-306, 2017. <https://doi.org/10.7824/rbh.v16i4.572>

Santos, K. F. D. N.; Moure, V. R.; Hauer, V.; Santos, A. S.; Donatti, L.; Galvão, C. W.; Steffens, M. B. R. Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals up-regulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. *Plant and Soil*, v.415, n.1-2, p.245-255, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3140-6>

5 DISCUSSÃO GERAL

Os resultados apresentados no artigo I demonstram que o fato da *A. brasilense* associar-se às plântulas somente após a emissão da radícula (KERBAUY, 2008), faz com que a bactéria não interfira na germinação das sementes. Durante a germinação o eixo embrionário utiliza recursos provindos do endosperma, adquiridos durante a formação das sementes (COTRIM et al., 2016)

Com relação às avaliações de vigor, nos testes utilizados não foram observados incrementos nos valores em função da inoculação com *A. brasilense*. Por outro lado, houve redução no vigor de plântulas com a utilização do tratamento químico ou aditivo osmoprotetor, sendo que isso ocorreu mesmo na presença de um desses compostos e da bactéria. Esses resultados se devem, provavelmente, a algum efeito fitotóxico do tratamento químico (LUDWIG et al., 2014; RAMPIM et al. 2012) ou ao incremento no número de barreiras físicas ao redor das sementes, o que pode ter ocasionado redução na velocidade de embebição e do fluxo de oxigênio para o interior da semente, diminuído a velocidade das reações metabólicas envolvidas com a germinação (MENDONÇA et al., 2007).

A atividade de H^+ nas soluções avaliadas não foi um fator limitante ao crescimento, não sendo observada diferença entre plântulas em função do pH da solução nutritiva. A concentração de íons H^+ parece também não ter efeito sobre a *A. brasilense*. Da mesma forma, não se observou alteração da resposta à inoculação em função do pH da solução.

De forma semelhante, não se observou efeito da interação entre inoculação com *A. brasilense* e utilização do N na composição da solução nutritiva. Possivelmente, na presença do nitrogênio a *A. brasilense* viria a induzir ao maior crescimento das plântulas, uma vez que as fontes $NH_4H_2PO_4$ e NH_4NO_3 estimulam a produção de indóis, quando em baixas concentrações como nesta condição (RADWAN et al., 2004), o que não foi observado nessa pesquisa.

Por outro lado, observou-se maior volume de raízes axiais nas plântulas inoculadas (22%), o que foi responsável pelo incremento no volume total e na massa seca de raízes, uma vez que o volume de laterais não foi alterado. Ao ter a capacidade de alterar a morfologia das raízes, as bactérias possibilitam a exploração de maior volume de solo pelas plantas e a intensificação do processo da redução assimilatória de nitrato disponível no solo. Quanto maior o aporte de N, mais completo o complexo enzimático e maior a capacidade fotossintética (BODDEY et al., 1986; MARTINS et al., 2018). Entre esses mecanismos o incremento do sistema radicular pode ser o mais importante, uma vez que possibilita além da

maior absorção de minerais, maior absorção de água, o que favorece a expressão do potencial produtivo (CASSÁN et al., 2009; GALINDO et al., 2017).

Não foi observada influência da utilização do aditivo osmoprotetor no sentido de atenuar os efeitos negativos do tratamento químico. Plântulas oriundas de sementes tratadas quimicamente apresentaram redução dos parâmetros avaliados, indicando alguma forma de inibição do crescimento em relação às não tratadas, mesmo com a utilização do aditivo osmoprotetor. Essa redução no vigor das plântulas pode ser em função dos efeitos tóxicos exercidos por estes produtos químicos, envolvendo a formação de radicais livres (SOARES; MACHADO, 2007).

Os resultados apresentados no artigo II demonstram que a redução do pH do solo provoca nas plantas a expressão de mecanismos antioxidantes de defesa, dentre eles a maior atividade da enzima SOD. Quanto a estimativa da peroxidação de lipídios, esta foi reduzida em função da elevação do pH do solo de cultivo. O crescimento radicular reduzido em função da maior disponibilidade de Al^{3+} trocável quando em solo com pH 4,85 pode ter reduzido o volume de solo explorado pelas raízes e, por consequência, o acesso a água. Tais condições estressantes levam a uma produção excessiva de EROs e, na ausência de mecanismos eficientes de proteção (enzimáticos ou não), podem ocorrer alterações metabólicas que resultam nestes danos oxidativos às membranas, como a peroxidação de lipídios (FUKAMI et al., 2018).

O conteúdo de pigmentos foi influenciado pelos tratamentos aplicados via semente tanto no afilhamento quanto no florescimento da cultura. No florescimento observou-se maior conteúdo de clorofila *b* nos tratamentos com a utilização da inoculação e da *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor. Por possuir degradação mais lenta do que a observada para a clorofila *a*, a maior proporção de clorofila *b* é uma característica interessante. O incremento dos teores de clorofila *b* nas folhas aumenta a capacidade de absorção de luz em diferentes comprimentos de onda, dentre eles, raios de onda longa (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A clorofila *b* capta a energia e a transfere para a clorofila *a*, que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese (RUBENICH et al., 2015; TAIZ; ZEIGER, 2013). Provavelmente, essa resposta trata-se de uma adaptação da cultura dado ao aporte de nitrogênio e fitohormônios pela bactéria. A longevidade de folhas e o uso eficiente de luz são incrementados pela disponibilidade de N, favorecendo a ocorrência de maior produtividade da cultura (DORDAS, 2009).

A atividade da NR foi maior quando as plantas foram cultivadas em solo com pH 6,5 em relação ao observado em pH 4,85. Provavelmente, o incremento de 18% no estágio de

afilhamento e 6% durante o florescimento na atividade da enzima, quando em solo com acidez corrigida, se devem ao nitrato passar a ser a principal forma de N disponível para as plantas (BISSANI et al., 2008).

Com relação aos tratamentos aplicados via semente, houve maior atividade da enzima NR com a utilização da *A. brasilense*, independente do estágio fenológico observado. As bactérias são capazes de promover o incremento do crescimento de raízes nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta (SANTOS et al., 2017). Quanto maior o volume de raízes, maior é a exploração do solo e a absorção de água e nutrientes, dentre eles o NO_3^- , estimulando a síntese e atividade da NR (BEEVERS; HAGEMAN, 1969).

Exceto no tratamento com inoculação, nos demais tratamentos o estande inicial de plantas foi inferior ao observado na testemunha, nos dois anos de estudo. As maiores reduções foram de 33 e 28%, respectivamente, para os tratamentos com aditivo osmoprotetor + TS e aditivo osmoprotetor + *A. brasilense* + TS no ano de 2016 e, 31 e 26%, respectivamente, para os tratamentos com aditivo osmoprotetor e aditivo osmoprotetor + TS no ano de 2017. Dentre as prováveis causas pode estar a redução na velocidade de embebição causada pelo incremento no número de barreiras físicas ao redor da semente. O acúmulo de camadas pode dificultar a protrusão das raízes primárias e da parte aérea durante a germinação. Além disso, retardar a emergência deixa as plântulas mais suscetíveis a patógenos, aumentando a desuniformidade de germinação e de emergência (MENDONÇA et al., 2007).

Os maiores valores para o número de espigas por metro quadrado (NE) foram observados quando em solo com acidez corrigida. Dentre os tratamentos aplicados via semente, os maiores valores foram observados nos tratamentos com *A. brasilense*, *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor e *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor + TS, quando em 2016, já no ano 2017 o tratamento com *A. brasilense* foi o qual apresentou o maior resultado. O NE é uma variável dependente do número de filhos que cada planta produz, mantém e desenvolve até o final do ciclo. Diretamente influenciado pela disponibilidade de N e P durante o estágio de afilhamento, o maior NE foi observado com o uso da bactéria. Provavelmente, isso se deve ao incremento no desenvolvimento sistema radicular e, por consequência, do volume de solo explorado durante o desenvolvimento da cultura (SANTOS et al., 2017).

Quanto ao número de grãos por espiga (NGE), plantas cultivadas em solo sem correção da acidez produziram 30,38 e 28,18 grãos por espiga, enquanto aquelas cultivadas em solo com acidez corrigida produziram 31,85 e 30,78 grãos por espiga, respectivamente, nos anos 2016 e 2017. Com exceção do tratamento com *A. brasilense* + TS, nos demais

tratamentos com a utilização da bactéria o NGE foi maior do que nos tratamentos onde não se utilizou a *A. brasilense*, quando em 2016. No ano 2017, apesar de não ser igual à utilização de *A. brasilense* de forma isolada, o tratamento com *A. brasilense* + TS foi superior ao observado nos tratamentos com a ausência da bactéria. Provavelmente, o acréscimo no NGE esteja relacionado também à produção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas pelas bactérias. Substâncias essas, que junto ao aporte de nitrogênio, atenuaram as perdas no potencial produtivo observadas nos demais tratamentos (SANTOS et al., 2017).

Com relação a massa de hectolitro (MH), no ano 2016 observou-se que os maiores valores foram encontrados no tratamento com *A. brasilense* e *A. brasilense* + aditivo osmoprotetor, sendo o valor observado em solo corrigido superior ao observado em solo sem correção da acidez no tratamento com *A. brasilense*. Em 2017, com exceção do tratamento com a aplicação do aditivo osmoprotetor + TS, os demais tratamentos apresentaram resultados superiores quando em solo com acidez corrigida em relação ao observado sem correção, sendo os tratamentos com a utilização da bactéria superiores a aqueles na sua ausência quando em solo com acidez corrigida.

Esse comportamento da MH indica a existência de diferenças fisiológicas no acúmulo de N na parte aérea das plantas e na sua remobilização para os grãos quando as sementes inoculadas são cultivadas em solo com acidez corrigida (MENDES et al., 2011). Efeito semelhante da inoculação na assimilação de N pelas plantas de trigo foi observado por Hungria et al. (2016), que demonstraram a ocorrência de um aumento no N-total maior do que o incremento de massa seca. O aumento na incorporação de N pelas plantas quando inoculadas com *A. brasilense* foi atribuído, por esses autores, ao incremento da atividade da NR, como também é observado neste estudo.

A ausência de resposta à inoculação quando em solo sem correção da acidez pode estar relacionada ao fato de que o valor está abaixo da faixa considerada ideal (6,0 a 6,5) para a máxima atividade microbiana no solo (DARTORA et al., 2013; MOREIRA et al., 2010). A *A. brasilense* é predominantemente rizosférica e mais vulnerável a estresses ambientais quando comparada a outros gêneros como a *H. seropedicae* (DARTORA et al., 2013). O pH baixo influencia indiretamente na disponibilidade de nutrientes e a penetração de compostos tóxicos presentes no ambiente edáfico para o interior das células (MOREIRA et al., 2010).

Com relação ao tratamento *A. brasilense* + TS, houve redução na produtividade de grãos em relação a utilização da *A. brasilense* de forma isolada ou desta mais o aditivo quando em solo com acidez corrigida. No tratamento *A. brasilense* + TS a produtividade de grãos foi igual à apresentada pela testemunha em 2016 e, inferior ao tratamento com *A.*

brasiliense em 2017. Observa-se que a utilização do aditivo junto a *A. brasiliense*, quando aplicados sobre sementes tratadas, não resultou em incremento de produtividade como observado com a *A. brasiliense* quando inoculada em sementes não tratadas. É possível a ocorrência de efeito antagônico dos componentes utilizados no tratamento químico de sementes sobre a bactéria.

5.1 VIABILIDADE ECONÔMICA

A inoculação pode ser considerada uma prática economicamente viável para a cultura do trigo (aproximadamente 0,46% do custo total), uma vez que, o valor gasto com a inoculação variou em torno de R\$ 13,00 ha⁻¹ nos dois anos do estudo (TOTAL BIOTECNOLOGIA, 12-05-18). Ao considerar o valor médio (dos dois anos de estudo) pago pela tonelada do trigo de R\$ 591,00 (COTRIJAL, 16-07-18), incrementos acima de 22 kg de grãos ha⁻¹ justificariam a sua realização.

Entretanto, neste estudo os incrementos na produtividade com a inoculação de *A. brasiliense* foram observados apenas em solo com acidez corrigida. Para elevar o pH do solo de 4,85 (condição do estudo) para 6,0 (pH de referência para a cultura do trigo), na camada de 0-20 cm são necessárias 4,25 toneladas de calcário ha⁻¹ com PRNT 100% (1/4 SMP para pH_{água} 6,0) (CQFS-RS/SC, 2004). Com o custo de R\$ 125,00 a tonelada (PRNT 70%) somado ao custo de R\$ 60,00 ha⁻¹ para a distribuição mecanizada (total de R\$ 591,25 ha⁻¹), apenas incrementos acima de uma tonelada na produtividade de grãos (considerar o valor de R\$ 591,00 a tonelada do grão) justificariam a realização da calagem e assim, o favorecimento da atividade da bactéria na cultura do trigo.

Por outro lado, em uma condição mais restritiva, considerando uma área de plantio direto que não foi implantada com a correção da acidez na camada de 0 a 20 cm e que apresenta saturação por Al maior que 30% na camada de 10 a 20 cm, ocorrência de produtividade das culturas abaixo da média local, grau de compactação do solo restringindo o crescimento radicular em profundidade e disponibilidade de P do solo na camada de 10 a 20 cm menor que o teor crítico; nesse caso pode ser necessário reiniciar o sistema plantio direto. Nessa condição, o calcário deve incorporado ao solo, por aração e gradagem, sendo utilizada a dose de 1 SMP para pH_{água} 6,0. Assim, seriam necessárias 17 toneladas ha⁻¹ de calcário, onde apenas incrementos acima 3,76 toneladas na produtividade de grãos justificariam a realização da calagem.

Cabe salientar que a calagem é uma prática barata, correspondente em média a, aproximadamente, 9,6% do custo total de produção para agricultura de sequeiro (SOUSA; LOBATO, 2004). Sua realização não deve ser ponderada somente em função dos benefícios à bactéria ou a uma cultura, mas sim, aos benefícios proporcionados ao sistema. A utilização da *A. brasilense* é uma estratégia importante na busca por sistemas agrícolas mais sustentáveis (FUKAMI et al., 2016). No entanto, para sua indicação deve ser levado em conta, entre outros fatores, o nível de investimento adotado na lavoura.

6 CONCLUSÃO GERAL

Com a utilização do tratamento químico não há efeito da *A. brasilense* no crescimento de plântulas de trigo, sendo que o aditivo osmoprotetor não atenua o efeito negativo do tratamento químico de sementes.

O pH da solução e a presença de nitrogênio, em condições controladas e nos valores testados, não influem sobre os efeitos da inoculação da *A. brasilense*.

Em solo com acidez corrigida a inoculação com *A. brasilense* incrementa a produtividade de grãos da cultura do trigo.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, M.; HODGE, S.; RAVEN, J. Positive plant microbial interactions. **Annals of Applied Biology**, v. 157, n. 3, p. 317-320, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00440.x>>. Acessado em: 19 jul. 2018.
- BARASSI, C. A. et al. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 49-59.
- BASHAN, Y. et al. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 4, p. 279-285, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00374-005-0025-x>>. Acessado em: 15 jul. 2018.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, n. 1, p. 77-136, 2010. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)>. Acessado em: 17 jul. 2018.
- BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998- 2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1, p. 1-33, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>>. Acessado em: 19 jul. 2018.
- BRATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. H. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>>. Acessado em: 30 jul. 2018.
- BENEDETTI, E. et al. Efeito da aplicação de calcário na ocorrência de bactérias nitrificadoras em sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 1, n. 1, p. 635-638, 2006. Disponível em: <<http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/cad/article/view/1593/1433>>. Acessado em: 9 jul. 2018.
- BERTONCELLI, P. et al. O manejo de inverno e inoculação de sementes influenciam na produtividade e qualidade da silagem de milho sob sistema plantio direto. **Revista Ceres**, v. 64, n. 5, p. 523-531, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201764050010>>. Acessado em: 9 jul. 2018.
- BRAGAGNOLO, J. et al. Optical crop sensor for variable-rate nitrogen fertilization in corn: I - plant nutrition and dry matter production. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 5, p. 1288–1298, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832013000500018>>. Acessado em: 16 jun. 2018.
- BUENO, C. J. ; MEYER, M. C.; SOUZA, N. L. Efeito de fungicidas na sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5019 e SEMIA 5079) e na nodulação da soja. **Acta**

Scientiarum: Agronomy, v. 25, n. 1, p. 231-23, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v25i1.2676>>. Acessado em: 10 jun. 2018.

CASSÁN, F. et al. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: **cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.

CAVALLET, L. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 4, p. 129-132, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-43662000000100025>>. Acessado em: 10 jul. 2018.

CHANG, T. T.; LI, C. Y. Weathering of limestone, marble, and calcium phosphate by ectomycorrhizal fungal and associated microorganisms. **Taiwan Journal of Forest Science**, v. 13, n. 2, p. 85-90, 1998.

CONAB. Companhia Nacional do Abastecimento. **Safra Brasileira de Grãos**. 2018 Online. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br>>. Acessado em: 9 jul. 2018.

CORASSA, G. M. et al. Inoculação com *Azospirillum brasilense* associada à adubação nitrogenada em trigo na região norte do Rio Grande do Sul. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, n. 16, p. 1298-1308, 2013. Disponível em: <https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/43379565/INOCULAO_COM_Azospirillum_brasilense_ASS20160304-12325-15vzt58.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1542814120&Signature=rDMxf%2BOfHzQYp6ob8Tu0%2FCBj6Zg%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DINOCULACAO_COM_Azospirillum_brasilense_A.pdf>. Acessado em: 9 jul. 2018.

CORREA, O. S. et al. *Azospirillum brasilense* - plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: **cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 87-95.

DANELLI, A. D.; VIANA, E.; FIALOS, F. G. Fungos patogênicos detectados em sementes de trigo de ciclo precoce e médio, produzidas em três lugares do Rio Grande do Sul, Brasil. **Scientia Agropecuária**, v. 1, n. 1, p. 67-74, 2012. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3892247>>. Acessado em: 12 jul. 2018.

DARTORA, J. et al. Co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 20, n. 1, p. 545-550, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n6p545-550>>. Acessado em: 19 jun. 2018.

DE-POLLI, H.; SOUTO, S. M.; FRANCO, A. A. **Compatibilidade de agrotóxicos com *Rhizobium* spp. e a simbiose das leguminosas**. Seropédica: Embrapa-UAPNPBS, 1986. 75p. (Embrapa- UAPNPBS. Documentos, 3).

DEUBEL, A.; GRANSEE, A; MERBACH, W. Transformação de rizodépósitos orgânicos por bactérias rhizoplaneia e sua influência em a disponibilidade de cálcio terciário e fosfato. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 163, n. 1, p.387-392, 2000.

DUAN, X.; BURRIS, J. S. Film coating impairs leaching of germination inhibitors in sugar beet seed. **Crop Science**, v. 37, n. 1, p. 515-520, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.2135 / crops1997.0011183X003700020034x](http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700020034x)>. Acessado em: 26 jul. 2018.

ELSLAHI, R. H. et al. Comparative study of the fungicide Benomyl toxicity on some plant growth promoting bacteria and some fungi in pure cultures. **Interdiscip Toxicol**, v. 7, n. 1, p. 12–6, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2478/intox-2014-0002>>. Acessado em: 30 jul. 2018.

FENG, Y.; MOTTA, A. C.; REEVES, D. W. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 35, n. 12, p.1693-1703, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.08.016>>. Acessado em: 21 jul. 2018.

FERREIRA, J. P. et al. Inoculação com *Azospirillum brasilense* e nitrogênio em cobertura no trigo em região de cerrado. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 8, n. 3, p. 27-32, 2014. Disponível em: <<http://revistatca.pb.gov.br/edicoes/volume-08-2014/volume-8-numero-3-setembro-2014/tca8306.pdf>>. Acessado em: 22 jul. 2018.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis-uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/qn/v29n4/30263.pdf>>. Acessado em: 23 jul. 2018.

FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>>. Acessado em: 23 jul. 2018.

GARBUIO, F. J. et al. Carbon and nitrogen dynamics in an Oxisol as affected by liming and crop residues under no-till. **Soil Science Society of America Journal**, v. 75, n. 5, p. 1723-1729, 2011. Disponível em: <[https://doi.org/10.2136 / sssaj2010.0291](https://doi.org/10.2136/sssaj2010.0291)>. Acessado em: 23 jun. 2018.

GARCIA JUNIOR, D.; VECHIATO, M.H.; MENTEN, J.O.M. Efeito de fungicidas no controle de *Fusarium graminearum*, germinação, emergência e altura de plântulas em sementes de trigo. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p. 280-283, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v34n3/18.pdf>>. Acessado em: 10 jul. 2018.

HOBBS, P.R.; SAYRE, K.; GUPTA, R. The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 363, n. 1, p. 543–555, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098 / rstb.2007.2169>>. Acessado em: 10 jun. 2018.

HOSSEN, D. C. et al. Tratamento químico de sementes de trigo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 1, p. 104-109, 2014. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/pat/v44n1/v44n1a14.pdf>>. Acessado em: 10 jul. 2018.

HUERGO, L. F. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 17-35.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Sinais moleculares trocados entre plantas hospedeiras e rizóbios: aspectos básicos e potencial de aplicação na agricultura. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 819-830, 1997. Disponível em:

<[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00239-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00239-8)>. Acessado em: 10 jul. 2018.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. D. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Brasília: Embrapa Cerrados. 2001. 48 p. Disponível em:

<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/459673/1/circTec35.pdf>>. Acessado em: 19 jul. 2018.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Brasília: Embrapa Soja. 2011. 37 p. Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/29560/1/DOC325.2011.pdf>>.

Acessado em: 11 jun. 2018.

KANEKO, F. H. et al. Análise econômica do milho em função da inoculação com *Azospirillum*, fontes e doses de n em cerrado de baixa altitude. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 14, n. 1, p. 23-37, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v14n1p23-37>>. Acessado em: 11 jun. 2018.

KAZI, N. et al. The response of wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasilense* in the field. **Field Crops Research**, v. 196, n. 1, p. 368-378, 2016. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.07.012>>. Acessado em: 16 jul. 2018.

KINTSCHEV, M. R.; GOULART, A. C. P.; MERCANTE, F. M. Compatibilidade entre a inoculação de rizóbios e fungicidas aplicados em sementes de feijoeiro-comum. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 4, p. 338-346, 2014. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1590/0100-5405/1906>>. Acessado em: 9 jun. 2018.

LIMA, R. M. F. D.; SOUZA, V. V. Polímeros Biodegradáveis: aplicação na agricultura e sua utilização como alternativa para a proteção ambiental. **Revista Agrogeoambiental**, v. 3, n. 1, p. 75-82, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.18406/2316-1817v3n12011303>>.

Acessado em: 10 jul. 2018.

LOPES, A. S.; GUILHERME L. R. G. Fertilidade do solo e produtividade agrícola. In:

NOVAIS, R. F. et al. **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade de Ciência do Solo, 2007. p. 2-61.

MULLER, T. M. et al. Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases corn yield. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 210-215,

2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131283>>. Acessado em: 9 jul. 2018.

NOLLA, A.; ANGHINONI, I. Atividade e especiação química na solução afetadas pela adição de fósforo em um Latossolo sob plantio direto em diferentes condições de acidez. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 1, p. 955-963, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v30n6/a05v30n6>>. Acessado em: 29 jul. 2018.

NOLLA, A. e al. Disponibilidade de nutrientes e fitotoxidez de alumínio: influência da complexação por ligantes na solução do solo. **Journal of Agronomic Sciences**, 4, n. especial, p. 1-16, 2015. Disponível em: <<http://www.dca.uem.br/V4NE/01.pdf>>. Acessado em: 26 jul. 2018.

PEREIRA, C. E. **Peliculização e tratamento fungicida de sementes de soja: efeitos no armazenamento e na inoculação com *Bradyrhizobium***. 2005. 95 p. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

PEREIRA, C. E. et al. Compatibility among fungicide treatments on soybean seeds through film coating and inoculation with *Bradyrhizobium* strains. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 585-589, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v32i4.5756>>. Acessado em: 16 jun. 2018.

PEREIRA, C. E. et al. Tratamentos inseticida, peliculização e inoculação de sementes de soja com rizóbio. **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p. 653-658, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2010000500014>>. Acessado em: 13 jul. 2018.

PEREIRA, L. C. et al. Rendimento do trigo (*Triticum aestivum*) em resposta a diferentes modos de inoculação com *Azospirillum brasilense*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 106-114, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.19084/RCA16089>>. Acessado em: 15 jul. 2018.

PERSSON, H. The distribution and productivity of fine roots in boreal forest. **Plant Soil**, v. 71, n. 1, p. 87-101, 1983. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02182644>>. Acessado em: 15 jun. 2018.

QUADROS, P. D.; ZHALNINA, K.; DAVIS-RICHARDSON, A. The effect of tillage system and crop rotation on soil microbial diversity and composition in a subtropical acrisol. **Diversity**, v. 4, n. 4, p. 375-395, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/d4040375>>. Acessado em: 29 jun. 2018.

RAIJ, B. et al. Efeito de níveis de calagem na produção de soja em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 1, n. 1, p. 28-31, 1977. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302457004>>. Acessado em: 19 jul. 2018.

REIS, E. M. et al. Eficiência e persistência de fungicidas no controle do oídio do trigo via tratamento de sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 4, p. 371-374, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052008000400016>>. Acessado em: 23 jun. 2018.

RIDLEY, A. M. et al. Nitrate leaching loss under annual and perennial pastures with and without lime on a duplex (texture contrast) soil in humid South-Eastern Australia. **European Journal of Soil Science**, v. 52, n. 1, p. 237–252, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2001.00387.x>>. Acessado em: 9 jul. 2018.

SANGOI, L. et al. Desempenho agronômico do milho em razão do tratamento de sementes com *Azospirillum* sp. e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 1, p. 1141-1150, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/01000683rbc20140736>>. Acessado em: 9 jun. 2018.

SILVA, A. P. et al. Microbial biomass under various soil- and cropmanagement systems in short and long-term experiments in Brazil. **Field Crops Research**, v. 119, n. 1, p. 20-26, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.06.012>>. Acessado em: 17 jun. 2018.

SUGAWARA, M. et al. Rhizobitoxine modulates plant–microbe interactions by ethylene inhibition. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 4, p. 382-388, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.01.004>>. Acessado em: 11 jul. 2018.

TANG, C. et al. Understanding subsoil acidification: effect of nitrogen transformation and nitrate leaching. **Soil Research**, v. 38, n. 4, p. 837-849, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/SR99109>>. Acessado em: 16 jul. 2018.

TEIXEIRA, I. R. Variação dos valores de pH e dos teores de carbono orgânico, cobre, manganês, zinco e ferro em profundidade em Argissolo Vermelho-Amarelo, sob diferentes sistemas de preparo de solo. **Bragantia**, v. 62, n. 1, p. 119-126, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052003000100015>>. Acessado em: 19 jun. 2018.

YANG C. et al. Fungicide: modes of action and possible impact on non-target microorganisms - Review Article. **ISRN Ecology**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5402/2011/130289>>. Acessado em: 29 jun. 2018.

ZAIED, K. A. et al. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. **Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 344-358, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2003.344.358>>. Acessado em: 29 jul. 2018.