

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

Tânia Maria Müller

**COMPONENTES DE PRODUTIVIDADE DE GRÃOS E DE ATIVIDADE
ENZIMÁTICA NA CULTURA DO MILHO INOCULADO COM
Azospirillum brasilense EM TRATAMENTO DE SEMENTES E
APLICAÇÃO FOLIAR**

Santa Maria, RS
2016

Tânia Maria Müller

**COMPONENTES DE PRODUTIVIDADE DE GRÃOS E DE ATIVIDADE
ENZIMÁTICA NA CULTURA DO MILHO INOCULADO COM *Azospirillum*
brasilense EM TRATAMENTO DE SEMENTES E APLICAÇÃO FOLIAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Agronomia.**

Orientador: Prof. Dr. Thomas Newton Martin

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Müller, Tânia Maria
COMPONENTES DE PRODUTIVIDADE DE GRÃOS E DE ATIVIDADE
ENZIMÁTICA NA CULTURA DO MILHO INOCULADO COM
Azospirillum brasilense EM TRATAMENTO DE SEMENTES E
APLICAÇÃO FOLIAR / Tânia Maria Müller.- 2016.
84 p.; 30 cm

Orientador: Thomas Newton Martin
Coorientadores: Ubirajara Russi Nunes, Luciane
Almeri Tabaldi
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2016

1. Zea mays L. 2. fixação biológica de nitrogênio 3.
aplicação foliar 4. enzimas antioxidantes 5. morfologia
radicular I. Martin, Thomas Newton II. Nunes, Ubirajara
Russi III. Tabaldi, Luciane Almeri IV. Título.

Tânia Maria Müller

**COMPONENTES DE PRODUTIVIDADE DE GRÃOS E DE ATIVIDADE
ENZIMÁTICA NA CULTURA DO MILHO INOCULADO COM *Azospirillum
brasilense* EM TRATAMENTO DE SEMENTES E APLICAÇÃO FOLIAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Agronomia.**

Aprovada em 26 de julho de 2016:

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

Ubirajara Russi Nunes, Dr. (UFSM)

Luciane Almeri Tabaldi, Dr^a. (UFSM)

Itacir Eloi Sandini, Dr. (UNICENTRO)

Leandro Galon, Dr. (UFFS)

Santa Maria, RS
2016

OFEREÇO

Ao meu namorado, amigo e companheiro Cleiton Trebien pelo amor, dedicação, carinho, paciência, compreensão e apoio incondicional durante toda esta caminhada. Obrigada por fazer parte da minha vida e por apoiar os meus sonhos.

DEDICO

Aos meus pais Alúcia e Leo que sempre acreditaram em mim, não importando a circunstância, vocês são e sempre serão a razão pela qual eu nunca desisti dos meus sonhos.

Aos meus amados Sírio e Keli por todo amor e carinho. Aos meus sobrinhos Arthur, Maria Eduarda, João Gabriel, Pedro e Ana que me proporcionaram momentos felizes e descontraídos.

Aos meus queridos Maria, Rolf, Anderson, Simoni e Mikael pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, mais especificamente ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade oferecida.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Thomas Newton Martin pela orientação, amizade, compreensão e ensinamentos para a realização deste trabalho.

Aos Professores Ubirajara Russi Nunes e Luciane Almeri Tabaldi pela paciência, amizade e dedicação para conseguirmos realizar o trabalho proposto.

Aos Professores Itacir Eloi Sandini, Antônio Luís Santi e Leandro Galon pelas contribuições.

Aos queridos amigos da Pós-Graduação (“Só nós da Pós”): Janete, Jessica, Glauber, Vinícius, Marcos, Patrícia, Paulo, Gerusa, Evandro, Giovane, Marlo e Eduardo pela parceria, amizade e dias de descontração na locadora.

Aos meus amigos do Grupo de Pesquisa em Grandes Culturas, em especial ao Alex, Leonardo, Nathália, Magno, Luiz, Anderson, Guilherme e Beatriz.

Aos meus parceiros de experimento da casa de vegetação Liana, Aline e Athos.

Aos funcionários do departamento de Fitotecnia Ilton, João e Alberto pela disponibilidade.

As minhas colegas de apartamento Larissa, Marciele e Vanessa pelos bons momentos compartilhados.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Meu, mais sincero, muito obrigada!

RESUMO

COMPONENTES DE PRODUTIVIDADE DE GRÃOS E DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA CULTURA DO MILHO INOCULADO COM *Azospirillum brasilense* EM TRATAMENTO DE SEMENTES E APLICAÇÃO FOLIAR

Autor: Tânia Maria Müller

Orientador: Thomas Newton Martin

O nitrogênio (N) é o nutriente que tem a maior capacidade de influenciar e aumentar a produtividade de grãos da cultura do milho. O N está disponível em quantidades insuficientes nos solos brasileiros, elevando o custo de produção da cultura. Assim há o interesse na utilização de fontes alternativas para suprir a demanda da planta, como a fixação biológica, que é realizada por um grupo de bactérias denominadas diazotróficas, as quais são capazes de fixar N e disponibiliza-lo para as plantas. Dentre as mais utilizadas em associação com gramíneas está a *Azospirillum brasilense*. A interação positiva com o milho tem sido avaliada em diversas pesquisas, entretanto são poucos os estudos que avaliam a aplicação foliar, a contribuição no aporte de N e a atividade enzimática das plantas inoculadas. Dessa forma o objetivo do trabalho foi estabelecer relação entre os componentes de produtividade, alterações enzimáticas e morfológicas de diferentes bases genéticas de milho com a inoculação via semente e foliar de *A. brasilense*. O presente trabalho é dividido em dois capítulos. O Capítulo I teve o objetivo de estabelecer relação entre os híbridos de milho e formas de aplicação de *A. brasilense*, desdobrando os efeitos diretos e indiretos dos principais componentes da produtividade de grãos e estimando a contribuição nitrogenada relativa. Para tanto foram conduzidos experimentos nas safras 2013/14 e 2014/15, compostos por híbridos simples, duplos e triplos inoculados com *A. brasilense* via tratamento de sementes e via aplicação foliar, nos estádios fenológicos V2, V2+V4, V4 e sem aplicação da bactéria. Houve resposta variada conforme o híbrido e o ano. Na safra 2013/14, a produtividade de grãos foi significativa para o híbrido simples AG9045 aplicado via semente e foliar em V2. A inoculação via semente apresentou aumentos de produtividade de grãos para o híbrido triplo BG7051 na safra 2014/15. As variáveis avaliadas, na análise de trilha têm influência direta sobre a produtividade de grãos, principalmente, a massa de mil grãos. Considerando o incremento dos híbridos estima-se que houve acúmulo de N fixado para o híbrido simples AG9045 e híbrido triplo BG7051 nas aplicações via semente e foliar em V2 e via semente, respectivamente. Assim conclui-se que não há relação estabelecida entre as formas de aplicação de *A. brasilense* e a base genética do híbrido. O Capítulo II objetivou avaliar as alterações enzimáticas e morfológicas de híbridos de milho submetidas a inoculação via semente e foliar com *A. brasilense*. O ensaio foi composto por seis híbridos de milho inoculados com *A. brasilense* no tratamento de sementes e via foliar no estágio V2. Analisou-se, na parte aérea e em raízes, as variáveis bioquímicas: peroxidação lipídica, atividade das enzimas superóxido dismutase, guaicaol peroxidase e nitrato redutase e conteúdo de clorofila total e carotenóides; e morfológicas: área foliar, massa seca da parte aérea, comprimento de raiz, área projetada, área superficial, diâmetro, volume, número de ramificações e massa seca de raízes. A maior atividade da superóxido dismutase (SOD) da parte aérea, foi no BG7060 com aplicação em V2, o qual evitou danos nos lipídeos de membrana. A nitrato redutase, na parte aérea apresentou maior atividade no tratamento controle, observando que a presença da bactéria reduziu a atividade da enzima. A bactéria apresentou-se eficiente para as variáveis de área projetada e área superficial da raiz nos híbridos AG8025 e AG2040. Assim, pode-se observar que os híbridos têm comportamentos diferentes com a presença da bactéria, sendo que a mesma afeta positivamente a atividade das enzimas antioxidantes e aumenta o sistema radicular e a área foliar das plantas.

Palavras-chave: *Zea mays* L., fixação biológica de nitrogênio, aplicação foliar, enzimas antioxidantes, morfologia radicular.

ABSTRACT

GRAIN PRODUCTIVITY COMPONENTS AND ENZYME ACTIVITY IN CORN CULTURE INOCULATED WITH *Azospirillum brasilense* ON SEEDS AND APPLICATION OF TREATMENT LEAF

Autor: Tânia Maria Müller

Orientador: Thomas Newton Martin

Nitrogen (N) is the nutrient that has the greatest ability to influence and increase the productivity of grains of corn. The N is available in insufficient amounts in Brazilian soils, increasing the cost of crop production. So there is interest in using alternative sources to meet the demand of the plant, such as fixation, which is held by a group of bacteria called diazotrophic, which are able to fix nitrogen and make it available to plants. Among the most used in association with grasses is *Azospirillum brasilense*. Positive interaction with corn has been evaluated in several studies, however there are few studies that evaluate the foliar application, the contribution of N input and the enzymatic activity of inoculated plants. Thus the aim of the study was to establish the relationship between productivity components, enzymatic and morphological changes of different genetic bases of corn with seed inoculation and leaf of *A. brasilense*. This work is divided into two chapters. Chapter I aimed to establish the relationship between the hybrids and application forms of *A. brasilense*, unfolding the direct and indirect effects of the main components of grain yield and estimating the relative contribution of nitrogen. Therefore, we conducted experiments in 2013/14 and 2014/15 seasons, consisting of single cross hybrids, double and triple inoculated with *A. brasilense* via seed treatment and foliar application in growth stages V2, V4 + V2, V4 and without application of the bacteria. There was varied response as hybrid and year. In the 2013/14 harvest, grain yield was significant for the simple hybrid AG9045 applied via seed and leaf in V2. The seed inoculation showed grain yield increases for the triple hybrid BG7051 in season 2014/15. The variables in the path analysis have direct influence on grain yield, especially, the thousand grain weight. Considering the increase in hybrid it is estimated that there was accumulation of N fixed for the simple hybrid AG9045 and triple hybrid BG7051 in applications via seed and leaf in V2 and via seed, respectively. Thus it is concluded that there is no established relationship between the forms of application *A. brasilense* and genetics based hybrid. Chapter II aimed to evaluate the enzymatic and morphological changes of corn hybrids submitted to seed inoculation and leaf with *A. brasilense*. The test was composed of six corn hybrids inoculated with *A. brasilense* in the treatment of seeds and leaf via the V2 stage. Analyzed in shoots and roots, biochemical variables: lipid peroxidation, activity of superoxide dismutase, guaiacol peroxidase and nitrate reductase and chlorophyll content and carotenoids; and morphological leaf area, shoot dry weight, root length, projected area, surface area, diameter, volume, number of branches and dry mass of roots. The increased activity of superoxide dismutase (SOD) of the shoot was the BG7060 with application V2, which prevented damage to the lipid membrane. The nitrate reductase, the shoot was most active in the control treatment, noting that the presence of bacteria reduced the activity of the enzyme. The bacteria showed to be efficient in the area of variables designed and superficial root area in the AG8025 and AG2040 hybrids. Thus, it can be seen that the hybrids have different behaviors in the presence of the bacterium, and the same positively affects the activity of antioxidant enzymes and increase the root system and plant leaf area.

Keywords: *Zea mays* L., biological nitrogen fixation, foliar application, antioxidant enzymes, root morphology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Índice de área foliar (a), altura de planta (b), altura de inserção de espiga (c), diâmetro de colmo (d), teor relativo de clorofila (e) e número de espigas por planta (f) de milho inoculadas com *A. brasilense*, na safra 2013/14 (ANEXO G).27
- Figura 2.** Variáveis de índice de área foliar (a), altura de planta (b), altura de inserção de espiga (c), diâmetro de colmo (d), teor relativo de clorofila (e) e número de espigas por planta (f) analisadas na safra 2014/15 (ANEXO I). 28
- Figura 3.** Dispersão das médias das variáveis de número de fileiras por espiga (a), grãos por fileira (b), grãos por espiga (c), comprimento da espiga (d), massa de mil grãos (e) e produtividade de grãos (f) avaliadas nos híbridos de milho em função da aplicação de *A. brasilense* via semente e foliar na safra 2013/14 (ANEXO H). 30
- Figura 4.** Médias das variáveis de número de fileiras por espiga (a), grãos por fileira (b), grãos por espiga (c), comprimento da espiga (d), observadas nos híbridos de milho com aplicação de *A. brasilense*, via semente e folha na safra 2014/15 (ANEXO J). 31
- Figura 5.** Diâmetro da espiga (a), massa de mil grãos (b), produtividade de grãos (c), observadas nos híbridos com aplicação de *A. brasilense*, via semente e folha na safra 2014/15 (ANEXO J). 32

CAPÍTULO II

- Figura 6.** Efeito de *A. brasilense* na área foliar (AF, a), clorofila total (b) e carotenóides (c) em híbridos de milho. (ANEXO O). 50
- Figura 7.** Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, a), guaiacol peroxidase (POD, b), nitrato redutase (NR, c) e peroxidação lipídica (T-Bars, d) em híbridos de milho inoculados com *A. brasilense* via semente e aplicação foliar. (ANEXO P). 52
- Figura 8.** Comprimento de raiz (a), área projetada (b), área superficial (c), volume de raiz (d), número de ramificações (e) e massa seca de raiz (f) dos híbridos de milho inoculados via tratamento de sementes e aplicação foliar de *A. brasilense*. (ANEXO Q). 55
- Figura 9.** Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) guaiacol peroxidase (POD) e nitrato redutase (NR) e níveis de MDA (T-Bars), na parte radicular, de seis híbridos de milho inoculados com *A. brasilense* via tratamento de sementes e aplicação foliar. (ANEXO R). 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de trilha para as variáveis de altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de colmo (DC), massa de mil grãos (MMG) e grãos por espiga (GE) em função das aplicações de <i>A. brasilense</i> na produtividade de grãos (PG) na Safra 2013/14.....	34
Tabela 2. Análise de trilha para as variáveis de altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de colmo (DC), massa de mil grãos (MMG) e grãos por espiga (GE) em função das aplicações de <i>A. brasilense</i> na produtividade de grãos (PG) na Safra 2014/15.....	35

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
CAPÍTULO I.....	19
PRODUTIVIDADE DE MILHO COM <i>Azospirillum brasilense</i> APLICADA VIA SEMENTE E FOLIAR	19
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	22
Resultados e Discussão.....	25
Conclusão	36
Referências	36
CAPÍTULO II.....	44
ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM HÍBRIDOS DE MILHO INOCULADOS COM <i>Azospirillum brasilense</i> , VIA TRATAMENTO DE SEMENTES E APLICAÇÃO FOLIAR.....	44
Resumo	44
Abstract.....	44
1. Introdução.....	45
2. Material e métodos	46
3. Resultados e Discussão.....	49
4. Conclusão	58
5. Referências	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO A - Análise de solo da área experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).....	69
ANEXO B. Extrato do balanço hídrico normal por Thornthwait & Mather (1955), representado por decêndios para 2013 (a), 2014 (b) e 2015 (c) para Santa Maria (RS).....	70
ANEXO C. Resumo da análise de variância para as variáveis de índice de área foliar (IAF), altura de planta (AP), altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de colmo (DC), índice relativo de clorofila (CL), número de espigas por planta (NE) dos híbridos, de milho, inoculados com <i>A. brasilense</i> , na safra 2013/14.....	71
ANEXO D. Resumo da análise de variância para as variáveis de número de fileiras por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), número de grãos por espiga (GE), diâmetro de espiga (DE), comprimento de espiga (CE), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) dos híbridos, de milho, inoculados com <i>A. brasilense</i> , na safra 2013/14.....	72
ANEXO E. Resumo da análise de variância para as variáveis de índice de área foliar (IAF), altura de planta (AP), altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de colmo (DC), índice relativo de clorofila (CL), número de espigas por planta (NE) de seis híbridos, de milho, inoculados com <i>A. brasilense</i> , na safra 2014/15.....	73
ANEXO F. Resumo da análise de variância para as variáveis de número de fileiras por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), número de grãos por espiga (GE), diâmetro de espiga (DE), comprimento de espiga (CE), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) dos híbridos, de milho, inoculados com <i>A. brasilense</i> , na safra 2014/15.....	74
ANEXO G. Índice de área foliar (IAF), altura de planta (AP), altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de colmo (DC), clorofila total (CL) e número de espigas (NE) na aplicação de <i>A. brasilense</i> em híbridos simples (HS), duplo (HD) e triplo (HT), na safra 2013/14.....	75
ANEXO H. Médias das variáveis de número de fileiras por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), número de grãos por espiga (GE), comprimento de espiga (CE, cm), massa de mil	

grãos (MMG, g) e produtividade de grão (PG, kg ha ⁻¹) dos híbridos de milho em função da aplicação de <i>A. brasilense</i> , avaliados na safra 2013/14.....	76
ANEXO I. Índice de área foliar (IAF), altura de planta (AP), altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de colmo (DC), clorofila total (CL) e número de espigas (NE) em híbridos simples (HS), duplo (HD) e triplo (HT) com aplicação de <i>A. brasilense</i> , avaliados na safra 2014/15. 77	
ANEXO J. Número de fileiras por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), número de grãos por espiga (GE), comprimento de espiga (CE), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grão (PG) dos híbridos de milho, simples (HS), duplo (HD) e triplo (HT), em função da aplicação de <i>A. brasilense</i> , avaliados na safra 2014/15.....	78
ANEXO L. Resumo da análise de variância das variáveis de área foliar (AF), massa seca foliar (MS), teor de clorofila (CL), carotenoides (CA), superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD), conteúdo de ácido tiobarbitúrico (T-Bars) e nitrato redutase (NR), dos híbridos de milho submetidos a inoculação com <i>A. brasilense</i> via semente e foliar.	79
ANEXO M. Resumo da análise de variância para as variáveis morfológicas de comprimento de raiz (CR), área projetada (AP), área superficial (AS), diâmetro de raiz (DR), volume de raiz (VR), número de ramificações (NRA) e massa seca (MS) da parte radicular dos híbridos de milho inoculados com <i>A. brasilense</i>	80
ANEXO N. Resumo da análise de variância da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD), conteúdo de ácido tiobarbitúrico (T-Bars) e nitrato redutase (NR) da parte radicular dos híbridos de milho inoculados com <i>A. brasilense</i>	81
ANEXO O. Resposta foliar para as variáveis de clorofila total, carotenoides, e área foliar (AF) dos híbridos de milho inoculados com <i>A. brasilense</i>	82
ANEXO P. Níveis de MDA (T-Bars) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) guaiacol peroxidase (POD) e nitrato redutase (NR) na parte aérea de híbridos de milho inoculados com <i>A. brasilense</i>	83
ANEXO Q. Comprimento de raiz (CR), área projetada (AP), área superficial (AS), diâmetro (DR), volume (VR), número de ramificações (NRA) e massa seca (MS) das raízes dos híbridos de milho inoculados com <i>A. brasilense</i> via semente e folha.	84
ANEXO R. Enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD) e nitrato redutase (NR), e níveis de MDA (T-bars) das raízes dos híbridos de milho inoculados com <i>A. brasilense</i> via semente e folha.....	85

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é uma das culturas mais exigentes em fertilizantes, principalmente os nitrogenados que influenciam diretamente na produção final (OHLAND et al., 2005). Plantas com deficiência de nitrogênio (N) podem apresentar redução da produtividade de grãos, amarelecimento nas folhas mais velhas, seguidas de clorose generalizada com senescência e em alguns casos, podem ser observadas deformações nas pontas das espigas (SUBEDI et al., 2009).

A produtividade das culturas é o resultado do potencial genético das sementes, condições edafoclimáticas, manejo e tratos culturais. Para otimizar os rendimentos são necessárias grandes quantidades de fertilizantes, principalmente de N, assim uma das possibilidades para viabilizar uma produção com menores custos é a utilização do potencial genético das plantas aliado aos recursos biológicos do solo (SUBEDI et al., 2009).

Dentre os processos biológicos que ocorrem na natureza, a fixação biológica do N atmosférico (FBN) é realizada por um grupo restrito de bactérias, denominadas diazotróficas. Bactérias fixadoras de N foram isoladas a partir de diversas raízes de gramíneas, cultivadas e silvestres. Entre estas bactérias destacam-se as pertencentes ao gênero *Azospirillum* spp. são conhecidas por se associarem com raízes de gramíneas. Estas bactérias podem agir sobre o crescimento das plantas por meio de redução de N atmosférico (N_2) a amônia (NH_3), resultando na diminuição da energia utilizada pela planta para redução de NO_3^- a amônio (NH_4^+), assim, a energia pode ser canalizada para outros processos vitais do metabolismo (PENG et al., 2006).

As bactérias do gênero *Azospirillum* pertencem a classe α -proteobactérias, sendo gram-negativas, de vida livre, endofíticas facultativas, conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) e estão presentes na maioria dos solos. Tem formato de bastonete, são espiraladas (SILVA et al., 2004), curvas e móveis (HUERGO et al., 2008). O fator intrínseco que determinará a maior mobilidade, no solo e nas plantas, é a presença de flagelos (DE WEERT et al., 2002). A temperatura para o crescimento da bactéria varia entre 28 e 41°C, dependendo da espécie, e são pouco tolerantes a acidez (ECKERT et al., 2001).

O metabolismo de carbono e N apresentado pelas espécies de bactérias são altamente dinâmicas, e as fontes preferidas de carbono são os ácidos orgânicos, tais como malato, piruvato, succinato e frutose (OKUMURA et al, 2013). Esses ácidos orgânicos são atrativos para a bactéria, mas o grau de resposta para cada composto difere entre estirpes. Assim, as respostas na inoculação de *Azospirillum*, a campo, dependem da habilidade das estirpes selecionadas para sobreviverem e colonizarem sementes germinadas, na presença de grande

número de outros microrganismos da rizosfera, como da capacidade de mobilidade e quimiotaxia em direção aos exsudatos radiculares (HAUWAERTS et al., 2002).

Pesquisas indicam a interação positiva de *Azospirillum* e milho, contudo ainda há inconsistência nos resultados de trabalhos de campo (REIS, 2008). O clima e o tipo de solo interferem na adaptação das bactérias inoculadas podendo acarretar variação nos resultados de inoculação. Entretanto, há consenso de que o genótipo é o fator-chave para que se obtenha sucesso na associação entre planta e o microrganismo (SALA et al., 2007).

A inoculação com bactérias promotoras de crescimento (BPC) pode estimular o aumento do peso da radícula e da altura da plântula de milho (JAVED et al., 1998), ou contribuir com incrementos de até 68% no comprimento e no peso das raízes (ZAHIR et al., 2000). A atividade benéfica das bactérias já está consolidada, porém, sua interação com diferentes genótipos de milho ainda necessita de mais pesquisas (QUADROS et al., 2014). Deste modo, o genótipo da planta desempenha papel importante na colonização pelas bactérias, e faz-se necessário o estudo dos híbridos de milho que tenham resposta agrônômica positiva à inoculação.

A variação ocorre na resposta da inoculação de BPC em diferentes tipos de solo e híbridos. Fallik; Okon (1988) relataram que a inoculação de *Azospirillum* não causou efeito significativo no aumento do comprimento das raízes quando inoculado em composto contendo argila e mais que 1% de matéria orgânica. A especificidade hospedeira na associação dos diazotróficos com o milho pode ser um dos principais fatores que influenciam negativamente na inoculação.

A inoculação modifica a morfologia do sistema radicial provavelmente devido à produção de substâncias promotoras do crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas, e não somente pela FBN (CAVALLET et al., 2000). Essa produção de fitormônios interfere no crescimento das plantas e altera a morfologia das raízes de modo que possibilite maior volume de exploração do solo (SILVA et al., 2004). As plantas de milho não apresentam nodulação, mas ocorre aumento na superfície das raízes, observando-se diferenças entre a densidade de raízes secundárias e o surgimento das raízes principais. As raízes secundárias em plantas inoculadas apresentaram menor número, no entanto, maior superfície de contato (SILVA et al., 2004). O incremento do sistema radicial, em plantas inoculadas, proporciona maior longevidade aos tecidos verdes, em consequência ocorre maior período de atividade fotossintética, o que resulta em quantidades maiores de fotoassimilados para os grãos ou para a própria assimilação de N, em relação às plantas não inoculadas (DIDONET et al., 2000). Em trabalho desenvolvido por Saikia et al. (2007), plantas inoculadas com *Azospirillum* apresentaram maior taxa

fotossintética e maior condutância estomática, resultando em maior rendimento de grãos em comparação com plantas não inoculadas, assim como o teor de nutrientes nos grãos foi maior em plantas inoculadas. Para a incorporação desta tecnologia, no campo, há várias formas de aplicação: líquida, turfa, pulverização pós-emergente sobre as sementes, nos sulcos e a utilização de sementes peletizadas. De um modo geral, o produto é aplicado diretamente na semente, no estado líquido ou de turfa.

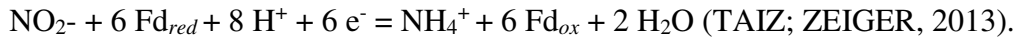
O *Azospirillum* pode entrar passivamente no sistema radicular, utilizando camadas endodérmicas de células rompidas, resultantes do desenvolvimento da raiz. Após a penetração, algumas bactérias endofíticas podem, em seguida, colonizar espaços intercelulares do córtex ricos em nutrientes, na zona de alongamento da raiz, pelos radiculares e tecido vascular, no interior das células, movimentando-se para o xilema, e colonizando colmos e folhas (OLIVARES et al., 1996). Na folha, as bactérias podem ser absorvidas de forma passiva que consiste num processo não metabólico, onde a solução aplicada na superfície foliar atravessa a cutícula ocupando o espaço livre aparente (ELA), formado pela parede celular, espaços intercelulares e superfície externa do plasmalema. A interação pode desenvolver-se rapidamente com alguns endófitos, como observado em camadas de células corticais de milho 12 horas após a inoculação, e após 24 horas no xilema (OKUMURA et al., 2013).

Os genótipos de milho respondem diferentemente ao íon amônio, cuja concentração afeta a atividade das enzimas de assimilação e os genótipos apresentam incremento na atividade da enzima (MAGALHÃES; MACHADO, 1995). Por outro lado, bactérias diazotróficas podem produzir amônio em espaços intracelular das raízes, aumentando conseqüentemente a disponibilidade do íon amônio no sistema radicular (CHRISTIANSEN-WENIGER; VANDERLEYDEN, 1994).

Um dos problemas na FBN é o processo de transferência de N fixado à planta, que ocorre lentamente e apenas pequena parte fica disponível para a planta, porém a morte e mineralização das bactérias pode liberar significativas quantidades de N (LEE et al., 1994). A FBN consiste na redução do N atmosférico (N_2) em amônia. As reações de transferência de elétrons que ocasionam a redução do N são possíveis devido ao complexo da enzima nitrogenase. Em função da grande demanda por energia, o processo de FBN está associado à respiração celular. O complexo da nitrogenase é inativado por significativos níveis de oxigênio e pela presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas através das reações de oxirredução (CORRÊA; SCHRANK, 2005).

A rota de assimilação do N em plantas superiores envolve dois estágios sequenciais. A conversão do nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), mediada pela enzima nitrato redutase, a qual

reduz NO_3^- a nitrito (NO_2^-). Na rota as células vegetais transportam o NO_2^- para o cloroplasto, nas folhas, e plastídios, nas raízes e nessas organelas a enzima nitrito redutase reduz NO_2^- a NH_4^+ . Cloroplastos e plastídios tem diferentes formas da enzima, mas todas as formas transferem elétrons de ferredoxina para NO_2^- pela reação de:



O amônio é então assimilado nos aminoácidos glutamina e glutamato, os quais servem para translocar nitrogênio orgânico de fontes para drenos (PURCINO et al., 1994). As células vegetais convertem rapidamente o amônio gerado pela assimilação de nitrato ou fotorrespiração, em aminoácidos, evitando a toxicidade do amônio. A via primária para a conversão envolve as ações sequenciais de glutamina sintetase e da glutamato sintase pela reação:



Alternativamente, o NO_3^- e o NH_4^+ podem ser transportados por carregadores específicos através do tonoplasto e armazenados no vacúolo, para posteriormente serem reduzidos no citosol da mesma célula ou serem translocados para a parte aérea da planta. Nos colmos e folhas, o nitrato é reduzido a nitrito pela ação da enzima NR, e o amônio, através da enzima RNi. O amônio é então incorporado em aminoácidos pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintetase (GOGAT). Estes elementos também são armazenados no vacúolo das células para posterior redução e utilização (KING et al., 1993; TAIZ; ZEIGER, 2013).

O nitrogênio, uma vez absorvido, pode ser assimilado na própria raiz ou ser transportado para as folhas, onde ocorre a assimilação. Nas folhas, a energia para as reações de assimilação do nitrogênio é gerada nos cloroplastos pela fotossíntese, no citosol pela glicólise, e nas mitocôndrias pelo ciclo do ácido tricarboxílico no processo de respiração (HUPPE; TURPIN, 1994). Nos cloroplastos, as reações catalisadas pelas enzimas RNi e GOGAT exigem a redução da ferredoxina, o que é feito pelo sistema de transporte não-cíclico de elétrons (TAIZ; ZEIGER, 2013). Quando o nitrogênio é metabolizado nas raízes, a energia é gerada no citosol, através do ciclo das pentoses e da glicólise, e nas mitocôndrias pelo ciclo do ácido tricarboxílico (OAKS, 1994).

A otimização da produtividade de grãos depende, entre outros fatores, da eficiência de canalização de carbono (C) e N para o grão e da transformação desses elementos em compostos de reserva. Aumentar a eficiência através da manipulação desses processos pode ser um meio de melhorar a produtividade. Durante o estágio fenológico V4 (RITCHIE et al., 1993), a planta tem seu potencial de produção definido, justificando a importância da nutrição, principalmente do N disponível (FORNASIERI FILHO, 2007).

Quando a deficiência de N se estabelece, ocorre redução da disponibilidade do nutriente para a cultura, o que causa estresse, prejudicando os processos fisiológicos e bioquímicos da planta. Dessa forma, a competição pelo N pode induzir a produção de radicais livres que oxidam os componentes fosfolipídicos das membranas celulares (HAN; WANG, 2002). Estresses são mudanças na fisiologia quando há exposição das plantas a estímulos desfavoráveis, e que induzirão resposta defensiva ou adaptativa ao estímulo (LARCHER, 1980). Fisiologicamente, estresse é a condição causada por fatores que tendem a alterar o equilíbrio da planta (NILSEN; ORCUTT, 1996). Sob condições de estresse, uma das estratégias adotadas pelas plantas é desacelerar o crescimento, conservando energia para defesa e limitando o risco de danos e essa condição, de estresse celular pode ser avaliada através da peroxidação lipídica (HUANG et al., 2004).

O estresse oxidativo corresponde a um estado em que há uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), onde os mecanismos celulares pró-oxidativos ultrapassam os antioxidantes. Sob condições de “não estresse”, o sistema de defesa antioxidante fornece proteção adequada contra as EROs. Contudo, situações de estresse de origem natural ou antrópica podem provocar o aumento da produção de EROs, os quais possuem potencial para interagir de forma não específica com muitos componentes celulares, desencadeando reações peroxidativas e causando danos significativos às membranas e a outras macromoléculas essenciais, tais como os pigmentos fotossintéticos, as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídios (FOYER et al., 1994).

A produção de EROs pode iniciar o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares, formando hidroperóxidos de lipídeos. A peroxidação de lipídeos de membrana é um dos eventos mais significativos do estresse oxidativo, porque causa a diminuição da fluidez, modificações de permeabilidade iônica e de outras funções associadas às membranas (QUEIROZ et al., 1998), como perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação das lipoproteínas e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (BARBER; HARRIS, 1994). Os eventos bioquímicos resultantes de diminuição da fluidez das membranas incluem a interferência nas funções das proteínas, a redução do suprimento de energia, a perda de compartimentalização, a liberação acentuada de íons e outros eventos que rompem o metabolismo normal e levam ao desequilíbrio e perda das funções essenciais. A peroxidação é determinada através das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), via acúmulo de malondialdeído (MDA). O MDA é um dos produtos da peroxidação

de lipídeos, conseqüentemente, o maior conteúdo desse composto indica estresse oxidativo (HEALTH; PACKER, 1968).

A capacidade das plantas de sequestrar radicais livres aumenta com a sua aclimação, geralmente associada a atividades elevadas de enzimas antioxidantes. Sob estresses abióticos, as enzimas sequestradoras de ERO são induzidas a diminuir a concentração de quantidades tóxicas de ERO intracelulares (APEL; HIRT, 2004).

As principais enzimas envolvidas na defesa das plantas contra as EROs compreendem a superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD) e a catalase (CAT) (SHAH et al., 2001). O balanço entre as atividades destas enzimas determina o estado estável de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio nas células. A estabilidade das enzimas é baseada na atividade de uma ou mais enzimas quando as plantas são expostas sob condições de estresse, e este aumento está relacionado com a tolerância ao estresse ou a produção de EROs (TABALDI, 2008).

A SOD catalisa a conversão de superóxido (O_2^-) à peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerado através de diferentes processos do metabolismo celular, tais como o transporte de elétrons na mitocôndria e cloroplastos. Dentro da célula, a SOD constitui a primeira linha de defesa contra as EROs. A redução na atividade da SOD ocorre com um aumento simultâneo da acumulação de O_2^- . O radical O_2^- é um dos principais oxidantes responsáveis pela peroxidação de lipídios e conseqüente aumento na permeabilidade das membranas (APEL; HIRT, 2004). Os carotenoides também possuem um papel importante na proteção do pigmento clorofila sob condições de estresse e são conhecidos por manter as reações fotodinâmicas, protegendo a clorofila da peroxidação lipídica e impedindo o esgotamento da membrana dos cloroplastos (KNOX; DODGE, 1985).

Dessa forma o objetivo geral do trabalho foi estabelecer relação entre os componentes de produtividade, alterações enzimáticas e morfológicas de bases genéticas de milho com a inoculação via semente e folia de *A. brasilense*. O presente trabalho foi dividido em dois capítulos sendo o Capítulo I intitulado como: Produtividade de milho com *Azospirillum brasilense* aplicada via semente e foliar; e formatado conforme as normas da Revista Acta Scientiarum. E o Capítulo II intitulado como: Atividade enzimática e alterações morfológicas em híbridos de milho inoculados, via semente e foliar, com *Azospirillum brasilense*; e formatado conforme as normas para publicação da revista Plant Physiology and Biochemistry.

CAPÍTULO I

PRODUTIVIDADE DE MILHO COM *Azospirillum brasilense* APLICADA VIA SEMENTE E FOLIAR

Corn yield with *Azospirillum brasilense* applied in seed and leaf

Resumo – Objetivou-se com esse estudo estabelecer relação entre as bases genéticas de milho e formas de aplicação de *Azospirillum brasilense*, desdobrando os efeitos diretos e indiretos dos principais componentes da produtividade de grãos e estimando a contribuição nitrogenada relativa. Foram conduzidos experimentos nas safras 2013/14 e 2014/15, compostos por dois híbridos simples, dois híbridos duplos e dois híbridos triplos inoculados com *A. brasilense* via tratamento de sementes e via aplicação foliar, nos estádios fenológicos V2, V2+V4, V4 e tratamento controle, sem aplicação da bactéria. Foram avaliadas as características morfológicas das plantas e componentes de produtividade. Para as variáveis de produtividade de grãos, altura de inserção de espiga, diâmetro de colmo, massa de mil grãos e número de grãos por espiga foi realizada a análise de trilha e para as médias da produtividade de grãos foi estimada a contribuição de nitrogênio fixado. Houve resposta variada conforme o híbrido e o ano. Na safra 2013/14, a produtividade de grãos foi significativa para o híbrido simples AG9045 inoculado com *A. brasilense* via semente e foliar em V2. A inoculação de *A. brasilense* via semente apresentou aumentos de produtividade de grãos para o híbrido triplo BG7051, na safra 2014/15. As variáveis avaliadas, na análise de trilha têm influência direta sobre a produtividade de grãos, principalmente, a massa de mil grãos. Considerando o incremento dos híbridos estima-se que houve acúmulo de nitrogênio fixado para o híbrido simples AG9045 e triplo BG7051 nas aplicações via semente e foliar em V2 e via semente, respectivamente. A aplicação via foliar de *A. brasilense* é uma alternativa eficiente nos caracteres morfológicos da planta, incrementando em alguns híbridos a produtividade de grãos.

Palavras-chave: *Zea mays* L., fixação biológica de nitrogênio, inoculação, aplicação foliar.

Abstract - The objective of this study was to establish the relationship between the genetic basis of corn and application forms of *Azospirillum brasilense*, unfolding the direct and indirect effects of the main components of grain yield and estimating the relative contribution of nitrogen. crop experiments were conducted in 2013/14 and 2014/15, consisting of two single hybrids, two double and two triple hybrid hybrids inoculated with *A. brasilense* via seed treatment and foliar application in growth stages V2, V4 + V2, V4 and control treatment,

37 without application of the bacteria. The morphological characteristics of the plants and
38 components productivity was evaluated. For grain yield variables, ear insertion height, stem
39 diameter, thousand grain weight and number of grains per spike was performed path analysis
40 and the average grain yield was estimated nitrogen contribution fixed. There was varied
41 response as hybrid and year. In the 2013/14 harvest, grain yield was significant for the simple
42 hybrid AG9045 inoculated with *A. brasilense* seed and foliar in V2. Inoculation of *A. brasilense*
43 via seed showed grain yield increases for the triple hybrid BG7051 in season 2014/15. The
44 variables in the path analysis have direct influence on grain yield, especially, the thousand grain
45 weight. Considering the increase in hybrid it is estimated that there was accumulation of
46 nitrogen fixed for the simple hybrid AG9045 and triple BG7051 in applications via seed and
47 leaf in V2 and via seed, respectively. The application to the leaves of *A. brasilense* is an efficient
48 alternative in the morphological characteristics of the plant, increasing in some hybrid grain
49 yield.

50 **Keywords:** *Zea mays* L., biological nitrogen fixation, inoculation, seed treatment, leaf
51 application.

52

53

Introdução

54

55 O nitrogênio (N) é o elemento mineral mais importante e limitante na produtividade da cultura
56 do milho (*Zea mays* L.), participando diretamente na biossíntese de proteínas e clorofilas. Sua
57 aplicação é requerida em grandes quantidades para suprir a demanda da cultura (Dotto, Lana,
58 Steiner & Frandoloso, 2010). Devido a sua dinâmica no solo, apresenta um complexo manejo,
59 sendo, geralmente, o elemento mais caro no sistema de produção da cultura (Bastos, Cardoso,
60 Melo, Ribeiro & Andrade Júnior, 2008) estima-se que para a produção de uma tonelada de
61 grãos, de milho, são necessários 28 kg de N. Os custos econômicos e ambientais relacionados
62 à fertilização nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a
63 utilização deste fertilizante sem que haja redução da produção de grãos (Dotto et al., 2010).
64 Uma das possibilidades para viabilizar uma produção com menores custos e menor impacto
65 ambiental é a utilização do potencial genético das plantas, aliado aos recursos biológicos do
66 solo, como as bactérias diazotróficas, que são consideradas promotoras de crescimento vegetal
67 por possuírem a capacidade de fixar nitrogênio (N₂) para a planta, e de produzir hormônios de
68 crescimento, como auxinas e giberelinas, que estimulam o crescimento vegetal principalmente
69 das raízes, atuando na maior absorção de nutrientes e água (Dobbelaere et al., 2002).

70 Aumentos de produtividade no campo têm sido obtidos com bactérias que se associam a
71 gramíneas e contribuem na fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Verma, Yadav, Tiwari
72 & Singh, 2010; Bhattacharyya & Jha, 2012). A interação planta-bactéria pode ocorrer na
73 rizosfera, no qual bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPB) são atraídas por
74 exsudatos radiculares (Raaijmakers, Paulitz, Steinberg, Alabouvette & Moëgne-Loccoz, 2009;
75 Compant, Clément & Sessitsch, 2010). A composição de exsudatos depende do tipo de solo,
76 disponibilidade de nutrientes, genótipo da planta e fatores bióticos e abióticos, além disso,
77 existem alterações, nos padrões, ao longo do sistema radicular que resultam em diferenças na
78 composição dos exsudatos e das comunidades de bactérias associadas
79 (Zhang, Subramanian, Stacey & Yu, 2009).

80 Dentre os grupos de bactérias associadas as raízes, as diazotróficas endofíticas apresentam
81 vantagem devido a capacidade de colonizar o interior das raízes das plantas e estabelecer nichos
82 que oferecem condições mais adequadas para a eficaz fixação de nitrogênio e posterior
83 transferência para a planta hospedeira (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). Entre os
84 microrganismos diazotróficos encontrados nas raízes de gramíneas estão as espécies do gênero
85 *Azospirillum* (Rodrigues, Baldani & Baldani, 2006), que existem naturalmente na maioria dos
86 solos (Ardakani, Mazaheri, Mafakheri, & Moghaddam, 2011).

87 As bactérias do gênero *Azospirillum* sp. podem ser inoculadas em plantas de interesse
88 agrônomico, estimulando seu crescimento por múltiplos mecanismos, incluindo síntese de
89 fitohormônios, melhoria da nutrição nitrogenada, mitigação de estresse e controle biológico da
90 microbiota patogênica (Bashan & De-Bashan, 2010). A FBN na planta, durante a associação
91 planta-bactéria, é o processo em que as bactérias fornecem o N fixado (Chubatsu et al., 2012),
92 o qual não supre completamente as necessidades da cultura do milho, assim o inoculante não
93 substitui totalmente a adubação nitrogenada, mas promove melhor absorção e utilização do N
94 que está no solo ou fornecido (Saubidet, Fatta & Barneix, 2002). Para a obtenção de
95 rendimentos econômicos, é essencial a suplementação nitrogenada, sendo necessária uma dose
96 de N que proporcione bom desenvolvimento da planta, mas que não venha prejudicar a FBN
97 (Oliveira, Silva, Arruda, Nascimento, & Alves, 2003).

98 A eficiência no uso de N, na absorção e na utilização do N, é a capacidade interna da planta de
99 produzir grãos ou matéria seca. Em relação aos híbridos, estudos realizados na área de
100 melhoramento, revelam a tendência de superioridade média dos híbridos simples em relação
101 aos triplos e duplos (Arnhold, Pacheco, Carvalho, Silva & Oliveira Junior, 2010). Em
102 experimentos com híbridos de ciclo precoce constatou-se diferença, sendo os híbridos simples
103 superiores aos duplos e triplos, dessa forma, pode-se ressaltar a importância da heterose nessas

104 populações (Silva & Miranda Filho, 2003). A atividade benéfica das bactérias já está
105 consolidada (Bashan, Holguin & De-Bashan, 2004), porém, sua interação com diferentes
106 genótipos ainda necessita ser mais pesquisada, pois desempenha papel importante na
107 colonização pelas bactérias, e faz-se necessário o estudo dos híbridos de milho que tenham
108 resposta agrônômica, positiva, à inoculação (Quadros et al., 2014). As alternativas são estudos
109 regionais com híbridos comerciais, que busquem selecionar genótipos que possuam condições
110 de adaptabilidade e estabilidade antes da sua recomendação (Cardoso et al., 2009).

111 A forma usual de aplicação de *A. brasilense* tem sido via tratamento de sementes, entretanto a
112 inoculação da bactéria via foliar pode ser uma alternativa eficiente em diferentes híbridos de
113 milho, mas é preciso identificar as condições em que a bactéria possa promover mais benefícios
114 às plantas (Martins et al., 2012). A inoculação com *A. brasilense* é uma tecnologia barata e de
115 baixo impacto ambiental. No entanto, sua indicação técnica ainda precisa ser melhorada,
116 levando-se em conta, entre outros fatores, o nível de investimento adotado na lavoura (Sangoi
117 et al., 2015).

118 A principal barreira à utilização do *A. brasilense* na cultura do milho tem sido a inconsistência
119 dos resultados de pesquisa, que podem variar de acordo com as condições edafoclimáticas, a
120 metodologia de condução da pesquisa e o híbrido (Bartchechen et al., 2010). Procurando
121 compreender melhor a associação entre caracteres, Wright (1921) propôs um método,
122 denominado análise de trilha (*path analysis*). Por meio desse é possível estimar a correlação e
123 a relação de causa e efeito entre os caracteres explicativos e o principal, com o desdobramento
124 do coeficiente de correlação, por meio da análise de trilha, e efeitos diretos e indiretos de
125 caracteres explicativos sobre a produtividade de grãos. As análises têm sua importância por
126 distinguir as causas genéticas e de ambiente (Almeida, 1988).

127 Desta forma, objetivou-se com esse estudo estabelecer relação entre os híbridos de milho e
128 formas de aplicação de *A. brasilense*, desdobrando os efeitos diretos e indiretos dos principais
129 componentes da produtividade de grãos e estimando a contribuição nitrogenada relativa.

130

131

Material e Métodos

132

133 Os experimentos foram instalados a campo em sistema semeadura direta, durante as safras
134 2013/14 e 2014/15, na Área Experimental do Departamento de Fitotecnia na Universidade
135 Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, RS. A área está localizada a 29° 43' Sul e
136 53° 44' Oeste, com altitude média de 116 m. O clima da região é classificado como Cfa
137 (subtropical úmido) conforme Köppen (Peel, Finlayson & McMahon, 2007; Heldwein, Buriol

138 & Streck, 2009), subtropical de clima temperado chuvoso, cuja temperatura média anual é de
139 19,4° C (Heldwein et al., 2009). O solo da área experimental é classificado como Argissolo
140 Vermelho distrófico arênico (Embrapa, 2013) apresentando, na profundidade de 0 a 20 cm, as
141 características: para a safra 2013/14 (ANEXO A): argila: 23 % massa por volume (m/v); índice
142 Shoemaker, Mac lean e Pratt (SMP): 5,5; P: 17,25 mg dm⁻³; K: 84 mg dm⁻³; e MO: 2,2 % m/v;
143 e na safra de 2014/15 (ANEXO A): argila: 24 % m/v; índice SMP: 6,0; P: 12,6 mg dm⁻³; K:
144 108,0 mg dm⁻³; e MO: 2,4 % m/v. Para correção da fertilidade, em ambas as safras, foram
145 aplicados 250 kg ha⁻¹ da fórmula 0-23-30 (N-P-K) (COMISSÃO DE QUÍMICA E
146 FERTILIDADE DO SOLO - RS/ SC, 2004).

147 Em ambas as safras os experimentos foram compostos por seis híbridos comerciais, sendo dois
148 híbridos simples (HS), dois duplos (HD) e dois triplos (HT) inoculados com *A. brasilense*
149 (estirpes AbV5+AbV6 com garantia de 2x10⁸ UFC mL⁻¹) via tratamento de sementes (TS), na
150 dose de 2,50 mL kg⁻¹ de semente e via aplicação foliar, nos estádios fenológicos V2, V4, V2+V4
151 (Ritchie, Hanway & Benson, 1993), na dose de 300 mL ha⁻¹, e controle, sem a aplicação da
152 bactéria. Os híbridos utilizados na safra 2013/14 foram HS AG 9045, HS AG 8025, HD AG
153 2040, HD AG 1051, HT AG 5011 e HT AG 8011; e na safra 2014/15 HS AG 9045, HS AG
154 8025, HD AG 2040, HD Feroz, HT BG 7051 e HT BG 7060. O delineamento experimental
155 utilizado foi blocos ao acaso com quatro repetições, a unidade experimental constituiu-se de
156 duas fileiras de sete metros de comprimento descontando-se a bordadura de meio metro em
157 cada extremidade com área útil de 5,40 m², espaçamento entre fileiras de 0,45 m e espaçamento
158 entre plantas de 0,33 m, totalizando população de 66.666 plantas ha⁻¹.

159 Os manejos e tratos culturais efetuados com a cultura seguiram as indicações técnicas para a
160 cultura do milho (Indicações Técnicas..., 2013). As pulverizações foram realizadas utilizando
161 pulverizador costal contendo pontas de pulverização de jato leve (leque), espaçadas em 0,45 m
162 uma da outra, com pressão de trabalho de 30 lb pol⁻² o que proporcionou a aplicação de um
163 volume de calda de 200 L ha⁻¹.

164 No estádio R1 (florescimento) foi realizada a estimativa do índice de clorofila foliar com a
165 utilização do clorofilômetro portátil ClorofiLOG[®] (modelo CFL 1030), que expressa medições
166 do teor de clorofila em unidades dimensionais chamadas índice de clorofila foliar (ICF). Neste
167 estádio foi determinado ainda o índice de área foliar (IAF) com a medição, com régua graduada,
168 do comprimento e largura de todas as folhas da planta, as avaliações foram realizadas em cinco
169 plantas de forma aleatória na área útil de cada parcela.

170 No mesmo estádio, realizou-se a avaliação de altura de planta, altura de inserção de espiga e
171 diâmetro basal do colmo, com auxílio de uma trena. Para determinação destas variáveis foram

172 avaliadas cinco plantas, por parcela, com homogeneidade morfológica e fenológica, utilizando
 173 como padrão, para estatura de planta, à medida da distância do colo da planta à extremidade do
 174 pendão (inserção da folha bandeira) e a altura de inserção de espiga correspondendo à distância
 175 entre o colo da planta e o nó em que estava inserida a espiga superior, o diâmetro basal do
 176 colmo foi medido com auxílio de paquímetro digital.

177 A colheita foi realizada no estádio R6 na maturação fisiológica das plantas (formação da
 178 camada preta no grão), com a contagem total de plantas e espigas colhidas, obteve-se a
 179 população final e o número de espigas por planta. Dez espigas foram utilizadas para realizar a
 180 contagem de grãos por fileira e de fileiras por espiga estimando-se, assim, o número de grãos
 181 por espiga. Após as espigas serem trilhadas e classificadas, foi determinada a massa de mil
 182 grãos e a massa de parcela, com a correção da umidade para 13% converteu-se o valor para kg
 183 ha⁻¹ para a estimativa da produtividade de grãos.

184 A partir da verificação da interação entre híbridos e aplicação dos tratamentos, procedeu-se a
 185 estimação da contribuição relativa de N (kg ha⁻¹) descrita por Dourado Neto & Detomini (2005),
 186 em que se estimou a quantidade de N necessária para aumentar a produtividade de grãos em
 187 relação ao tratamento controle. O resultante do N acumulado foi convertido para Dólar (\$) com
 188 o preço atual do kg de N (\$ 11,59) (Conab, 2016).

$$QN = \frac{DP}{IC.EF} [TPG.TNP.IC + (1-IC).TNOP] (1-NS)$$

189 Em que, DP refere-se à diferença de produtividade de milho dos tratamentos com e sem
 190 inoculação, IC ao índice de colheita (0,5) (Doorembos & Kassam, 1994), TPG ao teor de
 191 proteína no grão (0,12) (Oliveira, Chaves, Duarte, Brasil & Ribeiro, 2004), TNP ao teor de
 192 nitrogênio na proteína (0,17) (Dourado Neto & Detomini, 2005), TNOP ao teor de nitrogênio
 193 em outras partes (0,01) (Dourado Neto & Detomini, 2005), NS ao nitrogênio proveniente do
 194 solo (0,6) (Urquiaga & Zapata, 2000) e EF a eficiência de utilização de nitrogênio pelas plantas
 195 (0,42) (Urquiaga & Zapata, 2000).

196 Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância (Teste F), e as médias dos
 197 tratamentos comparadas pelo Teste Scott-Knott, utilizando-se o programa estatístico SISVAR
 198 (Ferreira, 2011) com probabilidade de erro de 5%. Logo após estimou-se a matriz de
 199 coeficientes de correlação fenotípica entre os caracteres e após fez-se o diagnóstico de
 200 multicolinearidade, visando identificar e, posteriormente, eliminar caracteres causadores de
 201 multicolinearidade. Em seguida, foi realizada a análise de trilha considerando a produtividade
 202 de grãos como a variável principal e os demais caracteres – altura de espiga, diâmetro de colmo,

203 número de grãos por espiga e massa de mil grãos – como variáveis explicativas. As análises
204 foram realizadas com o auxílio do programa GENES (Cruz, 1998).

205

206

Resultados e Discussão

207

208 De maneira geral, durante a condução dos experimentos, nas safras 2013/14 e 2014/15, a
209 distribuição hídrica foi favorável para a expressão do potencial produtivo dos híbridos avaliados
210 (ANEXO B). Durante a safra 2013/14, no período próximo ao florescimento houve baixa
211 precipitação, sendo que o mesmo não foi observado para a safra 2014/15, na qual a distribuição
212 foi uniforme durante o mesmo período. Contudo a baixa precipitação pode não ter
213 comprometido os resultados, uma vez que em condições que ocorra ligeira diminuição de
214 umidade do solo, não há impacto sobre a população do *A. brasilense*, devido a capacidade das
215 bactérias se pré-adaptarem para variações de umidade, por meio da regulação de sua atividade
216 celular (Joe et al., 2012).

217 Em ambas as safras houve efeito significativo dos híbridos com as formas de aplicação de *A.*
218 *brasilense* sobre algumas das variáveis analisadas (ANEXO C, D, E e F). Corroborando com
219 BERTOLINI, GAMERO, SALATA e PIFFER (2008), não houve tendência de resposta da
220 associação da bactéria com os genótipos avaliados.

221 Nos experimentos realizados na primeira safra o índice de área foliar (IAF) foi significativo
222 somente para o híbrido duplo (HD) AG1051, apresentando acréscimo de 1 m² com aplicação
223 de *A. brasilense* em V4 (Figura 1a). Na safra 2014/15 os híbridos HD AG2040, HD Feroz e
224 híbrido simples (HS) AG9045 responderam a inoculação de *A. brasilense* na semente,
225 entretanto sem diferir, estatisticamente, do tratamento controle (Figura 2a). As aplicações via
226 foliar em V2 e associação de V2+V4 aumentaram o IAF dos híbrido triplo (HT) BG7051 e HS
227 AG8025. O IAF da planta depende do espaçamento, número e tamanho das folhas, do estágio
228 de desenvolvimento da planta, fertilidade do solo, condições climáticas e do material genético
229 (Fancelli & Dourado Neto, 2000) e, neste estudo, foi incrementado com a aplicação de *A.*
230 *brasilense*. Assim, a planta inoculada com a bactéria poderá apresentar maior capacidade de
231 explorar o espaço disponível para seu desenvolvimento, aumentando a atividade fotossintética.
232 Quanto mais rápido a planta atingir o IAF máximo e quanto mais tempo a área foliar permanecer
233 ativa maiores serão os incrementos na produtividade (Pereira & Machado, 1987).

234 Na safra 2013/14 somente o HD AG1051 apresentou incremento na altura de planta com a
235 aplicação da bactéria via semente e via foliar em V2, mas sem diferir do controle (Figura 1b).

236 Na safra 2014/15 foi observado aumento de altura de planta com inoculação via semente para

237 o HD AG2040 e com todos os tratamentos via foliar para o HD Feroz (Figura 2b). As variáveis
238 de diâmetro de colmo, altura de planta e de inserção de espiga podem ser associadas à estímulos
239 da bactéria para a produção de fitohormônios, como auxíνας, citocininas e giberelinas (Moreira,
240 Silva, Nóbrega & Carvalho, 2010).

241 Seguindo a tendência de altura de planta, a aplicação em V2 proporcionou a maior altura de
242 inserção de espiga para o HD AG1051, e o HD AG8011 apresentou incremento nas aplicações
243 em V2 e V2+V4, mas sem diferir do controle (Figura 1c). Na safra 2014/15 os HS AG8025 e
244 AG9045 apresentaram altura de inserção de espiga de 1,24 e 1,17 m com as aplicações em V2
245 e na associação V2+V4, respectivamente (Figura 2c). A maior abundância de *Azospirillum* na
246 rizosfera pode aumentar a secreção de hormônios, inibindo o crescimento da raiz e,
247 conseqüentemente a altura da planta. Efeitos negativos de altas concentrações de *Azospirillum*
248 foram relatados para o trigo e milho (Bashn & De- Bashn 2004).

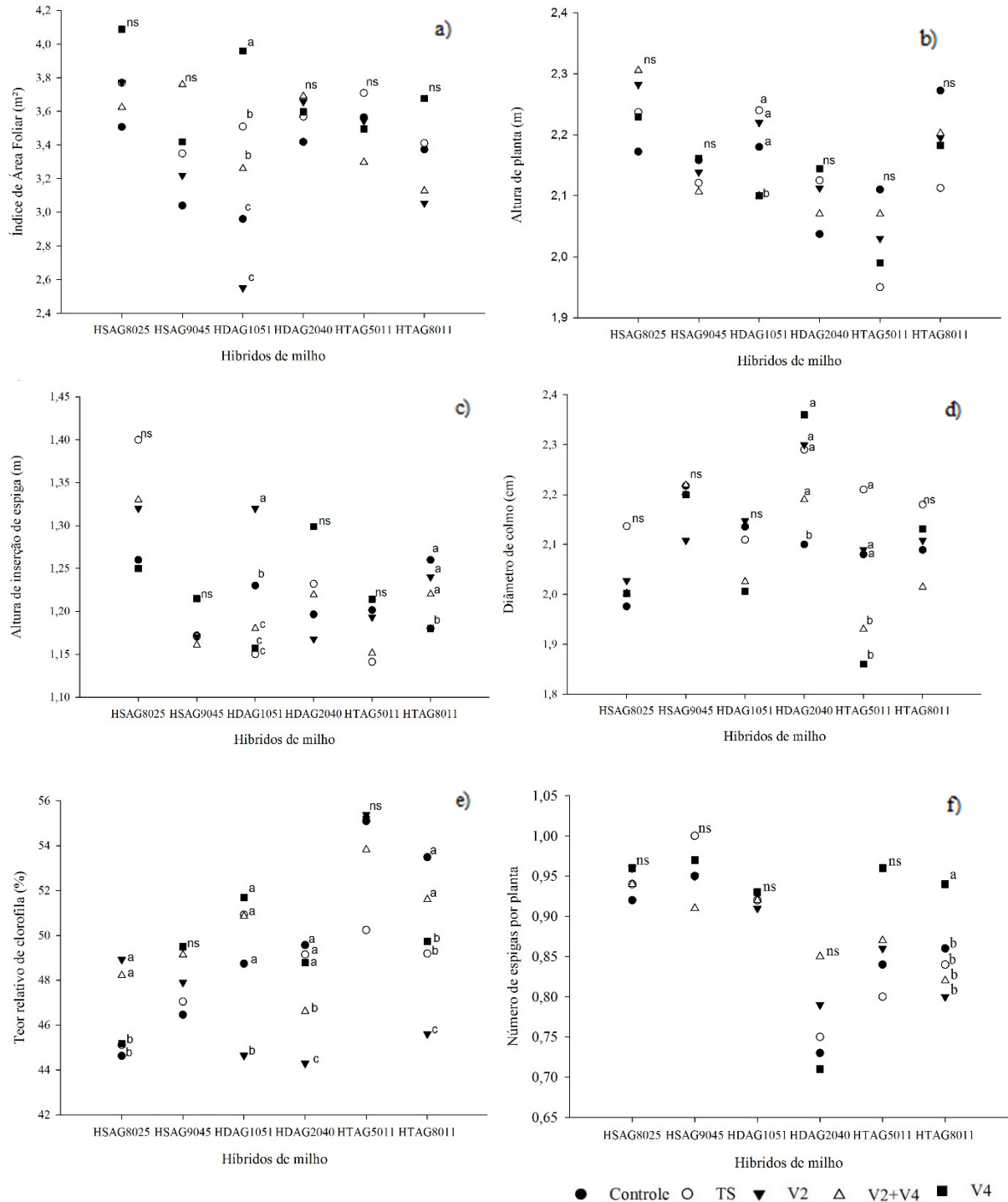
249 Na safra 2013/14 a inoculação via semente e aplicação foliar em V2 foram significativas,
250 estatisticamente, para a variável diâmetro de colmo nos HD AG2040 e HT AG5011 (Figura
251 1d). Esta variável na safra 2014/15 apresentou média de 0,21 m com os tratamentos, para os
252 híbridos HD AG2040, HT BG7060 e HS AG9045. Sendo que a mesma está ligada a capacidade
253 de sustentação da planta e a maior resistência ao acamamento (Figura 2d).

254 A variável que está mais relacionada ao N absorvido pela planta é o índice de clorofila (Argenta
255 et al., 2003). Os índices encontrados variaram conforme o tratamento e o híbrido. Na safra
256 2013/14 a inoculação via semente reduziu, significativamente, o índice de clorofila do HD
257 AG1051, o mesmo tratamento aumentou o índice de clorofila para HD AG2040, apontando a
258 variação da interação entre genótipo e bactéria (Figura 1e, Figura 2e). O HS AG8025 apresentou
259 maior índice de clorofila quando houve aplicação em V4 e o HT BG7051 obteve maior média
260 de clorofila nos tratamentos com aplicação em TS e V2, para a safra 2014/15. O efeito no índice
261 de clorofila está relacionado com a FBN e a eficiência de utilização do N absorvido que consiste
262 na capacidade, interna da planta, de produzir grãos e matéria seca (Reis Júnior, MACHADO,
263 MACHADO & SODEK, 2008).

264 A capacidade produtiva da planta está relacionada com seu potencial de acumular e transferir
265 carboidratos do colmo para a formação da espiga e o enchimento de grãos (Castro, Kluge &
266 Sestari, 2008). Assim, os HT AG8011 (Safra 2013/14) e HT BG7060 (Safra 2014/15)
267 apresentaram maior número de espigas quando houve aplicação foliar em V4 (Figura 1f, Figura
268 2f), indicando que a bactérias auxiliou a planta a aculumar e tranferir carboidratos.

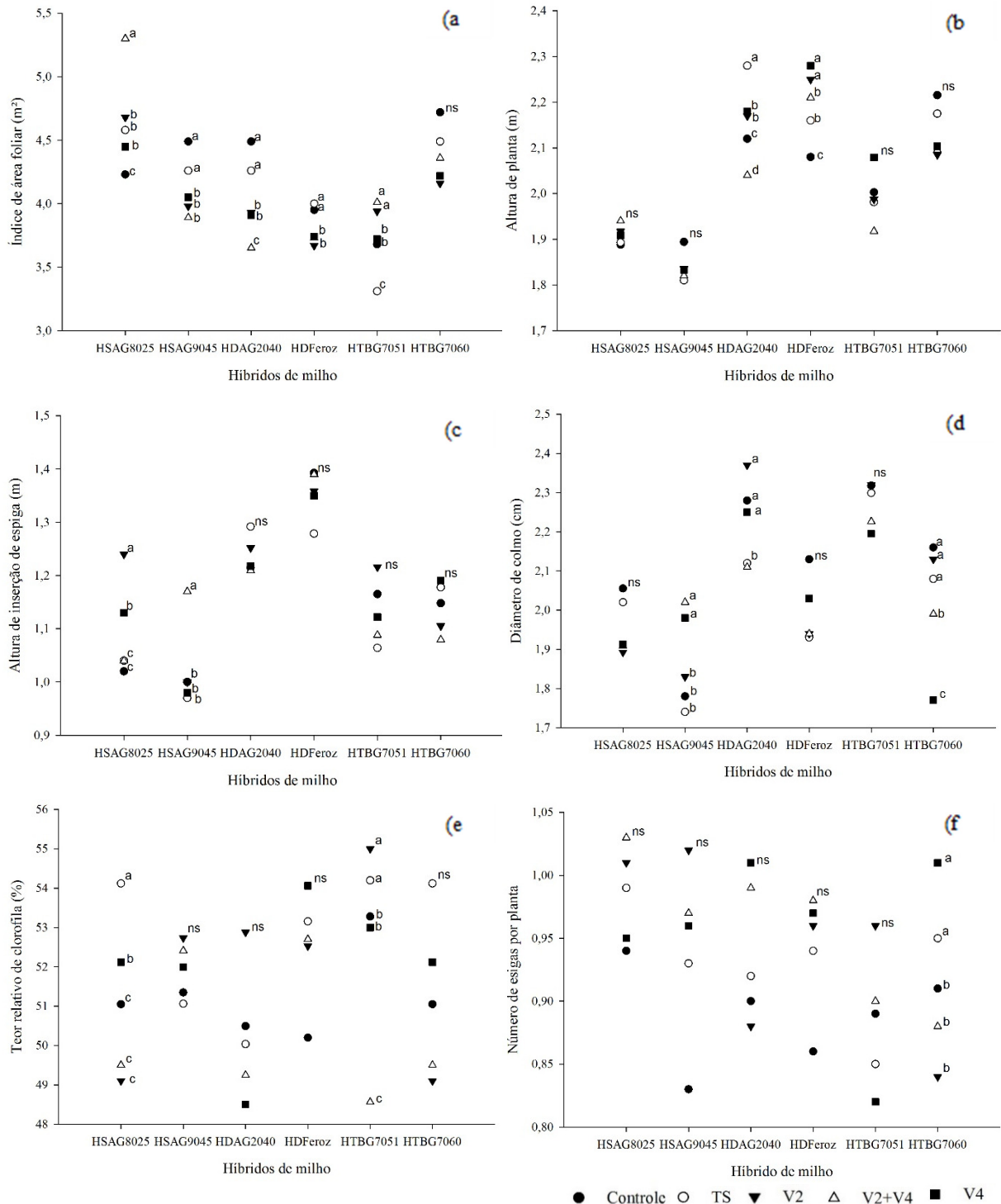
269

270 **Figura 1.** Índice de área foliar (a), altura de planta (b), altura de inserção de espiga (c), diâmetro
 271 de colmo (d), teor relativo de clorofila (e) e número de espigas por planta (f) de milho
 272 inoculadas com *A. brasilense*, na safra 2013/14 (ANEXO G).



273 * Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Skott-Knott, a 5% de
 274 probabilidade. HS: híbrido simples; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo. Controle: sem *A. brasilense*, TS:
 275 inoculação na semente com *A. brasilense*, V2: aplicação foliar de *A. brasilense* estágio V2, V2+V4: aplicação
 276 foliar de *A. brasilense* nos estádios V2 e V4, V4: aplicação foliar de *A. brasilense* no estágio V4.

277 **Figura 2.** Variáveis de índice de área foliar (a), altura de planta (b), altura de inserção de espiga
 278 (c), diâmetro de colmo (d), teor relativo de clorofila (e) e número de espigas por planta (f)
 279 analisadas na safra 2014/15 (ANEXO I).



280 * Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Skott-Knott, a 5% de
 281 probabilidade. HS: híbrido simples; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo. Controle: sem *A. brasilense*, TS:
 282 inoculação na semente com *A. brasilense*, V2: aplicação foliar de *A. brasilense* estágio V2, V2+V4: aplicação
 283 foliar de *A. brasilense* nos estádios V2 e V4, V4: aplicação foliar de *A. brasilense* no estágio V4.

284 O número de fileiras por espiga é definido no estágio V8, fase em que há maior exigência de
285 nutrientes, especialmente N (Repke, Cruz, Silva, Figueiredo & Bicudo, 2013). A inoculação de
286 *A. brasilense* na semente apresentou tendência de diminuição do número de fileiras, ao passo
287 que as aplicações via foliar, principalmente em V4, apresentou incremento (Figura 3a, b, c,
288 Figura 4 a, b, c). Desse mesmo modo as variáveis de número de grãos por fileira e grãos por
289 espiga apresentaram resposta positiva com aplicação de *A. brasilense*, para alguns dos híbridos
290 testados nas duas safras. Os componentes da espiga, além de influenciarem na massa da massa
291 seca das espigas, influem de forma substancial na produtividade de grãos.

292 A deficiência de nutrientes até o R3, estágio de enchimento de grãos, pode reduzir severamente
293 o tamanho das espigas (Repke et al., 2013). Nas duas safras foi constatado que o comprimento
294 de espiga aumenta com a aplicação de *A. brasilense*, variando a forma de aplicação entre os
295 híbridos (Figura 4d, Figura 5a). O diâmetro de espigas não foi alterado significativamente, na
296 safra 2013/14. Já para os experimentos do segundo ano, a bactéria, nas diferentes formas de
297 aplicação, não apresentou diferença com o controle, exceto para o HD AG2040 na aplicação
298 via foliar.

299 A interação genótipo e ambiente exerce grande influência sobre a expressão de caracteres
300 quantitativos (Schmild, Nascimento, Cruz & Oliveira, 2011). A massa de mil grãos variou
301 conforme o ano e o híbrido, sendo que a bactéria se mostrou eficiente nas aplicações via foliar
302 para alguns híbridos (Figura 3e, Figura 5b). Este resultado por estar relacionado com FBN e
303 maior disponibilização de N para a planta nos estádios iniciais, promovendo maior acúmulos
304 de massa seca na planta e sendo transportados para as espigas, repercutindo no aumento da
305 massa de mil grão. Entretanto, alguns trabalhos apresentam a ausência de incremento para a
306 massa de grãos com a inoculação de *A. brasilense* (Braccini, Dan, Piccinin, Albrecht &
307 Barbosa, 2012; Araújo, Mercante & Vitorino, 2015).

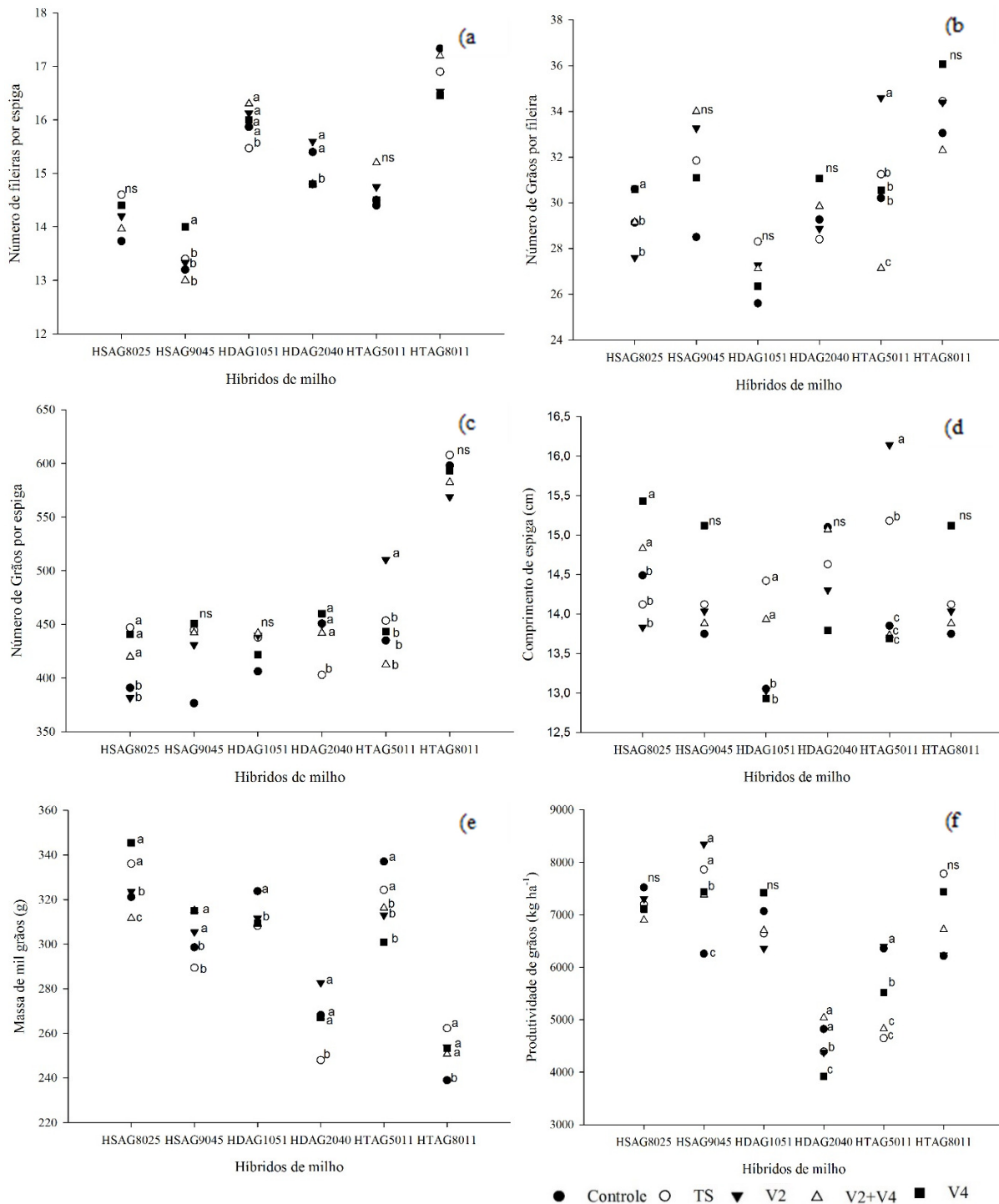
308 Os efeitos da inoculação com *Azospirillum* sp. na nutrição e produtividade do milho dependem
309 do híbrido utilizado e das condições edafoclimáticas (Quadros et al., 2015). Incrementos, com
310 inoculação de *A. brasilense*, de 6, 9 e 17 % foram reportados por alguns autores (Hungria,
311 Campo, Souza & Pedrosa, 2010; Novakowski et al., 2011; Müller et al., 2016). Outros
312 trabalhos, avaliando inoculantes à base de *Azospirillum* spp, não encontraram aumentos
313 significativos para a produtividade de grãos (Repke et al., 2013; Vogt, Balbinot Junior, Galotti,
314 Padolfo & Zoldan, 2014; Sangoi et al., 2015).

315

316

317

318 **Figura 3.** Dispersão das médias das variáveis de número de fileiras por espiga (a), grãos por
 319 fileira (b), grãos por espiga (c), comprimento da espiga (d), massa de mil grãos (e) e
 320 produtividade de grãos (f) avaliadas nos híbridos de milho em função da aplicação de *A.*
 321 *brasilense* via semente e foliar na safra 2013/14 (ANEXO H).

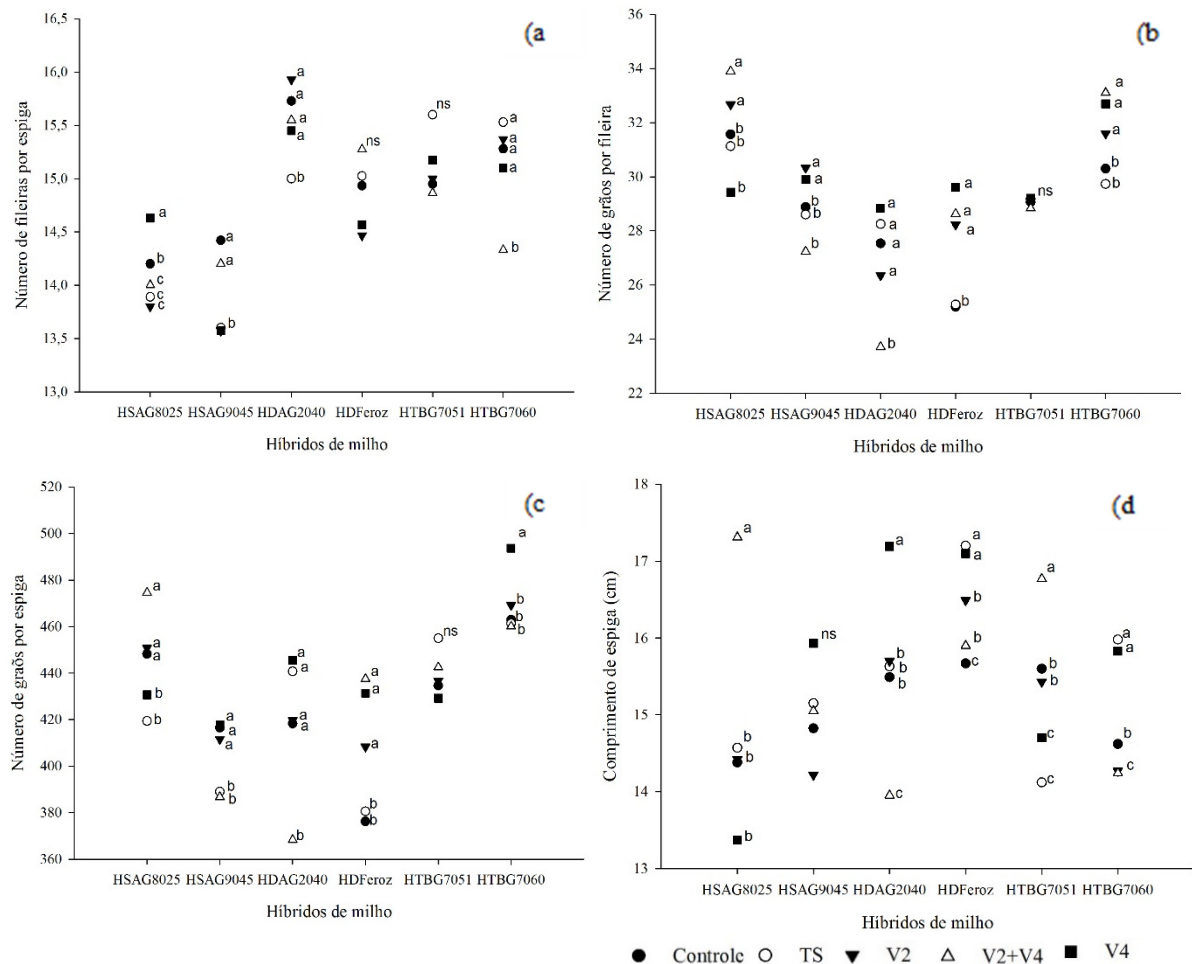


322 * Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Skott-Knott, a 5% de
 323 probabilidade. HS: híbrido simples; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo. Controle: sem *A. brasilense*, TS:
 324 inoculação na semente com *A. brasilense*, V2: aplicação foliar de *A. brasilense* estágio V2, V2+V4: aplicação
 325 foliar de *A. brasilense* nos estádios V2 e V4, V4: aplicação foliar de *A. brasilense* no estágio V4.

326 Na safra 2013/14, a produtividade de grãos foi significativa, e diferente do tratamento controle,
 327 somente para HS AG9045 aplicada via semente e foliar em V2 (Figura 3 f). A inoculação via
 328 semente apresentou aumentos de produtividade de grãos para o HD BG7051, na safra 2014/15
 329 (Figura 5c). Os incrementos encontrados foram de 1.606 e 2.092 kg ha⁻¹ na safra 2013/14 e de
 330 412 kg ha⁻¹ na safra 2014/15. A ausência de adubação nitrogenada pode ter interferido nas
 331 baixas produtividades alcançadas nas safras, uma vez que a bactéria não tem mecanismos
 332 suficientes para suprir toda demanda de N da cultura do milho.

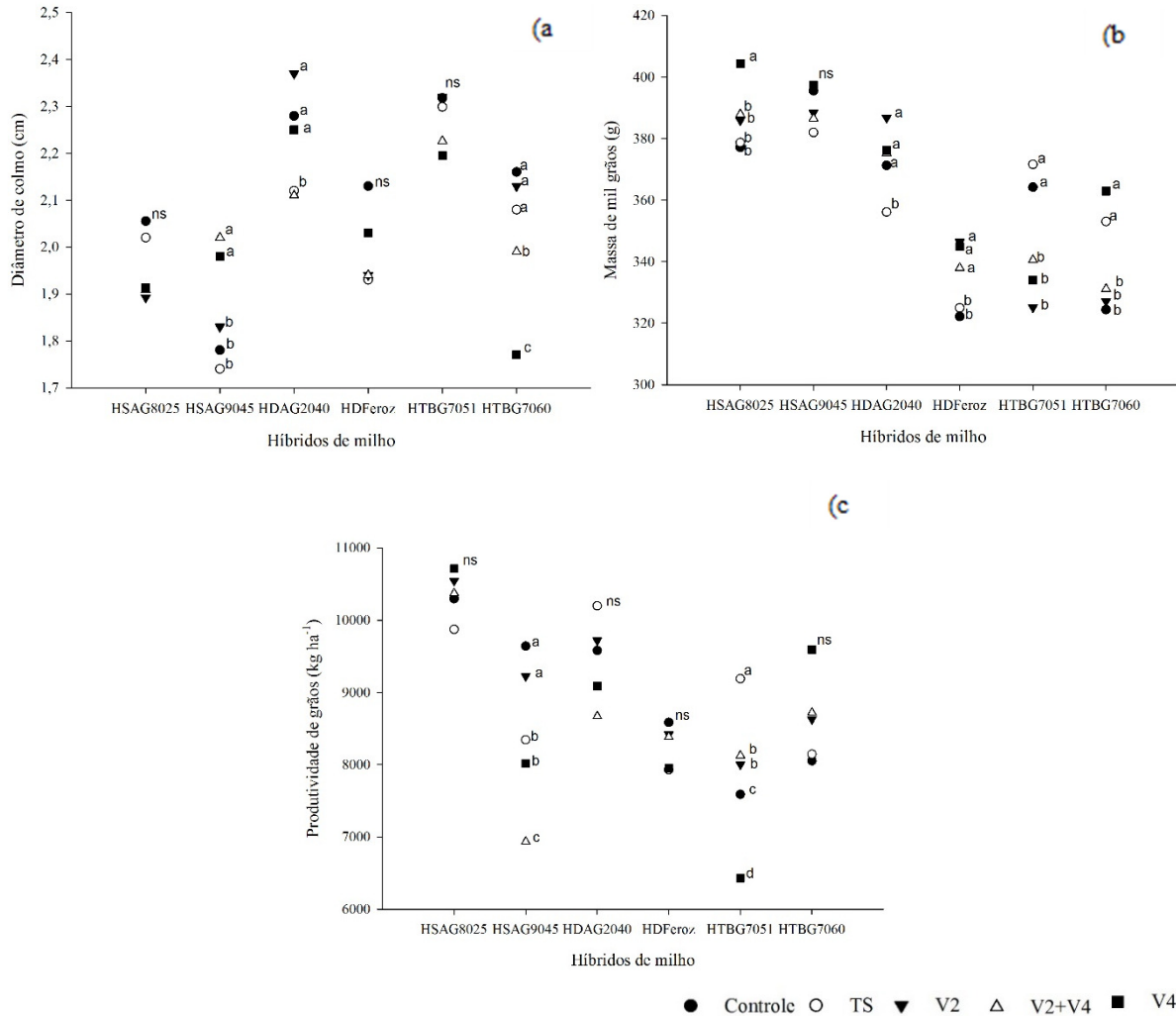
333

334 **Figura 4.** Médias das variáveis de número de fileiras por espiga (a), grãos por fileira (b), grãos
 335 por espiga (c), comprimento da espiga (d), observadas nos híbridos de milho com aplicação de
 336 *A. brasilense*, via semente e folha na safra 2014/15 (ANEXO J).



337 * Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Skott-Knott, a 5% de
 338 probabilidade. HS: híbrido simples; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo. Controle: sem *A. brasilense*, TS:
 339 inoculação na semente com *A. brasilense*, V2: aplicação foliar de *A. brasilense* estágio V2, V2+V4: aplicação
 340 foliar de *A. brasilense* nos estádios V2 e V4, V4: aplicação foliar de *A. brasilense* no estágio V4.

341 **Figura 5.** Diâmetro da espiga (a), massa de mil grãos (b), produtividade de grãos (c),
 342 observadas nos híbridos com aplicação de *A. brasilense*, via semente e folha na safra 2014/15
 343 (ANEXO J).



344 * Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Skott-Knott, a 5% de
 345 probabilidade. HS: híbrido simples; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo. Controle: sem *A. brasilense*, TS:
 346 inoculação na semente com *A. brasilense*, V2: aplicação foliar de *A. brasilense* estágio V2, V2+V4: aplicação
 347 foliar de *A. brasilense* nos estádios V2 e V4, V4: aplicação foliar de *A. brasilense* no estágio V4.

348

349 Considerando o incremento dos híbridos, calculado pela fórmula de Dourado Neto & Detomini
 350 (2005), estima-se que houve acúmulo de 46,50; 60,60 e 46,40 kg ha⁻¹ de N, com economia de
 351 538,94; 702,35 e 537,78 \$ ha⁻¹, para o HS AG9045 nas aplicações via semente e foliar em V2
 352 e para o HT BG7051 via semente, respectivamente. Mesmo com os incrementos obtidos, na
 353 aplicação da bactéria na semente e via foliar em V2, essa tecnologia ainda não está consolidada
 354 como estratégia de manejo para melhorar o desempenho agrônomo da cultura do milho
 355 (Sangoi et al., 2015).

356 Os fatores que interferem nas respostas das culturas à inoculação com *Azospirillum* ainda não
357 estão totalmente esclarecidos. Três dos híbridos avaliados permaneceram os mesmos durante
358 os dois anos de experimento, mas as respostas das variáveis analisadas dos híbridos HS
359 AG9045, HS AG8025 e HD AG2040 variaram nas duas safras, confirmando que a resposta da
360 bactéria não está, necessariamente, ligada ao genótipo e à compatibilidade entre bactéria e
361 genótipo, mas pode estar ligada às exigências e sobrevivência da bactéria aos fatores ambientais
362 e do solo. Os resultados positivos com incrementos, na associação milho-*Azospirillum* estão
363 relacionados, na maioria das situações, a fatores da própria bactéria, como a escolha da estirpe,
364 o número ideal de unidades formadoras de colônias (UFC) por semente e sua viabilidade
365 (Mehnaz & Lazarovits, 2006).

366 Sangoi et al. (2015) concluiu que o alto teor de matéria orgânica (MO) do solo em que conduziu
367 o trabalho (50,0 g kg⁻¹) pode ter aumentado a disponibilidade de N às plantas, mitigando os
368 benefícios da inoculação das sementes com *Azospirillum* sp. Seguindo a teoria de Sangoi et al.
369 (2015) os experimentos foram realizados em solos com níveis de 24 e 26 g kg⁻¹ de MO, nas
370 safras 2013/14 e 2014/15, respectivamente. Dessa forma, a menor disponibilidade de N deveria
371 ter influenciado a atividade das bactérias incrementando a FBN e a disponibilidade do N fixado.
372 Além da MO, o pH do solo, o tipo de solo e a disponibilidade de nutrientes influenciam na
373 composição dos exsudatos das raízes interferindo na interação planta-bactéria que pode ocorrer
374 na rizosfera onde as bactérias são estimuladas por exsudatos radiculares de plantas e atraídas
375 pela mucilagem da raiz (Tadra-Sfeir et al., 2011).

376 A produtividade de grãos é resultado da interação de diversos fatores genéticos, fisiológicos,
377 de manejo e ambientais, por isso os estudos de componentes de rendimento de grãos devem ser
378 levados em consideração. Analisando o coeficiente de correlação, da análise de trilha, e seu
379 efeito direto sobre a produtividade de grãos, safra 2013/14, a variável de massa de mil grãos
380 apresentou maior efeito direto sobre a produtividade de grãos dos híbridos avaliados, no
381 tratamento controle, aplicação foliar em V2, V2+V4 e V4 (Tabela 1). No tratamento com
382 inoculação via semente de *A. brasilense*, o número de grãos por espiga apresentou maior efeito
383 direto sobre a produtividade de grãos. A produtividade de grãos é uma característica complexa,
384 resultante da expressão e da associação de diferentes componentes da planta (Amorim, Ramos,
385 Ungaro & Kiihl, 2008).

386

387

388 **Tabela 1.** Análise de trilha para as variáveis de altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de
 389 colmo (DC), massa de mil grãos (MMG) e grãos por espiga (GE) em função das aplicações de
 390 *A. brasilense* na produtividade de grãos (PG) na Safra 2013/14.

Tratamentos	Safra 2013/14			
	Efeito	AE	DC	Variáveis MMG
Controle				
Direto sobre a Produtividade	0,37	-0,06	0,65	0,11
Indireto via AE	-	-0,11	-0,05	0,08
Indireto via DC	0,02	-	0,00	0,00
Indireto via MMG	-0,09	-0,05	-	-0,48
Indireto via GE	0,02	0,01	-0,08	-
Total	0,33	-0,22	0,53	-0,29
Coefficiente de determinação	0,45			
TS				
Direto sobre a Produtividade	0,18	-0,20	0,14	0,51
Indireto via AE	-	-0,01	0,05	-0,02
Indireto via DC	0,01	-	0,04	0,03
Indireto via MMG	0,04	-0,03	-	-0,02
Indireto via GE	-0,06	-0,09	-0,12	-
Total	0,17	-0,31	0,10	0,48
Coefficiente de determinação	0,34			
V2				
Direto sobre a Produtividade	-0,12	-0,35	0,34	-0,01
Indireto via AE	-	0,04	-0,01	0,03
Indireto via DC	0,11	-	0,05	0,00
Indireto via MMG	0,05	-0,05	-	-0,24
Indireto via GE	0,00	0,00	0,01	-
Total	0,05	-0,35	0,38	-0,23
Coefficiente de determinação	0,25			
V2+V4				
Direto sobre a Produtividade	0,26	0,23	0,64	0,69
Indireto via AE	-	-0,01	0,00	-0,01
Indireto via DC	0,00	-	-0,02	-0,02
Indireto via MMG	-0,01	-0,05	-	-0,43
Indireto via GE	-0,03	-0,05	-0,47	-
Total	0,21	0,13	0,14	0,23
Coefficiente de determinação	0,33			
V4				
Direto sobre a Produtividade	-0,11	-0,25	-0,66	-0,10
Indireto via AE	-	0,03	0,04	0,03
Indireto via DC	0,08	-	-0,17	-0,12
Indireto via MMG	0,28	-0,45	-	-0,43
Indireto via GE	0,03	0,05	-0,07	-
Total	0,28	-0,72	-0,85	-0,06
Coefficiente de determinação	0,77			

391

392

393 **Tabela 2.** Análise de trilha para as variáveis de altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de
 394 colmo (DC), massa de mil grãos (MMG) e grãos por espiga (GE) em função das aplicações de
 395 *A. brasilense* na produtividade de grãos (PG) na Safra 2014/15.

Safra 2014/15				
Tratamentos	Variáveis			
Efeito	AE	DC	MMG	GE
Controle				
Direto sobre a Produtividade	0,47	-0,44	0,57	0,32
Indireto via AE	-	0,21	-0,31	-0,23
Indireto via DC	-0,20	0,40	0,18	-0,06
Indireto via MMG	-0,38	-0,23	-	0,07
Indireto via GE	-0,15	-0,05	0,04	-
Total	-0,03	-0,41	0,48	0,09
Coefficiente de determinação	0,36			
TS				
Direto sobre a Produtividade	0,66	0,14	0,86	0,21
Indireto via AE	-	0,16	-0,50	0,06
Indireto via DC	0,04	-	-0,01	0,09
Indireto via MMG	-0,65	-0,05	-	0,12
Indireto via GE	0,02	0,12	0,03	-
Total	0,07	0,38	0,38	0,48
Coefficiente de determinação	0,52			
V2				
Direto sobre a Produtividade	0,20	-0,17	0,64	0,34
Indireto via AE	-	0,05	-0,02	-0,03
Indireto via DC	-0,04	-	0,05	-0,02
Indireto via MMG	-0,07	-0,18	-	-0,10
Indireto via GE	-0,05	0,04	-0,05	-
Total	0,04	-0,27	0,62	0,19
Coefficiente de determinação	0,52			
V2+V4				
Direto sobre a Produtividade	0,04	-0,18	0,30	0,60
Indireto via AE	-	0,00	0,00	0,00
Indireto via DC	0,01	-	0,02	0,05
Indireto via MMG	-0,03	-0,03	-	-0,09
Indireto via GE	-0,16	-0,16	-0,19	-
Total	-0,13	-0,13	0,12	0,54
Coefficiente de determinação	0,42			
V4				
Direto sobre a Produtividade	0,37	-0,13	0,78	0,37
Indireto via AE	-	0,00	-0,15	0,07
Indireto via DC	0,00	-	0,04	0,05
Indireto via MMG	-0,31	-0,21	-	-0,10
Indireto via GE	0,07	-0,14	-0,05	-
Total	0,12	-0,48	0,61	0,38
Coefficiente de determinação	0,73			

396

397 Na segunda safra observou-se que nos tratamentos com aplicação de *A. brasilense* no TS, V2 e
 398 em V4 a variável de massa de mil grãos apresentou efeito direto sobre a produtividade (Tabela
 399 2). E, com a inoculação de *A. brasilense* no TS, as variáveis massa de mil grãos e grãos por

400 espiga apresentaram efeito indireto entre si. O efeito direto do número de grãos por espiga,
401 sobre a produtividade, foi observado com aplicação de *A. brasilense* na associação dos estádios
402 V2+V4. O tratamento controle apresentou efeito direto de todas as variáveis analisadas sobre a
403 produtividade de grãos, as variáveis massa de mil grãos, grãos por espiga, altura de planta e
404 diâmetro de colmo apresentaram efeito indireto entre si. Os tratamentos avaliados têm
405 influência direta sobre a produtividade de grãos. Este resultado sugere que a aplicação da
406 bactéria via foliar pode ser uma alternativa eficiente (Martins et al., 2012), demonstrando a
407 necessidade de entender as condições nas quais a bactéria apresenta incrementos significativos
408 à cultura do milho.

409 A substituição completa dos fertilizantes nitrogenados para gramíneas por *A. brasilense* é
410 viável, devido à pequena contribuição da FBN pela bactéria (Fukami, Nogueira, Araujo &
411 Hungria, 2016). No entanto, a combinação de todas as contribuições menores por *Azospirillum*
412 para o crescimento das plantas pode resultar em plantas que são mais eficientes para absorver
413 água e nutrientes do solo, aumentando assim a nutrição das plantas e crescimento (Hungria et
414 al., 2015). Mesmo as respostas sendo variáveis, em função dos tratamentos avaliados, é possível
415 observar que há influência da inoculação sobre os genótipos avaliados, resultando em alguns
416 casos em resposta superior ao tratamento sem inoculação.

417

418

Conclusão

419

- 420 1. A aplicação via foliar de *A. brasilense* é uma alternativa eficiente nos caracteres
421 morfológicos da planta, incrementando em alguns híbridos a produtividade de grãos.
- 422 2. Não há relação estabelecida entre as formas de aplicação de *A. brasilense* e a base
423 genética do híbrido.
- 424 3. A aplicação de *A. brasilense* via semente e foliar incrementam a contribuição relativa
425 de N.

426

427

Referências

428

- 429 Almeida A. H. B (1998). Heterose e correlações em plantas branquicas e normais de jerimum
430 caboclo (*Cucurbita maxima* Duchesne). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de
431 Viçosa, 95.

432

- 433 Amorim, E. P., Ramos, N. P., Ungaro, M. R. G. & Kiihl, T. A. M. (2008). Correlações e análise
434 de trilha em girassol. *Bragantia*, 67, 307-316.
- 435
- 436 Araújo, E. O., Mercante, F. M. & Vitorino, A. C. T. (2015). Effect of nitrogen fertilization
437 associated with inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* on corn.
438 *African Journal of Agricultural Research*, 1, 137-145.
- 439
- 440 Ardakani, M. R., Mazaheri, D., Mafakheri, S. & Moghaddam, A. (2011) Absorption efficiency
441 of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum L.*) by *Azospirillum*
442 *brasilense*, *Streptomyces sp.*, *Glomus intraradices* and manure application. *Physiology and*
443 *Molecular Biology of Plants*, 17, 181-192.
- 444
- 445 Argenta, G., Silva, P. R. F., Fosthofer, E. L., Strieder, M. L., Suhre, E. & Teichmann, L. L.
446 (2003). Adubação nitrogenada em milho pelo monitoramento do nível de nitrogênio na planta
447 por meio do clorofilômetro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27, 109-119.
- 448
- 449 Arnhold, E., Pacheco, C. A. P., Carvalho, H. W. L. de, Silva, R. G. & Oliveira Junior, E. A. de.
450 (2010). Produtividade de híbridos de milho em região de fronteira agrícola no Nordeste do
451 Maranhão. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 5 (4), 468-473.
- 452
- 453 Bartchechen, A., Fiori, C. C. L., Watanabe, S. H., Guarido, R. C. (2010). Efeito da inoculação
454 de *Azospirillum brasilense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays L.*) - *Campo Digital*,
455 5(1), 56-59.
- 456
- 457 Bashan, Y., De-Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*
458 promotes plant growth – a critical assessment. *Advances in Agronomy*, 108, 77-136.
- 459
- 460 Bashan, Y., Holguin, G. & De-Bashan, L. E. (2004). Review: *Azospirillum*-plant relationships:
461 physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian*
462 *Journal of Microbiology*, 50, 521-577.
- 463
- 464 Bastos, E. A., Cardoso, M. J., Melo, F. B., Ribeiro, V. Q. & Andrade Júnior, A.S. (2008). Doses
465 e formas de parcelamento de nitrogênio para a produção de milho sob plantio direto. *Revista*
466 *Ciência Agrônômica*, 39 (2), 275-280.

467

468 Bertolini, E. V., Gamero, C. A., Salata, A. C. & Piffer, C. R. (2008). Antecipação da adubação
469 de semeadura do milho em dois sistemas de manejo do solo. *Revista Brasileira de Ciência do*
470 *Solo*, 32, 2355-2366.

471

472 Bhattacharyya, P. N. & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR):
473 emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28 (4), 1327–1350.

474

475 Braccini, A. L., Dan, L. G. M., Piccinin, G. G., Albrecht, L. P. & Barbosa, M. C. (2012). Seed
476 inoculation with *Azospirillum brasilense*, Associated with the use of bioregulators in maize.
477 *Revista Caatinga*, 25 (2), 58-64.

478

479 Cardoso, M. J., Carvalho, H. W. L., Pacheco, C. A. P., Oliveira, I. R., Rocha, L. M. P., Tabosa,
480 J. N., Lira, M. A. & Melo, K. E. O. (2009). Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho
481 na região Meio-Norte do Brasil na safra 2006/2007. *Agrotrópica*, 21, 173-180.

482

483 Castro, P. R. C., Kluge, R. A. & Sestari, I. (2008). *Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de*
484 *cultivos*. São Paulo: Agronômica Ceres.

485

486 Chubatsu, L. S., Monteiro, R. A., De Souza, E. M., De Oliveira, M. A. S., Yates, M. G. Wassem,
487 R., ... Pedrosa, F. O. (2012). Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant*
488 *and Soil*, 356, 197-207.

489

490 Compant, S., Clément, C. & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the
491 rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects
492 for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 669-678.

493

494 COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/ SC. Manual de adubação e
495 calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. 10.ed. Porto Alegre, SBCS
496 - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p

497

498 CONAB. *Companhia Nacional de Abastecimento*. Disponível em: <
499 <http://consultaweb.conab.gov.br/consultas/consultaInsumo.do?d-6983528->

- 500 [p=3&uf=RS&idGrupo=27&btnConsultar=Consultar&ano=2016&method=acaoListarConsulta&jcaptcha=w9au&idSubGrupo=7>](#). Acesso em: 19 jun. 2016.
- 501
- 502
- 503 Cruz, C. D. (1988). Programa GENES - Aplicativo Computacional em Estatística Aplicada à
- 504 Genética (GENES - Software for Experimental Statistics in Genetics). *Genetics and Molecular*
- 505 *Biology*, 21 (1).
- 506
- 507 Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Tryss, A., Ptacek, D., Okon, Y. & Vanderleyden, J. (2002).
- 508 Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum irakense* strains
- 509 on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of*
- 510 *Soils*, 36 (4), 284-297.
- 511
- 512 Doorenbos, J. & Kassam, A. H. (1994). *Efeito da água no rendimento das culturas*. Trad. de
- 513 GHEYI, H. Campina Grande, PB: UFPB. (Estudos FAO: Irrigação e Drenagem, 33).
- 514
- 515 Dotto, A. P., Lana, M. C., Steiner, F. & Frandoloso, J. F. (2010). Produtividade do milho em
- 516 resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio,
- 517 *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 5 (3), 376-382.
- 518
- 519 Dourado Neto, D. & Detomini, E.R. Modelo de adubação nitrogenada aplicável a rebrota de
- 520 pastagens submetidas a sistemas de desfolha intermitente. *Pasturas tropicales*, 27 (2), 18-25.
- 521
- 522 Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. (2013). *Sistema*
- 523 *brasileiro de classificação de solos*. 3ª ed. Brasília, DF: Embrapa.
- 524
- 525 Fancelli, A. L. & Dourado Neto, D. (2008). *Produção de milho*. Livroceres: 2nd ed Livraria e
- 526 Editora Agropecuária Ltda.
- 527
- 528 Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência Agrotecnológica*,
- 529 35 (6).
- 530
- 531 Fukami, J., Nogueira, M. A., Araujo, R. S. & Hungria, M. (2016). Assessing inoculation
- 532 methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express*, 6 (3).
- 533

- 534 Heldwein, A. B., Buriol, A. G. & Streck, N. A. (2009). O clima de Santa Maria. *Ciência &*
535 *Ambiente*, 38, 43-58.
- 536
- 537 Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M. & Pedrosa, F. O. (2010). Inoculation with selected
538 strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in
539 Brazil. *Plant and Soil*, 331, 413-425.
- 540
- 541 Hungria, M., Nogueira, M. A. & Araujo, R. S. (2015). Soybean seed co-inoculation with
542 *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield
543 and sustainability. *American Journal of Plant Sciences*. 6, 811-7.
- 544
- 545 INDICAÇÕES TÉCNICAS PARA O CULTIVO DE MILHO E DE SORGO NO RIO
546 GRANDE DO SUL – safras 2013/14 e 2014/15 (2013). *50ª Reunião Técnica anual do Milho,*
547 *41ª Reunião Técnica Anual do Sorgo*. Embrapa clima temperado.
- 548
- 549 Joe, M. M., Karthikeyan, B., Chauhan, P. S., Shagol, C., Islam, M. R., Deiveekasundaram, M.
550 & Sa, T. (2012). Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its
551 inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. *European*
552 *Journal of Soil Biology*, 50, 198-206.
- 553
- 554 Martins, F. A. D., Andrade, A. T., Condé, A. B. T., Godinho, D. B., Caixeta, C. G., Costa, R.
555 L., ... Soares, C. M. S. (2012). Avaliação de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*
556 *brasilense*. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 18 (2), 102-109.
- 557
- 558 Mehnaz, S. & Lazarovits, G. (2006). Inoculation effects of *Azospirillum lipoferum* on corn
559 plants growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*, 51, 326-35.
- 560
- 561 Moreira, F. M. S., Silva, K., Nóbrega, R. S. A. & Carvalho, F. (2010). Bactérias diazotróficas
562 associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1, 74-99.
- 563
- 564 Müller, T. M., Sandini, I. E., Rodrigues, J. D., Novakowski, J. H., Basi, S. & Kaminski, T. H.
565 (2016). Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of
566 nitrogen fertilizer increases corn yield. *Ciência Rural*, 46 (2), 210-215.
- 567

- 568 Novakowisk, J. H., Sandini, I. E., Falbo, M. K., De Moraes, A., Novakowiski, J. H. & Cheng,
569 N. C. (2011). Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense*
570 na cultura do milho. *Semina: Ciências Agrárias*, 32, 1687-1698.
571
- 572 Oliveira, A. P., Silva, V. R. F., Arruda, F. P., Nascimento, I. S. & Alves, A. U. (2003).
573 Rendimentos de feijão caupi em função de doses e formas de aplicação de nitrogênio.
574 *Horticultura Brasileira*, 21, 77-80.
575
- 576 Oliveira, J. P., Chaves, L. J., Duarte, J. B., Brasil, E. M.; & Ribeiro, K. O. (2004). Qualidade
577 física do grão em populações de milho de alta qualidade proteica e seus cruzamentos. *Pesquisa*
578 *Agropecuária Tropical*, 37 (4), 233-241.
579
- 580 Peell, M. C., Finlayson, B. L. & McMahon, T. A. (2007) Updated world map of the
581 KöppenGeiger climate classification. *Hydrology and Earth System Science*, 11, 1633-1644.
582
- 583 Pereira, A. R. & Machado, E. C. (1987). Análise quantitativa do crescimento de comunidade
584 vegetal. *Instituto Agrônomo, Boletim Técnico*, 114, 33.
585
- 586 Quadros, P. D., Roesch, L. F. W., Silva, P. R. F., Vieira, V. M., Roehrs, D. D., Camargo, F. A.
587 O. (2014). Desempenho agrônomo a campo de híbridos de milho inoculados com
588 *Azospirillum*. *Revista Ceres*, 61 (2), 209-218.
589
- 590 Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C. & Moënne-locco, Y. (2009).
591 The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial
592 microorganisms. *Plant and Soil*, 321, 341-361.
593
- 594 Reinhold-Hurek, B. & Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current*
595 *Opinion in Plant Biology*, 14, 435-443.
596
- 597 Reis Junior, F. B., Machado, C. T. T., Machado, A. T., Sodek, L. (2008). Inoculação de
598 *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio.
599 *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32 (3), 1139- 1146.
600

- 601 Repke, R. A., Cruz, S. J. S., Silva, C. J., Figueiredo, P. G. & Bicudo, S. J. (2013). Eficiência da
602 *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de
603 milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 12 (3), 214-226.
- 604
- 605 Rodrigues, I. S., Baldani, V. L. D. & Baldani, J. L. (2006). Diversity of endophytic diazotrophic
606 bactéria of the genus *herbaspirillum* and *Burkholderia* in wetland rice. *Brazilian*
607 *Journal of Agricultural Research*, 41(2), 275-284.
- 608
- 609 Ritchie, S. W., Hanway, J. J. & Benson, G. O. (1993). How a corn plant develops. *Special*
610 *Bulletin*, 48. Disponível em: [https://www.biologie.uni-hamburg.de/b-](https://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/maize/www.ag.iastate.edu/departments/agronomy/corngrows.html)
611 [online/library/maize/www.ag.iastate.edu/departments/agronomy/corngrows.html](https://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/maize/www.ag.iastate.edu/departments/agronomy/corngrows.html).
- 612
- 613 Sangoi, L., Silva, L. M. M., Mota, M. R., Panison, F.; Schmitt, A.; Souza, N. M., ... Schenatto,
614 D. E. (2015). Desempenho agrônômico do milho em razão do tratamento de sementes com
615 *Azospirillum* sp. e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. *Revista Brasileira de Ciências*
616 *do Solo*, 39, 1141-1150.
- 617
- 618 Saubidet, M. I., Fatta, N. & Barneix, A. J. (2002). The effect of inoculation with *Azospirillum*
619 *brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant and Soil*, 245, 215-222.
- 620
- 621 Schmidt, E. R., Nascimento, A. L., Cruz, C. D. & Oliveira, J. A. R. Avaliação de metodologias
622 de adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho. *Acta Scientiarum Agronomy*, 33 (1),
623 51-58.
- 624
- 625 Silva, R. M., Miranda Filho, J. B. Heterosis expression in crosses between maize populations:
626 ear yield. *Scientia Agricola*, 60(3), 519-524.
- 627
- 628 Tadra-Sfeir, M. Z. Souza, E. M., Faoro, H., Müller-Santos, M., Baura, V. A., Tuleski, T. R., ...
629 Monteiro, R. A. (2011). Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall
630 synthesis in *Herbaspirillum seropedica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 2180–
631 2183.
- 632
- 633 Urquiaga, S. & Zapata, F. (2000). *Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos*
634 *anuales en América Latina y el Caribe*. Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 110.

635

636 Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N. & Singh, V. L. (2010). Impact of plant growth promoting
637 rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research*, 5, 954-983.

638

639 Vogt, G. A., Balbinot Junior, A. A., Galotti, G. J. M., Padolfo, C.M. & Zoldan, S. (2014).
640 Desempenho de genótipos de milho na presença ou ausência de inoculação com *Azospirillum*
641 *brasilense* e adubação nitrogenada de cobertura. *Agropecuária Catarinense*, 27, 49-54.

642

643 Wright, S. Correlation and causation. *Journal of Agricultural Research*, 20, 557-585, 1921.

644

645 Zhang, J., Subramanian, S., Stacey, G. & Yu, O. (2009). Flavones and flavonols play distinct
646 critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant*
647 *Journal*, 7, 171-183.

648

CAPÍTULO II

ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM HÍBRIDOS DE MILHO INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense*, VIA TRATAMENTO DE SEMENTES E APLICAÇÃO FOLIAR

Enzyme activity and changes in inoculation morphological corn hybrids with *Azospirillum brasilense*, via seed treatment and leaf application

Resumo

As plantas apresentam sistema de defesa para minimizar os estresses causados por deficiências de nutrientes. Sendo assim, objetivou-se com a presente pesquisa avaliar as alterações enzimáticas e morfológicas de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense* em tratamento de semente e foliar. O ensaio foi instalado em blocos inteiramente casualizados composto por seis híbridos de milho inoculados com *A. brasilense* em tratamento de sementes e via foliar no estágio V2. Os híbridos utilizados foram: AG9045, AG8025, AG2040, Feroz, BG7051 e BG7060. Analisou-se, na parte aérea e em raízes, as variáveis bioquímicas: peroxidação lipídica, atividade das enzimas superóxido dismutase, guaicaol peroxidase e nitrato redutase e conteúdo de clorofila total e carotenóides; e morfológicas: área foliar, massa seca da parte aérea, comprimento de raiz, área projetada, área superficial, diâmetro, volume, número de ramificações e massa seca de raízes. A maior atividade da superóxido dismutase, da parte aérea, foi no BG7060 quando se aplicou *A. brasilense* em V2, o qual evitou danos nos lipídeos de membrana. A nitrato redutase na parte aérea apresentou maior atividade no tratamento controle, observando que a presença da bactéria reduziu a atividade da enzima. A bactéria apresentou-se eficiente para as variáveis de área projetada e área superficial da raiz nos híbridos AG8025 e AG2040. Assim, pode-se observar que os híbridos apresentam comportamentos diferenciados na presença da bactéria, a qual afeta positivamente a atividade das enzimas antioxidantes e aumentando o sistema radicular e a área foliar das plantas.

Palavras chave: *Zea mays* (L.), enzimas antioxidantes, metabolismo do nitrogênio, produção sustentável.

Abstract

Plants have immune system to minimize the stresses caused by nutrient deficiencies. Thus, the aim of the present research was to evaluate the enzymatic and morphological changes of corn hybrids inoculated with *Azospirillum brasilense* in seed treatment and foliar. The experiment was conducted in a completely randomized block consisting of six corn hybrids inoculated with *A. brasilense* in seed treatment and foliar the V2 stage. Hybrids were: AG9045, AG8025, AG2040, Feroz, BG7051 and BG7060. Analyzed in shoots and roots, biochemical variables: lipid peroxidation, activity of superoxide dismutase, guaicaol peroxidase and nitrate reductase and chlorophyll content and carotenoids; and morphological leaf area, shoot dry weight, root length, projected area, surface area, diameter, volume, number of branches and dry mass of roots. The increased activity of superoxide dismutase, the shoot was in BG7060 when applied *A. brasilense* in V2, which prevented damage to the lipid membrane. The nitrate reductase in

the shoot showed greater activity in the control treatment, noting that the presence of bacteria reduced the activity of the enzyme. The bacteria showed to be efficient in the area of variables designed and superficial root area in the AG8025 and AG2040 hybrids. Thus, it can be seen that the hybrids exhibit different behaviors in the presence of the bacterium, which positively affects the activity of antioxidant enzymes and increase the root system and plant leaf area.

Keywords: *Zea mays* (L.), antioxidant enzymes, nitrogen metabolism, root morphology, leaf application.

1. Introdução

O nitrogênio (N) é exigido em maior quantidade pela cultura do milho, sendo necessário, em torno de, 28 kg de N por tonelada de grãos produzidos, e é o nutriente que mais frequentemente limita a produtividade (Araújo et al., 2004). A importância do N é reconhecida quanto as suas funções no metabolismo das plantas, participando como constituinte de proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, citocromo, clorofila e pigmentos (Ferreira et al., 2007).

O nitrato é a principal forma de N absorvido pelas plantas (Taiz e Zeiger, 2013), sendo a enzima nitrato redutase (RN) considerada a enzima-chave na regulação do metabolismo do N, já que o nitrato absorvido pelas raízes deve ser reduzido a NH_4^+ antes de ser incorporado em compostos orgânicos no sistema radicular e/ou na parte aérea. A enzima nitrato redutase atua no primeiro passo da redução do nitrogênio nítrico nas plantas superiores. A rota de assimilação do nitrato em plantas superiores envolve dois estágios sequenciais: a conversão do nitrato à nitrito, mediada pela enzima NR, a qual reduz nitrato à nitrito, e pela enzima nitrito redutase, que converte nitrito à amônia. Em seguida, a amônia é assimilada nos aminoácidos glutamina e glutamato, os quais servem para translocar nitrogênio orgânico das fontes para os drenos. As principais enzimas envolvidas são a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) (Taiz e Zeiger, 2013).

Os efeitos de vários estresses ambientais em plantas, como a deficiência de N são conhecidos pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). As plantas contêm um complexo sistema antioxidante para eliminar as EROs, incluindo enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD) (Hernández et al., 2001). Os radicais livres inativam enzimas e danificam componentes celulares importantes, além de causar degradação de fosfolipídios presentes na membrana (Bartoli, 2012); degradação de polissacarídeos, desnaturação de enzimas, quebra do DNA (Matysik, 2002) e degradação da clorofila (Miller et al., 2010). Os mecanismos de defesa contra os radicais livres são importantes na limitação da ação do estresse oxidativo e na destruição das EROs, os quais dependem da duração do estresse

e da capacidade de a planta sobreviver a estes estresses. A planta pode reagir com o aumento da expressão de genes de enzimas com funções antioxidantes (Munné-Bosch, 2013).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses (Halliwell e Whiteman, 2004).

A busca por sustentabilidade nos sistemas agrícolas de produção vem aumentando. Uma alternativa encontrada para minimizar o uso de fertilizantes nitrogenados é a utilização de microrganismos que realizam a fixação biológica do nitrogênio (FBN), a qual pode suplementar a utilização deste fertilizante, mantendo a planta nutrida e com maior capacidade de resistir a estresses. Bactérias fixadoras de N₂ do gênero *Azospirillum* (Döbereiner e Day, 1976; Baldani e Döbereiner, 1980) e *Herbaspirillum* (Olivares et al., 1996) foram isoladas de folhas, colmos e principalmente de raízes de diversas gramíneas. Salomone e Döbereiner (1996) observaram diferenças significativas na atividade da nitrato redutase em genótipos de milho submetidas à inoculação de uma mistura de estirpes de *Azospirillum*.

Escassos são os estudos efetuados para identificar os mecanismos da interação entre essas bactérias e as enzimas do metabolismo do N em milho. Dessa forma, objetivou-se com o trabalho avaliar as alterações enzimáticas e morfológicas de híbridos de milho submetidas a inoculação com *A. brasilense* em tratamento de sementes e via foliar.

2. Material e métodos

O estudo foi conduzido em casa de vegetação em sistema hidropônico e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (RS). Sementes de seis híbridos de milho foram semeadas, sobre substrato germiteste, em caixas de plástico, com capacidade para 17 L, acondicionadas a temperatura de 25 °C e com disponibilidade hídrica de 15 ml de água, destilada, por dia para que ocorresse a germinação. Após duas semanas, plântulas uniformes (comprimento da parte aérea de, aproximadamente, 7 cm) foram selecionadas e transplantadas para o sistema hidropônico, em solução nutritiva, sem disponibilidade de N. A solução nutritiva foi composta por: CaCl₂: 221,96 mg l⁻¹; MgSO₄: 246,40 mg l⁻¹; KH₂PO₄: 544,40 mg l⁻¹; FeSO₄/Na-EDTA: 47,99 µM; e solução completa de micronutrientes: Mo: 0,03 mg l⁻¹; B: 0,26 mg l⁻¹; Cu: 0,06 mg l⁻¹; Mn: 0,50 mg l⁻¹; Zn: 0,22 mg l⁻¹. O pH da solução foi mantido em 5,8 e com substituição da solução a cada sete dias.

Foram conduzidos seis experimentos, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, compostos por seis híbridos de milho com inoculação de *A. brasilense* no tratamento

de sementes na dose de 2,5 mL kg⁻¹ de semente, via foliar em V2 na dose de 300 mL ha⁻¹ e controle (ausência da bactéria). Os híbridos utilizados foram: AG9045, AG8025, AG2040, Feroz, BG7051 e BG706. O inoculante utilizado é composto por colônias de bactérias *A. brasilense*, das estirpes AbV5 e AbV6, numa concentração de 2,0x10⁸ UFC mL⁻¹. Cada parcela foi composta por 4 plantas, conduzidas até o estágio V3 (Ritchie et al., 1993) sendo posteriormente coletadas, separando-se a parte aérea e radicular. As plantas utilizadas para as análises bioquímicas de peroxidação lipídica, atividade das enzimas superóxido dismutase, guaiacol peroxidase e nitrato redutase e conteúdo de clorofila total e carotenóides foram congeladas imediatamente em N líquido, após a coleta e mantidas em *freezer* (-80 °C) até a determinação das análises. A mensuração morfológica de área foliar, massa seca da parte aérea, comprimento de raiz, área projetada, área superficial, diâmetro, volume, número de ramificações e massa seca de raízes foi realizada logo após a coleta das plantas.

A peroxidação lipídica (T-Bars) foi estimada seguindo o método de El-Moshaty et al. (1993). Amostras de folhas (0,5 g) e raízes (1,5 g) foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 4 mL de 0,2 M de tampão citrato (pH 6,5) contendo 0,5% de Triton X-100. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 xg por 15 min a 4°C. A quantidade de um mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (w/v) contendo 0,5% (w/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi aquecida a 95° C por 40 min e então resfriada em banho de gelo por 15 min, sendo centrifugada a 10.000 xg por 15 minutos. A absorbância do sobrenadante foi lida a 532 e 600 nm (para corrigir a turbidez não específica). A peroxidação lipídica foi expressa como nmol MDA mg⁻¹ de proteína

Amostras de folhas e raízes maceradas em nitrogênio líquido foram utilizadas para as análises enzimáticas, sendo que 0,5 g de amostra foi homogeneizada em 3 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,8) 0,05 M, contendo 1 mM de EDTA e 2% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 xg por 20 min. a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas (Zhu et al., 2004) e concentração de proteínas (Bradford, 1976). A atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) foi determinada segundo Zeraik et al. (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato. A mistura de reação continha 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5), 1,0 mL de guaiacol (15 mM) e 1,0 mL de H₂O₂ (3 mM). Após homogeneização, foi adicionado 50 µL do extrato da planta a esta solução. A atividade da enzima foi medida pela oxidação do guaiacol a tetraguaiacol através do aumento na absorbância a 470 nm. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína (U mg⁻¹ proteína). Para o cálculo, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 26,6 mM⁻¹cm⁻¹. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o

método espectrofotométrico, descrito por Giannopolitis e Ries (1977). A mistura de reação continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, riboflavina 2 μ M, nitrobluetetrazólio (NBT) 75 μ M, EDTA 0,1 mM, e 100 μ L de extrato enzimático.

A produção fotoquímica da formazana azul a partir do NBT foi monitorada pelo incremento da absorvância a 560 nm. A reação foi realizada em tubos de ensaio a 25°C, dentro de uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Como controle, tubos com a mistura de reação foram mantidos no escuro. A reação teve início ligando-se a luz e após 15 minutos de iluminação, a reação foi paralisada, desligando-se a luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe a fotorredução do NBT em 50% (Beauchamp e Fridovich, 1971). No ensaio, a riboflavina fotoquimicamente excitada é reduzida pela metionina em semiquinona, que doa um elétron ao oxigênio, formando o radical superóxido que por sua vez converte NBT em formazana azul.

Os pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenoides) das folhas foram extraídos segundo o método de Hiscox e Israelstan (1979) e estimados usando a equação de Lichtenthaler (1987). Amostras frescas de folhas (0,05 g) foram incubadas a 65°C com dimetilsulfóxido (DMSO) até que os pigmentos fossem completamente retirados. As absorvâncias da solução foram medidas em espectrofotômetro (Celm E-205D) a 663, 645 e 470 nm para clorofila total e carotenóides, respectivamente.

A atividade da nitrato redutase (NR) (μ M de NO_2^- g MF^{-1} h⁻¹) foi analisada utilizando-se o método descrito por Jaworski (1971), com modificações, calculando-se a atividade da enzima pela quantidade de nitrito liberada, pelos tecidos vegetais, na solução de incubação e obtida por meio de uma curva padrão. Inicialmente macerou-se 0,5 g de cada amostra em 5 mL de tampão fosfato (KNH_2PO_4) 0,1 mM (pH 7,5) contendo isopropanol 1% (v/v) e KNO_3^- (50 mM). Os extratos foram transferidos para tubos de ensaio e dispostos em banho-maria a 37 °C por 30 minutos, na ausência de luz. A paralisação da reação foi induzida com a adição de 1 mL de sulfanilamida 1% e 1 mL de α -naftil (n-naftil-etileno-diamino) 0,02%. O conteúdo dos tubos foi mantido em repouso por 15 minutos e após lido em espectrofotômetro a 540 nm.

A área foliar, comprimento de raiz, área projetada, área superficial, diâmetro, volume e número de ramificações das raízes foram determinados através do software WinRHIZO Pro LA2400 (Sistema de Análise de Raízes).

Os dados foram submetidos a análise de variância teste F ($p \leq 0,05$) (ANEXO L, M e N), havendo significância aplicou-se teste de Scott-Knott para as médias dos tratamentos. Os dados foram analisados utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

3. Resultados e Discussão

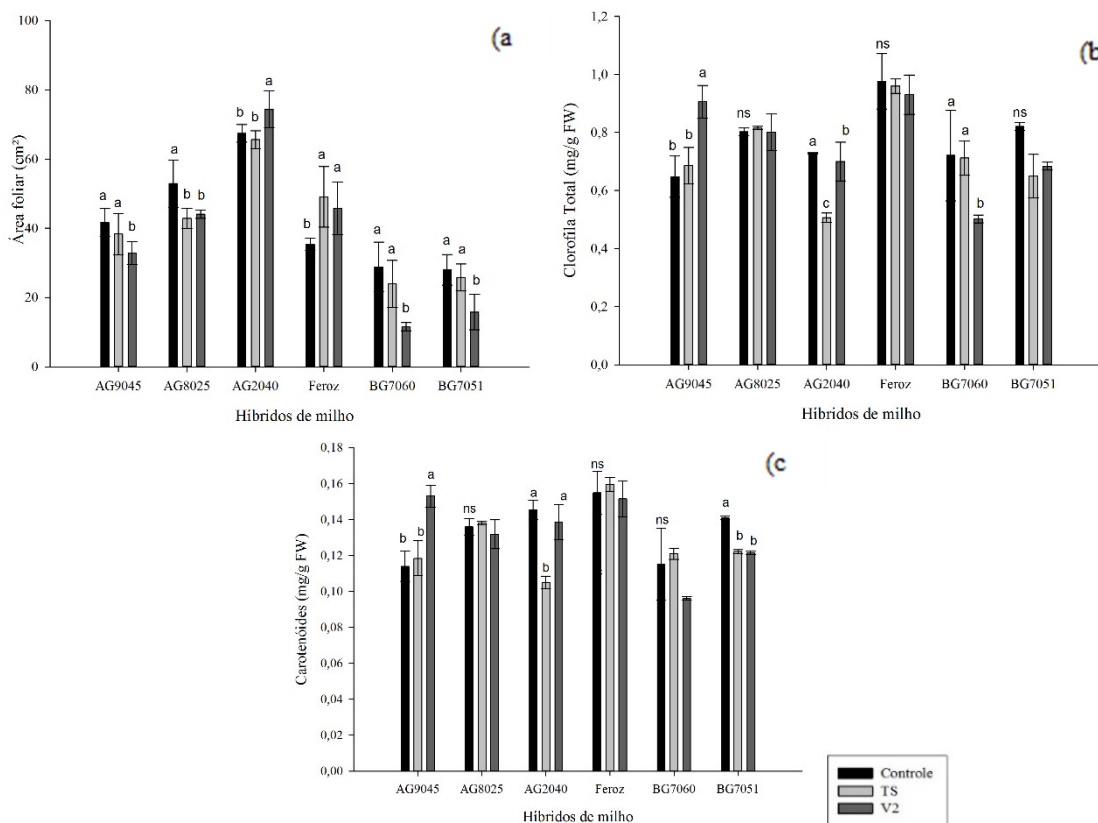
Houve efeito significativo em todos os híbridos para a variável de área foliar (AF) (Figura 6 a). A aplicação via sementes apresentou-se eficiente e maior que o controle para o híbrido Feroz. Este efeito positivo pode estar relacionado com a presença da bactéria na raiz e/ou no interior da planta contribuindo para a FBN e produção de fito-hormônios o que incrementa a AF. Na cultura do trigo foi observado maior AF e biomassa seca de parte aérea quando as plantas foram inoculadas com *A. brasilense* sem adição de N (El-Sayed e Althubiani, 2015). Neste estudo, o incremento na AF não apresentou diferenças significativas na biomassa seca da parte aérea, exceto para os híbridos AG2040 e Feroz, os demais híbridos com aplicação do inoculante no estágio V2 reduziram, significativamente, a AF. Como a coletas foram efetuadas em V3 é possível que a bactéria tenha se associado as plantas de milho, mas possivelmente não houve tempo hábil para o incremento da AF, proporcionado pela bactéria, uma vez que a interação pode desenvolver-se rapidamente com alguns endófitos, como observado 12 horas após a inoculação, em camadas de células corticais de milho e após 24 horas no xilema (Okumura et al., 2013).

Os pigmentos foliares foram analisados pelo conteúdo de clorofila e carotenóides (Figura 6 b e 6 c). Observou-se o maior conteúdo de clorofila no híbrido AG9045 ao se aplicar no estágio de desenvolvimento V2. Essa maior concentração de pigmentos proporciona maior absorção de energia luminosa, fotossíntese e incremento no potencial de produção e vigor das plantas (Bashan et al., 2006). Os resultados demonstram que para o híbrido AG2040 a presença da bactéria reduziu o conteúdo de clorofila, sendo que este resultado pode estar relacionado com algum estresse sofrido pelas plântulas que não foi mensurado ou ainda pode ser que a planta teve menos N disponível para a síntese de clorofila. Ressalta-se que essa perda de clorofila pode ocasionar um declínio progressivo na capacidade fotossintética das plantas. As clorofilas desempenham papel importante na fotossíntese, sendo responsáveis pela captação de energia luminosa. Assim a menor concentração de clorofila pode levar à diminuição da eficiência fotossintética, além de afetar outros processos celulares como a divisão e expansão celular (Taiz e Zeiger, 2013).

A variável carotenoides apresentou diferenças entre os híbridos, apresentando maior conteúdo para a aplicação de *A. brasilense* em V2 nos híbridos AG9045 e AG2040 e no controle para os híbridos AG2040 e BG7051. Em geral observou-se que com a aplicação de inoculante via semente houve redução do conteúdo de carotenóides. Além de pigmentos acessórios na fotossíntese, os carotenoides desempenham papel essencial na fotoproteção, auxiliando na eliminação de radicais livres, que danificam componentes celulares, como os lipídeos (Taiz e

Zeiger, 2013). Portanto, esses pigmentos são importantes na prevenção da indução de danos oxidativos causados pelo estresse (Wahid, 2007). Neste sentido, híbridos que apresentarem maiores quantidades desses pigmentos possuem maior capacidade de eliminar os radicais livres, enquanto a menor concentração de carotenoides pode significar maiores danos nas membranas fotossintéticas nos híbridos avaliados. Espera-se que híbridos que apresentam maiores conteúdos desses pigmentos tenham maior capacidade de tolerar condições de estresse, devido à estreita relação entre pigmentos, potencial fotossintético e produtividade de grãos (O'Neill et al., 2006).

Figura 6. Efeito de *A. brasilense* na área foliar (AF, a), clorofila total (b) e carotenóides (c) em híbridos de milho. (ANEXO O).



* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação via foliar no estágio V2 de *A. brasilense*.

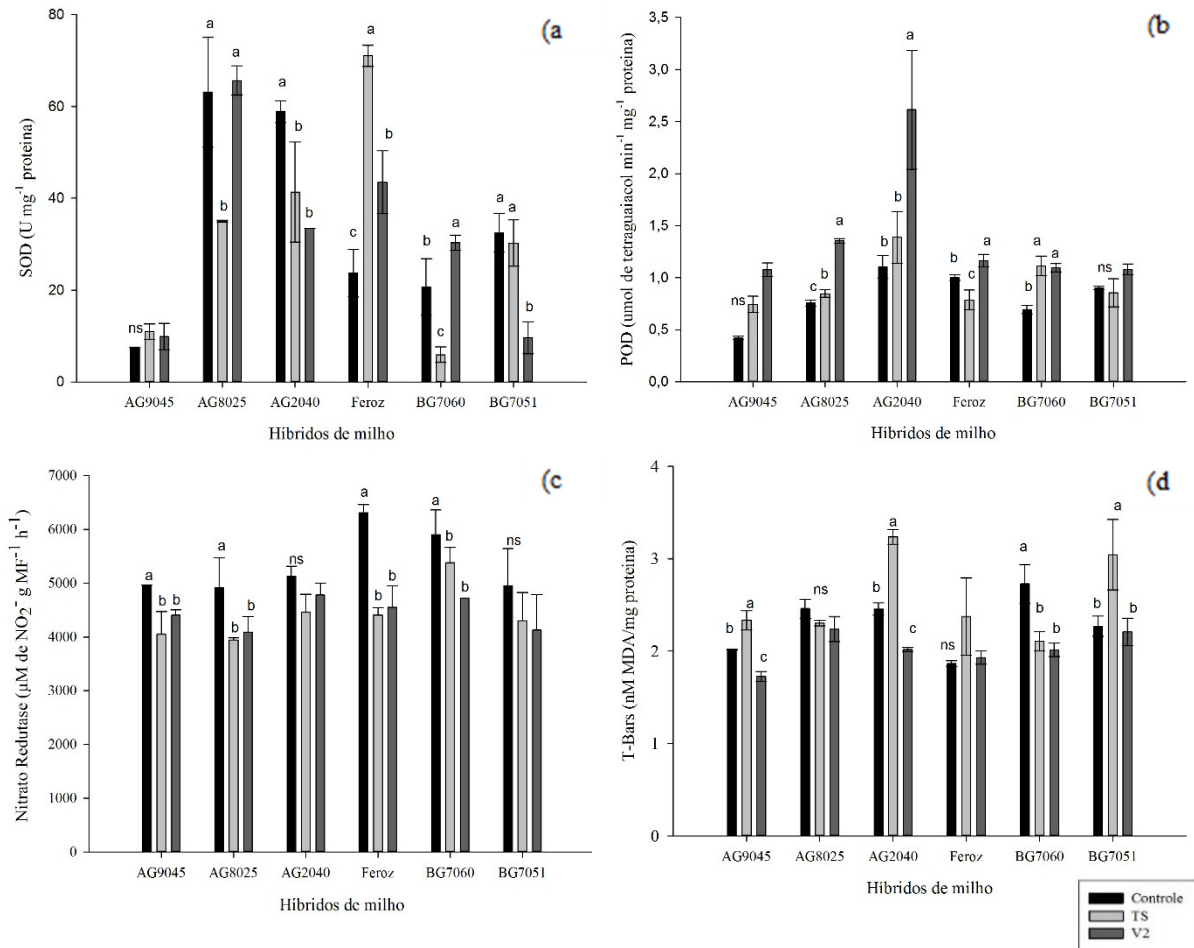
Para minimizar os efeitos do estresse oxidativo, as plantas apresentam sistema antioxidante, composto por enzimas como a guaiacol peroxidase (POD) e a superóxido dismutase (SOD), que participam ativamente da eliminação e quebra de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Foyer e Noctor, 2003). A menor atividade da SOD indica que outras enzimas antioxidantes,

não determinadas neste experimento, podem estar agindo para evitar danos nos lipídeos no híbrido BG7051 com aplicação de *A. brasilense* em V2 (Figura 7 a). A maior atividade da SOD no tratamento V2 no BG7060 evitou danos nos lipídeos. Estes resultados indicam que a aplicação da bactéria aumenta efetivamente a capacidade de defesa das plantas de milho contra o estresse oxidativo induzido pela ausência de N. Houve menor atividade da SOD na aplicação de *A. brasilense* via semente, para os híbridos AG8025 e AG2040, já a maior atividade da SOD no híbrido Feroz com aplicação de *A. brasilense* via semente evitou a peroxidação de lipídios. A SOD é a enzima antioxidante mais eficaz em todos os organismos aeróbios e nos espaços subcelulares propensos a estresse oxidativo. Está bem descrito, na literatura, que vários estresses ambientais muitas vezes levam ao aumento da geração de EROs, e nesse sentido a SOD tem sido importante na tolerância ao estresse de plantas, proporcionando a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos de níveis elevados de EROs.

Comportamento semelhante ocorreu na atividade da enzima antioxidante POD, onde a aplicação via foliar em V2 aumentou a atividade da POD na parte aérea dos híbridos AG9045, AG8025, AG2040, Feroz e BG7060. Esse resultado pode estar relacionado com a menor peroxidação de lipídios de membrana nesse tratamento (Figura 7 b). A POD é responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma EROs (Hameed et al., 2011), o qual pode atuar de forma prejudicial, de proteção ou como sinalizador dependendo do equilíbrio entre a produção e a eliminação das EROs no local e tempo adequado (Gratão et al., 2005). Assim, a maior atividade da SOD e POD, quando ocorreu a aplicação de *A. brasilense*, reduziu a peroxidação de lipídios e aumentou, na maior parte, a AF dos híbridos avaliados.

A assimilação do nitrogênio é um processo que necessita de grande gasto de energia para as plantas, razão pela qual ocorre predominantemente nas folhas, onde é o centro de síntese de ATP, agentes redutores e fornecedores de elétrons (Andrade Netto et al., 2004). A enzima NR, da parte aérea, apresentou maior atividade no tratamento controle, observando que a presença da bactéria reduziu a atividade da NR (Figura 7 c). A expressão e a atividade da NR são fortemente reguladas por diversos fatores, como a luz, a concentração de nitrato, carboidratos, e a disponibilidade de cofatores metálicos (Taiz e Zeiger, 2013). O equilíbrio da enzima é determinado pela taxa de sua degradação, assim como, pela taxa de síntese da mesma (Andrade Netto et al., 2004). A taxa e a quantidade de nitrogênio assimilado pelas plantas durante o seu ciclo dependem da atividade das enzimas envolvidas e da disponibilidade de energia necessária para os processos de assimilação (Bredemeier e Mundstock, 2000).

Figura 7. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, a), guaiacol peroxidase (POD, b), nitrato redutase (NR, c) e peroxidação lipídica (T-Bars, d) em híbridos de milho inoculados com *A. brasilense* via semente e aplicação foliar. (ANEXO P).



* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação via foliar no estágio V2 de *A. brasilense*.

Nos tratamentos onde houve a presença de *A. brasilense*, observou-se menor atividade da NR, o que pode ter ocorrido devido as bactérias atuarem no crescimento vegetal por meio da redução do NH_4^+ . A absorção de NH_4^+ é geralmente mais rápida que a absorção de NO_3^- numa ampla faixa de condições ambientais. Desse modo, as plantas não gastariam energia para reduzir o nitrato até amônia e essa energia poderia ser canalizada para outros processos vitais do metabolismo. Para Machado et al. (1998), tais bactérias podem exercer alguma influência na atividade da glutamina sintetase em raízes de plantas de milho, sendo que, neste estudo não foi avaliada a atividade desta enzima. Reis Junior et al. (2008) observaram que com o predomínio de nitrato, a atividade da enzima NR foi mais alta e, com o predomínio da forma amoniacal, a

atividade da GS foi mais elevada. A variabilidade genética para a atividade da NR (Purcino et al., 1994) e da GS (Magalhães e Machado, 1995) já foi relatada.

A concentração de malondialdeído (um dos produtos da peroxidação lipídica) foi observada em maiores níveis com a aplicação do tratamento TS nos híbridos AG9045, AG2040 e BG7051 indicando que houve maior estresse por deficiência de N, que refletiu no menor conteúdo de clorofilas e carotenoides (Figura 7 d). O acúmulo de EROs, como resultado de várias tensões ambientais, é uma das principais causas de perda de componentes de produtividade das plantas (Gill e Tuteja 2010) já que essas afetam funções celulares como os ácidos nucléicos e as proteínas causando a peroxidação de lipídeos (Foyer e Noctor, 2005). O estresse oxidativo foi reduzido com a presença da bactéria para o híbrido BG7060. Isso pode ter ocorrido devido a maior atividade das enzimas antioxidantes, que evitaram estresses na planta.

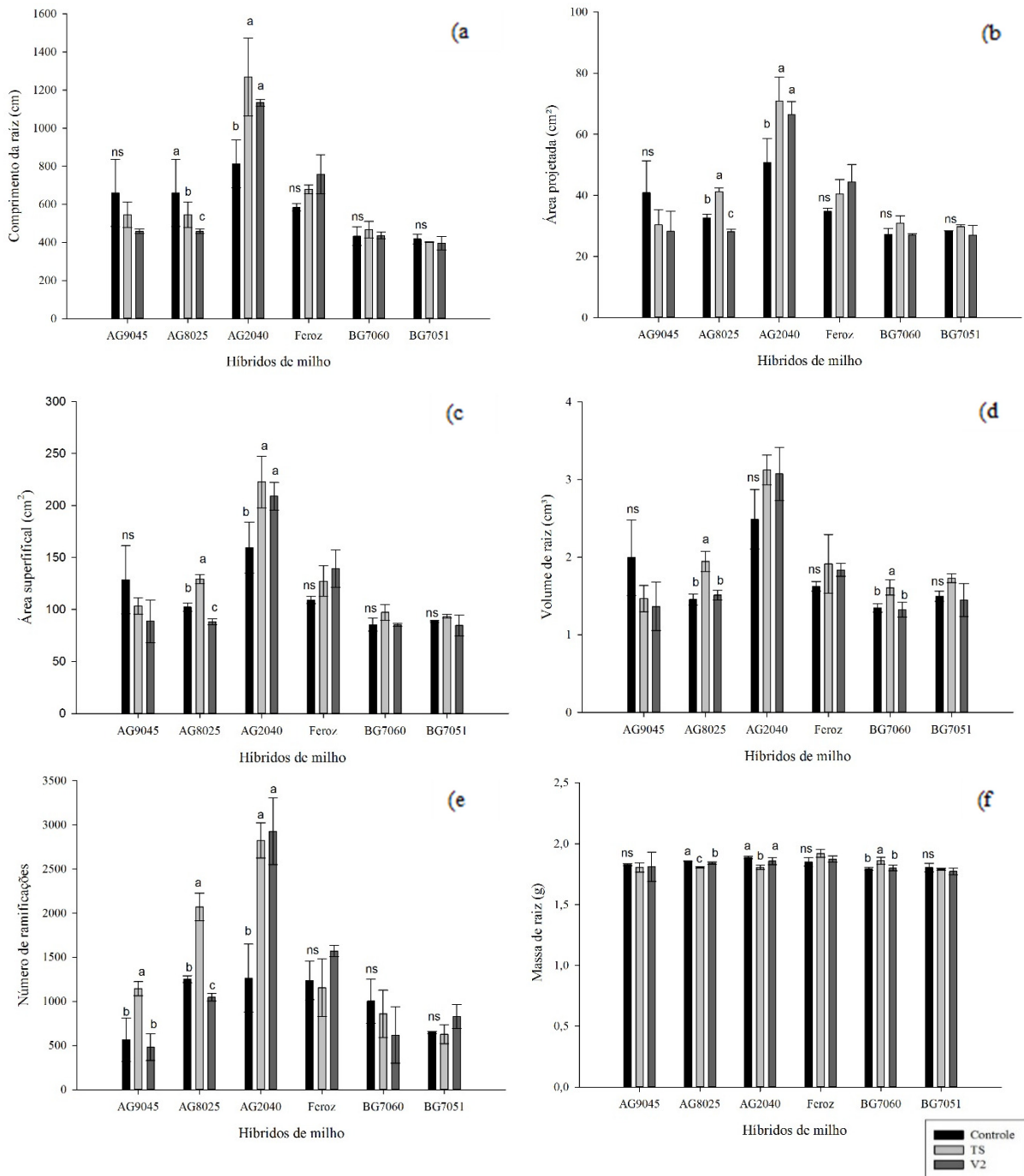
Os parâmetros de comprimento de raiz, área projetada e área superficial apresentaram resposta positiva para a inoculação com *A. brasilense*, tanto no tratamento de sementes quanto na aplicação no estágio V2, para o híbrido AG2040 (Figura 8 a; b; c). Além disso, o tratamento de sementes com *A. brasilense* promoveu resposta positiva no comprimento de raízes, na área projetada, na área superficial, no volume de raízes e no número de ramificações no híbrido AG8025 (Figura 8 d; e). Esses resultados, de maiores incrementos, na raiz, com inoculação via semente, podem ser devido a bactéria estar associada a essa estrutura desde o início do desenvolvimento, promovendo benefícios para a planta. Neste sentido, como a condução do experimento se deu até o estágio V3, a bactéria não conseguiu beneficiar com maior expressividade as plantas que tiveram a aplicação via foliar. Os incrementos nas raízes foram, provavelmente, devido a capacidade da bactéria produzir e disponibilizar fito-hormônios para a planta. Em estudos com inoculação de *A. brasilense* na cultura do milho, foram observadas modificações na morfologia da raiz, com maior número de raízes laterais e aumento de pelos radiculares semelhante às alterações promovidas com aplicação de ácido indolacético (AIA) (Perrig et al., 2007).

A bactéria promoveu incrementos na variável massa seca para o híbrido BG7060, sendo que para os híbridos AG8025 e AG2040 houve redução com a utilização do tratamento com a presença da bactéria (Figura 8 f). A influência da inoculação com *A. brasilense* sobre o desenvolvimento radicular em híbridos está relacionado com o potencial de área explorada pelas plantas. Bactérias diazotróficas podem influenciar a nutrição nitrogenada de culturas, o que é indiretamente relacionado com o aumento do sistema radicular (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000). Nos primeiros estudos sobre as associações entre plantas e *Azospirillum* spp., pesquisadores acreditavam que os benefícios promovidos pela bactéria eram derivados

somente a partir da FBN (Dobbelaere et al., 2001). Contudo, trabalhos demonstraram que os efeitos positivos proporcionados por esses microrganismos são devido principalmente à alterações morfológicas e fisiológicas nas raízes de plantas inoculadas (Okon e Vanderleyden, 1997).

Alterações no sistema radicular estão relacionadas com a produção de substâncias promotoras de crescimento principalmente o AIA, produzido por *Azospirillum* spp., o qual desempenha um papel importante na promoção do crescimento de plantas em geral (Bashan e Holguin, 1997). Neste sentido, em estudos com a bactéria, em meio líquido contendo *A. brasilense*, foi constatado que a produção de AIA aumentou em até 96 horas. Além disso, uma pequena, mas biologicamente significativa, quantidade de giberelina e cinetina foram detectadas no meio líquido (El-Sayed e Althubiani, 2015).

Figura 8. Comprimento de raiz (a), área projetada (b), área superficial (c), volume de raiz (d), número de ramificações (e) e massa seca de raiz (f) dos híbridos de milho inoculados via tratamento de sementes e aplicação foliar de *A. brasilense*. (ANEXO Q).

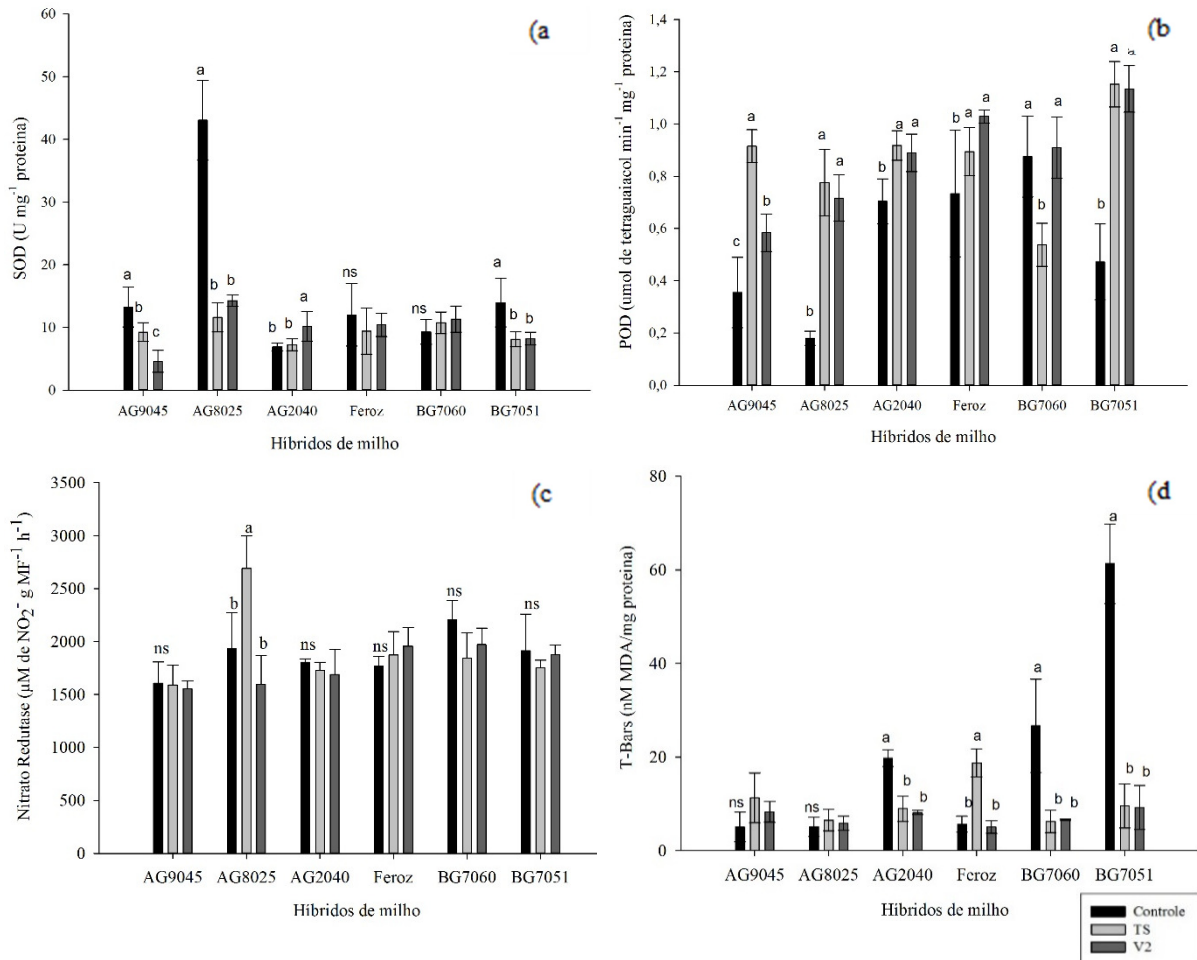


* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação via foliar no estágio V2 de *A. brasilense*.

Dentre as enzimas envolvidas na remoção de EROs a SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos em níveis elevados (Gill e Tuteja 2010). Em relação a isso no tratamento V2, para o híbrido AG2040, verificou-se aumento, significativo, na atividade das enzimas SOD e POD em raízes de plantas de milho (Figura 9 a). Esse resultado pode estar relacionado com a menor peroxidação lipídica na raiz, resultando em aumento na morfologia radicular. Os híbridos AG9045 e BG7051 apresentaram maior atividade da SOD quando houve a ausência da bactéria (tratamento controle). A deficiência de N pode gerar aumento na produção de EROs, promovendo uma inibição na síntese de proteínas e aumento na atividade das enzimas antioxidantes. A atividade da POD apresentou diferença significativa em todos os híbridos avaliados, e com maior frequência proporcionou aumento na atividade quando as plantas estavam expostas à bactéria *A. brasilense* diminuindo a peroxidação de lipídeos (Figura 9 b). Assim pode-se afirmar que a bactéria auxiliou na maior atividade das enzimas antioxidantes da raiz evitando que houvesse peroxidação de lipídios. As enzimas antioxidantes participam da eliminação direta do H_2O_2 , sendo que agem no citosol, vacúolo, parede celular e nas organelas onde a detoxificação é necessária (Noctor e Foyer, 1998).

Diferente da resposta obtida pela atividade da NR na parte aérea, a presença da bactéria no TS aumentou a atividade da enzima NR da raiz para os híbridos AG8025 (Figura 9 c). Esse resultado pode ser devido a associação da bactéria na raiz das plantas ter promovido a FBN e aumentado a atividade da enzima. A diminuição da atividade da NR em folhas acompanhado pelo aumento de rendimentos, poderia ser explicado pela redução de NO_3^- nas raízes com a ajuda da atividade de NR bacteriana, como observado no trigo (Baldani et al., 1986). A expressão dessa enzima, mesmo em condições de baixas concentrações de nitrogênio, é devida ao fato de a mesma se caracterizar como carregadora constitutiva de alta afinidade (Lea e Azevedo, 2007). O efeito do excesso de nitrogênio na forma de amônio pode ser confundido com a modificação do pH do meio, inclusive do solo. Outra característica importante da absorção de NO_3^- é o seu controle rigoroso pelo estado energético (disponibilidade de fotoassimilados) e nutricional das plantas. Plantas deficientes em N absorvem NO_3^- mais rapidamente do que plantas bem supridas com N. Isto indica que a demanda de N pela planta também controla as suas taxas de absorção. A NR é a primeira enzima na cadeia de redução do N dentro do processo de assimilação do N nas plantas. Devido a isso a atividade da NR pode estar relacionada indiretamente com a produtividade das culturas. Plantas com alta atividade da NR possuem maior capacidade de assimilar o nitrato disponível e, em consequência, maior capacidade em responder à adubação nitrogenada (Purcino et al., 1994).

Figura 9. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) guaiacol peroxidase (POD) e nitrato redutase (NR) e níveis de MDA (T-Bars), na parte radicular, de seis híbridos de milho inoculados com *A. brasilense* via tratamento de sementes e aplicação foliar. (ANEXO R).



* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação via foliar no estágio V2 de *A. brasilense*.

O malondialdeído (MDA) é o produto da peroxidação de lipídeos, consequentemente, o maior conteúdo desse composto indica estresse oxidativo (Han e Wang, 2002). Para o híbrido Feroz foi observado maior dano nos lipídeos no TS, sendo que a maior atividade da POD nos tratamentos com *A. brasilense* não conseguiu evitar o dano, indicando que a competição pelo nitrogênio fixado pode induzir a produção de radicais livres que oxidaram os componentes fosfolipídicos das membranas celulares, acarretando no incremento dos teores da variável nesse híbrido (Figura 9 d). Recentemente, observou-se a capacidade da competição ocasionar estresse oxidativo, uma vez que foi detectado acúmulo de H₂O₂ na primeira folha e tecidos radiculares (Afifi e Swanton, 2012).

Quando a competição por nitrogênio se estabelece ocorre redução da disponibilidade do nutriente para a cultura, causando estresse, prejudicando processos fisiológicos e bioquímicos na planta. Essa condição de estresse celular pode ser avaliada através da peroxidação lipídica (Huang et al., 2004). Nos híbridos AG2040, BG7060 e BG7051 houve maior peroxidação de lipídeos no tratamento controle, podendo concluir que a bactéria auxilia na atividade das enzimas antioxidantes promovendo a redução da peroxidação de lipídeos, observando que a alta atividade da POD pode estar relacionada à grande disponibilidade de H₂O₂ produzido pelo estresse por deficiência de N, e desta forma a POD seria a principal enzima para a quebra do peróxido, já que está localizada na parede celular. Dessa forma, a bactéria apresenta capacidade de promover aumento em características morfológicas e bioquímicas, quando ocorre interação adequada entre planta e bactéria, sendo importante descobrir as condições adequadas para que bactéria seja responsiva no aumento da produtividade de grãos da cultura do milho.

4. Conclusão

Os híbridos têm comportamentos distintos com a presença da bactéria, porém esta afeta positivamente a atividade das enzimas antioxidantes e aumenta o sistema radicular e a área foliar das plantas.

5. Referências

- Afifi, M., Swanton, C., 2012. Early physiological mechanisms of weed competition. **Weed Science**, 60 (4), 542-551.
- Andrade Netto, J.F.de, Favarin, J.L., Bernardes, M. S., Dourado Neto, D., 2004. Parâmetros fisiológicos em função da espécie de café e da luminosidade natural. **Revista de Agricultura** (Piracicaba), Piracicaba, 79 (2), 177-188.
- Araújo, L.A.N., Ferreira, M.E., Cruz, M.C.P., 2004. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39, 771- 777.
- Baldani, V.L.D., Döbereiner, J., 1980. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, 12, 433-439.

- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Döbereiner, J., 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, 90, 35-46.
- Bartoli, C.G., Casalongue, C.A., Simontacchi, M., Marquez-Garcia, B., Foyer, C.H., 2012. Interactions between Hormone and Redox Signalling Pathways in the Control of Growth and Cross Tolerance to Stress. **Environmental and Experimental Botany**, 93, 73-88.
- Bashan, Y., Holguin, G., 1997. *Azospirillum* plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, 43, 103 -121.
- Bashan, Y., Bustillos, J.J., Leyva, L.A., Hernandez, J.P., Bacilio, M., 2006. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, 42 (1), 279-285.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochemistry**, 8 (44), 276–287.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2,p. 248-254, 1976.
- Bredemeier, C., Mundstock, C.M., 2000. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, 30, 365-372.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., CaballeroMellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., Okon, Y., 2001. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.871-879, 2001.
- Döbereiner, J., Day, L.M., 1976. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Newton, W.E., Nyman, C.J. (Eds.). **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State University, 2, pp. 518-538.

El-Moshaty, F.I.B., Pike, S.M., Novackya, J., Seghal, O.P., 1993. 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**, 39 (43), 109-119.

El-Sayed, H.E.A., Althubiani, A.S., 2015. Enhancement of Plant Growth by Soil Inoculation with *Azospirillum brasilense* HM1 Isolated from Soil of Saudi Arabia. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 4 (10), 238-248.

Ferreira, P.A., Garcia, G.O.de, Miranda, G.V., Oliveira, F.G., Santos, D.B., 2007. **Tolerância da variedade milho ufvu 100 à salinidade avaliada por três métodos**. Irriga: Botucatu, 12 (4), 532-544.

Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência Agrotecnológica**, 35 (6), 1039-1042.

Foyer, C.H., Noctor, G., 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, 119, 355–364.

Foyer, C.H.; Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell & Environment**, 29, 1056–1071.

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Journal of Plant Physiology**, 48 (59), 315- 318.

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 48(12), 909-930, 2010.

Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R. A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, 32, 481-494.

- Han, Y.C., Wang, C.Y., 2002. Physiological basis of bentazon tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) lines. **Weed Biology and Management**, 2 (4), 186-193.
- Hameed, A., Bibi, N., Akhter, J., Iqbal, N., 2011. Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, 49, 178–185.
- Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, 142 (2), 231-55.
- Hernández, J.A, Ferrer, M.A., Jiménez, A., Ros-Barcelo, A., Sevilla, F., 2001. Antioxidant Systems and O_2^-/H_2O_2 Production in the Apoplast of Pea Leaves. It's Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins. **Plant Physiology**, 127, 817–831.
- Hiscox, J.D., Israelstam, G.F., 1979. Method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique**, 57 (12), 1332-1334.
- Huang, Z.A., Jiang, D.A., Yang, Y., Sun, J.W., Jin, S.H., 2004. Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. **Photosynthetica**, 42 (3), 357-364.
- Jaworski, E.G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 43, 1274-1279.
- Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2007. Nitrogen use efficiency. 2. Amino acid metabolism. **Annals of Applied Biology**, 151, 269-275.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and Carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, 148, 350-382.

Machado, A.T., Sodek, L., Döbereiner, J., Reis, V.M., 1998. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33, 961-970.

Magalhães, J.R., Machado, A.T., 1995. Biochemical parameters selecting maize for nitrogen assimilation efficiency under stress conditions. In: Machado, A.T., Magnavaca, R., Pandey, S., Silva, A.F., (Eds). **Simpósio Internacional Sobre Estresse Ambiental: o milho em perspectiva**, pp.346-367.

Matysik, J., Alia, A., Bhalu, B., Mohanty, P., 2002. Molecular Mechanism of Quenching of Reactive Oxygen Species by Proline under Water Stress in Plants. **Current Science**, 82, 525-532.

Miller, G., Suzuki, N. Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R., 2010 Reactive Oxygen Species Homeostasis and Signalling During Drought and Salinity Stresses. **Plant, Cell & Environment**, 33 (4), 453-67.

Munné-Bosch, S., Queval, G; Foyer, C.H., 2013. The Impact of Global Change Factors on Redox Signaling Underpinning Stress Tolerance. **Plant Physiology**, 161, 5-19.

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49, 249–279.

Okon, Y., Vanderleyden, J., 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, 63, 366-370.

Okumura, R.S., Mariano, D.deC., Dallacort, R., Albuquerque, A.N. de, Lobato, A.K.daS., Guedes, E.M.S., Oliveira Neto, C.F.de., Conceição, H.E.O. da, Alves, G.A.R., 2013. *Azospirillum*: A new and efficient alternative to biological nitrogen fixation in grasses. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, 11, 1142-1146.

Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J., 1996. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, 21, 197-200.

O'Neill, P.M., Shanahan, J.F., Schepers, J.S., 2006. Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. **Crop Science of America**, 46 (2), 681-687.

Perrig, D., Boiero, M.L., Masciarelli, O.A., Penna, C., Ruiz, O.A., Cassá, F.D., Luna, M.V., 2007. Plant-growthpromoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 75 (5), 1143-50.

Purcino, A.A.C., Magnavaca, R., Machado, A. T., Marriel, I. E., 1994. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 6 (1), 41-46.

Reis Júnior, F.B., Machado, C.T.T., Machado, A.T., Sodek, L., 2008. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 32 (3), 1139-1146.

Ritchie, S.W.; Hanway, J.J.; Benson, G.O. How a corn plant develops. *Special Bulletin*, 48, 1993. Disponível em: https://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/maize/www.ag.iastate.edu/departments/agronomy/corn_grows.html.

Salomone, I.G.de, Döbereiner, J., 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, 21 (3), 193-196.

Steenhoudt, O., Vanderleyden, J., 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, 24, 487-506.

Taiz, L., Zeiger, E., 2013. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 5, 918.

Wahid, A., 2007. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. **Journal of Plant Research**, 120 (2), 219- 228.

Zeraik, A.E., Souza, F.S., Fatibello-Filho, O., 2008. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, 31, 731-734.

Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., Yu, J., 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, 167, 527-533.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura do milho apresenta altas repostas a adubação, principalmente para a disponibilidade do nitrogênio (N) que influencia o crescimento e desenvolvimento da planta, refletindo na produtividade de grãos. A utilização da bactéria *Azospirillum brasilense* têm se tornado uma fonte alternativa para a demanda de N, através da fixação biológica desse nutriente. Além da fixação de N atmosférico a bactéria contribui incrementando o desenvolvimento radicular da planta, aumentando a área de absorção da raiz.

A contribuição positiva da inoculação com *A. brasilense* é muito estudada, entretanto não se têm uma padronização quanto as condições em que a planta apresenta maiores incrementos na interação planta-bactéria. A utilização da bactéria visa promover o desempenho da cultura do milho, como nos resultados obtidos neste estudo, os quais apresentaram maior tendência de efeito positivo quando a bactéria está associada a híbridos simples de milho. A aplicação via foliar pode ser considerada uma alternativa prática adotada pelo agricultor, apresentando efeito positivo quando realizada no estágio fenológico V2. Essa resposta possivelmente seja devido a planta ainda não estar com seu dossel estabelecido e a pulverização atingir, além da planta, o solo podendo a bactéria se associar tanto via foliar quanto via raiz.

Dessa forma, ficam evidentes as contribuições proporcionadas pela bactéria afetando positivamente a atividade das enzimas antioxidantes, aumentando o sistema radicular e a área foliar das plantas, incrementando a contribuição relativa de N e com isso refletindo na maior produtividade de grãos.

REFERÊNCIAS

- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review in Plant Biology**, v.53, p.373-399, 2004.
- AZIZ, A.; LARHER, F.; Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassic nappus* L. **Journal of Plant Physiology**, v.153, n.5, p.754-762, 1998.
- BARBER, A.D., HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Amer. Pharm**, v.34, n.9, p.26-35, 1994.
- CAVALLET, L.E. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* sp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.1, p.129-132, 2000.
- CHRISTIANSEN-WENIGER, C.; VANDERLEYDEN, J. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays* L.) for nodules. **Biology and Fertility of Soils**, v.17, p.1-8, 1994.
- CORRÊA, C.M.; SCHRANK, I.S. Isolamento do gene que codifica superóxido dimutase (SOD) em *Azoapirillum*. **Anais...** Salão de Iniciação Científica, 2005.
- De WEERT, S. et al. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p.1173-1180, 2002.
- DIDONET, A.D. et al. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos em trigo submetidos à inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.2, p.401-411, 2000.
- ECKERT, B. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.17-26, 2001.
- FALLIK, E.; OKON, Y. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, v.20, p.45- 49, 1988.
- FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: Funep, p.576, 2007.
- FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Acta Physiology Plant**, v.92, p.696-717, 1994.
- JAVED, M.; ARSHAD, M.; ALI, K. Evaluation of rhizobacteria for their growth promoting activity in maize. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.14, p.36-42, 1998.
- HAN, Y.C.; WANG, C.Y. Physiological basis of bentazon tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) lines. **Weed Biology and Management**, v.2, n.4, p.186-193, 2002.

- HAUWAERTS, D. et al. A major chemotaxis gene cluster in *Azospirillum brasilense* and relationships between chemotaxis operons in Alfa-Proteobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.208, p.61-67, 2002.
- HEALTH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts.I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, n.1, p.189-198, 1968.
- HUANG, Z.A. et al. Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. **Photosynthetica**, v.42, n.3, p.357-364, 2004.
- 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. Buenos Aires: **Asociación Argentina de Microbiología**, p. 17-35, 2008.
- HUPPE, H. C.; TURPIN, D. H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 577-607, 1994.
- KNOX, J. P.; DODGE, A. D. Singlet oxygen and plants. **Phytochemistry**, v.24, p.889– 896, 1985.
- LARCHER, W. Physiological PLant Ecology. **Springer**, 1980.
- LEE, K. K. et al. Associative N₂ -fixing in pearl millet and sorghum: Levels and response to inoculation. *Soil Science Plant Nutrition* v.40, p.477-484, 1994.
- MAGALHÃES, J.R.; MACHADO, A.T. Biochemical parameters selecting maize for nitrogen assimilation efficiency under stress conditions. **Anais...** In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: o milho em perspectiva. 1992.
- NILSEN, E.; ORCUTT, D.M. The physiology of plants under stress – Abiotic factors. **John Wiley and Sons**, 1996.
- OAKS, A. Efficiency of nitrogen utilization in C3 and C4 cereals. **Plant Physiology**, v.106, n.2, p.407-414, 1994.
- OHLAND, R. A. A. et al. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.3, p.538-544, 2005.
- OLIVARES, F.L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominanty of Graminae. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, p.197-200, 1996.
- OKUMURA, R.S. et al. *Azospirillum*: A new and efficient alternative to biological nitrogen fixation in grasses. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.11, p.1142-1146, 2013.

PENG, G. et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses Grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1263–1267, 2006.

PURCINO, A.A.C. et al. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.6, n.1, p.41-46, 1994.

QUADROS, P.D. et al. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v.61, n.2, p.209-218, 2014.

QUEIROZ, C.G.S. et al. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea Arabica* L. roots. **Biology Plantarum**, v.41, n.3, p.403- 413, 1998.

REIS JUNIOR, F.B. et al. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.3, p.1139-1146, 2008.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. How a corn plant develops. *Special Bulletin*, 48, 1993. Disponível em: <https://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/maize/www.ag.iastate.edu/departments/agronomy/corngrows.html>.

SAIKIA, S. P. et al. Dinitrogen fixation activity of *Azospirillum brasilense* in maize (*Zea mays*). **Current Science**, v.93, n.9, 2007.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.F.; SILVEIRA, A.P.D. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, n.11, p.1593-1600, 2007.

SHAH, T.M. et al. Radio sensitivity of various chickpea genotypes in M₁ generation I-laboratory studies. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, n.2, p.649-665, 2008.

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

SUBEDI, K.D.; MA, B.L. Assessment of some major yield-limiting factors on maize production in a humid temperate environment. **Field Crops Research**, v.110, n.1, p.21-26, 2009.

TABALDI, L.A. Avaliação bioquímica-fisiológica de clones de batata em relação ao alumínio. **Tese de Doutorado**, Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

ZAHIR, Z. A. et al. Substrate dependent microbially derived plant hormones for improving growth of maize seedlings. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.3, n.2, p.289-291, 2000.

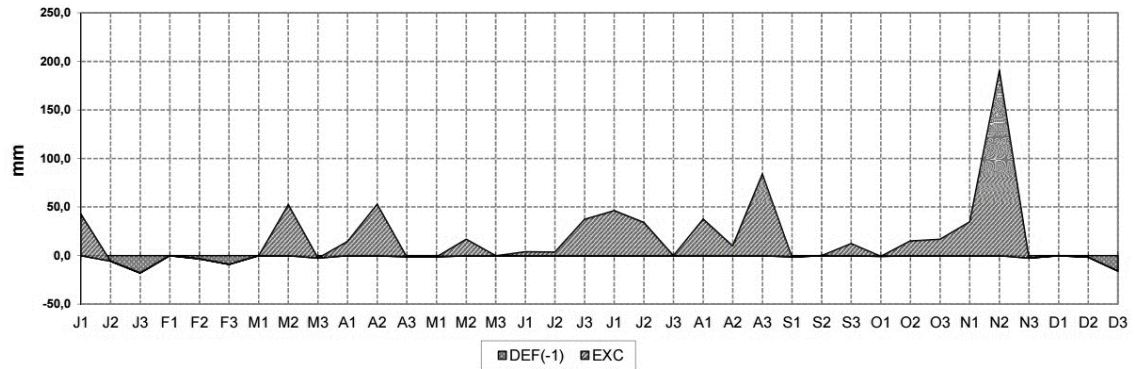
ANEXO A - Análise de solo da área experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Diagnóstico para acidez do solo e calagem						
Amostra	Nº registro	pH	H+Al cmol/dm ³	Al	Bases -----Saturação (%)-----	Índice SMP água 1:1
2013/14	29371	5,1	7,9		10,5	47,8
2014/15	17185	5,2	4,4		6,1	67,5
Diagnóstico para macronutrientes e recomendação de adubação NPK- S						
	% M.O.	% Argila	S	P-melich	CTC pH7	S K
	-----m/v-----		-----mg/dm ³ -----		cmol/dm ³	mg/dm ³
		-				
2013/14	2,2	33,5	25,0	17,3	14,7	84,0
2014/15	2,4	24,0	12,0	12,6	13,7	108,0

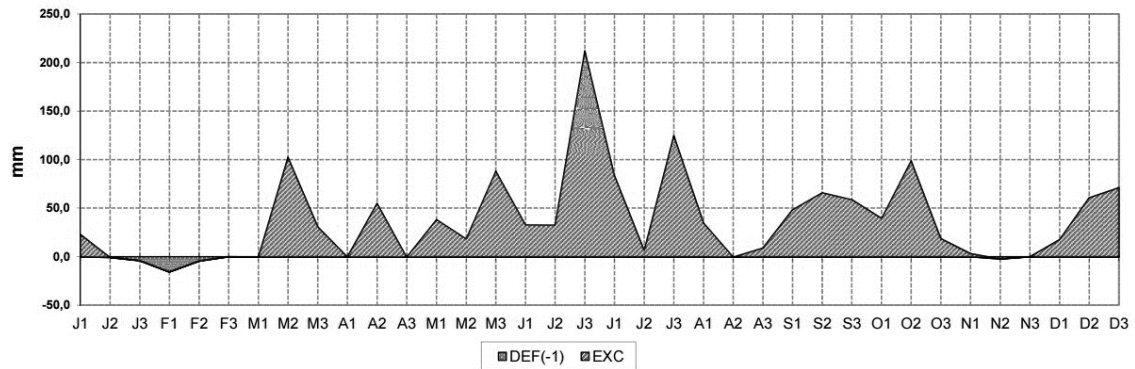
Laudo emitido pelo Laboratório de Análise de Solo da UFSM. Determinado em analisador elementar de combustão seca.

ANEXO B. Extrato do balanço hídrico normal por Thornthwait & Mather (1955), representado por decêndios para 2013 (a), 2014 (b) e 2015 (c) para Santa Maria (RS).

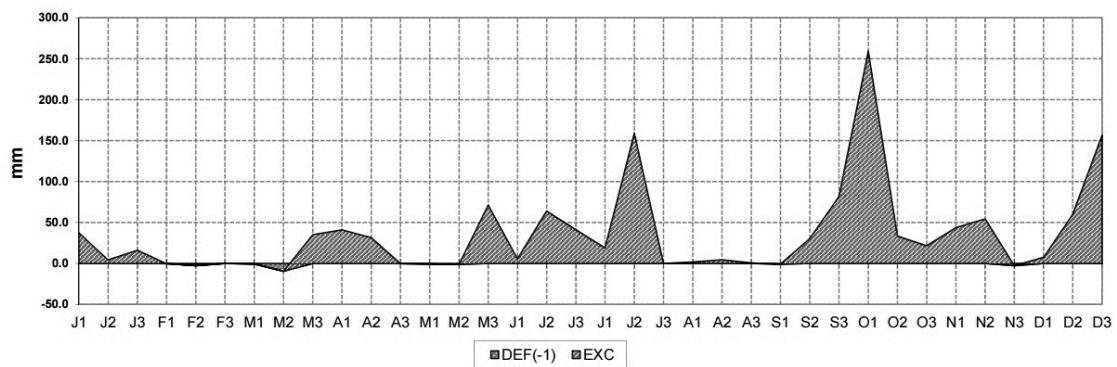
(A)



(B)



(C)



Adaptado de Rolim & Sentelhas (1998). Disponível em: <<https://geojurista.files.wordpress.com/2014/04/bhaua.xls>>. Dados das estações automáticas do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Disponível em: <<https://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep%2Fbdmep>>.

ANEXO C. Resumo da análise de variância para as variáveis de índice de área foliar (IAF), altura de planta (AP), altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de colmo (DC), índice relativo de clorofila (CL), número de espigas por planta (NE) dos híbridos, de milho, inoculados com *A. brasilense*, na safra 2013/14.

FV ¹	GL ³	IAF	AP	AE	DC	CL	NE
HS⁴ AG8025							
Valor de Pr>Fc		0,17	0,16	0,07	0,52	0,00	0,75
Inoculação	4	0,19	0,01	0,01	0,02	16,02**	0,00
Repetição	3	0,15	0,10	0,04	0,00	3,05	0,00
Erro	12	0,10	0,01	0,00	0,02	1,02	0,00
CV (%)		8,41	3,22	4,76	6,81	2,17	5,49
Média		3,75	2,25	1,31	2,03	46,41	0,94
HS AG9045							
Valor de Pr>Fc		0,06	0,27	0,58	0,70	0,40	0,02
Inoculação	4	0,28	0,00	0,00	0,01	6,86	0,00*
Repetição	3	0,05	0,00	0,01	0,08	39,82	0,01
Erro	12	0,08	0,00	0,00	0,01	6,28	0,00
CV (%) ²		8,22	1,77	4,48	5,56	5,22	3,36
Média		3,36	2,14	1,18	2,19	48,01	0,96
HD AG1051							
Valor de Pr>Fc		0,00	0,05	0,00	0,16	0,00	0,99
Inoculação	4	1,146 **	0,02*	0,02**	0,02	32,71**	0,00
Repetição	3	0,02	0,03	0,02	0,01	2,19	0,01
Erro	12	0,08	0,01	0,00	0,01	2,38	0,01
CV (%)		8,61	3,30	2,95	4,46	3,12	8,02
Média		3,24	2,17	1,21	2,08	49,37	0,92
HD AG2040							
Valor de Pr>Fc		0,51	0,56	0,06	0,03	0,00	0,21
Inoculação	4	0,04	0,01	0,01	0,04*	19,56**	0,01
Repetição	3	0,02	0,11	0,01	0,14	0,12	0,01
Erro	12	0,06	0,01	0,00	0,01	0,18	0,01
CV (%)		6,28	4,74	4,65	4,67	0,89	10,82
Média		3,59	2,10	1,22	2,25	47,68	0,76
HT AG5011							
Valor de Pr>Fc		0,27	0,04	0,06	0,03	0,17	0,15
Inoculação	4	0,09	0,02*	0,00	0,08*	18,72	0,01
Repetição	3	0,01	0,05	0,00	0,06	7,21	0,01
Erro	12	0,06	0,00	0,00	0,02	9,75	0,01
CV (%)		6,95	0,38	3,15	6,87	5,79	9,75
Média		3,52	2,03	1,18	2,03	53,95	0,86
HT AG8011							
Valor de Pr>Fc		0,11	0,07	0,04	0,46	0,00	0,04
Inoculação	4	0,25	0,01	0,01*	0,02	34,84**	0,01*
Repetição	3	0,09	0,02	0,00	0,06	1,46	0,00
Erro	12	0,11	0,00	0,00	0,02	1,81	0,00
CV (%)		9,75	2,99	3,12	5,98	2,69	6,61
Média		3,33	2,19	1,22	2,11	49,92	0,85

¹Fator de variação; ²Coefficiente de variação. ³Graus de liberdade. **Significativo a 1% de probabilidade ($p < 01$)
*significativo a 5% de probabilidade ($01 = < p > 05$). ⁴HS: híbrido simples; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo.

ANEXO D. Resumo da análise de variância para as variáveis de número de fileiras por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), número de grãos por espiga (GE), diâmetro de espiga (DE), comprimento de espiga (CE), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) dos híbridos, de milho, inoculados com *A. brasilense*, na safra 2013/14.

FV ¹	GL ³	NF	GF	GE	DE	CE	MMG	PG
HS⁴ AG8025								
Valor de Pr>Fc		0,06	0,02	0,00	0,07	0,01	0,00	0,15
Inoculação	4	0,47	6,25*	3398,14**	0,05	1,38**	703,55**	211483,45
Repetição	3	0,07	3,32	287,83	0,03	0,20	12,52	347254,62
Erro	12	0,15	1,40	271,08	0,02	0,21	16,41	101650,49
CV (%)		2,77	4,02	3,96	2,90	3,16	1,24	4,42
Média		14,18	29,42	415,98	4,47	14,61	327,57	7208,10
HS AG9045								
Valor de Pr>Fc		0,02	0,03	0,01	0,37	0,13	0,03	0,00
Inoculação	4	0,56*	18,36*	3633,71**	0,02	1,58	484,79*	2407603,23**
Repetição	3	0,13	1,94	818,83	0,04	0,73	84,22	338111,73
Erro	12	0,13	4,61	595,23	0,02	0,72	130,35	156958,06
CV (%) ²		2,70	6,77	5,69	3,37	5,54	3,75	5,31
Média		13,39	31,74	428,96	4,27	15,26	304,74	7458,10
HD AG1051								
Valor de Pr>Fc		0,00	0,09	0,17	0,19	0,02	0,00	0,06
Inoculação	4	0,40**	4,13	933,17	0,10	1,77*	168,42**	681082,34
Repetição	3	0,05	0,45	179,48	0,00	0,05	7,93	94716,74
Erro	12	0,06	1,56	481,34	0,01	0,37	22,33	228402,25
CV (%)		1,49	4,64	5,11	1,45	450,00	1,51	6,99
Média		15,95	26,93	429,50	4,92	13,47	312,42	6839,62
HD AG2040								
Valor de Pr>Fc		0,01	0,06	0,02	0,35	0,07	0,01	0,00
Inoculação	4	0,61**	4,24	1987,91*	0,03	1,21	609,04**	754718,57**
Repetição	3	0,74	2,20	543,78	0,03	0,63	161,03	110396,74
Erro	12	0,12	1,39	419,41	0,02	0,42	116,38	62419,78
CV (%)		2,32	3,99	4,64	3,44	4,44	4,05	5,54
Média		15,08	29,49	441,16	4,47	14,58	266,66	4509,35
HT AG5011								
Valor de Pr>Fc		0,50	0,00	0,02	0,24	0,00	0,01	0,00
Inoculação	4	0,42	28,50**	5317,15*	0,05	4,82**	720,58**	2721316,53**
Repetição	3	0,41	1,87	1038,92	0,04	0,16	50,61	300968,06
Erro	12	0,47	2,46	1217,77	0,03	0,30	136,32	90630,28
CV (%)		4,65	5,10	7,74	3,51	3,75	3,67	5,43
Média		14,67	30,75	450,95	4,88	14,52	318,32	5547,88
HT AG8011								
Valor de Pr>Fc		0,07	0,34	0,47	0,42	0,06	0,01	0,07
Inoculação	4	0,60	8,42	893,13	0,02	1,19	283,02**	2015127,14
Repetição	3	0,04	10,69	1114,94	0,00	0,81	273,37	174471,25
Erro	12	0,21	6,66	950,43	0,02	0,38	55,57	698132,06
CV (%)		2,69	7,58	5,22	3,01	4,35	2,96	12,14
Média		16,89	34,05	590,14	4,86	14,18	251,88	6880,40

¹Fator de variação; ²Coefficiente de variação. ³Graus de liberdade. **Significativo a 1% de probabilidade ($p < 01$) *significativo a 5% de probabilidade ($01 < p > 05$). ⁴HS: híbrido simples; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo.

ANEXO E. Resumo da análise de variância para as variáveis de índice de área foliar (IAF), altura de planta (AP), altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de colmo (DC), índice relativo de clorofila (CL), número de espigas por planta (NE) de seis híbridos, de milho, inoculados com *A. brasilense*, na safra 2014/15.

FV ¹	GL ³	IAF	AP	AE	DC	CL	NE
HS⁴ AG8025							
Valor de Pr>Fc		0,00	0,67	0,00	0,06	0,00	0,71
Inoculação	4	0,65**	0,00	0,03**	0,02	28,83**	0,01
Repetição	3	0,10	0,02	0,01	0,00	1,60	0,01
Erro	12	0,04	0,00	0,00	0,01	1,76	0,01
CV (%)		4,02	2,99	5,00	4,44	2,58	10,57
Média		4,65	1,91	1,09	1,96	51,37	0,98
HS AG9045							
Valor de Pr>Fc		0,01	0,50	0,00	0,00	0,53	0,24
Inoculação	4	0,23**	0,00	0,03**	0,06**	1,98	0,02
Repetição	3	0,03	0,01	0,01	0,00	3,85	0,01
Erro	12	0,04	0,00	0,00	0,01	2,37	0,01
CV (%) ²		4,59	3,71	5,01	4,86	2,97	11,87
Média		4,14	1,84	1,03	1,87	51,91	0,94
HD AG2040							
Valor de Pr>Fc		0,00	0,00	0,21	0,01	0,28	0,37
Inoculação	4	0,43**	0,03**	0,00	0,05**	11,08	0,01
Repetição	3	0,07	0,00	0,02	0,00	29,66	0,01
Erro	12	0,02	0,00	0,00	0,01	7,73	0,01
CV (%)		3,84	1,30	4,25	4,22	5,54	10,84
Média		4,05	2,16	1,24	2,23	50,23	0,94
HD Feroz							
Valor de Pr>Fc		0,00	0,00	0,28	0,06	0,16	0,51
Inoculação	4	0,09**	0,02**	0,01	0,03	8,20	0,01
Repetição	3	0,02	0,01	0,03	0,01	5,22	0,00
Erro	12	0,01	0,00	0,01	0,01	4,16	0,00
CV (%)		2,31	2,76	5,63	3,80	3,88	10,72
Média		3,82	2,20	1,35	1,99	52,53	0,94
HT BG7051							
Valor de Pr>Fc		0,00	0,39	0,11	0,12	0,00	0,12
Inoculação	4	0,30**	0,01	0,01	0,01	25,05**	0,01
Repetição	3	0,06	0,01	0,01	0,01	0,98	0,02
Erro	12	0,03	0,01	0,01	0,01	0,81	0,00
CV (%)		4,49	4,97	6,91	3,30	1,70	7,52
Média		3,73	1,99	1,13	2,27	52,81	0,88
HT BG7060							
Valor de Pr>Fc		0,03	0,17	0,07	0,00	0,04	0,01
Inoculação	4	0,20**	0,01	0,01	0,10**	16,69*	0,02**
Repetição	3	0,05	0,01	0,00	0,01	4,23	0,00
Erro	12	0,05	0,01	0,00	0,01	4,88	0,00
CV (%)		5,20	3,93	4,88	3,71	4,32	5,77
Média		4,39	2,13	1,14	2,02	51,18	0,92

¹Fator de variação; ²Coefficiente de variação. ³Graus de liberdade. **Significativo a 1% de probabilidade ($p < 01$) *significativo a 5% de probabilidade ($01 = < p > 05$). ⁴HS: híbrido simples; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo.

ANEXO F. Resumo da análise de variância para as variáveis de número de fileiras por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), número de grãos por espiga (GE), diâmetro de espiga (DE), comprimento de espiga (CE), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grãos (PG) dos híbridos, de milho, inoculados com *A. brasilense*, na safra 2014/15.

FV ¹	GL ³	NF	GF	GE	DE	CE	MMG	PG
HS⁴ AG9045								
Valor de Pr>Fc		0,00	0,01	0,01	0,00	0,07	0,19	0,00 **
Inoculação	4	0,67**	5,88**	925,37**	0,07**	1,53	164,05	4519805,33**
Repetição	3	0,06	1,98	93,47	0,00	0,36	80,51	473716,71
Erro	12	0,02	1,14	191,45	0,00	0,52	90,05	368741,10
CV (%) ²		1,10	3,68	3,42	0,74	4,79	2,43	7,20
Média		13,87	28,99	404,26	4,84	15,03	390,00	8432,58
HS AG8025								
Valor de Pr>Fc		0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32
Inoculação	4	0,44**	11,26**	1783,83**	0,05**	8,73**	470,73**	400699,28
Repetição	3	0,01	1,14	207,37	0,00	0,19	10,77	661395,25
Erro	12	0,02	1,93	183,87	0,00	0,64	40,05	306347,08
CV (%)		1,10	4,27	3,05	1,00	5,38	1,64	5,34
Média		14,10	31,79	444,71	4,96	14,81	386,82	10360,22
HD AG2040								
Valor de Pr>Fc		0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25
Inoculação	4	0,49**	16,49**	1746,70**	0,11**	5,28**	493,84**	1387432,19
Repetição	3	0,17	10,34	473,35	0,00	0,33	22,17	1181754,36
Erro	12	0,09	1,86	340,65	0,00	0,55	70,10	899247,80
CV (%)		1,90	5,06	4,41	0,86	4,76	2,24	10,03
Média		15,53	16,93	418,50	4,89	15,59	373,16	9452,98
HD Feroz								
Valor de Pr>Fc		0,23	0,00	0,02	0,05	0,00	0,01	0,88
Inoculação	4	0,44	16,51**	3170,99*	0,03*	1,89**	503,20**	351562,29
Repetição	3	0,18	4,77	1534,15	0,02	0,47	39,03	2884848,88
Erro	12	0,28	1,55	702,57	0,01	0,27	99,90	1238609,80
CV (%)		3,53	4,54	6,52	1,81	3,16	2,98	13,48
Média		14,85	27,39	406,77	4,81	16,47	335,35	8254,64
HT BG7051								
Valor de Pr>Fc		0,31	1,00	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00
Inoculação	4	0,34	0,09	389,20	0,12**	4,00**	1591,62**	3980848,39**
Repetição	3	0,13	1,50	458,30	0,00	1,21	377,08	27491,26
Erro	12	0,25	1,97	536,45	0,00	0,35	207,13	55797,60
CV (%)		3,33	4,82	5,27	1,00	3,86	4,15	3,00
Média		15,12	29,08	439,60	4,95	15,32	347,08	7867,09
HT BG7060								
Valor de Pr>Fc		0,00	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,33
Inoculação	4	0,88**	8,52*	786,43*	0,12**	2,92**	1184,95**	1507663,31
Repetição	3	0,05	1,53	173,83	0,00	0,14	148,52	321203,15
Erro	12	0,09	2,65	237,57	0,02	0,19	85,10	1171774,11
CV (%)		1,95	5,17	3,28	2,57	2,87	2,72	12,55
Média		15,12	31,48	469,48	4,92	14,99	339,72	862872,00

¹Fator de variação; ²Coefficiente de variação. ³Graus de liberdade. **Significativo a 1% de probabilidade ($p < 01$) *significativo a 5% de probabilidade ($01 < p > 05$). ⁴HS: híbrido simples; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo.

ANEXO G. Índice de área foliar (IAF), altura de planta (AP), altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de colmo (DC), clorofila total (CL) e número de espigas (NE) na aplicação de *A. brasilense* em híbridos simples (HS), duplo (HD) e triplo (HT), na safra 2013/14.

Inoculação	IAF m ²	AP m	AE m	DC cm	CL %	NE -
HS AG8025						
Controle	3,51 ^{ns}	2,17 ^{ns}	1,26 ^{ns}	1,98 ^{ns}	44,62 b*	0,92 ^{ns}
TS	3,77	2,24	1,40	2,14	45,11 b	0,94
V2	3,77	2,28	1,32	2,03	48,93 a	0,96
V2+V4	3,62	2,31	1,33	2,00	48,21 a	0,94
V4	4,09	2,23	1,25	2,00	45,17 b	0,96
Média	3,75	2,25	1,31	2,03	46,41	0,94
CV	8,41	3,22	4,76	6,81	2,17	5,49
HS AG9045						
Controle	3,04 ^{ns}	2,16 ^{ns}	1,17 ^{ns}	2,22 ^{ns}	46,45 ^{ns}	0,95 ^{ns}
TS	3,35	2,12	1,17	2,20	47,05	1,00
V2	3,22	2,14	1,17	2,11	47,90	0,95
V2+V4	3,76	2,11	1,16	2,22	49,14	0,91
V4	3,42	2,16	1,21	2,20	49,50	0,97
Média	3,36	2,14	1,18	2,19	48,01	0,96
CV	8,22	1,77	4,48	5,56	5,22	3,36
AG1051						
Controle	2,96 c	2,18 a	1,23 b	2,14 ^{ns}	48,74 a	0,92 ^{ns}
TS	3,51 b	2,24 a	1,15 c	2,11	50,92 a	0,92
V2	2,55 c	2,22 a	1,32 a	2,15	44,64 b	0,91
V2+V4	3,26 b	2,10 b	1,18 c	2,03	50,85 a	0,92
V4	3,96 a	2,10 b	1,17 c	2,01	51,69 a	0,93
Média	3,25	2,17	1,21	2,08	49,37	0,92
CV	8,61	3,3	2,95	4,46	3,12	8,02
AG2040						
Controle	3,42 ^{ns}	2,04 ^{ns}	1,20 ^{ns}	2,10 b	49,57 a	0,73 ^{ns}
TS	3,57	2,13	1,23	2,29 a	49,15 a	0,75
V2	3,66	2,11	1,17	2,30 a	44,29 c	0,79
V2+V4	3,69	2,07	1,22	2,19 a	46,61 b	0,85
V4	3,60	2,14	1,30	2,36 a	48,78 a	0,71
Média	3,59	2,10	1,22	2,25	47,68	0,76
CV	6,28	4,74	4,65	4,67	0,89	10,82
AG5011						
Controle	3,56 ^{ns}	2,11 ^{ns}	1,20 ^{ns}	2,08 a	55,10 ^{ns}	0,84 ^{ns}
TS	3,71	1,95	1,14	2,21 a	50,24	0,8
V2	3,54	2,03	1,19	2,09 a	55,4	0,86
V2+V4	3,30	2,07	1,15	1,93 b	53,82	0,87
V4	3,50	1,99	1,21	1,86 b	55,18	0,96
Média	3,52	2,03	1,18	2,03	53,95	0,86
CV	6,95	0,38	3,15	6,87	5,79	9,75
AG8011						
Controle	3,37 ^{ns}	2,27 ^{ns}	1,26 a	2,09 ^{ns}	53,49 a	0,86 b
TS	3,41	2,11	1,18 b	2,18	49,19 b	0,84 b
V2	3,05	2,2	1,24 a	2,11	45,60 c	0,80 b
V2+V4	3,13	2,2	1,22 a	2,01	51,60 a	0,82 b
V4	3,68	2,18	1,18 b	2,13	49,73 b	0,94 a
Média	3,33	2,19	1,22	2,1	49,92	0,85
CV	9,75	2,99	3,12	5,98	2,69	6,61

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Skott-Knott, a 5% de probabilidade. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação foliar no estágio V2; V2+V2: associação de aplicação foliar nos estádios V2 e V4; V4: aplicação foliar em V4, com *A. brasilense*.

ANEXO H. Médias das variáveis de número de fileiras por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), número de grãos por espiga (GE), comprimento de espiga (CE, cm), massa de mil grãos (MMG, g) e produtividade de grão (PG, kg ha⁻¹) dos híbridos de milho em função da aplicação de *A. brasilense*, avaliados na safra 2013/14.

Inoculação	NF	GF	GE	DE	CE	MMG	PG
	-	-	-	cm	cm	g	Kg ha ⁻¹
HS** AG8025							
Controle	13,73 ^{ns}	29,13 b*	390,84 b	4,46 ^{ns}	14,49 b	321,13 c	7521,95 ^{ns}
TS	14,60	30,60 a	446,94 a	4,42	14,46 b	336,08 b	7198,66
V2	14,20	27,60 b	381,63 b	4,42	13,83 b	323,60 c	7306,31
V2+V4	13,96	29,15 b	419,75 a	4,67	14,83 a	311,60 d	6901,45
V4	14,40	30,60 a	440,74 a	4,40	15,43 a	345,42 a	7112,12
Média	14,18	29,42	415,98	4,47	14,61	327,57	7208,10
CV	2,77	4,02	3,96	2,90	3,16	1,24	4,42
HS AG9045							
Controle	13,20 b	28,50 ^{ns}	376,58 b	4,28 ^{ns}	15,20 ^{ns}	298,60 b	6258,47 c
TS	13,40 b	31,85	444,44 a	4,25	15,60	289,46 b	7864,37 a
V2	13,33 b	33,27	430,99 a	4,19	14,35	305,52 a	8350,85 a
V2+V4	13,00 b	34,00	442,06 a	4,25	16,04	315,11 a	7381,01 b
V4	14,00 a	31,10	450,75 a	4,40	15,13	315,00 a	7435,81 b
Média	13,39	31,74	428,96	4,27	15,26	304,74	7458,1
CV	2,70	6,77	5,69	3,37	5,54	3,75	5,31
HD AG1051							
Controle	15,87 a	25,60 ^{ns}	406,15 ^{ns}	4,98 ^{ns}	13,05 b	323,78 a	7070,51 ^{ns}
TS	15,47 b	28,30	437,85	4,94	14,42 a	308,20 b	6644,78
V2	16,13 a	27,27	439,87	4,93	13,03 b	311,70 b	6358,57
V2+V4	16,30 a	27,11	441,81	4,85	13,93 a	308,85 b	6701,99
V4	16,00 a	26,35	421,81	4,91	12,93 b	309,56 b	7422,25
Média	15,95	26,93	429,5	4,92	13,47	312,42	6839,62
CV	1,49	4,64	5,11	1,45	450	1,51	6,99
HD AG2040							
Controle	15,40 a	29,27 ^{ns}	450,71 a	4,43 ^{ns}	15,10 ^{ns}	268,22 a	4822,14 ^{ns}
TS	14,80 b	28,40	402,99 b	4,46	14,63	248,02 b	4390,67
V2	15,60 a	28,87	450,24 a	4,60	14,31	282,74 a	4376,4
V2+V4	14,80 b	29,85	441,82 a	4,37	15,07	267,22 a	5036,99
V4	14,80 b	31,07	460,05 a	4,46	13,79	267,10 a	3920,52
Média	15,08	29,49	441,16	4,47	14,58	266,66	4509,35
CV	2,32	3,99	4,64	3,44	4,44	4,05	5,54
HT AG5011							
Controle	14,40 ^{ns}	30,20 b	435,00 b	4,70 ^{ns}	13,85 c	337,01 a	6360,95 ^{ns}
TS	14,50	31,25 b	453,44 b	4,93	15,18 b	324,32 a	4644,89
V2	14,75	34,60 a	510,40 a	4,97	16,14 a	313,09 b	6397,63
V2+V4	15,20	27,13 c	412,71 b	4,86	13,73 c	316,27 b	4825,85
V4	14,50	30,55 b	443,22 b	4,94	13,69 c	300,89 b	5520,08
Média	14,67	30,75	450,95	4,88	14,52	318,32	5547,88
CV	4,65	5,10	7,74	3,51	3,75	3,67	5,43
HT AG8011							
Controle	17,33 ^{ns}	33,05 ^{ns}	597,93 ^{ns}	4,92 ^{ns}	13,75 ^{ns}	239,00 b	6215,58 ^{ns}
TS	16,9	34,45	607,87	4,75	14,12	262,32 a	7783,61
V2	16,53	34,40	568,95	4,91	14,03	253,98 a	6237,84
V2+V4	17,2	32,30	582,51	4,82	13,88	250,72 a	6719,98
V4	16,46	36,07	593,43	4,91	15,12	253,38 a	7444,97
Média	16,89	34,05	590,13	4,86	14,18	251,88	6880,4
CV	2,69	7,58	5,22	3,01	4,35	2,96	12,14

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Skott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação via foliar no estádio V2; V2+V2: associação de aplicação foliar nos estádios V2 e V4; V4: aplicação foliar em V4, com *A. brasilense*. HS: híbrido simples; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo.

ANEXO I. Índice de área foliar (IAF), altura de planta (AP), altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de colmo (DC), clorofila total (CL) e número de espigas (NE) em híbridos simples (HS), duplo (HD) e triplo (HT) com aplicação de *A. brasilense*, avaliados na safra 2014/15.

Inoculação	IAF m ²	AP m	AE m	DC cm	CL %	NE -
HS AG8025						
Controle	4,23 c*	1,89 ^{ns}	1,02 c	2,06 ^{ns}	50,63 c	0,94 ^{ns}
TS	4,58 b	1,89	1,04 c	2,02	48,62 c	0,99
V2	4,68 b	1,92	1,24 a	1,89	52,85 b	1,01
V2+V4	5,30 a	1,94	1,04 c	1,91	49,51 c	1,03
V4	4,45 b	1,91	1,13 b	1,91	55,25 a	0,95
Média	4,65	1,91	1,09	1,96	51,37	0,98
CV	4,02	2,99	5,00	4,44	2,58	10,57
HS AG9045						
Controle	4,49 a	1,89 ^{ns}	1,00 b	1,78 b	51,35 ^{ns}	0,83 ^{ns}
TS	4,26 a	1,81	0,97 b	1,74 b	51,06	0,93
V2	3,98 b	1,84	1,00 b	1,83 b	52,74	1,02
V2+V4	3,89 b	1,82	1,17 a	2,02 a	52,41	0,97
V4	4,05 b	1,83	0,98 b	1,98 a	52,00	0,96
Média	4,14	1,84	1,03	1,87	51,91	0,94
CV	4,59	3,71	5,01	4,86	2,97	11,87
HD AG2040						
Controle	4,49 a	2,12 c	1,22 ^{ns}	2,28 a	50,49 ^{ns}	0,90 ^{ns}
TS	4,26 a	2,28 a	1,29	2,12 b	50,04	0,92
V2	3,93 b	2,17 b	1,25	2,37 a	52,88	0,88
V2+V4	3,65 c	2,04 d	1,21	2,11 b	49,25	0,99
V4	3,91 b	2,18 b	1,22	2,25 a	48,50	1,01
Média	4,05	2,16	1,24	2,23	50,23	0,94
CV	3,84	1,30	4,25	4,22	5,54	10,84
HD Feroz						
Controle	3,95 a	2,08 b	1,39 ^{ns}	2,13 ^{ns}	50,20 ^{ns}	0,86 ^{ns}
TS	4,00 a	2,16 b	1,28	1,93	53,16	0,94
V2	3,67 b	2,25 a	1,36	1,94	52,53	0,96
V2+V4	3,73 b	2,21 a	1,39	1,94	52,70	0,98
V4	3,74 b	2,28 a	1,35	2,03	54,06	0,97
Média	3,82	2,20	1,35	1,99	52,53	0,94
CV	2,31	2,76	5,63	3,80	3,88	10,72
HT BG7051						
Controle	3,68 b	2,00 ^{ns}	1,17 ^{ns}	2,32 ^{ns}	53,28 b	0,89 ^{ns}
TS	3,31 c	1,98	1,06	2,30	54,20 a	0,85
V2	3,94 a	1,99	1,22	2,32	55,00 a	0,96
V2+V4	4,01 a	1,92	1,09	2,23	48,56 c	0,90
V4	3,72 b	2,08	1,12	2,20	53,00 b	0,82
Média	3,73	1,99	1,13	2,27	52,81	0,88
CV	4,49	4,97	6,91	3,30	1,70	7,52
HT BG7060						
Controle	4,72 ^{ns}	2,22 ^{ns}	1,15 ^{ns}	2,16 a	51,05 ^{ns}	0,91 b
TS	4,49	2,18	1,18	2,08 a	54,12	0,95 a
V2	4,16	2,08	1,11	2,13 a	49,10	0,84 b
V2+V4	4,36	2,10	1,08	1,99 b	49,50	0,88 b
V4	4,22	2,10	1,19	1,77 c	52,12	1,01 a
Média	4,39	2,13	1,14	2,02	51,18	0,92
CV	5,20	3,93	4,88	3,71	4,32	5,77

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Skott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação via foliar no estádio V2; V2+V2: associação de aplicação foliar nos estádios V2 e V4; V4: aplicação foliar em V4, com *A. brasilense*.

ANEXO J. Número de fileiras por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), número de grãos por espiga (GE), comprimento de espiga (CE), massa de mil grãos (MMG) e produtividade de grão (PG) dos híbridos de milho, simples (HS), duplo (HD) e triplo (HT), em função da aplicação de *A. brasilense*, avaliados na safra 2014/15.

Inoculação	NF	GF	GE	DE	CE	MMG	PG
	-	-	-	cm	cm	g	kg ha ⁻¹
AG8025							
Controle	14,20 b	31,57 b	448,23 b	5,07 a	14,38 b	377,13 b	10296,85 ^{ns}
TS	13,89 c	31,13 b	419,35 c	5,01 a	14,57 b	378,70 b	9872,64
V2	13,80 c	32,67 a	450,83 b	4,92 b	14,42 b	385,95 b	10546,56
V2+V4	14,00 c	33,90 a	474,57 a	4,80 c	17,31 a	387,91 b	10372,59
V4	14,63 a	29,43 b	430,59 c	5,02 a	13,37 b	404,40 a	10712,46
Média	14,10	31,74	444,71	4,96	14,81	386,82	10360,22
CV	1,10	4,27	3,05	1,00	5,38	1,64	5,34
AG9045							
Controle	14,42 a	28,88 b	416,46 a	4,94 a	14,82 ^{ns}	395,58 ^{ns}	9641,75 a
TS	13,60 b	28,60 b	388,97 b	4,82 b	15,15	382,02	8344,55 b
V2	13,57 b	30,33 a	411,53 a	4,96 a	14,22	388,47	9226,67 a
V2+V4	14,20 a	27,23 b	386,66 b	4,63 c	15,05	386,54	6933,99 c
V4	13,57 b	29,90 a	417,68 a	4,87 b	15,93	397,41	8015,92 b
Média	13,87	28,99	404,26	4,84	15,03	390,00	8432,58
CV	1,10	3,68	3,42	0,74	4,79	2,43	7,20
AG2040							
Controle	15,73 a	27,53 a	418,29 a	4,90 b	15,49 b	371,28 a	9581,54 ^{ns}
TS	15,00 b	28,25 a	440,74 a	4,73 c	15,63 b	356,13 b	10198,62
V2	15,93 a	26,35 a	419,68 a	4,77 c	15,70 b	386,79 a	9722,74
V2+V4	15,55 a	23,70 b	368,28 b	4,92 b	13,95 c	375,30 a	8671,43
V4	15,45 a	28,83 a	445,49 a	5,15 a	17,19 a	376,28 a	9090,57
Média	15,53	26,93	418,5	4,89	15,59	373,16	9452,98
CV	1,90	5,06	4,41	0,86	4,76	2,24	10,03
Feroz							
Controle	14,93 ^{ns}	25,19 b	376,21 b	4,94 ^{ns}	15,67 b	322,12 b	8585,47 ^{ns}
TS	15,03	25,27 b	380,54 b	4,83	17,20 a	324,93 b	7928,45
V2	14,47	28,23 a	408,25 a	4,76	16,49 a	346,43 a	8421,31
V2+V4	15,28	28,63 a	437,48 a	4,73	15,90 b	337,91 a	8384,93
V4	14,57	29,61 a	431,35 a	4,82	17,10 a	344,85 a	7953,05
Média	14,85	27,39	406,77	4,81	16,47	335,25	8254,64
CV	3,53	4,54	6,52	1,81	3,16	2,98	13,48
BG7051							
Controle	14,95	29,07 ^{ns}	434,64 ^{ns}	5,25 a	15,60 b	364,20 a	7588,77 c
TS	15,6	29,18	455,01	4,87 c	14,12 c	371,61 a	9190,42 a
V2	15,00	29,10	436,71	4,83 c	15,43 b	325,12 b	8001,52 b
V2+V4	14,87	28,83	442,53	4,84 c	16,77 a	340,51 b	8125,47 b
V4	15,18	29,20	429,10	4,94 b	14,70 c	333,97 b	6429,26 d
Média	15,12	29,08	439,60	4,95	15,32	347,08	7867,09
CV	3,33	4,82	5,27	1,00	3,86	4,15	3,00
BG7060							
Controle	15,28 b	30,30 a	462,94 b	5,15 a	14,62 b	324,38 b	8053,15 ^{ns}
TS	15,53 b	29,73 b	461,38 b	4,81 b	15,98 a	353,02 a	8144,81
V2	15,37 b	31,60 a	469,21 b	4,80 b	14,27 b	327,10 b	8630,48
V2+V4	14,33 b	33,10 a	460,08 b	4,77 b	14,24 b	331,13 b	8720,07
V4	15,10 b	32,70 a	493,76 a	5,06 a	15,83 a	362,95 a	9595,09
Média	15,12	31,48	469,47	4,92	14,99	339,71	8628,72
CV	1,95	5,17	3,28	2,57	2,87	2,72	12,55

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Skott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação via foliar no estádio V2; V2+V2: associação de aplicação foliar nos estádios V2 e V4; V4: aplicação foliar em V4, com *A. brasilense*.

ANEXO L. Resumo da análise de variância das variáveis de área foliar (AF), massa seca foliar (MS), teor de clorofila (CL), carotenoides (CA), superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD), conteúdo de ácido tiobarbitúrico (T-Bars) e nitrato redutase (NR), dos híbridos de milho submetidos a inoculação com *A. brasilense* via semente e foliar.

FV ¹	GL ³	AF	MS	CL	CA	SOD	POD	T-BARS	NR
AG9045									
Valor de Pr>Fc		0,03	0,50	0,01	0,00	0,14	0,00	0,00	0,01
Inoculação	2	100,29	0,00	0,06	0,00	10,35	0,32	0,28	636676,49
Erro	6	21,21	0,00	0,00	0,00	3,80	0,00	0,00	63532,19
CV (%) ²		12,26	3,46	8,53	7,31	20,83	7,77	3,28	5,64
Média		37,58	1,90	0,75	0,13	9,36	0,75	2,03	4470,92
AG8025									
Valor de Pr>Fc	-	0,01	0,74	0,87	0,30	0,00	0,00	0,85	0,04
Inoculação	2	150,65	0,00	0,00	0,00	869,39	0,32	0,04	813811,46
Erro	6	18,90	0,00	0,00	0,00	51,36	0,00	0,01	134244,43
CV (%)		9,32	1,43	4,61	3,45	13,13	3,47	4,30	8,49
Média		46,64	1,92	0,81	0,14	54,58	0,99	2,33	4316,30
AG2040									
Valor de Pr>Fc	-	0,01	0,30	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,05
Inoculação	2	106,01	0,02	0,04	0,00	506,59	1,91	1,14	336210,29
Erro	6	13,87	0,02	0,00	0,00	41,67	0,13	0,00	65661,36
CV (%)		5,39	6,45	6,07	5,78	14,49	21,44	2,39	5,35
Média		69,16	1,95	0,65	0,13	44,56	1,70	2,57	4787,59
Feroz									
Valor de Pr>Fc		0,02	0,66	0,73	0,53	0,00	0,00	0,84	0,00
Inoculação	2	256,02	0,00	0,00	0,00	1694,46	0,11	0,23	3362105,99
Erro	6	45,86	0,00	0,00	0,00	26,37	0,00	0,06	67707,91
CV (%)		15,60	2,87	7,25	6,83	11,14	6,69	11,91	5,11
Média		43,42	1,95	0,96	0,15	46,08	0,98	2,06	5089,44
BG7060									
Valor de Pr>Fc		0,00	0,90	0,05	0,88	0,00	0,00	0,00	0,01
Inoculação	2	397,37	0,01	0,05	0,00	462,31	0,17	0,45	1044437,92
Erro	6	32,83	0,00	0,01	0,00	13,62	0,00	0,02	98160,45
CV (%)		26,74	2,45	14,97	10,55	19,48	6,07	5,92	5,87
Média		21,43	1,83	0,65	0,11	18,95	0,97	2,28	5335,74
BG7051									
Valor de Pr>Fc		0,00	0,37	0,01	0,00	0,00	0,04	0,01	0,31
Inoculação	2	211,56	0,00	0,02	0,00	476,96	0,04	0,65	568201,63
Erro	6	20,29	0,00	0,00	3,33	18,46	0,01	0,06	398008,41
CV (%)		19,42	1,70	6,20	0,45	17,83	8,83	9,77	14,15
Média		23,20	1,85	0,72	0,13	24,10	0,94	2,51	4457,96

¹Fator de variação; ²Coefficiente de variação. ³Graus de liberdade. **Significativo a 1% de probabilidade ($p < 01$)
*significativo a 5% de probabilidade ($01 = < p > 05$).

ANEXO M. Resumo da análise de variância para as variáveis morfológicas de comprimento de raiz (CR), área projetada (AP), área superficial (AS), diâmetro de raiz (DR), volume de raiz (VR), número de ramificações (NRA) e massa seca (MS) da parte radicular dos híbridos de milho inoculados com *A.brasilense*.

FV ¹	GL ³	CR	AP	AS	DR	VR	NRA	MS
AG9045								
Valor de Pr>Fc		0,22	0,18	0,18	0,7	0,14	0,01	0,44
Inoculação	2	30552,93	138,28	1217,82	0,00	0,33	389194,75	0,35
Erro	12	15609,64	58,70	516,87	0,00	0,12	30355,08	0,38
CV (%) ²		22,53	23,10	21,28	2,54	21,49	23,87	38,02
Média		554,47	33,17	106,84	0,64	1,61	729,83	1,61
AG8025								
Valor de Pr>Fc		0,00	0,00	0,00	0,95	0,00	0,00	0,00
Inoculação	2	41040,15	132,34	1306,94	0,00	0,22	881911,00	0,00
Erro	12	1153,45	1,48	14,64	0,00	0,01	9260,25	0,00
CV (%)		5,86	3,59	3,59	7,80	5,71	6,61	0,36
Média		579,93	33,91	106,53	0,57	1,64	1455,83	1,86
AG2040								
Valor de Pr>Fc		0,02	0,03	0,03	0,62	0,89	0,00	0,01
Inoculação	2	163964,83	336,86	3323,08	0,00	0,37	260825,00	0,00
Erro	12	19361,42	47,24	466,01	0,00	0,10	110622,00	0,00
CV (%)		12,98	10,96	10,95	8,21	10,86	14,23	1,14
Média		1071,75	62,72	197,06	0,60	2,89	2338,00	1,85
Feroz								
Valor de Pr>Fc		0,04	0,09	0,87	0,90	0,34	0,14	0,08
Inoculação	2	23074,78	70,84	698,54	0,00	0,07	146668,53	0,00
Erro	12	3794,92	18,78	185,53	0,00	0,05	53083,53	0,00
CV (%)		9,14	10,87	10,87	7,32	12,73	17,44	1,60
Média		673,82	39,88	125,29	0,60	1,79	1321,06	1,88
BG7060								
Valor de Pr>Fc		0,52	0,66	0,07	0,08	0,01	0,31	0,04
Inoculação	2	1107,15	14,40	142,15	0,00	0,08	112944,25	0,00
Erro	12	1517,39	3,25	32,10	0,00	0,01	78930,42	0,00
CV (%)		8,75	6,35	6,35	3,29	6,02	34,05	1,33
Média		445,39	28,40	89,22	0,66	1,43	825,17	1,82
BG7051								
Valor de Pr>Fc		0,58	0,27	0,27	0,12	0,09	0,90	0,46
Inoculação	2	375,44	5,81	57,34	0,00	0,07	37134,75	0,00
Erro	12	631,39	3,55	34,99	0,00	0,02	9987,83	0,00
CV (%)		6,21	6,66	6,66	5,26	8,62	14,28	1,57
Média		404,68	28,29	88,86	0,69	1,56	700,00	1,79

¹Fator de variação; ²Coefficiente de variação. ³Graus de liberdade. **Significativo a 1% de probabilidade (p < 01)
*significativo a 5% de probabilidade (01 = < p > 05).

ANEXO N. Resumo da análise de variância da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD), conteúdo de ácido tiobarbitúrico (T-Bars) e nitrato redutase (NR) da parte radicular dos híbridos de milho inoculados com *A. brasilense*.

FV ¹	GL ³	SOD	POD	T-BARS	NR
AG9045					
Valor de Pr>Fc		0,00	0,00	0,07	0,90
Inoculação	2	94,26	0,40	48,32	2911,47
Erro	12	5,18	0,01	14,52	27268,44
CV (%) ²		25,21	15,45	46,43	10,43
Média		9,03	0,62	8,21	1582,96
AG8025					
Valor de Pr>Fc		0,00	0,00	0,53	0,00
Inoculação	2	1522,69	0,54	2,55	1251117,61
Erro	12	15,38	0,01	3,91	92396,24
CV (%)		17,07	16,46	33,90	15,65
Média		22,97	0,56	5,83	2074,94
AG2040					
Valor de Pr>Fc		0,01	0,00	0,00	0,54
Inoculação	2	16,26	0,07	209,67	14024,03
Erro	12	2,30	0,01	3,48	21282,27
CV (%)		18,71	8,68	15,19	8,38
Média		8,10	0,84	12,28	1740,99
Feroz					
Valor de Pr>Fc		0,55	0,03	0,00	0,56
Inoculação	2	8,68	0,11	298,87	24053,83
Erro	12	13,87	0,01	4,50	32891,84
CV (%)		35,11	16,98	21,67	9,72
Média		10,61	0,89	9,79	1866,22
BG7060					
Valor de Pr>Fc		0,27	0,00	0,00	0,08
Inoculação	2	5,44	0,21	679,97	134581,48
Erro	12	3,77	0,01	35,35	38437,47
CV (%)		18,59	15,72	45,12	9,77
Média		10,45	0,77	13,18	2007,55
BG7051					
Valor de Pr>Fc		0,00	0,00	0,00	0,54
Inoculação	2	55,12	0,75	4491,61	29045,82
Erro	12	5,79	0,01	366,28	44014,62
CV (%)		23,81	11,99	71,72	11,36
Média		10,10	0,92	26,69	1847,37

¹Fator de variação; ²Coefficiente de variação. ³Graus de liberdade. **Significativo a 1% de probabilidade (p < 01)
*significativo a 5% de probabilidade (01 = < p > 05).

ANEXO O. Resposta foliar para as variáveis de clorofila total, carotenoides, e área foliar (AF) dos híbridos de milho inoculados com *A. brasilense*.

Tratamento	Clorofila total mg/g FW	Carotenoides mg/g FW	AF cm ²
AG9045			
Controle	0,65 b	0,11 b	41,65 a
TS	0,69 b	0,12 b	38,30 a
V2	0,91 a	0,15 a	32,78 b
CV (%)	8,53	7,31	12,26
Média Geral	0,75	0,13	37,58
AG8025			
Controle	0,803 ^{ns}	0,14 ^{ns}	52,93 a
TS	0,816	0,14	42,86 b
V2	0,801	0,13	44,11 b
CV (%)	4,61	3,45	9,32
Média Geral	0,81	0,14	46,64
AG2040			
Controle	0,73 a	0,14 a	67,50 b
TS	0,51 c	0,10 b	65,63 b
V2	0,70 b	0,14 a	74,37 a
CV (%)	6,07	5,78	5,39
Média Geral	0,65	0,13	69,16
Feroz			
Controle	0,98 ^{ns}	0,15 ^{ns}	35,39 b
TS	0,96	0,16	45,77 a
V2	0,93	0,15	49,10 a
CV (%)	7,25	6,83	15,60
Média Geral	0,96	0,15	43,42
BG7060			
Controle	0,72 a	0,12 ^{ns}	28,83 a
TS	0,71 a	0,12	23,91 a
V2	0,50 b	0,10	11,53 b
CV (%)	14,97	10,55	26,74
Média Geral	0,65	0,11	21,43
BG7051			
Controle	0,82 a	0,14 a	28,02 a
TS	0,68 b	0,12 b	25,77 a
V2	0,65 b	0,12 b	15,80 b
CV (%)	6,2	0,45	19,42
Média Geral	0,72	0,13	23,20

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação via foliar no estágio V2 de *A. brasilense*.

ANEXO P. Níveis de MDA (T-Bars) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) guaiacol peroxidase (POD) e nitrato redutase (NR) na parte aérea de híbridos de milho inoculados com *A. brasilense*.

Tratamento	T-BARS nmol MDA mg ⁻¹ de proteína	SOD U mg ⁻¹ proteína	POD U mg ⁻¹ proteína	NR μM de NO ₂ ⁻ g MF ⁻¹ h ⁻¹
AG9045				
Controle	2,02 b	7,3 ^{ns}	0,42 c	4961,67 a
TS	2,34 a	10,91	0,74 b	4047,78 b
V2	1,73 c	9,88	1,07 a	4403,33 b
CV (%)	3,28	20,83	7,77	5,64
Média Geral	2,03	9,36	0,75	4470,92
AG8025				
Controle	2,4595 ^{ns}	63,10 a	0,75 c	4911,67 a
TS	2,3028	34,98 b	0,85 b	3945,00 b
V2	2,2392	65,66 a	1,36 a	4092,22 b
CV (%)	4,3	13,13	3,47	8,49
Média Geral	2,33	54,58	0,99	4316,30
AG2040				
Controle	2,46 b	58,86 a	1,11 b	5125,55 ^{ns}
TS	3,24 a	41,37 b	1,39 b	4456,11
V2	2,02 c	33,46 b	2,61 a	4781,11
CV (%)	2,39	14,49	21,44	5,35
Média Geral	2,57	44,56	1,7	4787,59
Feroz				
Controle	1,87 ^{ns}	23,70 c	1,00 b	6308,89 a
TS	2,38	71,03 a	0,78 c	4406,11 b
V2	1,93	43,51 b	1,16 a	4553,33 b
CV (%)	11,91	11,14	6,69	5,11
Média Geral	2,06	46,08	0,98	5089,44
BG7060				
Controle	2,73 a	20,64 b	0,69 b	5903,33 a
TS	2,11 b	5,91 c	1,11 a	5378,33 b
V2	2,01 b	30,29 a	1,10 a	4725,56 b
CV (%)	5,92	19,48	6,07	5,87
Média Geral	2,28	18,95	0,97	5335,74
BG7051				
Controle	2,27 b	32,49 a	0,90 ^{ns}	4950,56 ^{ns}
TS	3,04 a	30,20 a	0,85	4125,57
V2	2,21 b	9,60 b	1,08	4297,78
CV (%)	9,77	17,83	8,83	14,15
Média Geral	2,51	24,1	0,94	4457,96

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação via foliar no estádio V2 de *A. brasilense*.

ANEXO Q. Comprimento de raiz (CR), área projetada (AP), área superficial (AS), diâmetro (DR), volume (VR), número de ramificações (NRA) e massa seca (MS) das raízes dos híbridos de milho inoculados com *A. brasilense* via semente e folha.

Híbridos	CR cm	AP cm ²	AS cm ²	DR cm	VR cm ³	NRA -	MS g
AG9045							
Controle	659,53 ^{ns}	40,91 ^{ns}	128,53 ^{ns}	0,65 ^{ns}	1,99 ^{ns}	564,50 b	1,83 ^{ns}
TS	545,61	30,36	103,30	0,64	1,47	1143 a	1,80
V2	458,28	28,23	88,70	0,64	1,37	482 b	1,811
CV	22,53	23,10	21,28	2,54	21,49	23,87	38,02
Média	554,47	33,17	106,84	0,64	1,61	729,83	1,61
AG8025							
Controle	573,44 b	32,54 b	102,21 b	0,57 ^{ns}	1,45 b	1251, 50 b	1,86 a
TS	700,00 a	41,13 a	129,22 a	0,57	1,95 a	2070,50 a	1,81 c
V2	466,35 c	28,06 c	88,15 c	0,58	1,51 b	1045,50 c	1,84 b
CV	5,86	3,59	3,59	7,8	5,71	6,61	0,36
Média	579,93	33,91	106,53	0,57	1,64	1455,83	1,86
AG2040							
Controle	813,23 b	50,75 b	159,45 b	0,61 ^{ns}	2,49 ^{ns}	1263 b	1,89 a
TS	1268,33 a	70,89 a	222,70 a	0,60	3,12	2823 a	1,81 b
V2	1133,68 a	66,53 a	209,02 a	0,58	3,07	2928 a	1,86 a
CV	12,98	10,96	10,95	8,21	10,86	14,23	1,14
Média	1071,75	62,72	197,06	0,6	2,89	2338	1,85
Feroz							
Controle	583,75 ^{ns}	34,733 ^{ns}	109,12 ^{ns}	0,60 ^{ns}	1,62 ^{ns}	1238 ^{ns}	1,85 ^{ns}
TS	678,79	40,53	127,33	0,60	1,91	1153,50	1,92
V2	758,94	44,38	139,43	0,59	1,84	1571,67	1,88
CV	9,14	10,87	10,87	7,32	12,73	17,44	1,60
Média	673,82	39,88	125,29	0,60	1,79	1321,06	1,88
BG7060							
Controle	432,34 ^{ns}	27,19 ^{ns}	85,43 ^{ns}	0,63 ^{ns}	1,34 b	1001 ^{ns}	1,79 b
TS	467,45	30,93	97,16	0,66	1,61 a	857,50	1,86 a
V2	436,38	27,07	85,06	0,68	1,32 b	617	1,80 b
CV	8,75	6,35	6,35	3,29	6,02	34,05	1,33
Média	445,39	28,4	89,22	0,66	1,43	825,17	1,82
BG7051							
Controle	417,09 ^{ns}	28,15 ^{ns}	88,44 ^{ns}	0,67 ^{ns}	1,50 ^{ns}	645,50 ^{ns}	1,80 ^{ns}
TS	401,59	29,74	93,43	0,73	1,73	626,50	1,79
V2	395,36	26,97	84,72	0,66	1,45	828	1,77
CV	6,21	6,66	6,66	5,26	8,62	14,28	1,57
Média	404,68	28,29	88,86	0,69	1,56	700	1,79

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação via foliar no estádio V2 de *A. brasilense*.

ANEXO R. Enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD) e nitrato redutase (NR), e níveis de MDA (T-bars) das raízes dos híbridos de milho inoculados com *A. brasilense* via semente e folha.

Híbridos	T-BARS nmol MDA mg ⁻¹ de proteína	SOD U mg ⁻¹ proteína	POD U mg ⁻¹ proteína	NR μM de NO ₂ ⁻ g MF ⁻¹ h ⁻¹
AG9045				
Controle	5,05 ^{ns}	13,25 a	0,35 c	1606,11 ^{ns}
TS	11,27	9,26 b	0,92 a	1589,44
V2	8,30	4,58 c	0,58 b	1553,32
CV	46,43	25,21	15,45	10,43
Média	8,21	9,03	0,62	1582,96
AG8025				
Controle	5,10 a	43,06 ^{ns}	0,18 b	1936,67 b
TS	6,52 a	11,58	0,72 a	2690,37 a
V2	5,88 a	14,27	0,78 a	1597,78 b
CV	33,9	17,07	16,46	14,65
Média	5,83	22,97	0,56	2074,94
AG2040				
Controle	19,74 a	6,90 b	0,70 b	1805,19 ^{ns}
TS	8,95 b	7,24 b	0,92 a	1729,26
V2	8,15 b	10,18 a	0,89 a	1688,52
CV	15,19	18,71	8,68	8,38
Média	12,28	8,1	0,84	1740,99
Feroz				
Controle	5,62 b	12,01 ^{ns}	0,73 b	1767,92 ^{ns}
TS	18,71 a	9,40	0,89 a	1973,70
V2	5,04 b	10,41	1,03 a	1952,10
CV	21,67	35,11	16,98	9,72
Média	9,79	10,61	0,89	1866,22
BG7060				
Controle	26,64 a	9,30 ^{ns}	0,88 a	2206,42 ^{ns}
TS	6,22 b	10,72	0,54 b	1845,00
V2	6,66 b	11,33	0,91 a	1971,23
CV	45,12	18,59	15,72	9,77
Média	13,18	10,45	0,77	2007,55
BG7051				
Controle	61,29 a	13,93 a	0,47 b	1914,45 ^{ns}
TS	9,54 b	8,13 b	1,15 a	1751,48
V2	9,23 b	8,24 b	1,13 a	1876,17
CV	71,72	23,81	11,99	11,36
Média	26,69	10,1	0,92	1847,37

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Controle: sem inoculação; TS: inoculação na semente; V2: aplicação via foliar no estádio V2 de *A. brasilense*.