

## INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* E *Bacillus megaterium* EM SEMENTES DE MILHO

INOCULATION WITH *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*  
AND *Bacillus megaterium* IN CORN SEEDS

INOCULACIÓN CON *Azospirillum Brasilense*, *Trichoderma Harzianum*, *Bacillus Subtilis*  
Y *Bacillus Megaterium* EN SEMILLAS DE MAÍZ

**Alaerte Olbermann de Oliveira<sup>1</sup>; Andreia Cristina Peres R. da Costa<sup>2</sup>; Valdir Zucareli<sup>2</sup>**

1. Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade – PSU.
2. Docentes do Departamento de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual de Maringá, Campus Regional de Umuarama, PR.

### RESUMO

Objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da inoculação e coinoculação com os microrganismos *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, e *Bacillus megaterium* na germinação de sementes e nos componentes de produção do milho. Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro realizado em laboratório e o segundo a campo. O Experimento 1 foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com oito tratamentos e quatro repetições de 20 sementes. Utilizou-se a cultivar 30F53 da Pioneer<sup>®</sup>. Para a inoculação e coinoculação foram utilizados os produtos BiomaMais<sup>®</sup>, StimuControl<sup>®</sup> e BiomaPhos<sup>®</sup>, as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos e nele foram adicionadas as doses de cada tratamento. A dose utilizada foi de 80 ml ha<sup>-1</sup> de *Azospirillum brasilense*; 92 ml ha<sup>-1</sup> de *Trichoderma harzianum* e do produto BiomaPhos<sup>®</sup>. Estas foram dispostas sobre papel *Germitest*<sup>®</sup> umedecido 2,5 vezes o peso do papel e mantidas em câmara de germinação. Após por sete dias, foram avaliadas a germinação, o comprimento de parte aérea e raiz. Para avaliar o índice de velocidade de emergência (IVG), foram semeadas 50 sementes de milho com os tratamentos em três folhas de papel *Germitest*, sendo os procedimentos os mesmos realizados no teste de germinação. O Experimento 2 foi em delineamento experimental de blocos casualizados (DBC), com oito tratamentos e três repetições de 40m<sup>2</sup>. A semeadura do milho foi realizada no sistema convencional. Empregou-se espaçamento de 45 cm, com 4 linhas cada parcela de 20 m de comprimento, semeadura de 3 plantas m<sup>-1</sup>. A inoculação e coinoculação seguiu o mesmo procedimento que no experimento um. Foram determinados os componentes de produtividade. O tratamento T5 resultaram em maior germinação e comprimento de raiz. A inoculação com T3 acarretou maior desenvolvimento da parte aérea das plântulas. O tratamento T8 apresentou maior rendimento de grãos.

**Palavras-Chave:** bactérias diazotróficas; tratamento de sementes; produtividade.

## ABSTRACT

*The aim of this study was to evaluate the effects of inoculation and coinoculation with the microorganisms *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus megaterium* on seed germination and on maize production components. Two experiments were carried out, the first in the laboratory and the second in the field. Experiment 1 was carried out in a completely randomized design (DIC) with eight treatments and four replications of 20 seeds. Pioneer® cultivar 30F53 was used. For inoculation and co-oculation, BiomaMais®, StimuControl® and BiomaPhos® products were used, the seeds were placed in plastic bags and the doses of each treatment were added to it. The dose used was 80 ml ha<sup>-1</sup> of *Azospirillum brasilense*; 92 ml ha<sup>-1</sup> of *Trichoderma harzianum* and BiomaPhos® product. These were placed on moistened Germitest® paper 2.5 times the weight of the paper and kept in a germination chamber. After seven days, germination, shoot and root length were evaluated. To evaluate the emergence speed index (IVG), 50 corn seeds were sown with the treatments on three sheets of Germitest paper, the same procedures being carried out in the germination test. Experiment 2 was carried out in a randomized block design (DBC), with eight treatments and three replications of 40m<sup>2</sup>. Corn sowing was carried out in the conventional system. A spacing of 45 cm was used, with 4 rows each 20 m long, sowing of 3 plants m<sup>-1</sup>. Inoculation and co-inoculation followed the same procedure as in experiment one. Productivity components were determined. Treatment T5 resulted in higher germination and root length. Inoculation with T3 resulted in greater development of the aerial part of the seedlings. The T8 treatment showed the highest grain yield.*

**Keywords:** diazotrophic bacteria; seed treatment; productivity.

## RESUMEN

*El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la inoculación y coinoculación con los microorganismos *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* en la germinación de semillas y en los componentes de producción de maíz. Se realizaron dos experimentos, el primero en laboratorio y el segundo en campo. El Experimento 1 se llevó a cabo en un diseño completamente al azar (DCA) con ocho tratamientos y cuatro repeticiones de 20 semillas. Se utilizó la variedad 30F53 de Pioneer®. Para la inoculación y coinoculación se utilizaron los productos BiomaMais®, StimuControl® y BiomaPhos®, las semillas se colocaron en bolsas de plástico y se agregaron las dosis de cada tratamiento. La dosis utilizada fue de 80 ml ha<sup>-1</sup> de *Azospirillum brasilense*; 92 ml ha<sup>-1</sup> de *Trichoderma harzianum* y del producto BiomaPhos®. Estas se colocaron sobre papel Germitest® humedecido 2,5 veces el peso del papel y se mantuvieron en una cámara de germinación. Después de siete días, se evaluó la germinación, la longitud de la parte aérea y de la raíz. Para evaluar el índice de velocidad de emergencia (IVG), se sembraron 50 semillas de maíz con los tratamientos en tres hojas de papel Germitest, siguiendo los mismos procedimientos que en la prueba de germinación. El Experimento 2 se llevó a cabo en un diseño de bloques al azar*

(DBA), con ocho tratamientos y tres repeticiones de 40m<sup>2</sup>. La siembra de maíz se realizó en el sistema convencional. Se empleó un espaciado de 45 cm, con 4 líneas por parcela de 20 m de longitud, sembrando 3 plantas por metro. La inoculación y coinoculación siguieron el mismo procedimiento que en el experimento uno. Se determinaron los componentes de la productividad. El tratamiento T5 resultó en una mayor germinación y longitud de la raíz. La inoculación con T3 llevó a un mayor desarrollo de la parte aérea de las plántulas. El tratamiento T8 presentó un mayor rendimiento de granos.

**Palabras clave:** bacterias diazotróficas; tratamiento de semillas; productividad.

## 1 INTRODUÇÃO

A agricultura na região Noroeste do Estado do Paraná teve seu marco inicial com o cultivo e produção de café e ao longo do tempo a pecuária e agricultura ganharam destaque na região (Cunha et al, 1999).

Conforme Deral (2019), o Estado do Paraná no ano de 2018 liderou a produção de centeio, cevada, feijão e trigo, e alcançou a segunda colocação na produção de aveia em grão, batata-inglesa, mandioca, milho e soja. Entretanto, considerando que a atividade agrícola na região de Umuarama em sua maior parte é explorada pela pecuária com a produção de gado de corte e leite, estas foram responsáveis por 39% do Valor da Produção Bruta Municipal (VBP) na Safra 2018/2019 (DERAL, 2020).

O milho, por sua vez, trata-se de uma cultura de grande importância para a cadeia agrícola brasileira e mundial. De acordo com dados do Deral (2020), considerando o valor obtido de mais de R\$ 304 milhões com a produção de milho na Safra 2018/2019 na região de Umuarama, houve um acréscimo de 90% em relação à safra anterior, devido ao aumento em produtividade e preços favoráveis para a sua comercialização.

Os solos da região Noroeste Paranaense, oriundos do Arenito Caiuá, tendem a possuir textura que varia de arenosa à média, apresentando altos teores de areia e baixos teores de argila. Esse tipo de solo possui algumas desvantagens como a baixa fertilidade natural, baixos teores de matéria orgânica, baixa capacidade de retenção de água e nutrientes e alta suscetibilidade a erosão, implicando na necessidade da utilização de práticas de manejo conservacionistas, a fim de aumentar a produtividade das culturas sem que ocorra degradação do solo.

Nesse sentido, sistemas de manejo conservacionistas e sustentáveis estão sendo adotados, visando melhoria na qualidade do solo e uma produção mais sustentável, proporcionando benefícios para o sistema como um todo (Kassam et al., 2019).

Vários microorganismos têm sido utilizados para agregar na produção de grãos seja trigo, soja ou milho. Dentre esses, o *Trichoderma*, que possui a capacidade de atuar como agente controlador de doenças de diversas plantas cultivadas, como promotor de crescimento e indutores de resistência a doenças nas plantas, mostrado-se como importante ferramenta para a agricultura (Mohamed et al., 2006; Fortes et al., 2007).

A utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal é uma alternativa promissora, como as bactérias do gênero *Azospirillum*, que participam do processo de fixação biológica do nitrogênio, ajudam na produção de fitormônios (auxinas), e na solubilização de fosfato inorgânico e auxiliam no processo de indução de resistência das plantas a doenças (Dobbelaere et al., 2007).

O *Bacillus* sp. é uma das principais rizobactérias de importância para o aumento do crescimento vegetal. Essas rizobactérias influenciam positivamente na germinação, desenvolvimento e rendimento da cultura devido à produção de hormônios vegetais, pela solubilização de fósforo, fixação biológica de nitrogênio e inibição da ação de substâncias tóxicas produzidas por fungos através da antibiose (Kupper et al., 2003).

A utilização de microrganismos inoculados em sementes apresenta diversos benefícios para o desenvolvimento das plantas, incluindo melhorias na germinação de sementes, emergência de plântulas, enraizamento e disponibilização de nutrientes. Assim, é de grande interesse o desenvolvimento de pesquisas que esclareçam a maneira mais adequada para utilizá-los e os efeitos resultantes sobre as culturas agrícolas.

## OBJETIVOS

Avaliar o efeito da inoculação de sementes, com cepas de bactérias *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*, na germinação e produção da cultura do milho.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A atividade experimental foi realizada em duas etapas, tendo a primeira etapa o objetivo de avaliar o efeito da inoculação e co-inoculação de bactérias diazotróficas e microrganismos solubilizadores de fósforo na germinação de sementes de milho, sendo esta etapa realizada em laboratório. A segunda etapa foi realizada em campo, testando os mesmos tratamentos da etapa em laboratório, com o objetivo de avaliar a campo o efeito da inoculação e co-inoculação de bactérias diazotróficas e microrganismos solubilizadores de fósforo nas características agrônômicas da cultura do milho.

### Experimento 1: Efeito da inoculação e co-inoculação na germinação de sementes de milho

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Vegetal pertencente à Universidade Estadual de Maringá, Campus Regional de Umuarama.

O delineamento experimental utilizado para o teste de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas foi o inteiramente casualizado (DIC) com oito tratamentos e quatro repetições de 20 sementes. Para o teste de índice de velocidade de emergência (IVE), foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com oito tratamentos e seis repetições de 10 sementes.

Foram utilizadas sementes da cultivar 30F53 da empresa Pioneer®. Os tratamentos foram compostos por inoculação e co-inoculação de bactérias diazotróficas e microrganismos solubilizadores de fósforo, de forma isolada e em combinações conforme descrito na Tabela 1.

Para a inoculação e co-inoculação, de todos os experimentos, as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos e nele foram adicionadas as doses dos inoculantes, conforme cada tratamento. Para os tratamentos com *Azospirillum brasilense*, foi utilizado a dose comercial de 8 ml kg<sup>-1</sup> de semente, correspondendo a 80 ml ha<sup>-1</sup>. Para os tratamentos com *Trichoderma harzianum*, utilizou-se a dose de 6 ml kg<sup>-1</sup> de semente, equivalente a 92 ml ha<sup>-1</sup>; e *Bacillus subtilis*, e *Bacillus megaterium* a dose utilizada foi de 6 ml kg<sup>-1</sup> de semente, correspondendo a 92 ml ha<sup>-1</sup>. Posteriormente, os sacos plásticos foram agitados para completa homogeneização do produto e das sementes.

Para o teste de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas, as sementes de milho com os tratamentos foram semeadas em três folhas de papel germitest<sup>®</sup>, umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso seco do papel. As folhas foram dispostas em rolos, identificados, e colocados em sacos de plásticos transparentes a fim de diminuir a evaporação de água. Os sacos com os rolos foram acondicionados em câmara de germinação com temperatura de 25 °C, sob luz constante, conforme especificações das Regras para Análises de Sementes (Brasil, 2009).

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos utilizados nos experimentos, com à inoculação e co-inoculação de bactérias diazotróficas e microrganismos solubilizadores de fósforo.

Código dos tratamentos	Descrição dos tratamentos
T1 - TES	Testemunha
T2 - AZO	inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i>
T3 - TRI	inoculação com cepas de <i>Trichoderma harzianum</i>
T4 - BSM	inoculação com <i>Bacillus subtilis</i> , cepa B2084 e <i>Bacillus megaterium</i> , B119 (BiomaPhos <sup>®</sup> )
T5 – AZO + BSM	coinoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Bacillus subtilis</i> , cepa B2084 e <i>Bacillus megaterium</i> cepa B119 (BiomaPhos <sup>®</sup> )
T6 - AZO + TRI	coinoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Trichoderma harzianum</i>
T7 - TRI + BSM	coinoculação com <i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Bacillus subtilis</i> , cepa B2084 e <i>Bacillus megaterium</i> cepa B119 (BiomaPhos <sup>®</sup> )
T8 – AZO + TRI + BSM	coinoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Bacillus subtilis</i> , cepa B2084 e <i>Bacillus megaterium</i> cepa B119 (BiomaPhos <sup>®</sup> )

No sétimo dia, os rolos de papel foram retirados da câmara de germinação para determinação da porcentagem de germinação, e com o auxílio de uma régua milimétrica, o comprimento médio da parte aérea (CPA) e comprimento da raiz (CR) das plântulas consideradas

normais, sendo os resultados expressos em centímetros (cm) por plântula de cada repetição (Brasil, 2009; Ista, 2013).

Para avaliar o índice de velocidade de emergência (IVG), foram semeadas 50 sementes de milho com os tratamentos de inoculação, sendo postas para germinar em três folhas de papel germitest<sup>®</sup>, sob os procedimentos realizados para o teste de germinação. Durante 14 dias foram avaliados e anotados os valores de sementes germinadas diariamente, sendo considerados como germinadas as sementes que apresentaram protusão da raiz primária maior que 2 mm. Ao final, calculou-se o IVG, seguindo a fórmula de Maguire (1962).

#### Experimento 2: Efeito da inoculação e co-inoculação na produção de milho

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá, Campus Regional de Umuarama, sob as coordenadas geográficas 53°15'80" W e 23°47'23" S. O clima da região, segundo classificação de Köppen, é do tipo Cfa, apresentando clima subtropical com temperaturas superiores a 22°C no verão e com mais de 30 mm de chuva no mês mais seco.

O solo do local é classificado como LATOSSOLO VERMELHO Distrófico típico (Embrapa, 2013), de textura areia franca, conforme descrito na análise granulométrica da área (Tabela 2).

Tabela 2. Características granulométrica do solo utilizado no experimento.

Areia	Silte	Argila
	%	
86,0	3,0	11,0

Análise realizada no Laboratório Rural de Maringá, Maringá – PR.

Os dados referentes às precipitações pluviiais acumuladas (mm) da cidade de Umuarama no período de outubro de 2020 a abril de 2021, foram obtidos do Instituto Água e Terra (Figura 1). As temperaturas mínimas e máximas para o Estado do Paraná (Simepar, 2021) desse mesmo período estão descritos na Figura 2.

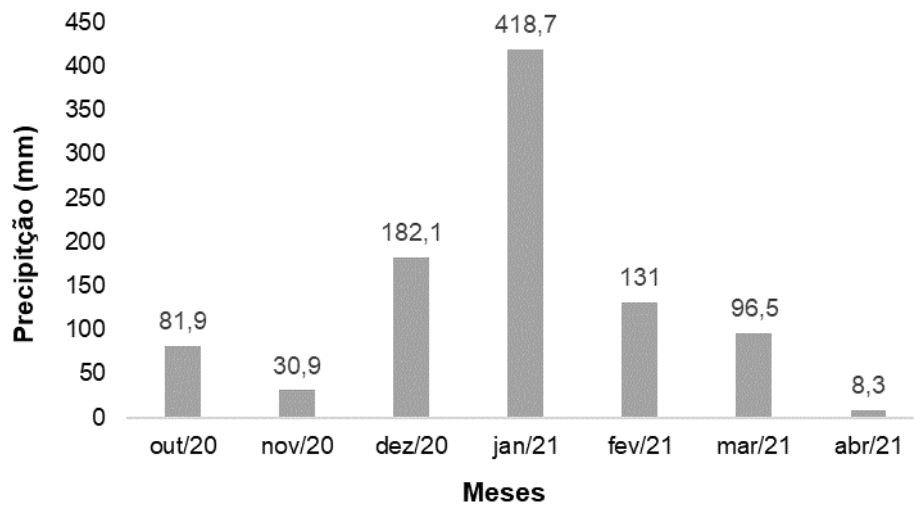


Figura 1. Precipitação pluvial na cidade de Umuarama durante a condução do experimento a campo.

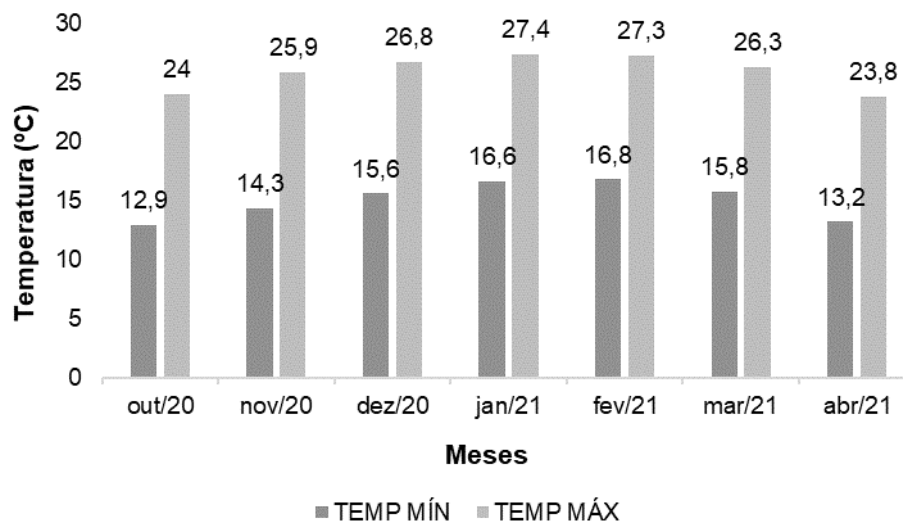


Figura 2. Temperaturas mínimas e máximas no Estado do Paraná durante a condução do experimento a campo.

O experimento foi implantado em delineamento de blocos casualizados (DBC), contendo oito tratamentos e três repetições, totalizando vinte e quatro parcelas. Os tratamentos foram os mesmos realizados no experimento 1 (Tabela 1).



Antes de proceder-se com a semeadura, foram realizadas as inoculações e coinoculação das sementes de milho com os respectivos tratamentos, utilizando-se o mesmo procedimento do Experimento 1.

O trabalho foi implantado no dia 20 de outubro de 2020, utilizando a cultivar de ciclo precoce 30F53 da Pioneer®. A semeadura do milho foi realizada no sistema convencional, utilizando a semeadora adubadora Tatu® PST3. Empregou-se espaçamento entre linhas de 45 cm, com 4 linhas compondo cada parcela de 20 m de comprimento, na taxa de semeadura de 3 plantas m<sup>-1</sup>, conforme recomendações da cultivar.

A adubação de semeadura foi realizada conforme resultado da caracterização química do solo apresentada na Tabela 3. Assim, aplicou-se 250 kg ha<sup>-1</sup> do formulado 10-15-15 na implantação da cultura do milho.

Tabela 3. Características químicas do solo coletado anteriormente à implantação do experimento.

K <sup>+</sup> (1)	Ca <sup>+2</sup> (2)	Mg <sup>+2</sup> (2)	Al <sup>3+</sup> (2)	H + Al	SB
-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----					
0,26	1,97	1,30	0,00	3,18	3,53
CTC	p <sup>(1)</sup>	pH	V	C	M.O <sup>(3)</sup>
cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	H <sub>2</sub> O	%	-----g dm <sup>-3</sup> -----	
3,53	9,11	5,70	52,63	10,40	17,93

(1) Extrator Mehlich<sup>-1</sup>; (2) Extrator KCl 1 mol L<sup>-1</sup>; (3) Método Walkey-Black; Análise realizada no Laboratório Rural de Maringá, Maringá – PR.

Visando o manejo de plantas daninhas, realizou-se a aplicação do herbicida Soldier® na dose de 2 L ha<sup>-1</sup> + óleo mineral na dose de 500 ml ha<sup>-1</sup>.

Após o desenvolvimento da cultura, foi realizada a colheita do experimento, coletando 15 plantas da área útil de cada parcela, nas quais foram determinadas as seguintes variáveis: comprimento de espiga (CE) mensurado com o auxílio de uma régua graduada; número de fileiras por espiga (NFE); diâmetro da espiga (DE) e diâmetro do sabugo (DS) mensurados com o auxílio de um paquímetro; e a produtividade (PROD).

A produtividade estimada foi obtida da média das produtividades estimadas de cada uma das 15 espigas, provenientes de cada parcela, multiplicado pelo número de plantas por hectare. A produtividade de grãos foi calculada em base de 12% de umidade.

Os dados obtidos nos dois experimentos foram submetidos à análise de variância, com o auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011), sendo detectado efeito significativo dos tratamentos pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste F do resumo da análise de variância para o ensaio de germinação e desenvolvimento de plântulas, indicou diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento de parte aérea e comprimento de raiz (Tabela 4).

**Tabela 4** – Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação (G (%)), índice de velocidade de germinação (IVG), Comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR), de sementes e plântulas oriundas de sementes de milho submetidas à inoculação e co-inoculação com bactérias diazotróficas e microrganismos solubilizadores de fósforo, no experimento em laboratório.

F. V.	G. L.	G (%)	IVG	CPA (cm)	CR (cm)
		P > F	P > F	P > F	P > F
Tratamentos	7	2,508*	8,505**	8,031**	3,486*
Erro	3				
Total	21				
C. V. (%)		10,33	4,36	5,38	5,83

\*\* e \* significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente.

Para a porcentagem de germinação, o tratamento 5 (co-inoculação de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus subtilis* e *B. megaterium*), foi superior em 33% em relação ao tratamento 7 com a co-inoculação dos quatro microorganismos (*A. brasilense* + *T. harzianum* + *B. subtilis* e *B. megaterium*), porém não diferenciou dos demais tratamentos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Porcentagem de germinação (G (%)), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) de sementes e plântulas oriundas de sementes de milho submetidas à inoculação e coinoculação com bactérias diazotróficas e microorganismos solubilizadores de fósforo, no experimento em laboratório.

Tratamentos	G (%)	IVG	CPA (cm)	CR (cm)
T1 - TES	85,00 ab	21,34 a	14,99 ab	20,28 ab
T2 - AZO	83,75 ab	20,94 a	15,29 ab	20,93 ab
T3 - TRI	85,00 ab	20,37 a	16,61 a	19,29 ab
T4 - BSM	87,50 ab	19,59 abc	14,08 bc	21,35 a
T5 – AZO + BSM	90,00 a	19,94 ab	14,31 bc	21,66 a
T6 - AZO + TRI	83,75 ab	19,99 ab	15,10 ab	19,78 ab
T7 - TRI + BSM	82,50 ab	18,22 bc	12,72c	18,50 b
T8 - AZO + TRI + BSM	67,50 b	17,68 c	14,42 bc	19,45 ab

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. TES = testemunha; AZO = *Azospirillum brasilense*; TRI = *Trichoderma harzianum*; BSM = *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*,

Pesquisas vêm buscando a comprovação da eficiência da coinoculação de *A. brasilense* com *Bacillus subtilis* e demonstrando que esta combinação promove maior desenvolvimento das plantas, além de diversos outros benefícios que a interação dessas bactérias pode proporcionar (Mazzuchelli et al., 2015).

Os maiores índices de velocidade de germinação foram observados para os tratamentos, testemunha, inoculação com *A. brasilense* e inoculação com *T. harzianum*, antecipando o estabelecimento do estande de plântulas após a semeadura, quando comparado com a

coinoculação dos quatro microrganismos (*A. brasilense* + *T. harzianum* + *B. subtilis* e *B. megaterium*), porém não diferenciou dos demais tratamentos (Tabela 5). Nota-se que o tratamento com os quatro microrganismos também foi o que apresentou menor porcentagem de germinação.

A maior velocidade de emergência pode proporcionar ao dossel vantagens no aproveitamento de água, luz e nutrientes iniciando o processo fotossintético antecipadamente, vindo a favorecer o crescimento da parte aérea e do sistema radicular (Panozzo et al., 2009). Quanto mais rápido ocorrer a germinação das sementes e a imediata emergência das plântulas, menos tempo as mesmas ficarão sob condições adversas, passando pelos estádios iniciais de desenvolvimento de forma mais acelerada (Martins et al., 1999).

Em relação à variável comprimento de parte aérea (CPA), pode-se observar, que a inoculação com *Trichoderma harzianum*, proporcionou maior comprimento quando comparado com sua coinoculação junto a outros microrganismo, exceto sua associação com *Azospirillum brasilense* (Tabela 5). O tratamento com *Trichoderma harzianum*, não diferiu dos demais tratamentos com a inoculação dos microrganismos de forma isolada, e com a testemunha.

Para a variável comprimento de parte aérea, os tratamentos com a inoculação de *B. subtilis* e *B. megaterium* e com a coinoculação de *A. brasilense* + *B. subtilis* e *B. megaterium*, foram os que apresentaram os maiores valores, porém diferenciando apenas do tratamento com *T. harzianum* + *B. subtilis* e *B. megaterium* (Tabela 5).

Para o comprimento de raiz, o tratamento com a coinoculação de *A. brasilense* + *B. subtilis* e *B. megaterium*, apresentou novamente o maior valor, sendo superior aos tratamentos com a coinoculação de *A. brasilense* + *T. harzianum* + *B. subtilis* e *B. megaterium* e o tratamento com *T. harzianum* + *B. subtilis* e *B. megaterium* (Tabela 5). Verifica-se que o tratamento com *T. harzianum* + *B. subtilis* e *B. megaterium* foi o que apresentou os menores valores de comprimento da parte aérea e raiz, porém não diferindo da testemunha.

Santos (2008) destaca que a prática da inoculação com fungos benéficos pode auxiliar a promoção de desenvolvimento das plantas, sendo que essa ação pode estar relacionada a capacidade de associação simbiótica nas raízes, juntamente com a ação decompositora, disponibilizando nutrientes para as plantas e ainda atuar no controle biológico de patógenos que possa interferir no desenvolvimento da plântula.

Hahn et al. (2013) ao analisarem a promoção de crescimento de híbridos de milho inoculados com rizóbios e bactérias diazotróficas associativas, verificaram que a inoculação com *A. brasilense* aumentou o crescimento de quatro dos cinco híbridos analisados, dentre eles o 30F53, que foi utilizado nesse trabalho.

Assim como Porto et al. (2020), que constataram aumento de 15,3% e 3% no comprimento de raiz e altura de plantas aos 8 e 30 dias após a semeadura (DAS), respectivamente, com a inoculação de *A. brasilense* em sementes de milho quando comparados com o tratamento controle. Todavia, analisando a altura de planta aos 60 e 90 DAS, não encontraram diferenças significativas em relação ao tratamento controle.

Da mesma forma, Tonin (2019) ao avaliar a inoculação isolada de *A. brasilense* na cultura do milho não encontrou influência dessa prática no incremento para as variáveis germinação de sementes, comprimento de raiz e de parte aérea, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

De acordo com Cássan et al. (2020), inúmeros são os mecanismos responsáveis pela promoção de crescimento proporcionados pelo uso de bactérias do gênero *Azospirillum*, como a síntese de reguladores de crescimento (AIA, ABA, etileno, citocininas e giberelinas). Todavia, como já citado no decorrer desse trabalho, o efeito positivo do uso dessa bactéria também está associado as características genéticas de cada híbrido (LANA *et al.*, 2012).

De acordo com Reis (2007), os diferentes resultados obtidos nos trabalhos realizados com *Azospirillum* spp. estão relacionados as interações edafoclimáticas e com a biota do solo, além de fatores ligados a bactéria, como o número ideal de células por semente e a fisiologia da semente. Assim, seria pertinente a contagem do número de células por planta, visto que a falta de resultados significativos pode estar relacionada ao não desenvolvimento das bactérias fixadoras.

Já Stefanello e Bonett (2013) constataram que a inoculação de sementes de milho com fungos do gênero *Trichoderma* tem efeito positivo no desenvolvimento da parte aérea da cultura, corroborando com resultados obtidos nesse estudo.

Em contrapartida, Resende et al. (2004) observaram que sementes de milho inoculadas com *Trichoderma* apresentaram melhor enraizamento e acúmulo de massa seca nas raízes, discordando

com os resultados obtidos com a inoculação desse fungo no presente trabalho. Demonstrando assim as divergências existentes nas conclusões entre as pesquisas.

Resultados encontrados por Buchelt et al. (2019) se assemelham às conclusões deste, visto que ao aplicarem bioestimulantes e *Bacillus subtilis* em sementes de milho não encontraram incremento na germinação, comprimento de raiz e massa seca e fresca de raiz e parte aérea.

Mazzuchelli et al. (2014) verificaram que plantas de milho coinoculadas com *A. brasilense* e *B. subtilis* apresentaram maior altura de plantas em relação à testemunha, acarretando incremento de mais de 4% nessa variável. Assim como os resultados obtidos nesse ensaio.

Desse modo, mesmo que a inoculação isolada de *A. brasilense* não tenha atingido os melhores resultados, a associação dessa bactéria ao gênero *Bacillus* proporcionou as maiores porcentagens de germinação e comprimento de raiz, demonstrando os seus efeitos benéficos para o híbrido utilizado.

Na parte experimental que foi realizada a campo para avaliar a produtividade da cultura em função dos tratamentos, observa-se pelo resumo da análise de variância que a única variável que foi significativa foi a produtividade (Tabela 6). As variáveis índice de velocidade de emergência, emergência total, comprimento de raiz e massa da matéria seca de raiz não foram influenciadas pelos tratamentos.

O tratamento testemunha e a inoculação com *T. harzianum*, foram os que apresentaram a menor produtividade, porém diferenciando apenas do tratamento com os quatro microorganismos (Figura 3).

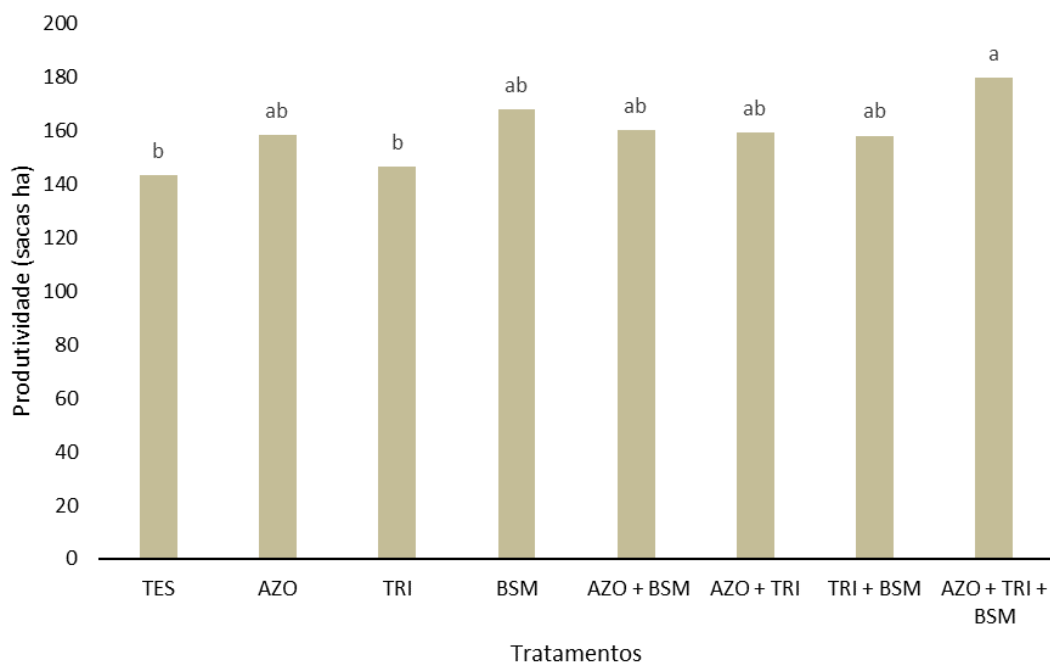
Autores como Harman et al., (2004), afirmam que isolados de *Trichoderma* proporcionam resultados superiores nos níveis de produtividade quando as condições são estressantes para a planta, mais especificamente, apenas quando se tem a presença de patógenos.

Assim como nesse ensaio, Repke et al. (2013) e Vogt et al. (2014) não encontraram resultados benéficos sobre a produtividade de plantas de milho ao inocularem *Azospirillum* em condições de campo. Da mesma forma, em trabalho conduzido por Sangoi et al. (2015), o tratamento de sementes com *Azospirillum* não apresentou melhora no desempenho agrônômico do milho.

**Tabela 6** – Resumo da análise de variância para Comprimento de espiga (CE), diâmetro de espiga (DE), número de fileiras por espiga (NFE), diâmetro do sabugo (DS) e produtividade em sacas (PROD) de plantas de milho submetidas à inoculação e coinoculação com bactérias diazotróficas e microrganismos solubilizadores de fósforo, no experimento a campo.

F. V.	G. L.	CE	DE	NFE	DS	PROD
		P > F	P > F	P > F	P > F	P > F
Tratamentos	7	0,713 <sup>ns</sup>	1.762 <sup>ns</sup>	0.721 <sup>ns</sup>	1.551 <sup>ns</sup>	5.353**
Erro	14					
Total	23					
C. V. (%)		2,56	2,04	3,13	2,29	5,39

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade. n.s.= não significativo.



**Figura 1.** Produtividade média das plantas de milho submetidas à inoculação e coinoculação com bactérias diazotróficas e microrganismos solubilizadores de fósforo, no experimento a campo. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. TES = testemunha; AZO = *Azospirillum brasilense*; TRI = *Trichoderma harzianum*; BSM = *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*,

Corroborando Fachinelli et al. (2017) que ao avaliarem a produtividade de milho safrinha inoculado com *Azospirillum* via tratamento de sementes em solo arenoso, não encontraram incrementos para altura de plantas, diâmetro de colmo, número de espigas por plantas e produtividade, quando comparados à adubação nitrogenada.

Todavia, conforme o mesmo autor, não apresentar incrementos em altura de plantas pode ser um fator positivo, visto que o aumento deste pode elevar o índice de tombamento das plantas de milho.

Por outro lado, Chagas et al. (2017) realizaram duas avaliações em períodos distintos (20 e 40 dias após a emergência (DAE)) de plantas de milho inoculadas com *B. subtilis* e *Trichoderma* sp. e constataram que na primeira avaliação a aplicação isolada de *B. subtilis* e a combinação *Trichoderma* + *B. subtilis*, foram superiores a aplicação isolada de *Trichoderma* e à testemunha para as variáveis de massa seca da parte aérea e massa seca total. Enquanto na avaliação após 40 DAE, a inoculação isolada de ambos os microrganismos foram superiores aos demais tratamentos.

Diante disso, é possível constatar que além das características inerentes à cada híbrido, a fase de desenvolvimento da cultura do milho também influencia na manifestação dos resultados observados com a prática da inoculação e da coinoculação desses microrganismos.

Nieto-Jacobo et al. (2017) afirmam que fatores bióticos e abióticos específicos, como temperatura, umidade, pH e disponibilidade de nutrientes, podem interferir nas respostas com a utilização do gênero *Trichoderma*. Além da própria planta hospedeira e dos componentes intraespecíficos. Logo, a utilização de diferentes isolados de *Trichoderma* em diferentes cultivares pode gerar respostas diferentes (Medeiros et al., 2019).

Não obstante, esse gênero pode proporcionar outros benefícios às culturas que não foram avaliados nesse experimento, com destaque no controle biológico de pragas e doenças. Como enfatizado por Mukherjee et al. (2013) a atuação desse fungo como biofungicida, bionematicida, biofertilizante, condicionador de solo ou fonte de enzimas hidrolíticas; ou por Medeiros et al. (2019), que destacam os diversos mecanismos de ação do *Trichoderma*, como a antibiose, competição e indução de resistência contra diferentes patógenos.

Nesse sentido, Pomella et al., (2009) relatam que os mecanismos do *Trichoderma* na promoção de crescimento vegetal, quando em ausência de fitopatógenos, ainda são pouco esclarecidos em comparação aos mecanismos de ação envolvendo o controle biológico. Sendo que



a ação estabelecida por esse fungo é complexa e realizada por interações com fatores bioquímicos e produção de diversas enzimas e compostos benéficos (Baugh et al., 2007).

Todavia, o efeito benéfico da associação dos gêneros *Trichoderma* e *Bacillus* é citado por alguns autores no uso de nitrogênio (Rezende et al., 2021), na indução de defesa contra estresses bióticos e abióticos, principalmente o estresse salino (Rubio et al., 2017), e na produção de fitormônios e solubilização de fosfatos (França et al., 2017). Como foi observado nos resultados obtidos em produtividade nesse trabalho.

Diante dos resultados obtidos observou-se que a coinoculação com *A. brasilense* e *B. subtilis*, cepa B2084 e *B. megaterium*, B119 (BiomaPhos®) resultaram em maiores porcentagens de germinação de sementes de milho e comprimento de raiz. A inoculação com *T. harzanium* acarretou maior desenvolvimento da parte aérea das plântulas de milho. Os menores índices de velocidade de germinação foram com a associação dos quatro microorganismos. O tratamento com *T. harzanium* e *B. subtilis*, cepa B2084 e *B. megaterium*, B119 (BiomaPhos®) apresentou maior rendimento de grãos, com incremento de 26% em relação à testemunha.

Desta forma concluímos que o uso de microrganismo em coinoculação em sementes de milho tem resultados benéficos, desde que sejam consideradas as variáveis que influenciam na manifestação dos resultados, as condições edafoclimáticas no momento da inoculação e a quantidade de bactérias viáveis após a inoculação.

## REFERÊNCIAS

- BAUGH, C. L.; ESCOBAR, B. The genus *Bacillus* and genus *Trichoderma* for agricultural bio-augmentation. **Rice Farm Magazine**, p. 1-4, 2007.
- BUCHELT, A. C.; METZLER, C. R.; CASTIGLIONI, J. L.; DASSOLER, T. F.; LUBIAN, M. S. Aplicação de bioestimulantes e *Bacillus subtilis* na germinação e desenvolvimento inicial da cultura do milho. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.6, n. 4, p. 69-74, 2019. DOI: <https://doi.org/10.32404/rean.v6i4.2762>

CHAGAS, L. F. B.; MARTINS, A. L. L.; CARVALHO FILHO, M. R.; MILLER, L. O.; OLIVEIRA, J. C.; CHAGAS JUNIOR, A. F. *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* sp. no incremento da biomassa em plantas de soja, feijão-caupi, milho e arroz. **Revista Agri-Environmental Sciences**, v. 3, n. 2, p. 10-18, 2017.

CUNHA, J. E.; CASTRO, S. S.; SALOMÃO. Comportamento erosivo de um sistema pedológico de Umuarama, noroeste do estado do Paraná. **Revista Brasileira Ciência de Solo**, n. 23, p. 943-951, 1999.

DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL – DERAL. **Análise preliminar VBP 2019 - NR Umuarama 2020.** Disponível em:

[https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-09/An%C3%A1lise%20Preliminar%20VBP%202019%20Umuarama.pdf](https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-09/An%C3%A1lise%20Preliminar%20VBP%202019%20Umuarama.pdf). Acesso em: 15 jan. 2021.

DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL – DERAL. **Análise preliminar VBP 2020 - NR Umuarama 2021.** Disponível em:

[https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2019-11/soja2020v1.pdf](https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2019-11/soja2020v1.pdf). Acesso em: 21 jul. 2021.

DOBBELAERE, S. & OKON, Y. The plant growth-promoting effect and plant responses. In: Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations (Elmerich, C.; Newton, W.E. eds.), p. 145-170. **Springer, Dordrecht, The Netherlands**. 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CNPQ, 2013. 353 p.

FACHINELLI, R.; DA LUZ, R. A.; MELO, T. S.; NETO, A. A. S.; CECCON, G. **Produtividade de milho safrinha com *Azospirillum* nas sementes em solo arenoso**. In: **XIV Seminário Nacional Milho Safrinha**. Cuiabá, p. 443-448, 2017.

FRANÇA, D. V. C.; KUPPER, K. C.; MAGRI, M. M. R. GOMES, T. M.; ROSSI, F. *Trichoderma* spp. isolates with potential of phosphate solubilization and growth promotion in cherry tomato. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 4, p. 360-368, 2017. DOI: 10.1590/1983-40632017v4746447

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-42, 2011. DOI: 10.1590/S1413-70542011000600001

- HAHN, L. SÁ, E. L. S.; SILVA, W. R.; MACHADO, R. G. Promoção de crescimento de híbridos de milho inoculados com rizóbios e bactérias diazotróficas associativas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 19, n. 1, p. 33-40, 2013.
- HARMAN, Gary E. et al. Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews microbiology**, Geneva-Nova York, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004. DOI:10.1038/nrmicro797
- ISTA- International Rules for Seed Testing. Handbook on Seedling Evaluation Switzerland. 2013.
- KASSAM, A.; FRIEDRICH, T.; DERPSCH, R. Global spread of conservation agriculture. **International Journal of Environmental Studies**, v. 76, n. 1, p. 29-56, 2019. DOI: 10.1080/00207233.2018.1494927
- KUPPER, K.C., GIMENES-FERNANDES, N. & GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira** 28:251-257. 2003. DOI: 10.1590/S0100-41582003000300005
- LANA, M. C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, p. 399-405, 2012. DOI:10.1590/S0034-737X2012000300016
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-77, 1962. DOI: 10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x
- MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. A. Efeito da posição da semente no substrato e no crescimento inicial das plântulas de palmito-vermelho (*Euterpe espirotosantensis* Fernandes–Palmae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 1, p. 164-173, 1999. DOI: 10.17801/0101-3122/rbs.v21n1p164-173
- MAZZUCHELLI, R. C. L.; SOSSAI, B. F.; ARAUJO, F. F. Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Colloquium Agrariae**, v. 10, n. 2, p. 40-47, 2014.

MEDEIROS, F. H. V.; GUIMARÃES, R. A.; SILVA, J. C. P.; CRUZ-MAGALHÃES, V.; SOUZA, J. T. *Trichoderma*: interações e estratégias. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (Org.). **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília: Embrapa. 2019. p. 219-234.

MOHAMED, H.A.L.A.; HAGGAG, W.M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Braz. J. Microbiol.** v. 37, n. 2, p. 181-191, 2006. DOI: 10.1590/S1517-83822006000200016

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; HERRERA-ESTRELLA, A.; SCHMOLL, M.; KENERLEY, C. M. *Trichoderma* research in the genome era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, n. 6, p. 1014-1023, 2014. DOI: 10.1146/annurev-phyto-082712-102353

NIETO-JACOBO, M. F.; STEYAERT, J. M.; SALAZAR-BADILLO, F. B.; NGUYEN, D. V.; ROSTAS, M.; BRAITHWAITE, M.; MENDONZA-MENDONZA, A. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 102, 2017. DOI:10.3389/fpls.2017.00102

REGRAS PARA ANÁLISES DE SEMENTES (RAS) – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Teste de germinação**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

PANOZZO, Luís Eduardo et al. Comportamento de plantas de soja originadas de sementes de diferentes níveis de qualidade fisiológica. **Revista da FZVA**, v. 16, n. 1, 2009.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas: uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 238-244.

PORTO, L. S.; COSTA, R. R. G. F.; SILVA, F. V.; ROCHA, A. F. S. Microrganismos eficazes e *Azospirillum brasilense*: efeitos sobre a produtividade do milho. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, v. 9, n. 2, p. 11-21, 2020.

REGRAS PARA ANÁLISES DE SEMENTES (RAS) – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Teste de germinação**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculantes par aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 22 p. (Embrapa Documentos 232).

REPKE, R. A.; CRUZ, S. J. S.; SILVA, C. J. D.; FIGUEIREDO, P. G.; BICUDO, S. J. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 3, p. 214-226, 2013.

RESENDE, M. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; VON PINHO, R. G.; VIEIRA, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004. DOI:10.1590/S1413-70542004000400010

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. M.; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C.; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. 1-15, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12725

RUBIO, M. B.; HERMOSA, R.; VICENTE, R.; GÓMEZ-ACOSTA, F. A.; MORCUENDE, R.; MONTE, E.; BETTIOL, W. The combination of *Trichoderma harzianum* and chemical fertilization leads to the deregulation of phytohormone networking, preventing the adaptive responses of tomato plants to salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 294, p. 1-14, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.00294. eCollection 2017.

SANGOI, L.; SILVA, L. M. M.; MOTA, M. R.; PANISON, F.; SCHMITT, A.; SOUZA, N. M.; GIORDANI, W.; SCHENATTO, D. E. Desempenho agronômico do milho em razão do tratamento de sementes com *Azospirillum* sp. e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 1141-1150, 2015. DOI: 10.1590/01000683rbcs20140736

SANTOS H, A. ***Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *fusarium oxysporum***. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SISTEMA DE TECNOLOGIA E MONITORAMENTO AMBIENTAL DO PARANÁ – SIMEPAR. **Boletim Climatológico**. 2021. Disponível em: [http://www.simepar.br/prognozweb/simepar/timeline/boletim\\_climatologico](http://www.simepar.br/prognozweb/simepar/timeline/boletim_climatologico). Acesso em: 04 ago. 2021.

STEFANELLO, L.; BONETT, L. P. Avaliação do desenvolvimento de milho com *Trichoderma* spp. **Cultivando o saber**, v. 6, n. 1, p. 121-127, 2013.

TONIN, J. C. **Influência da inoculação de *Azospirillum brasilense* em diferentes temperaturas na germinação de sementes de milho (*Zea mays*)**. 2019. 37 p. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal da Fronteira Sul, 2019.

VOGT, G. A.; BALBINOT JUNIOR. A. A.; GALOTTI, G. J. M.; PANDOLFO, C. A.; ZOLDAN, S. R. Desempenho de genótipos de milho na presença ou ausência de inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada de cobertura. **Agropecuária Catarinense**, v. 27, n.2 p. 49-54, 2014.