

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA**

DENIELE MARINI

**RESPOSTA DE HÍBRIDOS DE MILHO À ASSOCIAÇÃO COM *Azospirillum
brasilense* E ADUBAÇÃO NITROGENADA**

Marechal Cândido Rondon

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA**

DENIELE MARINI

**RESPOSTA DE HÍBRIDOS DE MILHO À ASSOCIAÇÃO COM *Azospirillum
brasiliense* E ADUBAÇÃO NITROGENADA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria do Carmo Lana

Marechal Cândido Rondon

2012

À minha família, que amo tanto,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar a vida, uma família maravilhosa e amigos tão especiais.

À minha mãe e meu pai pelo apoio e dedicação incondicional para realização dos meus estudos.

Ao meu esposo pelo carinho, apoio e paciência.

À Patrícia, irmã querida, pelo carinho.

À amiga Janaína pelo apoio e dedicação para realização deste trabalho e pelo companheirismo em todos os momentos, tornando o período do mestrado mais divertido.

As amigas Tailene e Mariângela que mesmo distantes me apoiaram nos momentos difíceis.

Ao professor Vandeir Francisco Guimarães pela confiança, orientação e ensinamentos no decorrer do mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido que me permitiu levar adiante o mestrado.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste projeto, seja diretamente ou indiretamente.

Muito obrigada a todos, sem vocês nada disto seria possível.

Resposta de híbridos de milho à associação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada

RESUMO

Estudos com a inoculação de *Azospirillum* em espécies de gramíneas têm demonstrado benefícios ao crescimento e desenvolvimento das plantas, por meio da produção de hormônios vegetais e da fixação biológica de nitrogênio que acarretam em outros efeitos positivos, podendo assim reduzir a necessidade de adubação nitrogenada para as culturas. Contudo, estirpes eficientes e genótipos promissores, devem ser associados para que se obtenham benefícios com essa associação. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a resposta de híbridos de milho à associação com *A. brasilense* e adubação nitrogenada. O delineamento experimental empregado foi de blocos ao acaso em esquema fatorial 2 x 2 x 5 com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por dois híbridos de milho (H1-30F53 e H2-CD386); inoculação ou não de produto comercial a base de *A. brasilense*, e cinco doses de N (0, 40, 80, 120 e 160 kg ha⁻¹). Foram avaliados os parâmetros: altura de planta, altura de inserção de espiga, diâmetro do colmo, massa seca de folhas, colmo + bainha, espiga e total de parte aérea, área foliar, teor de N foliar e os componentes de produção (comprimento de espiga, diâmetro de espiga, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira, massa da espiga, massa de 100 grãos e produtividade). Houve interação entre inoculação e adubação nitrogenada no estágio vegetativo para o diâmetro do colmo e entre híbridos e adubação nitrogenada para a produtividade. Os híbridos responderam de forma diferenciada para as variáveis analisadas e a aplicação de doses crescentes de N proporcionou incrementos para variáveis biométricas, teor de N foliar e componentes de produção. Houve influência da inoculação com *A. brasilense* apenas sobre a área foliar e massa seca total de parte aérea no estágio reprodutivo, que apresentaram incremento em presença da inoculação.

Palavras-chaves: *Zea mays* L., inoculação, bactérias diazotróficas, doses de nitrogênio.

Response of corn hybrids for association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization

ABSTRACT

Studies on the inoculation of *Azospirillum* on grass species has shown benefits to growth and development of plants, through the production of plant hormones and biological nitrogen fixation that lead to other positive effects, and could thus reduce the need for nitrogen fertilization. However, strains efficient and promising genotypes should be associated for obtain benefits with this association. Therefore, the present study aimed to evaluate the response of corn hybrids to its association with *A. brasilense* and nitrogen fertilization. The experimental design was randomized blocks in factorial 2 x 2 x 5 with four replications. The treatments consisted of two corn hybrids (H1-30F53 and H2-CD386); inoculation of a commercial product based on *A. brasilense*, and five nitrogen rates (0, 40, 80, 120 and 160 kg ha⁻¹). Were evaluated the parameters: plant height, ear height, diameter stem, dry mass of leaves, stem, ear and total shoot, leaf area, leaf N content and yield components (ear length, ear diameter, number of rows per ear, number of grains per row, weight of ear, weight of 100 grains and productivity). There was interaction between inoculation and nitrogen in the vegetative stage to the stem diameter and between hybrids and nitrogen for productivity. Hybrids responded differently to the variables and the application of increasing doses of N provided increments for biometric variables, leaf N content and yield components. Effect of inoculation with *A. brasilense* was found on leaf area and total dry mass of shoots in the reproductive stage, which had increased in the presence of inoculation.

Key words: *Zea mays* L., inoculation, diazotrophs, nitrogen rates.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Aspectos Gerais e Importância da Cultura do Milho	9
2.2 Nitrogênio	11
2.2.1 Dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta-atmosfera	11
2.2.2 Adubação nitrogenada.....	13
2.2.2.1 Necessidade de nitrogênio pela cultura do milho.....	13
2.2.2.2 Fertilizantes nitrogenados	15
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio	17
2.3.1 Organismos envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio ...	17
2.3.2 A enzima nitrogenase	19
2.3.3 <i>Azospirillum</i> : aspectos morfológicos, ecológicos e fisiológicos.....	21
2.3.4 <i>Azospirillum</i> X genótipos de milho	22
2.3.5 Contribuições da inoculação de <i>Azospirillum</i> em gramíneas	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Localização, Caracterização, Implantação e Condução do Experimento	25
3.2 Características Avaliadas	27
3.2.1 Variáveis biométricas.....	27
3.2.2 Análise de nitrogênio no tecido foliar	28
3.2.3 Componentes da produção e produtividade	29
3.3 Análise Estatística	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Variáveis Biométricas	30
4.2 Teor de Nitrogênio Foliar	37
4.3 Componentes de Produção do Milho	40
5 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) possui destacada importância econômica e social, visto que seu cultivo gera milhares de empregos nos diversos segmentos da cadeia agroindustrial. Pode-se destacar a pesquisa, produção de grãos, industrialização e comercialização, além de ser um alimento amplamente utilizado na alimentação humana e animal.

O suprimento adequado de nutrientes ao solo é imprescindível na busca de altas produtividades. Assim, na determinação das necessidades nutricionais da planta devem ser levadas em consideração a absorção e exportação de nutrientes pela cultura durante seu ciclo. Segundo Fornasieri Filho (1992), o nitrogênio (N) é um dos elementos mais requeridos e limitantes para produção de milho. Desta forma, é fundamental o manejo adequado da adubação nitrogenada nesta cultura.

O N é constituinte de muitos componentes da célula vegetal, incluindo aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos, sendo, portanto um elemento essencial ao desenvolvimento das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2009). Sua deficiência inibe rapidamente o crescimento vegetal, podendo manifestar-se através de clorose, que inicialmente ocorre em folhas mais velhas, reduzindo a atividade fotossintética da planta e, conseqüentemente, retardando o crescimento da mesma. As plantas podem obter este nutriente via solo, fixação não biológica, adição de fertilizantes nitrogenados e fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) (HUNGRIA, 2001).

Na agricultura moderna, o principal veículo de adição de N são fertilizantes inorgânicos e sua utilização é essencial para produção de alimentos requisitada pela população humana nos dias atuais. Considerando o elevado custo econômico e ambiental do processo industrial de fixação de N, surge o desafio de otimizar o uso deste elemento para permitir a sustentabilidade do sistema agrícola, além de minimizar os impactos negativos sobre os seres vivos e o ambiente.

Uma alternativa ao uso de fertilizantes inorgânicos é o aproveitamento do N atmosférico (N₂), pela FBN por organismos fixadores de N ou diazotróficos (LOPES, 2007). Em gramíneas, as associações de bactérias diazotróficas com as plantas não formam nódulos, como ocorre em leguminosas. A bactéria coloniza os tecidos do vegetal ou se ancora na superfície da raiz (REIS et al., 2000).

Diversas pesquisas com diferentes gêneros e espécies de bactérias e nas mais variadas condições tem sido realizadas para um maior conhecimento da interação planta-bactéria e dos benefícios ocasionados por esta associação. Dentre os gêneros de bactérias diazotróficas com potencial de FBN em gramíneas, o *Azospirillum* é um dos mais estudados.

A maior efetividade fotossintética e o sistema radicular fasciculado das gramíneas são características que permitem maior aproveitamento de água e exploração do solo por estas plantas, quando comparadas às espécies de leguminosas. Por estas razões e também pela alta necessidade de N pelas gramíneas, tem-se um grande interesse na fixação biológica deste elemento (DÖBEREINER, 1992). Sabe-se que a contribuição da FBN associativa à nutrição vegetal destas espécies não é tão significativa como das simbioses, que ocorre entre o grupo rizóbio em leguminosas. Entretanto, se for considerada a grande extensão de terras cultivadas por gramíneas e cereais, esta se torna importante, em termos globais (NÓBREGA et al., 2004) e também nos sistemas de agricultura sustentável (BALDANI, 1996). Vale destacar que uma das explicações para a promoção do crescimento vegetal pela inoculação com *Azospirillum* envolve também a produção de fitohormônios pela bactéria (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; CASSÁN, et al., 2008).

O uso da inoculação de bactérias diazotróficas em espécies de gramíneas ainda não é uma prática totalmente consolidada, pois ainda em muitos casos não é obtido efeito positivo dessa associação. Este fato tem sido atribuído principalmente ao genótipo da planta, estirpes com baixo potencial e também a ineficiência do processo de inoculação. Contudo, mais estudos são necessários com diferentes genótipos e condições de cultivo, para maior conhecimento dos fatores que podem influenciar a interação bactéria-planta.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a resposta de híbridos de milho à associação com *A. brasilense* e adubação nitrogenada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais e Importância da Cultura do Milho

O milho (*Zea mays L.*), originário da América, mais provavelmente da região onde se situa o México (PEIXOTO, 2002), representa um dos principais cereais cultivados no mundo, em virtude do seu alto potencial produtivo e valor nutritivo. É caracterizado como planta monocotiledônea pertencente à família das poáceas, embora seja comumente mencionado como uma gramínea por fazer parte do antigo grupo Gramineae.

O ciclo fenológico do milho varia de 90 a 205 dias, dependendo do genótipo e das condições climáticas. Os estádios de crescimento e desenvolvimento do milho apresentados no quadro 1 são classificados em duas fases: a primeira a vegetativa, refere-se aos estádios anteriores ao aparecimento das espigas e são identificados de acordo com o número de folhas plenamente expandidas; a segunda fase chamada de reprodutiva, engloba os estádios posteriores a emissão das espigas e a definição destes é baseada no desenvolvimento e consistência dos grãos (FANCELLI, 2010).

Quadro 1. Escala fenológica do milho

Estádio	Caracterização do estágio
Fase vegetativa	
V0	Germinação/emergência
V2	Emissão da segunda folha
V4	Emissão da quarta folha
V6	Emissão da sexta folha
V8	Emissão da oitava folha
V12	Emissão da 12ª folha
V14	Emissão da 14ª folha
Fase reprodutiva	
VT	Emissão do pendão e abertura das flores masculinas
R1	Florescimento pleno
R2	Grãos leitosos
R3	Grãos pastosos
R4	Grãos farináceos
R5	Grãos farináceos duros
R6	Maturidade fisiológica

Fonte: Fancelli (1986)

O milho é uma planta C4, sendo extremamente eficiente na conversão de CO₂, apresentando altas taxas de fotossíntese líquida (NORMAM et. al., 1995; TOLLENAAR e DWYER, 1999). Os grãos de milho apresentam em média a composição de 60% de carboidratos, 10% de proteínas, 4% de lipídios, além de minerais e vitaminas (FANCELLI e LIMA, 1982).

A importância econômica do milho é caracterizada pela sua ampla utilização na alimentação animal, sendo este o principal insumo para fabricação de rações e também na alimentação humana, consumido seja na forma “in natura” como processada, constituindo-se como alimento básico em regiões de baixa renda. Em relação ao aspecto social, a importância do milho está relacionada à geração de milhares de empregos nos diferentes segmentos da cadeia produtiva agroindustrial (DUARTE, 2004).

No cenário mundial de produção de milho, o Brasil destaca-se como quarto maior produtor, superado apenas pelos Estados Unidos, China e pela União Européia. Já em âmbito nacional, o milho é o segundo grão mais importante para a agricultura brasileira, sendo que no ano agrícola de 09/10, sua produção correspondeu a 37,5% da produção total de grãos no país, só perdendo para a soja, que representou 46% da produção nacional (CONAB, 2011).

Ainda segundo levantamento realizado pela Conab (2011), a área cultivada com milho no Brasil na safra 10/11 foi de 12,9 milhões de hectares, sendo aproximadamente 60% dessa área cultivada na primeira safra e 40% na safrinha. A produtividade média brasileira atingida nesta safra foi de 4.300 kg ha⁻¹. Dentre as regiões do Brasil, a região Sul, que compreende os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, foi a maior região produtora de milho no ano agrícola 09/10, com aproximadamente 22,8 milhões de toneladas em uma área de 3,9 milhões de hectares, atingindo uma produtividade média de 5.700 kg ha⁻¹. O grande impulso na produção brasileira se deu em função dos elevados rendimentos obtidos com o avanço tecnológico de cultivares transgênicas e de híbridos de alta produtividade (CARVALHO et al., 2011).

Atualmente a maior parcela dos grãos produzidos é destinada ao preparo de rações para alimentação animal, principalmente de aves e suínos, e para a produção de óleo comestível. Outra parte da produção de milho é direcionada à fabricação de produtos para a alimentação humana direta, tais como farinhas, cereais, salgadinhos

e xaropes de dextrose. Além da indústria alimentícia, o milho tem participação crescente nas indústrias de biocombustíveis, embalagens, cosméticos, tintas, dentre outras (PEIXOTO, 2002; DA RÓZ, 2003). Esse amplo mercado para a utilização do milho e também a considerável área cultivada com esse cereal no território brasileiro fundamentam a importância desta cultura para o Brasil.

2.2 Nitrogênio

2.2.1 Dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta-atmosfera

Entre os minerais considerados essenciais para o desenvolvimento das plantas, o N é o nutriente exigido em maior quantidade pelas culturas apresentando significativa influência sobre o crescimento das plantas (SYLVESTER-BRADLEY et al., 2001). Sua disponibilidade estimula o desenvolvimento e crescimento radicular, incrementando a absorção, não somente de N, mas também de outros nutrientes (YANAI et al., 1996).

A essencialidade do N é constatada pelas suas funções no metabolismo das plantas. Pois esse elemento é integrante da maioria dos componentes orgânicos das células, dentre eles, os aminoácidos, muitas enzimas e materiais de transferência de energia, como, por exemplo, a clorofila, ADP e ATP (adenosina di- e tri-fosfato) (BÜLL, 1993). Assim uma deficiência severa de N fará parar o processo de crescimento e de reprodução de uma planta (TROEH e THOMPSON, 2007).

O ciclo do nitrogênio no sistema solo-planta-atmosfera é complexo, em função dos vários processos de transformação que esse elemento pode sofrer e das suas diversas formas presente no ambiente. Do total de N orgânico terrestre, 96% estão na matéria orgânica morta e apenas 4% nos organismos vivos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A atmosfera terrestre é composta por 78% de N₂, contudo as plantas não podem utilizar diretamente esse reservatório devido à tripla ligação covalente existente entre os dois átomos de N (MARSCHNER, 1995). Tal N poderá ser utilizado quando for quimicamente combinado com hidrogênio, oxigênio ou carbono (C), processo este conhecido como fixação do N. As reações de fixação do N podem ser realizadas por processo industrial e por processo natural. Na natureza, são

realizadas por certos microrganismos, emissão de raios e relâmpagos e também por reações fotoquímicas, todos esses processos naturais fixam cerca de 190×10^{12} g ano⁻¹ de N (TAIZ e ZEIGER, 2009). No entanto, essa quantidade fixada é normalmente menor e raramente na quantidade em que as plantas poderiam usar (TROEH e THOMPSON, 2007).

O N presente no solo encontra-se nas formas orgânica (restos culturais e matéria orgânica), mineral (solução do solo, NO_3^- e NH_4^+) e em formas gasosas combinadas (NH_3^+ , N_2O e NO). De acordo com Sá (1996a), geralmente menos de 5% do N total está em formas inorgânicas como íon NH_4^+ e o íon NO_3^- . Como a maior parte do N presente no solo está ligado à cadeia carbônica da matéria orgânica (SCHULTEN; SCHNITZER, 1998), não sendo diretamente disponível às plantas, a atividade dos microrganismos tem relevante significância, pois permite a quebra gradual de materiais orgânicos complexos em íons inorgânicos simples que podem ser utilizados pelas plantas em crescimento, processo chamado de mineralização. A taxa na qual o N-orgânico é convertido a amônio (NH_4^+) e a nitrato (NO_3^-) é definida como taxa de mineralização, sendo representada pela quantidade de N-inorgânico liberada pela ação da microbiota em um tempo determinado (CAMARGO et al., 1999). O processo reverso, no qual íons inorgânicos são convertidos a forma orgânica, é chamado de imobilização (SIQUEIRA e FRANCO, 1988), tais processos são considerados processos-chave do ciclo do N no sistema solo-planta.

Malavolta (1980) relata que nos solos brasileiros cultivados, o teor de N total da camada de 0-0,20 m, varia de 0,05 a 0,5% de N, o que equivale de 1.000 a 10.000 kg ha⁻¹. O aumento dos estoques totais de N no solo poderá ocorrer através da fixação biológica atmosférica, pelas chuvas ou pela adubação orgânica e mineral. Enquanto que as perdas podem ocorrer devido à exportação pelas culturas, lixiviação, erosão, volatilização e desnitrificação (SCHULTEN; SCHNITZER, 1998; LARA CABEZAS et. al. 2000).

Os íons NO_3^- e NH_4^+ constituem as formas preferenciais de absorção de N pelas plantas (WILLIAMS e MILLER, 2001). O NO_3^- absorvido pode ser reduzido a NH_4^+ , acumulado no vacúolo ou exportado para outras partes da planta; a redução do NO_3^- a NH_4^+ ocorre por meio da ação sequencial das enzimas nitrato redutase e a nitrito redutase: a primeira catalisa a reação de redução do NO_3^- a nitrito (NO_2^-) no citossol, posteriormente este íon é rapidamente transportado pelas células para o

interior dos cloroplastos nas folhas e dos plastídios nas raízes, uma vez, que é altamente reativo e potencialmente tóxico; nessas organelas, a segunda enzima reduz o NO_2^- a NH_4^+ . Agora o NH_4^+ absorvido ou proveniente da redução do NO_3^- é incorporado a esqueletos de C, principalmente pela rota que envolve as enzimas glutamina sintetase e glutamato sintetase (GS-GOGAT) (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Para reação de redução do NO_3^- , assim como para a assimilação do NH_4^+ é requerido energia na forma de ATP e poder redutor, como o NADH, o NADPH e a ferredoxina reduzida, bem como esqueletos de C derivados do ciclo de Krebs. Portanto, esses processos drenam tanto esqueletos de C quanto energia e doadores de elétrons, competindo com o metabolismo do C (SOUZA e FERNANDES, 2006).

2.2.2 Adubação nitrogenada

2.2.2.1 Necessidade de nitrogênio pela cultura do milho

A grande maioria dos nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento das culturas é fornecida diretamente por meio da solução do solo, sendo as rochas fontes preferenciais de enriquecimento dos seus teores totais, via processos de intemperização e/ou mineralização de materiais orgânicos (HAVLIN, et al., 2005).

Os solos, em sua maioria, não possuem quantidade suficiente de N para o crescimento máximo das plantas, em parte devido a elevada demanda e também, pelas transformações bioquímicas que o N está sujeito no solo e que podem alterar significativamente sua disponibilidade (WIETHOLTER, 1996). Neste sentido, Hungria et al. (2001) verificaram que o reservatório de N presente na matéria orgânica do solo é limitado, podendo ser esgotado rapidamente após alguns cultivos. Além disso, os processos de decomposição da matéria orgânica e de perdas de N são acelerados pelas condições de temperatura e umidade predominantes no Brasil.

Em função da destacada importância do N para o metabolismo das plantas e também por ser o mineral quantitativamente mais exigido, o suprimento adequado deste nutriente é fundamental para o crescimento e conseqüentemente produção de uma determinada cultura.

Para o milho, o N é o nutriente que proporciona maiores respostas no ganho de produtividade, visto que este elemento tem um papel direto no acúmulo de massa de matéria seca nos grãos (BÜLL, 1993; BORTOLINI et al., 2001). Seus efeitos estão relacionados ao desenvolvimento do sistema radicular, aumento do comprimento da espiga e do número de espigas por planta (RAO et al., 1992), além de, afetar as taxas de iniciação e expansão foliar, tamanho final e a intensidade de senescência das folhas (UHART e ANDRADE, 1995).

O N é importante no estágio inicial de desenvolvimento do milho, visto que a definição do potencial de rendimento do milho ocorre entre a emissão da quarta e sexta folha. Nesta fase o sistema radicular, ainda em desenvolvimento, já possui considerável porcentagem de pelos absorventes e ramificações diferenciadas, a adição de N estimula sua proliferação, com conseqüente desenvolvimento da parte aérea. Também neste estágio tem início o processo de diferenciação floral, o qual origina o número de óvulos nos primórdios da espiga e o número de espigas por planta. Assim o suprimento inadequado de N nessa fase afeta negativamente o rendimento de grãos (FANCELLI, 2002; SCHREIBER et al., 1998).

Ainda de acordo com Fancelli (2002), na fase inicial de desenvolvimento do milho, a cultura exige a disponibilidade de pelo menos 25 kg ha⁻¹ de N, sendo obtidos os melhores resultados com o fornecimento de 30 a 45 kg ha⁻¹, que devem ser fornecidos por ocasião da semeadura. Usualmente esta cultura requer o uso de adubação nitrogenada em cobertura para complementar a quantidade suprida pelo solo ou pela adubação de base e também, quando se objetiva produtividades elevadas, visto que a exportação deste elemento pela cultura é de grandes quantidades. A aplicação da cobertura adicional com o restante da necessidade de N deve ser realizada no estágio em que a planta encontra-se com quatro a seis folhas (YAMADA, 1996). Segundo Cantarella (1993), a necessidade de adubação nitrogenada estimada para produção de uma tonelada de grãos de milho varia de 20 a 28 kg ha⁻¹.

O N, dentre os nutrientes é o de manejo e recomendação mais complexos, em virtude da multiplicidade de reações químicas e biológicas a que está sujeito e da grande dependência das condições edafoclimáticas (ERNANI, 2003; CANTARELLA e DUARTE, 2004). Normalmente, a recomendação de adubação nitrogenada para as culturas baseia-se na expectativa de produtividade de grãos e no teor de matéria orgânica do solo. Tal recomendação fundamenta-se na hipótese

de que a matéria orgânica libera N em tempo hábil para uso das plantas e que o N fornecido pelos fertilizantes complementa a necessidade deste mineral pelas culturas (ARGENTA et al., 2002).

A taxa de crescimento das plantas com deficiência de N é praticamente proporcional a taxa em que o nutriente é fornecido. Na condição de insuficiência de N, todas as partes da planta são afetadas inclusive raízes, o que ocasiona redução do tamanho do sistema radicular que pode, naturalmente, refletir em efeitos secundários tais como a redução de absorção de água e de outros nutrientes. O sintoma característico de deficiência deste elemento é o amarelecimento pronunciado de tecidos mais velhos, especialmente junto às nervuras, em função da decomposição da clorofila nestas áreas. A falta de clorofila confere as plantas coloração verde pálida, além de um crescimento lento, pois a mesma é requerida na produção de carboidratos pela fotossíntese (FORNASIERI FILHO, 1992).

Diversos experimentos realizados sob diferentes condições de solo, clima e sistemas de cultivo, demonstram resposta generalizada da cultura à adubação nitrogenada (AMARAL FILHO et al., 2005; FERREIRA et al., 2009; SANTOS et al., 2010). Em geral, 70 a 90 % dos experimentos de campo realizados no Brasil, apresentaram respostas positivas à aplicação de N na cultura do milho (COELHO, 2003). Por outro lado, Cruz et al. (2005) constataram que existem diferenças na utilização do N entre os genótipos de milho, não apenas em termos de resposta à fertilização nitrogenada, mas também em eficiência na absorção, acumulação e utilização do N absorvido.

2.2.2.2 Fertilizantes nitrogenados

Os fertilizantes nitrogenados podem ser tanto minerais como orgânicos. As formas orgânicas referem-se normalmente a esterco de animais, outras fontes de N orgânico vêm sendo amplamente utilizadas como o lodo de esgoto e de efluentes e os compostos de resíduos, essa utilização não se dá apenas pelo valor de fertilizante desses materiais, mas também como uma forma de se dispor do refugo. A principal desvantagem dos fertilizantes orgânicos é o baixo teor de N, apresentando em média cerca de 0,5% de N, exceto para o esterco de galinha que

apresenta 1,5% a 2%, portanto, para obter efeito significativo altas taxas devem ser aplicadas (TROEH e THOMPSON, 2007).

Os principais fertilizantes nitrogenados inorgânicos são a uréia, o nitrato de amônia e o sulfato de amônia (CQFS, 2004). Dentre essas fontes, a uréia destaca-se por apresentar elevada concentração de N (aproximadamente 45% de N), alta solubilidade, baixa corrosividade e menor relação custo por unidade de nutriente. Além disso, por ser um adubo altamente concentrado, torna-se mais barato o transporte, o armazenamento e a aplicação (COSTA et al., 2004). Por isso, Barbosa Filho e Silva (2001) afirmam que a uréia é uma das fontes de N mais utilizadas na agricultura brasileira, possivelmente por ser de menor custo e de maior disponibilidade no mercado.

Do ponto de vista agrônômico, um dos inconvenientes da uréia é a perda do N, pois esta necessita sofrer hidrólise para ser utilizada pelas plantas e, neste processo, o N pode ser perdido por volatilização na forma de NH_3 , principalmente, quando aplicado na superfície do solo (COSTA et al., 2004). O sulfato de amônio, no entanto, não sofre volatilização de nitrogênio amoniacal, quando o pH é inferior a 7. Porém, esse fertilizante tem sua eficiência reduzida, basicamente, pela lixiviação de nitrato (TEIXEIRA FILHO et al., 2010).

Um fator que prejudica a recuperação do N dos fertilizantes nitrogenados pelas plantas, em média 72% (POTAFOS, 2010), são as perdas gasosas do N representadas pelos processos de volatilização e desnitrificação. Cunha et al. (2010) relataram índices médios de aproveitamento do N pelas principais culturas cultivadas no Brasil entre 18% (café) e 109% (arroz), sendo que o milho apresentou 75% de aproveitamento do N. As perdas por desnitrificação têm sido estimadas em menos de 10% na cultura do milho (HILTON et al., 1994), porém a perda de NH_3 por volatilização, quando a uréia não é enterrada, ou incorporada ao perfil do solo pela água da chuva ou de irrigação, pode atingir de 31 a 78 % do total de N aplicado (LARA CABEZAS et al., 1997).

Lopes e Guilherme (2000), as doses e a forma de aplicação dos fertilizantes nitrogenados, associadas às condições climáticas (índice pluviométrico e temperatura), às características do solo (umidade, textura, pH, etc) e às condições da cultura (ciclo, variedade, capacidade de proliferação das raízes, etc) influenciam na eficiência dos fertilizantes nitrogenados. Os mesmos autores afirmam também que práticas de manejo como incorporação adequada do fertilizante, parcelamento

da adubação e irrigação controlada, podem aumentar consideravelmente a eficiência dos fertilizantes nitrogenados.

O processo de fabricação de fertilizantes nitrogenados utiliza meios industriais para fixação do gás (N_2) através da combinação de altas temperaturas e pressão, processo também conhecido como Haber-Bosch. A amônia anidra (NH_3) é um gás que contém 82% de N e constitui matéria-prima para fabricação da maioria dos fertilizantes nitrogenados. A amônia é produzida pela reação direta do N com o hidrogênio, em uma mistura na relação 1:3 de N proveniente do ar e hidrogênio proveniente de fontes diversas como o gás natural, nafta, óleo combustível ou de outros derivados de petróleo. O gás natural é o mais usado e também a melhor fonte de hidrogênio para a produção de fertilizantes nitrogenados inorgânicos (DIAS e FERNANDES, 2006; TROEH e THOMPSON, 2007).

A produção nacional de fertilizantes nitrogenados é insuficiente para atender à demanda interna, sendo suprida basicamente por importações, que respondem por cerca de 60% do consumo nacional. A volatilidade de preços e a disponibilidade de gás natural no País são fatores que dificultam a expansão da indústria de adubos nitrogenados e favorecem a importação destes. Assim, em razão da grande dependência externa, os fertilizantes representam um impacto considerável sobre a balança comercial brasileira (LIMA, 2007).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

2.3.1 Organismos envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de N é o processo de redução do N gasoso (N_2) a amônia (NH_3), esse processo é realizado por alguns organismos que habitam o solo, denominados fixadores de N e, ocorre graças à ação do complexo protéico da nitrogenase, enzima que catalisa a reação rompendo a tripla ligação existente entre os dois átomos de N (POSTGATE, 1982).

Os organismos que possuem a capacidade de produzir a enzima nitrogenase e outros componentes do sistema indispensáveis ao processo de fixação incluem diversos gêneros de bactérias, cianobactérias (também conhecidas como algas verdes-azuladas) e também os actinomicetos do gênero *Franckia* (SIQUEIRA e

FRANCO, 1988). Essas bactérias também denominadas como diazotróficas, se associam a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade, podendo assim ser classificadas como diazotróficos de vida livre, que fixam o N para seu próprio uso; diazotróficos associativos, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma relação de simbiose e os diazotróficos simbióticos, que estabelecem uma interação muito estreita com o simbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos (EVANS e BURRIS, 1992; HUNGRIA et al., 2007).

Na agricultura brasileira um exemplo da importância da contribuição da FBN para nutrição de plantas refere-se à simbiose que ocorre entre plantas leguminosas e bactérias do grupo dos rizóbios. A eficiência deste processo de FBN para a cultura da soja corresponde a até 94% do N requerido pelas cultivares mais produtivas (HUNGRIA et al., 2006), sendo que, para as leguminosas, praticamente todo o N fixado da atmosfera é disponibilizado ao hospedeiro e aos outros organismos associados com os fixadores de N (LOPES, 2007).

A maioria das bactérias diazotróficas de vida livre são heterotróficas requerendo ecossistemas capazes de prover uma fonte de C utilizável necessário para a fixação de N. Encontram-se incluídos nesse grupo os gêneros *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Azotobacter* e *Azomonas* (MARIN et al., 1999). Essas bactérias provavelmente fixam cerca de 11 kg ha⁻¹ a cada ano em solos com pouco N, contanto que haja condições adequadas ao processo (TROEH e THOMPSON, 2007).

No caso das bactérias associativas, Baldani et al. (1997) classificam estas em dois grupos: 1) endofíticos facultativos – colonizam tanto a rizosfera como o interior das raízes; 2) endofíticos obrigatórios – colonizam apenas o interior das raízes. Entre os endofíticos facultativos estão algumas bactérias do gênero *Azospirillum* spp. e entre os endofíticos obrigatórios, estão incluídas as espécies *Herbaspirillum seropedicae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Azoarcus* spp.. Ao contrário das bactérias simbióticas, as associativas excretam somente uma parte do N fixado diretamente para a planta associada; sendo posteriormente, cedidos aportes adicionais de N as plantas pela mineralização das bactérias (HUNGRIA, 2011).

Bactérias diazotróficas que se associam a gramíneas e cereais possuem a capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos do vegetal, sem causar danos (KLOEPPER, et al., 1989; MONTAÑEZ et al., 2009).

Para Perin et al. (2003), o estabelecimento endofítico da bactéria, pode influenciar mais eficientemente o crescimento das plantas quando comparado ao ambiente rizosférico, visto que no interior do vegetal a interface de troca de metabólitos é mais direta, e também por ter a competição microbiana e as flutuações ambientais uma influencia menor na colonização das bactérias.

Os benefícios proporcionados as plantas pela associação com os diazotróficos são obtidos principalmente pela produção de hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas e citocininas, que estimulam o crescimento vegetal, principalmente de raízes, que se dá muitas vezes pela modificação de algumas características morfológicas, tais como, comprimento, ramificação e incidência de pelos radiculares, permitindo uma maior exploração do solo pelas raízes (DOBBELAERE et al., 1999; MIYAUCHI, et al., 2008). Isto pode implicar em vários outros efeitos como incrementos na absorção da água e minerais, maior tolerância a estresses como salinidade e seca, resultando em uma planta mais vigorosa e produtiva (BASHAN e HOLGUIN, 1997; DOBBELAERE et al., 2001; BASHAN et al., 2004).

A solubilização de fosfatos ou aceleração de processos biológicos como mineralização (PERSELLO-CARTINEAUX et al., 2003), assim como a proteção contra patógenos por meio de vários mecanismos como a produção de sideróforos, glucanases e antibiose (WHIPPS, 2001), além do fornecimento de N por meio da fixação biológica deste elemento, representam outros benefícios relacionados a associação dos diazotróficos com gramíneas. Acredita-se que esses microrganismos promovam o crescimento das plantas por uma combinação de todos esses mecanismos (DOBBELAERE et al., 2003).

2.3.2 A enzima nitrogenase

Os microrganismos fixadores de N possuem como característica principal a presença da enzima nitrogenase, que é responsável por catalisar o processo de redução do N atmosférico a amônia, forma assimilável pelas plantas (RUSCHEL, 1985).

O complexo nitrogenase consiste de dois componentes do tipo metalo-proteína: um que contém o sítio ativo para redução do substrato a ferro-molibdênio-

proteína (FeMo), também chamada de componente I; e aquela que acopla a hidrólise de ATP para transferência de elétrons durante a reação, a ferro-proteína (Fe-proteína) ou componente II (BALDANI et al., 2009). A FBN é um processo complexo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados *nif* (“nitrogen fixation”), tais genes codificam a FeMo-proteína e a Fe-proteína, bem como genes acessórios para proteínas de transferência de elétrons, e também para a síntese e regulação dos grupos metálicos envolvidos diretamente neste processo (HALBLEIB e LUDDEN, 2000).

Estudos demonstram a existência de sistemas alternativos da nitrogenase independentes geneticamente: nitrogenase 1, dependente de molibdênio e ferro - codificada pelos genes *nif*; nitrogenase 2, dependente de vanádio (V) - codificada por genes *vnf* e nitrogenase 3, dependente de Fe - codificada por genes *anf* (REIS e TEIXEIRA, 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Estes dois últimos sistemas da nitrogenase são encontrados somente em um subconjunto limitado de bactérias diazotróficas e, na maioria dos casos estudados até agora, estão presentes secundariamente à nitrogenase FeMo. Estima-se que aproximadamente 5% das bactérias tenham os genes responsáveis pelo processo de fixação de N (RAYMOND et. al., 2004).

Na redução do substrato pela nitrogenase FeMo estão envolvidos em geral, três tipos básicos de transferência de elétrons: a) redução da Fe-proteína por carregadores de elétrons (ferredoxina); b) transferência de um único elétron a partir da Fe-proteína para a MoFe-proteína por meio de um processo dependente de Mg-ATP e c) transferência de elétrons para o substrato ligado ao sítio ativo da MoFe-proteína (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Huergo et al. (2008) relatam que a fixação do N é um processo muito caro em termos de energia biológica, pois requer grandes quantidades de poder redutor e fosfato de alta energia (ATP). Cerca de 16 mols de ATP e 4 pares de elétrons são necessários para produzir um mol de amônio pelo sistema enzimático nitrogenase, isto é equivalente a 28 mols de ATP por mol de amônia produzida por bactérias diazotróficas aeróbicas.

A nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio, podendo ser destruída irreversivelmente quando em contato com este elemento. Tal fato representa um problema para a maioria dos microrganismos diazotróficos com exceção daqueles que possuem um metabolismo anaeróbico. Os diazotróficos aeróbios desenvolveram

alguns mecanismos para impedir a interferência do oxigênio no sítio ativo da nitrogenase, como por exemplo: proteção respiratória, produção de exopolissacarídeos e heterocistos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Mas nem todos os diazotróficos aeróbios apresentam estes mecanismos de proteção contra o oxigênio.

Bactérias do gênero *Azospirillum* apresentam sensibilidade ao O₂, em função desta característica esses microrganismos dependem de ambientes microaerofílicos quando fixam N₂, ou seja, só podem fazê-lo quando a taxa de dissolução de oxigênio no meio aquoso estiver em equilíbrio com sua taxa de consumo pela respiração, permitindo, assim, a expressão e a atividade da enzima nitrogenase (DÖBEREINER et al., 1995). Acredita-se que diazotróficos endofíticos podem apresentar vantagens em relação aos associados às raízes, uma vez que eles se encontram mais bem localizados para explorar as fontes de C disponibilizadas pelas plantas (JAMES e OLIVARES, 1997).

2.3.3 *Azospirillum*: aspectos morfológicos, ecológicos e fisiológicos

As bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos heterotróficos, aeróbicos, Gram-negativos, em forma de bastonete e usualmente uniflagelados, podendo ter apenas um flagelo polar ou também flagelos laterais (ROPER e LADHA, 1995; ABDALLA et al., 2008). Onze espécies deste gênero estão atualmente descritas: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. zae* e *A. canadense* (BALDANI, et al., 2009).

O *Azospirillum* apresenta ampla distribuição nos solos de clima tropical e subtropical, em associação com gramíneas de grande importância econômica, como o trigo, milho, arroz, diversas forrageiras e também com outras espécies vegetais (BALDANI et al., 1996). Inicialmente estas bactérias foram classificadas como de vida livre, entretanto existem relatos de que estes microrganismos podem crescer extensivamente na rizosfera de gramíneas (KENNEDY e TCHAN, 1992), podendo também ser encontrados na superfície ou crescendo endofiticamente nos espaços intercelulares. De acordo com Baldani et al. (1997), este gênero de bactéria é classificado atualmente como endofítico facultativo.

A fisiologia dos microrganismos diazotróficos é marcada pelas propriedades inerentes da nitrogenase como: presença de seus componentes estruturais como o Fe, Mo ou V; ATP para sua atividade e suprimento adequado de poder redutor (flavodoxina e ferredoxina) (REIS e TEIXEIRA, 2005).

Os metabolismos de C e N apresentados pelas espécies de *Azospirillum* são bastante versáteis, o que as tornam bem adaptadas para estabelecer um ambiente competitivo na rizosfera. As fontes preferenciais de C são ácidos orgânicos como o malato, piruvato e succinato e, também frutose e glicose. No caso do N, amônia, nitrato, nitrito e aminoácidos, além do N atmosférico constituem as fontes deste elemento utilizadas por estas bactérias (DÖBEREINER, 1992). Especificamente para a espécie *A. brasilense*, pode-se salientar a incapacidade de utilização da glicose como fonte de C, devido à ausência de um transportador específico na membrana plasmática e de enzimas glicolíticas (GOEBEL e KRIEG, 1984).

Em condições desfavoráveis, tais como seca e limitação de nutrientes, tem sido demonstrado que a bactéria apresenta vários mecanismos fisiológicos de proteção (formação de cistos e produção melanina e poli-hidroxitirato), que podem facilitar a sua sobrevivência (SADASIVAN e NEYRA, 1987; DELGALLO e FENDIRIK, 1994).

2.3.4 *Azospirillum* X genótipos de milho

Quando se trata de FBN em espécies não leguminosas o efeito que o genótipo da planta pode exercer sobre a eficiência da fixação de N₂ é expressivo, assim medidas como a identificação, a seleção e o uso de genótipos de milho menos exigentes em N e eficientes na aquisição deste elemento constituem estratégias importantes (REIS JÚNIOR et al., 2000). Nesse sentido, deve ser considerada a busca por genótipos que formem associações mais eficientes com bactérias diazotróficas.

Sala et al. (2005) afirmam que uma das variáveis que contribui para a complexidade das respostas à inoculação é a interação do genótipo da planta e a estirpe inoculada. Diferenças de contribuição da FBN, de acordo com o genótipo de planta, são relatadas em diversos trabalhos com gramíneas. Oliveira (1994), aplicando o método de diluição isotópica de ¹⁵N em 40 cultivares de arroz inundado,

encontrou diferenças consideráveis entre as variedades no que se refere à contribuição de N, este fato também foi observado para ecótipos de *Panicum maximum* e trigo (MIRANDA et al., 1990; ZAVALIN et al., 1997).

Em levantamento realizado pela Embrapa em áreas de produção de cana-de-açúcar para verificar a contribuição da FBN, observou-se variação de 0 a 60%, com média de 32% de contribuição. Este resultado indica que fatores como genótipo da variedade cultivada e adubação nitrogenada, podem afetar de forma expressiva o processo de FBN nesta cultura (POLIDORO et al., 2001). Mais especificamente para a inoculação de *Azospirillum*, Salomone e Döbereiner (1996) avaliando com diferentes genótipos de milho em condições de campo obtiveram respostas diferenciadas quanto à inoculação, onde certos genótipos mostraram aumentos de até 100% na produção. Demonstrando assim que existem variações nas interações entre genótipos de milho e bactérias diazotróficas.

2.3.5 Contribuições da inoculação de *Azospirillum* em gramíneas

Dentre as bactérias capazes de fixar N em gramíneas o gênero *Azospirillum* é o mais estudado (RADWAN et al., 2004). Em um conjunto de ensaios realizados no estado do Paraná, onde se avaliou a combinação de duas estirpes de *Azospirillum* (Ab-V5 e Ab-V6) e também o veículo para aplicação da bactéria na semente (inoculante turfoso e líquido), observaram-se incrementos na produção de milho na ordem de 27% e de 31% no trigo, em relação aos controles não inoculados. Esses efeitos da inoculação foram atribuídos, ao aumento da absorção de macro e micronutrientes e não especificamente a FBN (HUNGRIA et al., 2010).

Aumentos na produção de grãos de milho também foram obtidos em outros experimentos com inoculação de *Azospirillum* spp. (SALOMONE e DÖBEREINER, 1996; CAVALLET et al., 2000). Dalla Santa et al. (2008), avaliando a associação da inoculação de *Azospirillum* a diferentes níveis de adubação nitrogenada para as culturas de trigo, cevada e aveia, concluíram que para o trigo e a cevada parte da fertilização nitrogenada inorgânica pode ser substituída pela inoculação. Incrementos de matéria seca de parte aérea e raiz no trigo também são obtidos com a inoculação desta bactéria (DÍAZ-ZORITAA e FERNÁNDEZ-CANIGIAB, 2009).

Okon e Vanderleyden (1997) baseando-se em dados acumulados durante anos de pesquisa com experimentos de inoculação a campo, concluem que o gênero *Azospirillum* spp. promove ganhos em rendimento em importantes culturas, e salientam que o ganho com a inoculação desta bactéria não se restringe apenas ao suprimento de N pela FBN, mas também ao aumento da superfície de absorção das raízes da planta, em função das mudanças morfológicas que ocorre no sistema radicular pela inoculação, aumentando conseqüentemente o volume de solo explorado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização, Caracterização, Implantação e Condução do Experimento

O experimento foi desenvolvido a campo na Estação Experimental “Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa”, pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon - PR. O município está localizado a uma longitude de 54° 22' W, latitude 24° 46' S e altitude média de 420 metros. O clima da região, segundo a classificação de Köppen é subtropical úmido (Cfa), com temperaturas médias anuais variando entre 17 e 19°C e precipitações totais entre 1.200 e 2.000 mm.

O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distroférico, de textura argilosa (EMBRAPA, 2006). Anteriormente à instalação do experimento foi realizada amostragem de solo (0-20 cm) na área experimental para determinação das características químicas do solo, cujos resultados foram os seguintes: pH em $\text{CaCl}_2 = 5,30$; M.O. = $34,17 \text{ g dm}^{-3}$; P = $18,34 \text{ mg dm}^{-3}$; K, Ca e Mg, 0,20; 2,92 e $1,52 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, respectivamente; H+Al = $7,19 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $\text{Al}^{3+} = 0,27 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Cu = $7,26 \text{ mg dm}^{-3}$; Mn = $134,00 \text{ mg dm}^{-3}$; Fe = $37,96 \text{ mg dm}^{-3}$; Zn = $1,50 \text{ mg dm}^{-3}$; SB = $4,64 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; CTC = $11,84 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Al = 5,81% , e V = 48,5%. Apesar do pH do solo estar baixo, optou-se por não realizar a calagem do solo em função do curto período entre a colheita da cultura anterior e a semeadura do milho, considerando que a calagem deve ser feita pelo menos dois meses antes do plantio (FORNASIERI FILHO, 1992) e também por não ter sido verificada deficiência de P nem conteúdo desfavorável de Al trocável. A precipitação pluviométrica acumulada e as temperaturas médias mensais incidentes durante o período de condução do experimento são apresentadas na Figura 1.

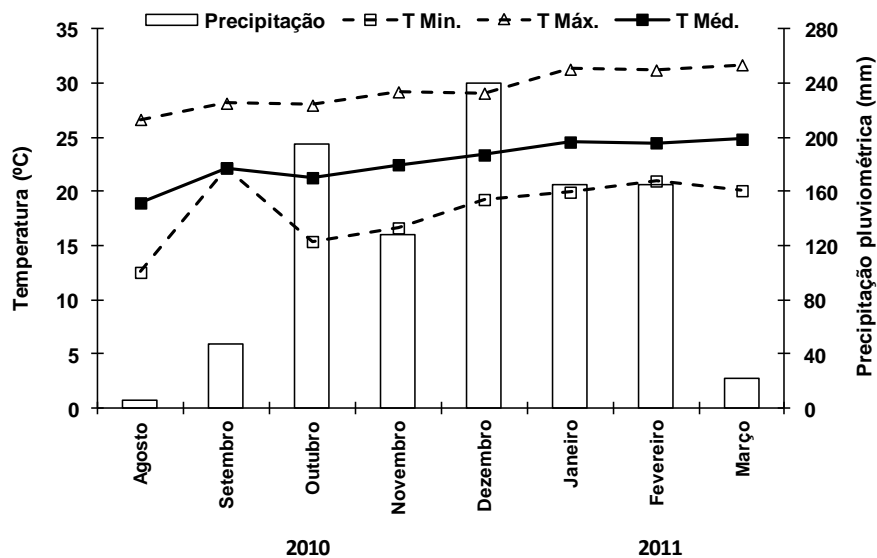


Figura 1: Precipitação pluviométrica acumulada e temperatura média mensal no período de agosto/2010 a março/2011. Estação Climatológica Automática de Marechal Cândido Rondon, PR.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial $2 \times 2 \times 5$, com quatro blocos. O primeiro fator refere-se aos híbridos simples de milho, 30F53 (A) e CD386 (B), ambos com ciclo produtivo precoce. O segundo fator é relativo à inoculação ou não de produto comercial a base de *Azospirillum brasilense* (líquido); e o terceiro fator refere-se às diferentes doses de N, sendo elas 0, 40, 80, 120 e 160 kg ha⁻¹ de N.

Cada parcela experimental constou de seis linhas de plantas, com espaçamento de 0,7 m entre linhas e comprimento de 5 m, com espaçamento de 0,7 m entre blocos. Assim, cada parcela apresentou uma área de 21 m² e o experimento uma área total de 1.682,1 m². Como parcela útil foram utilizadas as quatro linhas centrais, desconsiderando-se 1,0 m das extremidades como bordadura.

Para inoculação das sementes foi utilizado um produto comercial líquido (Marterfix Gramíneas[®]) contendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* na concentração de 2×10^8 UFC mL⁻¹. A inoculação foi realizada adicionando-se o inoculante, na proporção de 100 mL do produto para 60.000 sementes, com auxílio de pipetas automáticas, diretamente sobre as sementes, em sacos plásticos. Posteriormente estes foram agitados por aproximadamente 1 minuto para uniformizar a distribuição do produto nas sementes. A massa de sementes foi mantida à sombra por aproximadamente uma hora, sendo em seguida efetuada a semeadura.

Com base nos resultados da análise de solo e na recomendação de adubação para o milho no estado do Paraná (IAPAR, 2003), aplicou-se na área experimental, anteriormente ao plantio e no sulco de semeadura 40 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 50 kg ha⁻¹ de K₂O, utilizando-se como fonte de fósforo (P) e potássio (K) o superfosfato triplo e o cloreto de potássio, respectivamente. Esta aplicação foi realizada com auxílio de semeadora adubadora. A adubação nitrogenada foi realizada manualmente nas parcelas que receberam N, de acordo com os tratamentos. Foram aplicados 40 kg ha⁻¹ de N na semeadura, e o restante das doses em cobertura em duas aplicações, uma no estágio V4 e outra no V6, sendo utilizada como fonte de N a uréia, aplicada em condições de elevada umidade do solo.

A área em que foi realizado este experimento era manejada sob sistema de semeadura direta, sendo o milho a cultura antecessora à implantação do experimento.

A semeadura foi realizada no dia 09 de outubro de 2010. Para tanto, foram semeadas dez sementes por metro linear com o auxílio de matracas. Vinte dias após a semeadura (DAS), realizou-se o desbaste objetivando manter cinco plantas por metro linear. As sementes utilizadas no experimento foram previamente tratadas com uma mistura de fluodixonil (fungicida), lambdacialotrina e deltrametrina (inseticidas), na proporção de 10 mL kg⁻¹ de semente.

Durante a condução do experimento foram realizadas duas aplicações de herbicidas, uma em pré-plantio, para dessecação da área e outra antes do fechamento da cultura. Também foram feitas duas aplicações de inseticida, aos 18 e 30 DAP com produto contendo tiametoxam/lambdacialotrina como ingredientes ativos (200 mL ha⁻¹), para controle de lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e percevejo-barriga-verde (*Dichelops melacanthus*).

3.2 Características Avaliadas

3.2.1 Variáveis biométricas

Foram realizadas duas coletas de plantas, uma no estágio vegetativo V12 – planta com 12 folhas e, outra no reprodutivo, R3 – grãos pastosos. Em cada coleta foram retiradas de forma aleatória duas plantas da área útil de cada parcela para

avaliação. Previamente à coleta das plantas foi mensurada a altura de plantas (m) e diâmetro de colmo (mm), com auxílio de régua graduada e paquímetro digital, respectivamente.

As plantas coletadas foram levadas ao laboratório de Agronomia da Estação Experimental, sendo então seccionadas em diferentes partes. Em seguida foram determinadas as variáveis: área foliar, expressa em dm^2 por planta e, as massas secas de colmo + bainha (MSCB), folhas (MSF), espigas (MSE), apenas para o estágio reprodutivo, e massa seca total de planta (MST), valor este calculado. Todas as massas secas foram expressas em g por planta.

Para a quantificação da área foliar utilizou-se o método de amostragens proposto por Benincasa (2003). Após separação das folhas, retiraram-se dez medidas de folhas com uma área conhecida (cada uma com $15,25 \text{ cm}^2$), as quais foram consideradas como área foliar da amostra (AF amostra). Posteriormente, esta amostra assim como todo material foliar foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até atingirem massa constante. Em seguida, as massas foram obtidas em balança de precisão, obtendo-se assim a massa de matéria seca de amostra (MS amostra) e também a massa de matéria seca de folhas (MSF). A área foliar então foi calculada de acordo com a fórmula: $AF = [(AF \text{ amostra} \times MSF) / MS \text{ amostra}]$.

3.2.2 Análise do teor de nitrogênio no tecido foliar

A coleta de material para a análise do teor de N foliar foi realizada por ocasião do aparecimento da inflorescência feminina conforme metodologia proposta por Ritchie et al., 2003. Foram coletadas folhas da parte oposta e abaixo da espiga superior, de cinco plantas escolhidas aleatoriamente dentro da área útil de cada parcela experimental, sendo estas colocadas em sacos limpos, devidamente identificados. No laboratório as folhas foram lavadas com detergente e água destilada. Após a lavagem retirou-se a nervura central das folhas e estas foram secadas em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até atingirem massa constante. Em seguida as folhas foram moídas em moinho tipo facas, passadas em peneiras de 2 mm e armazenadas em sacos de papel identificados para posterior análise.

Para a determinação do teor de N, as amostras de tecidos foliares secas e moídas foram submetidas à digestão sulfúrica. O teor de N nos tecidos foi determinado pelo método Kjeldahl, conforme descrito por Tedesco et al. (1995).

3.2.3 Componentes da produção e produtividade

Ao final do ciclo da cultura foi mensurada a altura de inserção de espiga (m) de duas plantas por parcela, com auxílio de régua graduada. Posteriormente, coletaram-se dez espigas por parcela útil, sendo então determinados os seguintes componentes da produção: comprimento da espiga (cm), diâmetro da espiga (mm), massa da espiga (g), número de fileiras por espiga, números de grãos por fileira e massa de 100 grãos (g).

A produtividade foi avaliada a partir da produção da área útil de cada parcela, sendo expressa em kg ha^{-1} , após correção da umidade dos grãos para 14% (base úmida).

3.3 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2008) e as médias relativas aos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Para as variáveis com significância estatística (teste F) em função das doses de N foi utilizado análise de regressão, com a utilização do teste t de Student.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliações Biométricas

Para a avaliação realizada no estágio vegetativo (V12) foi verificada interação significativa apenas entre os fatores inoculação x doses de N para a variável diâmetro de colmo, enquanto para os demais parâmetros houve apenas efeito isolado de híbrido para altura e área foliar, e de doses de N para altura, massa de matéria seca de folhas e total (Tabela 1).

Tabela 1. Quadrados médios resultantes da análise de variância para altura de plantas (ALT), diâmetro de colmo (DC), área foliar (AF) e massas de matéria seca de colmo + bainha (MSCB), folha (MSF) e total de parte aérea (MSTPA), variáveis avaliadas no estágio vegetativo V12 da cultura do milho. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

Fonte variação	G.L.	Quadrados médios					
		ALT	DC	AF	MSCB	MSF	MSTPA
Híbridos (H)	1	0,170**	2,842	3443,869*	16,209	48,766	121,106
Inoculação (I)	1	0,002	15,016	337,308	767,870	137,917	1556,465
Doses N (D)	4	0,098**	68,029	1359,426	967,470	548,271*	2741,776*
HxI	1	0,002	1,568	298,262	83,784	241,651	609,353
HxD	4	0,008	11,810	142,251	217,866	69,743	377,341
IxD	4	0,002	179,897**	347,114	380,761	151,435	749,631
HxIx	4	0,018	8,315	404,215	288,622	49,641	381,263
Resíduo	57	0,015	47,896	689,838	414,582	184,951	806,534
CV (%)		9,44	20,63	25,38	24,15	16,74	17,15

** e *: significativo a $p \leq 0,01$ e a $p \leq 0,05$ pelo teste F, respectivamente.

Desdobrando-se a interação entre os fatores inoculação e doses de N para o diâmetro de colmo verificou-se influência das doses de N apenas em presença da inoculação de *A. brasilense*. Neste caso, houve ajuste dos dados a um modelo linear crescente (Figura 2A) sendo observado, de acordo com o modelo obtido, incremento de 0,07 mm no diâmetro de colmo para cada kg de N adicionado ao solo. Já o fator inoculação não influenciou as doses de N avaliadas para o diâmetro de colmo. Verona et al. (2010) em estudo sobre os efeitos da aplicação de reguladores vegetais via semente associados à inoculação de *Azospirillum* spp. na cultura do milho, constataram que a inoculação proporcionou maior diâmetro de colmo na fase vegetativa da planta em relação ao tratamento testemunha.

Altura de plantas e área foliar foram influenciadas pelos híbridos avaliados, sendo o híbrido 30F53 estatisticamente superior ao CD386 para as duas variáveis, demonstrando influência do fator genético para as mesmas (Tabela 2). A ausência de resposta da altura de plantas à inoculação também foi verificado por Campos et al. (2000) e Cavallet et al. (2000), em diferentes estudos avaliando a eficiência agrônômica do inoculante comercial “Graminante” a base de *Azospirillum* spp. e aplicações de N em semeadura e cobertura na cultura do milho. No entanto, para o acúmulo de massa de matéria seca das plantas de milho, estudos tem apresentado efeito positivo da inoculação com *Azospirillum* spp. Quadros (2009), avaliando o desempenho agrônômico de híbridos de milho em função da inoculação com *Azospirillum* em associação com a adubação nitrogenada, observou incrementos até 53% no rendimento da massa seca da parte aérea para o tratamento inoculado em relação atestemunha. Verona et al. (2010), mesmo em condição de estresse hídrico, também verificaram efeito positivo da inoculação sobre o incremento da massa seca da parte aérea do milho.

Tabela 2. Altura de plantas (ALT), diâmetro de colmo (DC), área foliar (AF), massas secas de colmo + bainha (MSCB), de folha (MSF) e total de parte aérea (MSTPA) no estágio vegetativo da cultura do milho em função do híbrido de milho e da inoculação ou não com *A. brasilense*. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

FONTES DE VARIACÃO	ALT	DC	AF	MSCB	MSF	MSTPA
HÍBRIDOS	m	mm	dm ²	-----g-----		
30F53	1,33 a	33,74 a	110,05 a	84,75 a	82,04 a	166,79 a
CD386	1,24 b	33,36 a	96,93 b	83,85 a	80,48 a	164,33 a
INOCULAÇÃO						
Controle	1,28 a	33,12 a	101,44 a	81,20 a	79,95 a	161,15 a
<i>A. brasilense</i>	1,29 a	33,99 a	105,54 a	87,40 a	82,57 a	169,97 a
DMS	0,05	3,09	11,76	9,11	6,08	12,71
CV (%)	9,44	20,63	25,38	24,15	16,74	17,15

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a $p \leq 0,05$.

As doses de N influenciaram os parâmetros altura de plantas (Figura 2B), massa de matéria seca de folha e total de parte aérea (Figura 3A e 3B). Os demais parâmetros não foram afetados pela adubação nitrogenada, sendo as médias apresentadas na tabela 3.

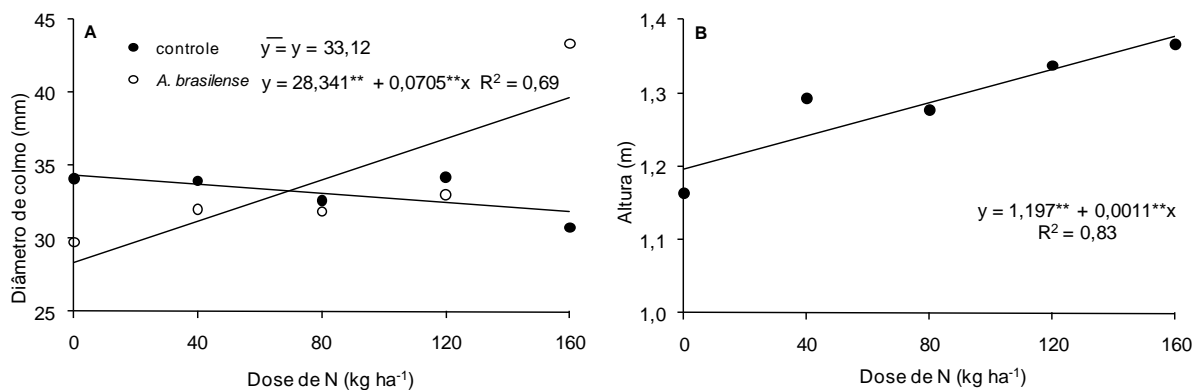


Figura 2. Diâmetro de colmo (A) e altura de plantas (B) de plantas de milho no estágio vegetativo em função da aplicação isolada de diferentes doses de N ou associada à inoculação ou não de *A. brasilense*. Unioeste, Marechal Cândido Rondon-PR, 2010/2011 (Obs. **: significativo a 1% pelo teste t).

Observou-se ajuste linear crescente dos dados de altura de plantas em função das doses de N (Figura 2A), com incrementos de 0,0011 m para cada kg de N adicionado ao solo. Santos et al. (2007) avaliando três híbridos de milho associados a dois espaçamentos entre fileiras e também a diferentes modos de aplicação de N, sendo eles zero, 120 kg ha⁻¹ no plantio e 30 kg ha⁻¹ no plantio + 60 kg ha⁻¹ em cobertura, observaram que a aplicação de N parcelado ou todo no plantio, elevou a altura de plantas dos híbridos estudados independentemente do espaçamento adotado. Resultado este que corrobora com os obtidos neste estudo.

Tabela 3. Médias de diâmetro de colmo de plantas (DC), área foliar (AF) e massa seca de colmo + bainha (MSCB) no estágio vegetativo da cultura do milho em função da aplicação de doses de nitrogênio. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

DOSE N (kg ha ⁻¹)	DC (mm)	AF (dm ²)	MSCB (g)
0	31,91	89,87	72,95
40	32,96	110,36	89,90
80	32,24	104,55	79,87
120	33,59	113,03	87,13
160	37,05	99,62	91,65
DMS	6,89	26,16	20,28
C.V (%)	20,63	25,38	24,15

Para os dados de massa de matéria seca de folha e total da parte aérea, houve um ajuste de modelo polinomial cúbico (Figura 3A e 3B), sendo obtidos os maiores rendimentos, de 89,05 g para folhas e de 178,95 g para parte aérea total, com a dose de 40 kg ha⁻¹ de N. Verificou-se um acúmulo de massa da matéria seca

de folhas e de parte aérea total até a dose de 40 kg ha⁻¹ de N, seguido de redução no até a dose de 120 kg ha⁻¹ de N, havendo a partir de então uma retomada no incremento de biomassa nas plantas até a dose de 160 kg ha⁻¹ de N. Nesse sentido, Deparis et al. (2007), estudando três espaçamentos entrelinhas com a combinação de sete doses de N (8, 20, 40, 80, 120, 140 e 152 kg ha⁻¹) e sete doses de potássio, também verificaram efeito positivo para produção de biomassa seca total quanto à adubação nitrogenada.

Na segunda avaliação biométrica, realizada no estágio R3, foi observada diferença significativa entre os tratamentos somente para os fatores isolados (Tabela 4). Portanto, os resultados são apresentados independentemente para cada híbrido, inoculação de *A. brasilense* nas sementes e doses de N.

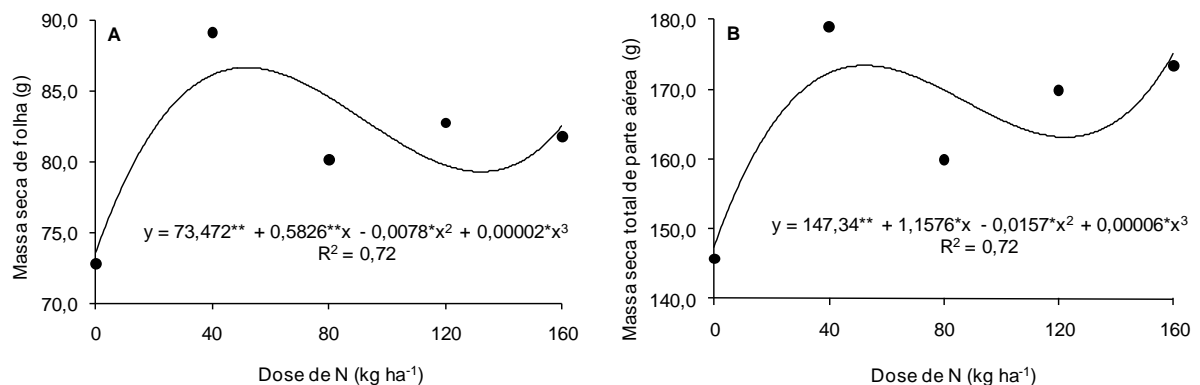


Figura 3. Massa de matéria seca de folha (A) e massa de matéria seca total de parte aérea (B) no estágio vegetativo da cultura do milho em função da aplicação de diferentes doses de N. Unioeste – Marechal Cândido Rondon, 2010/1011. (Obs. ** e *: significativo a 1% e a 5% pelo teste t, respectivamente).

Os híbridos de milho estudados apresentaram diferença estatística para todas as características avaliadas no estágio reprodutivo (R3), exceto para a massa de matéria seca de colmo + bainha, de folha e total (Tabela 4). Para altura de plantas, altura de inserção de espiga e área foliar o híbrido 30F53 mostrou-se estatisticamente superior ao CD386, em função do fator genético. Resultados inversos foram obtidos para as variáveis diâmetro de colmo e massa de matéria seca de espiga (Tabela 5).

A inoculação de *A. brasilense* influenciou positivamente a área foliar e a massa seca total de plantas (Tabela 4). Quanto à área foliar observou-se que a inoculação com *A. brasilense* proporcionou média de 101,59 dm², enquanto o tratamento controle apresentou média de 91,26 dm², ou seja, a inoculação proporcionou um incremento de 10,33 dm² ou 11% (Tabela 5).

Tabela 4. Quadrados médios resultantes da análise de variância para altura de plantas (ALT), altura de inserção de espiga (ALTE), diâmetro de colmo (DC), área foliar (AF) e massas de matéria seca de colmo + bainha (MSCB), espiga (MSE), folha (MSF) e total (MST), variáveis avaliadas no estádio reprodutivo da cultura do milho. Unioeste - Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

Fonte variação	G.L.	Quadrados Médios							
		ALT	ALTE	DC	AF	MSCB	MSE	MSF	MST
Híbridos (H)	1	0,605**	0,434**	15,603*	6715,013**	12656,487	28388,489*	4,181	77815,307
Inoculação (I)	1	0,009	0,008	8,587	2133,558*	62258,293	3468,583	322,284	106511,391*
Doses N (D)	4	0,045**	0,011*	14,297**	2777,413**	9953,003	14698,902*	1479,659**	47909,324
Hxl	1	0,0007	0,007	7,608	1546,512	10509,278	600,005	738,902	2585,083
HxD	4	0,011	0,002	3,721	891,231	15151,499	3647,096	211,826	13139,694
IxD	4	0,008	0,005	1,916	496,473	33837,628	3624,955	218,487	48200,730
HxIx	4	0,004	0,003	0,392	275,271	24685,350	2626,512	100,467	23736,322
Resíduo	57	0,006	0,002	3,402	483,173	15630,782	5491,702	223,658	20965,132
CV (%)		3,65	4,23	7,29	22,80	46,28	26,91	18,09	23,05

** e *: significativo a $p \leq 0,01$ e a $p \leq 0,05$ pelo teste F, respectivamente.

Para a massa de matéria seca total de parte aérea houve um incremento de aproximadamente 12% (72,98 g) quando realizada a inoculação com *A. brasilense* (Tabela 5). Reis Júnior et al. (2008) observaram incremento na massa seca de raízes de milho inoculadas com *Azospirillum* spp. e consideraram que o maior rendimento em massa seca por plantas inoculadas estava relacionado à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias. Bashan e Holguin (1997) relataram que fitormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA), excretados por *Azospirillum* desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas em geral.

Tabela 5. Altura de plantas (ALT), altura de inserção de espiga (AE), diâmetro de colmo de plantas (DC), área foliar (AF), massas secas de colmo + bainha (MSCB), de folha (MSF), de espiga (MSE) e total de parte aérea (MST) no estádio reprodutivo da cultura do milho em função do híbrido de milho e da inoculação ou não com *A. brasilense*. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

FONTE DE VARIAÇÃO	ALT	AE	DC	AF	MSCB	MSF	MSE	MST
HÍBRIDO	m	m	mm	dm ²	-----g-----			
30F53	2,31 a	1,24 a	24,86 b	105,59 a	257,59 a	82,88 a	256,58 b	597,05 a
CD386	2,13 b	1,09 b	25,75 a	87,27 b	282,75 a	82,43 a	294,25 a	659,43 a
INOCULAÇÃO								
Controle	2,23 a	1,15 a	25,63 a	91,26 b	298,07 a	84,66 a	281,99 a	591,75 b
<i>A. brasilense</i>	2,21 a	1,17 a	24,98 a	101,59 a	242,27 a	80,64 a	268,83 a	664,73 a
DMS	0,03	0,02	0,82	9,84	55,98	6,69	33,18	64,83
C.V (%)	3,65	4,23	7,29	22,80	46,28	18,09	26,91	23,05

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a $p \leq 0,05$.

Quanto às doses de N testadas, só não foi verificada diferença significativa para variáveis de massas secas de colmo + bainha e total de parte aérea (Tabela 4). Em relação à altura de plantas verificou-se ajuste polinomial quadrático dos dados (Figura 4A) em função das doses de N aplicadas, cujo modelo permitiu constatar que a altura máxima de planta (2,24 m) é obtida com a dose de 112,5 kg ha⁻¹ de N. Em geral, no tratamento sem fornecimento de N, observou-se durante o desenvolvimento da cultura uma coloração de verde menos intenso nas folhas, além de amarelecimento pronunciado das folhas mais velhas, fato este que certamente condicionou uma menor altura de plantas. Sá (1996b), avaliando a combinação das doses de 0, 30 e 60 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 0, 60 e 120 em cobertura, também verificou redução de crescimento das plantas e sintomas de amarelecimento das folhas no nível de 0 kg ha⁻¹ de N. Arnon (1975) verificou que a carência de N resulta em divisão retardada das células nos pontos de crescimento, acarretando assim redução no tamanho da planta, com reflexos na produtividade.

As doses de N estudadas também influenciaram significativamente a altura de inserção de espiga, com ajuste linear crescente (Figura 4B), sendo verificado pelo modelo obtido incremento de 0,0004 m para cada kg de N adicionado ao solo. Incrementos proporcionados pela adição de doses maiores de N também foram obtidos na altura de plantas tanto no estágio vegetativo quanto no reprodutivo, indicando assim uma interdependência entre altura de plantas e altura de inserção de espiga. No entanto, estas características são de alta herdabilidade genética e menos dependentes do meio, a não ser em uma condição em que a planta passe por uma deficiência nutricional acentuada (SILVA, 2005), o que provavelmente ocorreu no tratamento em que não houve o fornecimento de N. Resultado contrário foi observado por Casagrande e Fornasier Filho (2002), que avaliaram a resposta de dois híbridos de milho a duas épocas de aplicação de N e quatro doses de adubação nitrogenada (0, 30, 60 e 90 kg ha⁻¹ de N), e não observaram diferença estatística entre as doses de N para as características de altura de plantas e de inserção de espiga.

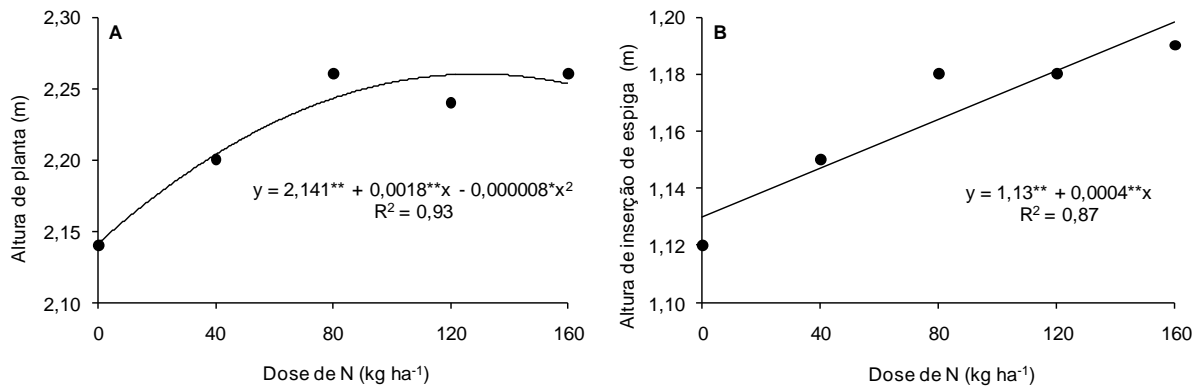


Figura 4. Altura de plantas (A) e altura de inserção de espiga (B) no estágio reprodutivo do milho em função da aplicação de diferentes doses de N. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/1011. (Obs. ** e *: significativo a 1% e a 5% pelo teste t, respectivamente).

A análise de regressão para diâmetro de colmo de plantas e área foliar em função das doses de N aplicadas permitiu um ajuste de equação linear para ambas as características (Figura 5A e 5B). De acordo com as equações obtidas foi possível verificar incrementos de 0,0126 mm no diâmetro de colmo e 0,171 dm² na área foliar para cada kg de N adicionado. Sabe-se que a deficiência de N induz ao menor crescimento e desenvolvimento da planta, proporcionando menor índice de área foliar e duração de folhas metabolicamente ativas. Este fato influi diretamente sobre a quantidade de radiação interceptada, produção de massa de matéria seca e, conseqüentemente, na produção de grãos (BULL, 1993; UHART e ANDRADE, 1995).

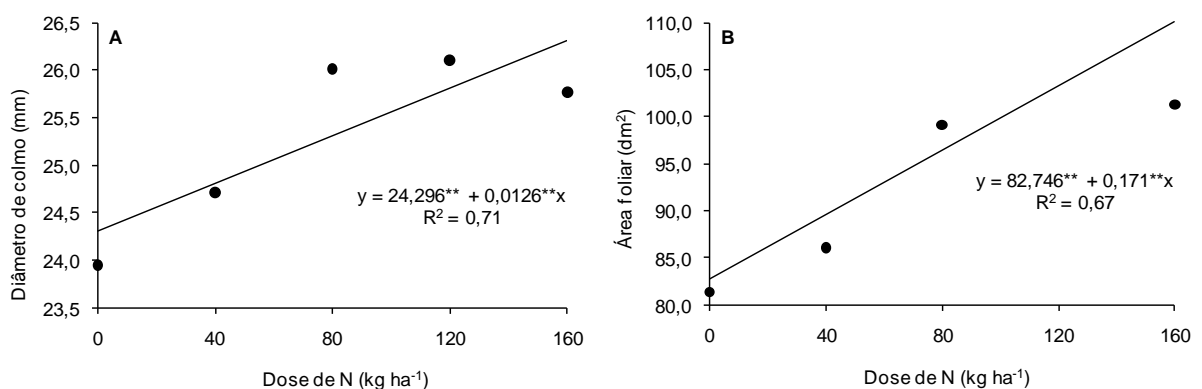


Figura 5. Diâmetro de colmo (A) e área foliar (B) de plantas de milho no estágio reprodutivo em função da aplicação de diferentes doses de N. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/1011. (Obs. **: significativo a 1% pelo teste t).

Para as variáveis massa de matéria seca de espigas e de folhas, observou-se semelhante tendência dos dados, ou seja, com incremento em massa de forma linear para ambas em função da adubação nitrogenada (Figura 6A e 6B). Sendo

possível verificar de acordo com os modelos ajustados acréscimos na ordem de 0,434 g na massa seca de espiga e 0,145 g na massa seca de folha para cada kg de N adicionado ao solo. Embora não tenha sido significativo o fator dose de N para massa seca total de parte aérea, foi observado incrementos nesta variável de acordo com a aplicação de doses crescentes de N, de forma que a dose 160 kg ha⁻¹ de N proporcionou um aumento de 24% na massa seca de parte aérea quando comparada a testemunha (Tabela 6).

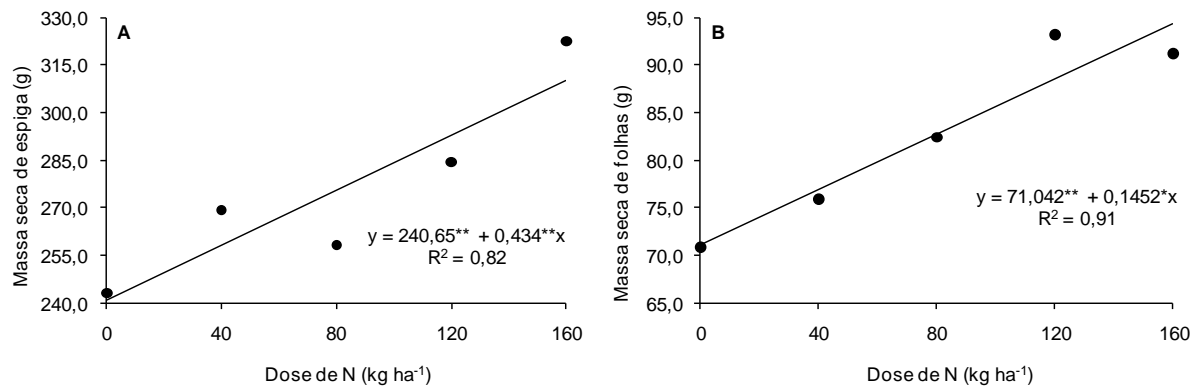


Figura 6. Massa de matéria seca de espiga (A) e massa de matéria seca total de parte aérea (B) de plantas de milho no estágio reprodutivo em função da aplicação de diferentes doses de N. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/1011. (Obs. ** e *: significativo a 1% e a 5% pelo teste t, respectivamente).

Tabela 6. Médias de massa de matéria seca de colmo + bainha (MSCB) e massa de matéria seca total parte aérea (MST) no estágio reprodutivo da cultura do milho em função da aplicação de diferentes doses de nitrogênio. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

DOSE N (kg ha ⁻¹)	MSCB (g por planta)	MST (g por planta)
0	254,39	568,19
40	239,30	584,39
80	297,79	638,25
120	266,59	644,05
160	292,77	706,33
DMS	124,55	144,25
C.V (%)	46,28	23,05

4.2 Teor de Nitrogênio Foliar

Na tabela 7, observa-se que o teor de N sofreu influência dos fatores isolados híbridos e doses de N.

Tabela 7. Quadrados médios resultantes da análise de variância para os teores foliares de nitrogênio (N). Unioeste - Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

Fonte de variação	Quadrado Médio
	N
Híbridos (H)	119,560**
Inoculação (I)	4,608
Doses N (D)	104,955**
HxI	40,328
HxD	5,282
IxD	10,857
HxIx	4,763
Resíduo	15,773
CV (%)	10,33

** e *: significativo a $p \leq 0,01$ e a $p \leq 0,05$ pelo teste F, respectivamente.

Para os híbridos, o CD386 foi estatisticamente superior ao híbrido 30F53, demonstrando que o CD386 é mais eficiente na absorção de N do solo (Tabela 8). Essa diferença significativa na eficiência de utilização de N entre cultivares de milho, também foi observada por Fernandes et al. (2005). Alföldi et al. (1992) relatam que a diferença entre híbridos de milho quanto à eficiência de utilização de N, se deve em decorrência das variações genéticas que se tem entre os genótipos de milho.

O teor de N foliar não foi influenciado pela inoculação de *A. brasilense* (Tabela 8), resultado este que também foi encontrado em estudo realizado por Dobbelaere et al. (2002) com milho e trigo inoculados com diferentes concentrações de células de duas linhagens de *Azospirillum* cultivados em substrato com diferentes concentrações de matéria orgânica e de N mineral, os autores observaram que a inoculação não alterou a concentração de N nas plantas ou nos grãos das culturas avaliadas, no entanto uma diferença na capacidade destas linhagens para estimular o crescimento e absorção de N pelo milho e pelo trigo foi observada. Entretanto, aumento nos teores de N em plantas inoculadas com *Azospirillum* spp. foi relatado por Dobbelaere et al. (2001), relacionado segundo os autores, com a fixação biológica de N_2 e com os mecanismos de promoção do crescimento, que podem incrementar a capacidade das plantas em absorver este nutriente.

Tabela 8. Teores foliares de nitrogênio (N) em função do híbrido de milho e da inoculação ou não com *A. brasilense*. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

FONTE DE VARIAÇÃO	N (g kg ⁻¹)
HÍBRIDO	
30F53	37,21 b
CD386	39,67 a
INOCULAÇÃO	
Controle	38,20 a
<i>A. brasilense</i>	38,68 a
DMS	1,78
C.V (%)	10,33

Observa-se na figura 7, que a curva do teor de N nas folhas de milho em função das doses de N aplicadas ajustou-se a um modelo polinomial quadrático sendo que, de acordo com a equação obtida, a dose de 87,4 kg ha⁻¹ de N permitiria alcançar teoricamente o máximo teor de N nas folhas (40,41 g kg⁻¹). Os teores foliares de N variaram de 35,92 a 41,53 g kg⁻¹ de N. Nota-se que os teores obtidos apresentaram-se acima do intervalo de 27,5 a 32,5 g kg considerado como adequado por Malavolta et al. (1997), contudo não foi observado durante a condução do experimento sintomas de toxidez nas plantas de milho.

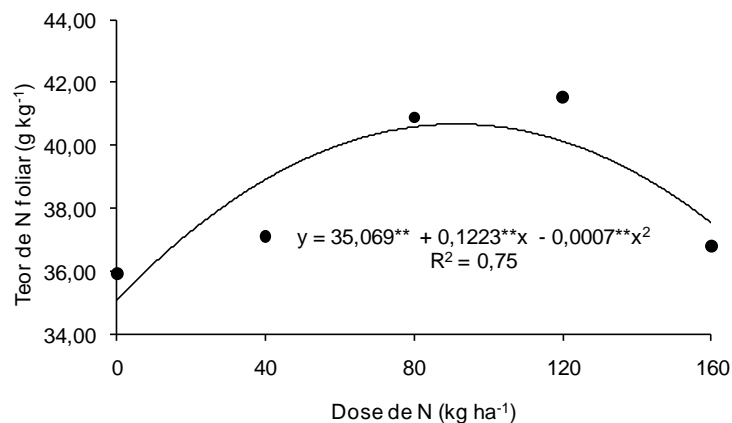


Figura 7. Teor foliar de nitrogênio em função da aplicação de diferentes doses de nitrogênio na cultura do milho. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/1011. (Obs. ** e *: significativo a 1% e a 5% pelo teste t, respectivamente).

Para Below (2002) um importante impacto do metabolismo do N no crescimento e rendimento do milho refere-se à função deste nutriente em estabelecer e manter a capacidade fotossintética. Tal autor ainda afirma que para se alcançar altos rendimentos, não basta apenas que as plantas estabeleçam a capacidade fotossintética, mas também que mantenham esta atividade durante a

formação da semente e enchimento de grãos. Com o envelhecimento das folhas, a capacidade fotossintética diminui, assim como o suprimento de assimilados e o rendimento de grãos. Este declínio ocorre mais rapidamente para as folhas deficientes em N. Assim sendo, o menor teor de N foliar (35,92 g kg⁻¹) constatado nas plantas de milho submetidas à dose de 0 kg ha⁻¹ de N, justifica o fato da produtividade de grãos obtida pelas plantas submetidas a esta dose, ter sido inferior às demais (Figura 9B).

4.3 Componentes de Produção do Milho

Os quadrados médios da análise de variância referentes aos componentes da produção dos híbridos de milho, em resposta à inoculação das sementes com *A. brasilense* e adubação nitrogenada são apresentados na Tabela 9. Verifica-se que, houve interação significativa apenas entre os fatores híbridos x dose de N para a produtividade de grãos. Os demais componentes de produção apresentaram significância para os fatores híbridos e/ou doses de N, e desta forma foram apresentados e discutidos.

Tabela 9. Quadrados médios resultantes da análise de variância para comprimento de espiga (CE), diâmetro de espiga (DE), número de fileiras por espiga (NFE), número de grãos por fileira (NGF), massa de espiga (ME), massa de 100 grãos (M100) e produtividade (PROD). Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

Fonte variação	G.L.	Quadrados Médios						
		CE	DE	NFE	NGF	ME	M100	PROD
Híbridos (H)	1	61,548**	170,207**	42,676**	546,744**	3002,965*	436,738**	109691457,8**
Inoculação (I)	1	0,165	0,021	1,499	0,125	31,450	0,968	1348632,499
Doses N (D)	4	13,307**	22,891**	0,371	70,039**	14540,596**	45,587**	14335212,649**
HxI	1	0,0009	0,697	0,0003	2,606	236,741	0,585	3646725,181
HxD	4	0,411	0,528	0,259	5,134	204,282	3,093	2948680,336*
IxD	4	0,907	0,233	0,356	2,469	1377,548	3,573	516908,259
HxIx	4	0,481	2,555	0,096	7,342	1061,982	5,101	787180,347
Resíduo	57	0,877	1,191	0,823	9,747	723,150	4,856	914765,691
CV (%)		5,36	2,04	5,64	8,93	10,62	5,75	12,20

** e *: significativo a $p \leq 0,01$ e a $p \leq 0,05$ pelo teste F, respectivamente.

Ainda na tabela 9, observa-se que para o fator híbrido houve diferença significativa para todos os componentes da produção avaliados. Observa-se que o 30F53 destacou-se em relação ao CD386 para a maioria dos componentes, sendo

estatisticamente inferior apenas para diâmetro de espiga e massa de 100 grãos (Tabela 10).

Os dados obtidos neste estudo demonstram que a inoculação de *A. brasilense* não influenciou significativamente os componentes da produção analisados (Tabela 9 e 10). Cavallet et al. (2000), também não obtiveram efeito positivo sobre o número de fileiras de grão por espiga com a inoculação de sementes de milho com produto comercial a base de *Azospirillum spp.* Mesmo não ocorrendo diferença significativa para produtividade com a inoculação de *A. brasilense*, observa-se uma produtividade média de 7.967,01 kg ha⁻¹ para o tratamento inoculado, ou seja, são obtidos 259 kg (4 sacas) a mais por hectare em comparação ao tratamento controle, onde foram produzidos 7.707,33 kg ha⁻¹ (Tabela 9). Efeitos positivos da associação da inoculação com a adubação nitrogenada no milho também foram obtidos por Machado et al. (1998) que, ao testarem o efeito das doses de 10 e 100 kg ha⁻¹ de N associada à inoculação com uma mistura de estirpes de bactérias diazotróficas (*A. amazonense*, *A. lipoferum* e *Herbaspirillum seropedicae*), constataram aumento de produção de 4.830 kg ha⁻¹ para 5.790 kg ha⁻¹ devido à inoculação, quando aplicaram a dose de 100 kg ha⁻¹ de N. De modo similar, Dobbelaere et al. (2002) verificaram que o efeito da inoculação de *A. brasilense* estirpe Sp 245 e *A. irakense* estirpe KBC1 foi maior quando associado às doses de N. Porém nem sempre são obtidas respostas positivas de aumento de produção com a inoculação de *Azospirillum spp.*, conforme relatam Campos et al. (1999) para as culturas de trigo e aveia e Campos et al. (2000) para a cultura do milho.

Tabela 10. Comprimento de espiga (CE), diâmetro de espiga (DE), número de fileiras por espiga (NFE), número de grãos por fileira (NGF), massa de espiga (ME), massa de 100 grãos (M100) e produtividade (PROD) em função do híbrido de milho e da inoculação ou não com *A. brasilense*. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

FONTE DE VARIAÇÃO	CE	DE	NFE	NGF	ME	M100	PROD
HÍBRIDO	cm	mm			-----g-----		kg ha ⁻¹
30F53	18,35 a	52,16 b	16,80 a	37,58 a	259,42 a	35,97 b	9008,13 a
CD386	16,59 b	55,07 a	15,34 b	32,35 b	247,17 b	40,64 a	6666,21 b
INOCULAÇÃO							
Controle	17,43 a	53,60 a	15,93 a	35,00 a	252,67 a	38,42 a	7707,33 a
<i>A. brasilense</i>	17,52 a	53,63 a	16,21 a	34,92 a	253,92 a	38,20 a	7967,01 a
DMS	0,41	0,48	0,40	1,39	12,04	0,98	428,25
CV (%)	5,36	2,04	5,64	8,93	10,62	5,75	12,20

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a p ≤ 0,05.

A variabilidade de respostas da inoculação de *Azospirillum* no milho está relacionada a diversos fatores, sendo o genótipo da planta um fator-chave para obtenção dos benefícios oriundos da associação da bactéria com a planta (REIS et al. 2000), visto que existe um certo grau de especificidade de algumas bactérias em relação ao hospedeiro. Dotto et al. (2010) relatam que a seleção de estirpes eficientes também é fundamental para se obter efeito positivo da inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas.

Fatores ambientais, como temperatura, umidade, aeração, pH, salinidade entre outros podem influenciar a atividade e a sobrevivência de bactérias no solo, além da competição com outros microrganismos do solo (BRANDÃO, 1992). Ainda segundo Brandão (1992), o pH pode prejudicar o crescimento de microrganismos no solo não somente quando a concentração de íons H^+ e OH^- estiver elevada, mas também pelo seu efeito indireto na disponibilidade de nutrientes e na penetração de compostos tóxicos presentes no meio nas células microbianas. Considerando-se o pH do solo nas condições do presente estudo, é possível inferir que a ausência de interação entre inoculação e adubação, assim como a ausência de resposta para a maior parte das variáveis à inoculação, podem estar relacionadas a influência do baixo pH do solo sobre a bactéria, destacando a necessidade de se conduzir, paralelamente ao experimento, uma avaliação da população bacteriana do solo, visando identificar tal efeito.

Portanto, mais estudos que avaliem a inoculação de *Azospirillum* spp. em diferentes condições de cultivo associados a genótipos diferentes de milho necessitam ser realizados para maior conhecimento da interação bactéria/genótipo/ambiente.

Todos os componentes de produção avaliados neste estudo, exceto o número de fileiras de grãos por espiga, foram influenciados de forma significativa pelas doses de N aplicadas (Tabela 9).

Para comprimento de espiga, observa-se na figura 8A um ajuste de modelo polinomial quadrático em relação às doses de N, sendo verificado através do modelo ajustado o máximo comprimento de espiga (18,1 cm) com a dose de 150 kg ha^{-1} de N. Para diâmetro de espiga, número de grãos por fileira e massa de espiga, houve uma resposta linear em relação às doses de N aplicadas (Figura 8B, 8C e 8D). De acordo com as funções obtidas foi possível verificar acréscimos de 0,018 mm no diâmetro de espiga, 0,031 no número de grãos por fileira e 0,46 g na massa de

espiga para cada kg de N aplicado no solo. Souza e Soratto (2006), verificaram incremento linear no número de grãos por espiga em função da aplicação de N em cobertura, estes resultados também foram observados por Escosteguy et al. (1997) e Melgar et al. (1991). O suprimento insuficiente de N, durante o estágio de diferenciação floral, pode reduzir a diferenciação do número de óvulos nos primórdios da espiga, e conseqüentemente afetar negativamente a produtividade de grãos (ERNANI et al., 2005).

Para a massa de 100 grãos ocorreu efeito linear crescente em resposta às doses de N. De acordo com o modelo obtido foi possível constatar incremento de 0,025 g na massa de 100 grãos para cada kg de N adicionado (Figura 9A). Efeito semelhante foi observado Lana et al. (2009), em pesquisa com três espaçamentos entrelinhas e quatro doses de N em cobertura (0, 30, 60 e 90 kg ha⁻¹). Aumentos na ordem de 0,016 g para cada kg de N utilizado na adubação foram obtidos pelos autores, independentemente do espaçamento empregado. Amaral Filho et al. (2005) e Silva et al. (2005) também obtiveram aumento na massa de grãos com a aplicação de N em cobertura na cultura do milho. No entanto, Soratto et al. (2011), estudando doses e fontes de N para a mesma cultura não observaram influência dos tratamentos estudados sobre a massa de 1000 grãos. Segundo Fancelli e Dourado Neto (2000), a massa de mil grãos é considerada um importante componente na produtividade de grãos, uma vez que, a ocorrência de qualquer tipo de estresse, seja de natureza biótica ou abiótica, após o florescimento, poderá afetá-la significativamente. Assim, a toxidez ou deficiência por algum elemento poderá interferir reduzindo a massa de mil grãos na cultura do milho, fato este que pode ser confirmado com o tratamento com 0 kg ha⁻¹.

A produtividade dos dois híbridos em resposta as diferentes doses de N é apresentada na figura 9B. Para o híbrido 1 (30F53), houve um ajuste de modelo polinomial cúbico. Observa-se que ocorreu um aumento na produtividade de acordo com incrementos na dose. Assim, a maior produtividade de grãos foi obtida com a dose de 160 kg ha⁻¹ de N, um aumento de 36% quando comparado com a testemunha (0 kg ha⁻¹ N). Para o híbrido 2 (CD386), ocorreu resposta linear crescente da produtividade em função das doses de N até a dose de 160 kg ha⁻¹, com um incremento na produção de 43% em relação a testemunha. O efeito linear das doses de N sobre o rendimento de grãos de milho para o híbrido 2 está em concordância com os resultados obtidos por Araújo et al. (2004).

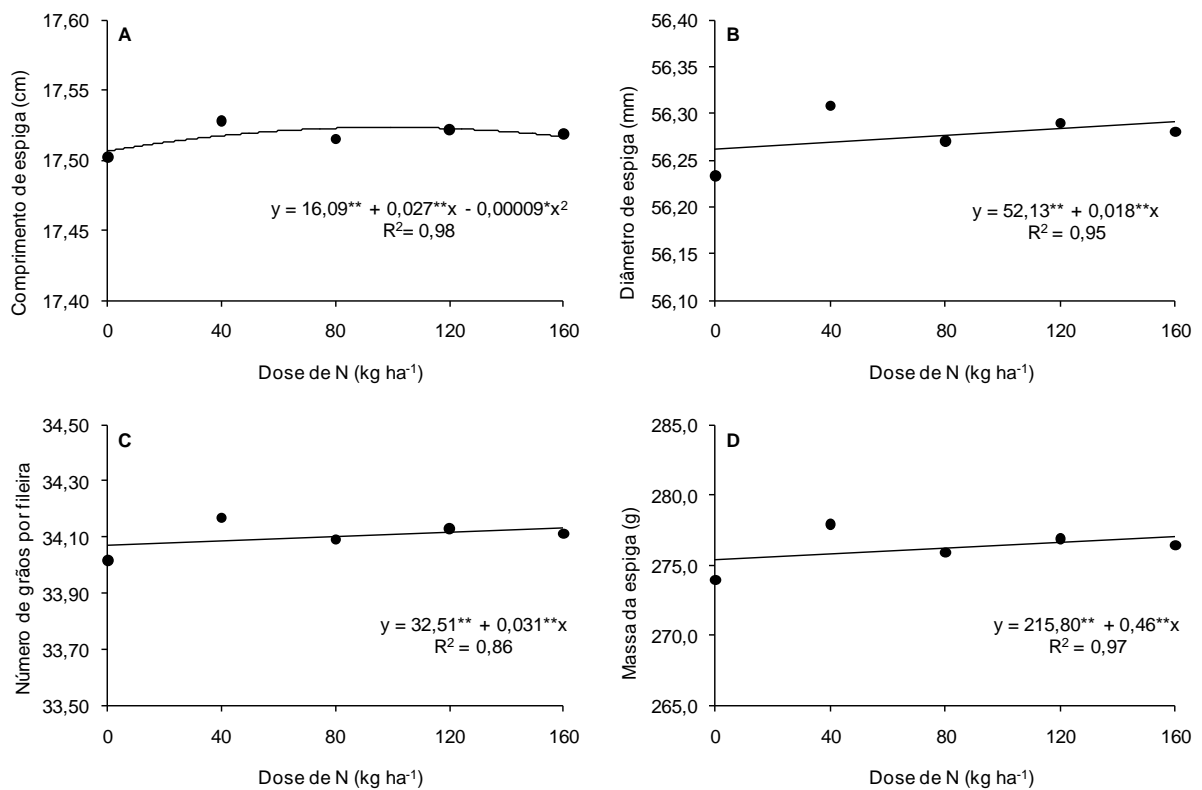


Figura 8. Comprimento de espiga (A), diâmetro de espiga (B), número de grãos por fileira (C) e massa de espiga (D) em função da aplicação de diferentes doses de nitrogênio na cultura do milho. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/1011. (Obs. ** e *: significativo a 1% e a 5% pelo teste t, respectivamente).

A interação significativa entre genótipos x doses de N também foi relatada por Ferreira et al. (2009), que ao estudarem o efeito de diferentes doses de N para três genótipos de milho, constataram que o aumento das doses de N proporcionou reflexo direto na produtividade de grãos. Trabalhos realizados por Da Ros et al. (2003) e Gomes et al. (2007), com adubação nitrogenada confirmam o aumento no rendimento de grãos com o incremento das doses de N.

O incremento na produtividade proporcionado pela aplicação do N (Figura 9B) se deu em virtude deste nutriente ter favorecido o crescimento da planta em altura e diâmetro de colmo (Figura 4A e 5A). Provavelmente este resultado se deve ao incremento da área foliar (Figura 5B), condicionando assim maior capacidade de assimilação de CO₂ e de síntese de carboidratos durante a fotossíntese, resultando em maior rendimento de grãos. Isso pode ser atribuído ao fato do N ser constituinte da molécula de clorofila, atuando nos processos de divisão e expansão celular (BÜLL, 1993; VARVEL et al., 1997). Assim, a adubação nitrogenada possivelmente favoreceu a translocação de açúcares e de N dos órgãos vegetativos para os grãos (KARLEN et al., 1988). Segundo Rao et al. (1992), o N também favorece o

crescimento do sistema radicular, propiciando à planta condições para maior absorção de água e nutrientes.

Cruz et al. (2005) relata claras evidências de que existem diferenças na utilização do N entre os genótipos de milho, não apenas em termos de resposta à fertilização nitrogenada, mas também no que se refere a eficiência de absorção, acumulação e utilização do N absorvido. Tal fato se deve a expressão um genótipo ser resultado de uma série de fatores, como genética, condições edafoclimáticas, técnicas de cultivo entre outros.

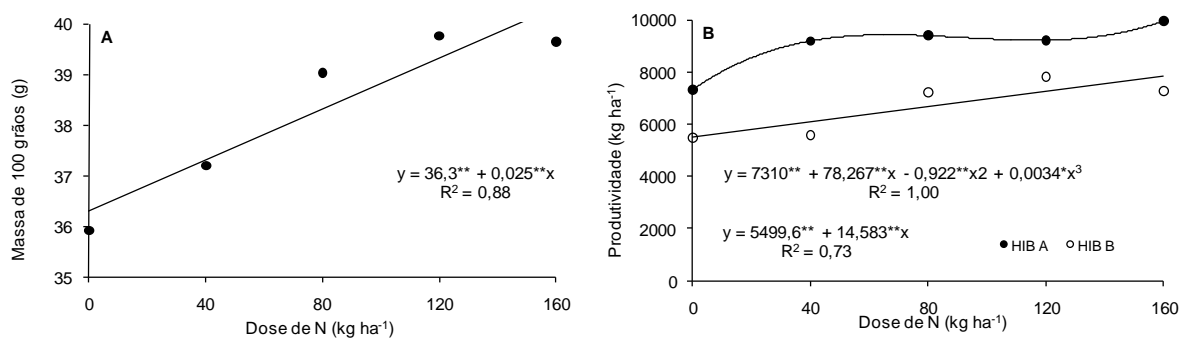


Figura 9. Massa de 100 grãos de milho (A) em função da aplicação de diferentes doses de nitrogênio e produtividade de dois híbridos de milho (B) submetidos a diferentes doses de nitrogênio. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011. (Obs. ** e *: significativo a 1% e a 5% pelo teste t, respectivamente; HIB A: 30F53 e HIB B: CD386).

5 CONCLUSÕES

- Não houve interação entre híbridos, adubação nitrogenada e inoculação com *A. brasilense*. Foi verificada interação entre inoculação e adubação nitrogenada no estágio vegetativo para o diâmetro do colmo, com efeito positivo da inoculação em presença da adubação nitrogenada e, entre híbridos e adubação nitrogenada, para a produtividade da cultura do milho;
- De um modo geral, os híbridos responderam de forma diferenciada para as variáveis analisadas; a aplicação de doses crescentes de N proporcionou incrementos para a maior parte das variáveis biométricas, teor de N foliar e componentes de produção do milho;
- Houve influência da inoculação com *A. brasilense* apenas sobre a área foliar e massa seca total de parte aérea no estágio reprodutivo, que apresentaram incremento na presença da inoculação.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, S. R. S.; PROCHNOW, L. I.; FANCELLI, A. L. **Simpósio discute como utilizar insumos e recursos para otimizar a produtividade do milho**. Piracicaba: IPNI, 2008. 32 p. (Informações Agronômicas, Nº 122).
- ALFOLDI, Z.; PINTER, L.; FEIL, B. Accumulation and partitioning of biomass and soluble carbohydrates in maize seedlings as affected by source of nitrogen, nitrogen concentration and cultivar. **Journal of Plant Nutrition**, v. 15, p. 2567-2583, 1992.
- AMARAL FILHO, J. P. R. do. et al. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 467-473, 2005.
- ARAÚJO, L. A. N.; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39; p. 771-777, 2004.
- ARGENTA, G. et al. Parâmetros de planta como indicadores do nível de nitrogênio na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 519-527, 2002.
- ARNON, I. **Mineral nutrition of maize**. Bern: International Potash Institute, 1975.
- ASSIS, J. P. **Modelo estocástico para estimação da produtividade potencial de milho em Piracicaba-SP**. 2004. 192 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia. Escola Superior Luis de Queiroz, Piracicaba, 2004.
- BALDANI, J. I. et al. Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas da Família Poaceae (Antiga Gramineae). In: RIBEIRO M.R.; NASCIMENTO C.W.A. do.; FILHO M.R.R.; CANTALICE J.R.B. (Eds.). **Tópicos Ciência do Solo**, v. 6, p. 203-271, 2009.
- BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n.5/6, p.911-922, 1997.
- BALDANI, J. I. et al. Recent advances in biological nitrogen fixation with non-legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996.
- BARBOSA FILHO, M. P.; SILVA, O. F. **Adubação de cobertura do feijoeiro irrigado com uréia fertilizante em plantio direto**: um ótimo negócio. Piracicaba: POTAFÓS, 2001. p.1-5. (Informações Agronômicas, n.93).
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. Azospirillum-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.

BELOW, F. E. **Fisiologia, nutrição e adubação nitrogenada do milho.** Informações Agronômicas. Piracicaba: Potafos, n. 99, set., 2002.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas.** 2 ed. 2003. 40p.

BORTOLINI, C. G. et al. Rendimento de grãos de milho cultivado após aveia-preta em resposta a adubação nitrogenada e regime hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 1101-1106, 2001.

BRANDÃO, E. M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo.** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 1-15.

BULL, L. T. Nutrição mineral do milho. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade.** Piracicaba: Potafós, 1993.

CAMARGO, F. A. O. et al. Nitrogênio orgânico do solo. In: SANTOS, G. A.; CARMARGO, F. A. O. (Eds). **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: ecossistemas tropicais e subtropicais.** Gênese, Porto Alegre, 117-137, 1999.

CAMPOS, B. H. C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do Inoculante “Graminante” na Cultura de Milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n.4, p.713-715. 2000.

CAMPOS, B. H. C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Inoculante “Graminante” nas culturas de trigo e aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.23, n.3, p.401-407, 1999.

CANTARELLA, H. Calagem e adubação do milho. In: BÜLL, L. T.; CANTARELLA, H. (Eds). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade.** Informações Agronômicas, Piracicaba, p. 147-198, 1993.

CANTARELLA, H.; DUARTE, A.P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V., eds. **Tecnologia de produção de milho.** Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, p.139-182, 2004.

CANTARELLA, H.; RAIJ, B. van; CAMARGO. C.R.O.; Cereais. In: RAIJ, B.van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. (Eds.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo.** 2 ed. Campinas: Instituto Agrônomo, p. 47-71, 1996. (Boletim Técnico, 100).

CARVALHO, C. et al. Anuário brasileiro do milho 2011. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2011. 128p.

CASAGRANDE, J. R. R.; FORNASIERI FILHO, D. Adubação nitrogenada na cultura do milho safrinha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 33-40, 2002.

CASSÁN, F. et al. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp.: aspectos fisiológicos y tecnológicos de La promoción Del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I.G. de. (Eds.). ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant**

interactions and agronomic research in Argentina. Buenos Aires: Asoc. Argentina de Microbiología, p. 79-84, 2008.

CAVALLET, L. E. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.

COELHO, A. M. **Agricultura de precisão**: Manejo da variabilidade espacial e temporal dos solos e das culturas. Tópicos em Ciência do Solo, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.3, p. 209-248, 2003.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento – Acompanhamento da Safra Brasileira. **Grãos: Safra 2010/2011, Décimo Primeiro Levantamento, Agosto/2011**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_08_09_11_44_03_boletim_agosto-2011..pdf. Acesso em: 22 de agosto de 2011.

COSTA, A. C. S. et al. Perdas de nitrogênio por volatilização da amônia em três solos argilosos tratados com uréia. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.26, n.4, p.467-473, 2004.

CQFS. COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. Ed. Porto Alegre: CQFS-RS/SC, 2004. 400 p.

CRUZ, J. C. et al. **Resposta de cultivares de milho à adubação nitrogenada em cobertura**. Sete Lagoas: Embrapa, 2005. (Comunicado técnico online, 116).

DA ROS, C. O. et al. Disponibilidade de nitrogênio e produtividade de milho e trigo com diferentes métodos de adubação nitrogenada no sistema de plantio direto. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 799-804, 2003.

DA RÓZ, A. L. O futuro dos plásticos: biodegradáveis e fotodegradáveis. **Polímeros**, v. 13, p. 4-6, 2003.

DALLA SANTA, O. R. et al. Influence of *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats. **Ambiência**, v.4, n.2, p.197-207, 2008.

DEL GALLO, M.; FENDIRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: OKON, Y., ed. ***Azospirillum* / plant associations**. Boca Raton: CRC Press, p.57-75, 1994.

DEPARIS, G. A.; LANA, M. do. C.; FRANDOLOSO, J. F. Espaçamento e adubação nitrogenada e potássica em cobertura na cultura do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 29, n. 4, p. 517-525, 2007.

DIAS, V. P.; FERNANDES, E. **Fertilizantes**: uma visão sintética. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 24, p. 97-138, set. 2006.

DIAS, L. E.; BARROS, N. F.; FRANCO, A. A. **Nitrogênio**. Brasília: ABEAS, 1996. 77p.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNÁNDEZ-CANIGIAB M. V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p.3-11, 2009.

DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, p. 155-164, 1999.

DOBBELAERE, S. et al. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.871-879, 2001.

DOBBELAERE, S. et al. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 284–297, 2002.

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

DÖBEREINER J. History and new perspectives of diazotrophs in association with nonleguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, p. 1-13, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, Embrapa-SPI. Itaguaí, Embrapa-CNPAB, 1995. 60p.

DOTTO, A. P. et al. Produtividade de milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 3, p. 376-382, 2010.

DUARTE, A. P. Característica e sistemas de produção. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa: UFV, 2004. p.109-139.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa-SPI, 2006.

ERNANI, P. R. **Disponibilidade de nitrogênio e adubação nitrogenada para macieira**. Lages: Graphel, 2003. 76p.

ERNANI, P. R. et al. A forma de aplicação de uréia e de resíduos vegetais afeta a disponibilidade de nitrogênio. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 360-365, 2005.

ESCOSTEGUY, P. A. V.; RIZZARDI, M. A.; ARGENTA, G. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em duas épocas de semeadura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, p.71-77, 1997.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **A produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360 p.

FANCELLI, A. L. **Adubação do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, módulo III, 2002, 44 p.

FANCELLI, A. L. Milho. In: PROCHNOW, L. I.; CASARIN, V.; STIPP, S. R. (Eds.). **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes**: culturas. Anais do simpósio sobre boas práticas para uso eficiente de fertilizantes (2009: Piracicaba, SP). Piracicaba: IPNI, v.3, p. 43-93, 2010.

FANCELLI, A. L.; LIMA, U. A. **Milho**: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo: SICCI; PROMOCET; FEALQ, 1982. 112p. (Série extensão Agroindustrial, 5).

FERNANDES, F. C. S. et al. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 4, n. 2, p. 195-204, 2005.

FERREIRA, A.de.O. et al. Desempenho de genótipos de milho cultivados com diferentes quantidades de palha de aveia-preta e doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.2, p.173-179, fev. 2009.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FORNASIERI FILHO, D. A cultura do milho. Jaboticabal: FUNEP, 1992, 273 p.

GOEBEL, E. M.; KRIEG, N. R. Fructose catabolism in *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, v. 159, p. 86-92, 1984.

GOMES, R.F. et al. Efeito de doses e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agrônômicos da cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 931-938, 2007.

HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1081-1084, 2000.

HARTMANN, A. Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. **Plant and Soil**, v. 110, p. 225-238, 1988.

HAVLIN, J. L. et al. **Soil fertility and fertilizers**: an introduction to nutrient management. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005. 515p.

HILTON, B. R.; FIXEN, P. E.; WOODWARD, H. J. Effects of tillage, nitrogen placement, and wheel compactation on denitrification rates in the corn cycle of a corn-oats rotation. **Journal of Plant Nutrition**, v. 17, p. 1341-1357, 1994.

HUERGO, L. F. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasiliense*. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I.G. de. (Eds.). ***Azospirillum sp.***: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Buenos Aires: Asoc. Argentina de Microbiología, p. 17-36, 2008.

HUNGRIA, M. et al. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p. 927-939, 2006.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasiliense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, p. 413–425, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasiliense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. (Documentos Embrapa Soja).

HUNGRIA, M.;CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. (Circular Técnica n. 13).

IAPAR. Instituto Agrônomo do Paraná. **Sugestão de adubação e calagem para culturas de interesse econômico no estado do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2003. 30 p. (Circular Técnica, nº 128).

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 77-119, 1997.

KARLEN, D. L.; FLANNERY, R. L.; SADLER, E. J. Aerial accumulation and partitioning of nutrients by corn. **Agronomy Journal**, v. 80, p. 232-242, 1988.

KENNEDY, I. R.; TCHAN, Y. T.. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. **Plant Soil**, v. 141, p. 93-118. 1992.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Tibtech**, v. 7, p. 39-44, 1989.

LANA, M. do. C. et al. Arranjo espacial e adubação nitrogenada em cobertura na cultura do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 433-438, 2009.

LARA-CABEZAS, W. A. R.; KORNDORFER, G. H.; MOTTA, S. A. Volatilização de N-NH₃ na cultura do milho: II. Avaliação de fontes sólidas e fluídas em sistema de plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 21, p. 489-496, 1997.

LARA CABEZAS, W. A. R. et al. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura do milho em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, p.363-376, 2000.

LIMA, P. C. R. **Fábrica de fertilizantes nitrogenados e produção de etanol no norte fluminense**. Abril, 2007. Disponível em: http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1341/fabrica_fertilizantes_lima.pdf?sequence=1. Acesso em: 25 de agosto de 2011.

LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G. **Uso eficiente de fertilizantes e corretivos agrícolas: aspectos agronômicos**. São Paulo: Anda – Associação nacional para difusão de adubos, 3º edição, 2000, 70 p. (Boletim Técnico, nº 4).

LOPES, E. S. Fixação biológica do nitrogênio o sistema solo-planta. In: YAMADA, T.; STIPP ABDALLA, S. R.; VITTI, G.C. (Eds.). **Anais do simpósio sobre Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007, p. 43-72.

MACHADO, A. T. et al. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho nitroflint. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 33, p. 961-970, 1998.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 130p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MARIN, V. A. et al. **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Embrapa, Abril, 1999 (Documento on-line, Nº 91). Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf>. Acesso em: 05 de agosto de 2011.

MARSCHINER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995. 889p.

MELGAR, R. J. et al. Doses e épocas de aplicação de fertilizantes nitrogenado para milho em Latossolo da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.15, p.289-296, 1991.

MIRANDA, C. H. B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the ¹⁵N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p.657-663, 1990.

MIYAUCHI, M. Y. H. et al. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. **Scientia Agricola**, v.65, n.5, p.525-531, 2008.

MONTAÑEZ, A. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, p. 253–263, 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006, 729 p.

NÓBREGA, R. S. A. et al. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.269-279, 2004.

NORMAN, M.J.T. PEARSON, C.J.; SEARLE, P.G.E. **The ecology of tropical food crops**. 2 ed. Melbourne: Cambridge University Press, 1995. 430p.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, v.63, p.364-370, 1997.

OLIVEIRA, O. C. **Quantificação da fixação biológica de nitrogênio em arroz (*Oryza sativa*, L.) inundado**. 1994. Tese (mestrado) - UFRRJ, Seropédica, R.J.

PEIXOTO, C. de. M. **O milho**: o rei dos cereais – da sua descoberta há 8.000 anos até as plantas transgênicas. Seed News (arquivo online), mar/abr 2002. Disponível em: <http://www.seednews.inf.br/portugues/seed62/milho62.shtml>. Acesso em: 29 de agosto de 2011.

PERIN, L. et al. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, vol. 37, nº 2, p. 47 - 53, 2003.

PERSELLO-CARTINEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant rhizobacteria interactions. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 189-199, 2003.

PIONEER SEMENTES. **Híbridos de milho**. Disponível em: <http://www.pioneersementes.com.br/default.aspx?page=ProdutosSilagemPlantaInteira&Id=0>. Acesso em: 14 de setembro de 2011.

POLIDORO, J. C. et al. **Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2001. 8p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 144).

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982.

QUADROS, P. D. de. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2009. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

RAO, A. C. S. et al. Considerations in estimating nitrogen recovery efficiency by the difference and isotopic dilution methods. **Fert. Research**, v. 33, p. 209-217, 1992.

RAYMOND, J. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

REIS JÚNIOR, 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, p. 1139-1146, 2008.

REIS JÚNIOR, F. B. et al. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v.219, p.153-159, 2000.

REIS, V. M. et al. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n.3, p. 227-247. 2000.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Fixação biológica de nitrogênio – estado de arte. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: EMBRAPA, p.151-180, 2005. (Informação Tecnológica).

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **Como a planta de milho se desenvolve**. Piracicaba: Potafos, 2003. 20 p. (Arquivo de Agrônomo, 15).

ROPER, M.M.; LADHA, J.K. Biological N₂ fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. **Plant and Soil**, v.174, p. 211–224, 1995.

RUSCHEL, A. P. Metabolismo do nitrogênio: fixação biológica do nitrogênio. In: FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: EPU, p. 169-180, 1985.

SÁ, J. C. M. **Manejo da fertilidade do solo no plantio direto**. Castro: Fundação ABC, 1996a, 96p.

SÁ, J.C..M. **Manejo de nitrogênio na cultura de milho no sistema de plantio direto**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996b. 23 p.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 1670-1677, 1987.

SALA, V. M. R. et al. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p.345-352, 2005.

SALOMONE, I. G. de; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, p.193-196, 1996.

SANTOS, M. M. et al. Épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em plantio direto, e alocação do nitrogênio (^{15}N) na planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1185-1194, 2010.

SANTOS, M. M. dos. et al. Espaçamento entre fileiras e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 29, n. 4, p. 527-533, 2007.

SCHREIBER, H. A.; STANBERRY, C.O.; TUCKER, H. Irrigation and nitrogen effects on sweet corn row number at various growth stages. **Science**, v.135, p. 135-136, 1998.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. **Biologic Fertility Soils**, v. 26, p. 1-15, 1998.

SILVA, E. C. da. **Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (^{15}N) da uréia, do milho e da crotalaria pelo milho sob semeadura direta em solo de cerrado**. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba, 2005, p.110.

SILVA, E. C. da. et al. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio na cultura do milho em plantio direto sobre Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n.3, p. 353-362, 2005.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Fixação biológica de nitrogênio. In: **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC – ESAL – FAEPE – ABEAS, p. 179-216, 1988.

SORATTO, R. P. et al. Doses e fontes alternativas de nitrogênio no milho sob plantio direto em solo arenoso. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.1, p. 62-70, 2011.

SOUZA, E. de. F. C. de.; SORATTO, R.P. Efeito de fontes e doses de nitrogênio em cobertura, no milho safrinha, em plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 5, n. 3, p. 387-397, 2006.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M.S. (ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. p. 216-252.

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

SYLVESTER-BRADLEY, R.; STOKES, D. T.; SCOTT, R. K. Dynamics of nitrogen capture without fertilizer: the baseline for fertilizing winter wheat in the UK. **Journal of Agricultural Science**, v.136, p.15-33, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4 ed., p. 317-341, 2009.

TEDESCO, M. J.; GIANELO, C.; BISSANI, C. A. **Análises de solo, planta e outros materiais**. Boletim Técnico, Porto Alegre, n. 5, 1995.

TEIXEIRA FILHO, M. C. M. et al. Doses, fontes e épocas de aplicação de nitrogênio em trigo irrigado em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.8, p.797-804, 2010.

TOLLENAAR, M.; DWYER, L. M. Physiology of maize. In: SMITH, D.L.; HAMEL, C. (Ed.). **Crop yield, physiology and processes**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. Cap. 5. p. 169-201.

TROEH, F. R.; THOMPSON, L. M. Nitrogênio. In: **Solos e Fertilidade do Solo**. São Paulo: Andrei, 2007. p. 311-342.

UHART, S. A.; ANDRADE, F. H. Nitrogen deficiency in maize. II. Carbon-nitrogen interaction effects on kernel number and grain yield. **Crop Science**, v. 35, p. 1384-1389, 1995.

USDA. **United States Department of Agriculture - Foreign Agricultural Service**. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Table+04+Corn+Area%2c+Yield%2c+and+Production+&hidReportRetrievalID=884&hidReportRetrievalTemplateID=1>. Acesso em 22 de agosto de 2011.

VARVEL, G. E.; SCHPERS, J. S.; FRANCIS, D. D. Ability for in-season correction of nitrogen deficiency in corn using chlorophyll meters. **Soil Science Society of American Journal**, v. 61, p. 1233-1239, 1997.

VERONA, D. A. et al. Tratamento de Sementes de Milho com Zeavit®, Stimulate® e Inoculação com *Azospirillum* sp. In: XXVIII CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2010, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010. p. 3731- 3737.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Jornal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

WIETHOLTER, S. **Adubação nitrogenada no sistema de plantio direto**. EMBRAPA-CNPT, Passo Fundo, 1996. 44p.

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.52, p. 659-688, 2001.

YAMADA, T. **Adubação nitrogenada do milho**: quanto, como e quando aplicar. Piracicaba. POTAFÓS, 1996. 15 p. (Informações Agronômicas, nº 74)

YANAI, J. et al. Effects of inorganic nitrogen application on the dynamics of the soil solution composition in the root zone of maize. **Plant and Soil**, v.180, n.1, p. 1-9, Mar. 1996.

ZAVALIN, A. A; KANDAUROVA, T. M.; VINOGRADOVA, L. V. Influence of associative nitrogen/fixing microorganisms on the provision with nitrogen of summer wheat. In: CONGRÈS INTERNATIONAL DE FIXATION DE L'AZOTE, 11th, INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION. **Abstracts**. Paris: Institut Pasteur/INRA/CNRS/CEAORSTOM/CIRAD, 1997. p.72.