UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON

JESICA FERNANDA DE SOUZA GENERO

RESPOSTA A INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADA E NÃO À ADUBAÇÃO NITROGENADA EM TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ
2016

JESICA FERNANDA DE SOUZA GÊNERO

RESPOSTA A INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADA E NÃO À ADUBAÇÃO NITROGENADA EM TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador: Dr. Antonio Carlos Torres da Costa
Coorientador: Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendrusculo
Coorientador: Dr. Vandeir Francisco Guimarães

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil).

G326r

Gênero, Jésica Fernanda de Souza

Resposta a inoculação de bactérias diazotróficas associada e não à adubação nitrogenada em trigo (*Triticum aestivum* L.) ./Jésica Fernanda de Souza Gênero. Marechal Cândido Rondon, 2016.

42 p.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2016

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia

1. Nitrogênio – Fixação biológica. 2. *Herbaspirillum seropedicae*. 3. *Azospirillum brasilense*. I. Costa, Antonio Carlos Torres da. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 21.ed. 635.642
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

JÉSICA FERNANDA DE SOUZA GÊNERO

RESPOSTA A INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADA E NÃO À ADUBAÇÃO NITROGENADA EM TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 02 de agosto de 2016

Prof. Dr. Claudio Yuji Tsutsumi
(UNIOESTE)

Profª. Drª. Luciana Grange
(UFPR)

Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa
(Orientador)
(UNIOESTE)

Impresso na UNIOESTE - marciane.neves

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fornecer paciência, proporcionando oportunidades como esta, de me provar merecedora de um título que jamais acreditei obter.

Agradeço pela proteção a minha família, que mesmo morando longe, o senhor sempre me fez senti-los por perto, a minha gratidão sempre será eterna e imensurável pelo bem que me proporcionas.

A minha amada família, que sempre me apoiou e me instruiu a fazer o meu melhor.

Ao meu esposo que se dedicou sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando nas horas fáceis e principalmente nas difíceis, entendendo muitas vezes à minha ausência.

A minhas amigas que sempre me apoiaram e entenderam minha ausência.

Aos amigos de mestrado, Meirieli Nunes e Élcio Friske, que me auxiliaram na conclusão da pesquisa, pelo companheirismo e experiências passadas no decorrer da jornada.

Ao meu professor orientador, Dr. Antonio Carlos Torres da Costa, que através do seu conhecimento e suas experiências me orientou nesses dois anos de experimento, mostrando a importância do meu trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Sementes da C. VALE que me auxiliaram na concretização deste experimento.

Aos Professores Dr. Cláudio Tsutsumi e Dra. Luciana Grange pelos ensinamentos e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao orientado da Professora Dra. Luciana Grange, o discente Lucas Hass do curso de Agronomia da UFPR – Setor Palotina, que me auxiliou nas avaliações.

A equipe de trabalhadores da Estação Experimental da C. VALE.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente, muito obrigada.

RESUMO

GENERO, Jesica Fernanda de Souza, M.S., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Agosto, 2016. **Resposta a inoculação de bactérias diazotróficas associada e não à adubação nitrogenada em trigo (*Triticum aestivum* L.)** Orientador: Antonio Carlos Torres da Costa. Coorientadores: Eliane Cristina Gruszka Vendrusculo e Vandeir Francisco Guimarães.

As bactérias *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* são fixadoras de nitrogênio e promotoras de crescimento vegetal, capazes de promover associações com a cultura do trigo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho agronômico do trigo em resposta a inoculação de bactérias diazotróficas com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* associada ou não à adubação nitrogenada e quantificar o número de células viáveis de bactérias das raízes de plantas de trigo. O experimento foi realizado nas safras agrícolas 2014/2014 e 2015/2015. O delineamento experimental foi de blocos casualizados em esquema fatorial 2 x 4, com 4 repetições. O primeiro fator refere-se às aplicações de nitrogênio em cobertura (com e sem nitrogênio). O segundo fator refere-se à inoculação de sementes com bactérias diazotróficas [tratamento sem inoculação (testemunha), estirpe de *A. brasilense*, estirpe de *H. seropedicae* e combinação das duas estirpes. Na ausência da inoculação, a adubação nitrogenada em cobertura promoveu um acréscimo de 18% no diâmetro do colmo. Na ausência da adubação nitrogenada em cobertura, a inoculação com *H. seropedicae* promoveu um acréscimo de 16% no diâmetro de colmo, e na presença da adubação nitrogenada esta bactéria promoveu um acréscimo de 24% no número de espiguetas por espiga em relação às plantas que não foram inoculadas. A inoculação combinada das estirpes *A. brasilense* + *H. seropedicae* com adubação nitrogenada em cobertura promoveu um acréscimo de 26% no número de espiguetas por espiga e o dobro do número de grãos obtidos, em relação à combinação sem adubação. A inoculação combinada das estirpes *A. brasilense* + *H. seropedicae* com adubação nitrogenada em cobertura promoveu um acréscimo de 48% e 13% na produtividade de grãos, na safra de 2014 e na safra de 2015, respectivamente, em relação as plantas que não foram inoculadas. A inoculação de *H. seropedicae* apresentou maior quantidade de células viáveis totais com a aplicação de nitrogênio. A redução do número de UFC de *A. brasilense* sob

condição de adubação nitrogenada pode apontar para uma menor competitividade destes indivíduos por exsudatos e nutrientes.

.

Palavras-chaves: Fixação Biológica de Nitrogênio. *Herbaspirillum seropedicae. Azospirillum brasilense.*

ABSTRACT

GENERO, Jesica Fernanda de Souza, M.S., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, August, 2016. **Response to inoculation of bacteria diazotrophic associate and not the nitrogen fertilizer in wheat (*Triticum aestivum* L.).** Advisor: Antonio Carlos Torres da Costa. Co- Advisors: Eliane Cristina Gruszka Vendrusculo and Vandeir Francisco Guimarães.

The bacteria *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* are nitrogen fixers and promoting plant growth, able to promote partnerships with the trigo. O objective of this study was to evaluate the crop wheat agronomic performance in response to inoculation with *Azospirillum brasilense* diazotrophs and *Herbaspirillum seropedicae* with or without nitrogen fertilization and quantify the number of viable cells of bacteria of the wheat plant roots. The experiment was conducted in the crop year 2014/2014 and 2015/2015. The experimental design was a randomized block in factorial 2 x 4, with four repetitions. The first factor relates to the nitrogen topdressing applications (with and without nitrogen). The second factor relates to inoculating seeds with diazotrophs [without inoculation treatment (control), strain *A. brasilense*, *H. seropedicae* strain and combination of the two strains. The combined inoculation of strains *A. brasilense* + *H. seropedicae* with nitrogen fertilization promoted an increase of 48% and 13% in grain yield, in the 2014 season and 2015 season, respectively, for the plants that were not inoculated. You can check the inoculation *Herbaspirillum*, showed better total amount of viable cells with the application of nitrogen. The reduction in the number of CFU of *Azospirillum* under nitrogen fertilization condition can point to a lower competitiveness of these individuals by exudates and nutrients.

Keywords: Biological Nitrogen Fixation. *Herbaspirillum seropedicae. Azospirillum brasilense*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 9
2.1 A CULTURA DO TRIGO 9
2.2 ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO TRIGO 9
2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) EM POACEAS 11
2.4. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS - BPCPS 12
2.4.1 *Azospirillum brasilense* 13
2.4.2 *Herbaspirillum seropedicae* 14
3 MATERIAL E MÉTODOS 17
3.1 LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL 17
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS 18
3.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO 18
3.4 VARIÁVEIS AGRONÔMICAS 20
3.5 ANÁLISE DE DADOS 21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 22
5 CONCLUSÕES 31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 32
ANEXOS. 38

1 INTRODUÇÃO

A cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) possui vários fatores limitantes para o seu desenvolvimento, dentre estes, o nitrogênio (N), pois é um elemento constituinte de muitos componentes da célula vegetal, incluindo aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos, sendo essenciais ao desenvolvimento das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2010).

No mundo, as culturas do trigo, milho e arroz utilizam aproximadamente 60% do total de fertilizantes nitrogenados consumidos na agricultura (LADHA et al., 2005). Portanto, são necessárias pesquisas relacionadas à tecnologia alternativas, que possibilitem a redução desses fertilizantes ou sua substituição parcial. Além da redução dos fertilizantes essas tecnologias contribuem para a redução dos impactos ambientais.

Uma alternativa ao uso de fertilizantes inorgânicos é o aproveitamento do N atmosférico (N_2), pela Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) por organismos fixadores de N ou diazotróficos (LOPES, 2007). Em poaceaes, as associações de bactérias diazotróficas com as plantas não formam nódulos, como ocorre em leguminosas. A bactéria coloniza os tecidos dos vegetais ou se ancora na superfície da raiz (REIS et al., 2000).

Existem vários gêneros de bactérias com potencial de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em poaceaes, o *Azospirillum brasilense* e a espécie *Herbaspirillum seropedicae* são os mais estudados. As bactérias *Azospirillum* e *Herbaspirillum* são fixadoras de nitrogênio e promovem crescimento vegetal, capazes de colonizar a cultura do trigo. Essas espécies podem estimular o crescimento da planta, aumentar o rendimento das culturas, sem prejudicar a planta. Estimulam o desenvolvimento de raízes (OLIVEIRA et al., 2009), raízes laterais e promovem aumento da biomassa de raiz e folha.

Estima-se que a utilização da inoculação por parte dos produtores, com base nas bactérias diazotróficas, poderá gerar uma economia de 1,2 bilhões de dólares por ano, considerando apenas a substituição parcial (50%) no N-fertilizante para a cultura do milho e trigo no Brasil (HUNGRIA et al., 2010).

Este trabalho fundamenta-se que a inoculação individual ou combinada das estirpes das bactérias diazotróficas pode substituir a adubação nitrogenada no cultivo do trigo.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho agronômico do trigo em resposta a inoculação de bactérias diazotróficas com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* associada ou não à adubação nitrogenada e quantificar o número de células viáveis de bactérias das raízes de plantas de trigo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO TRIGO

O trigo é uma planta de ciclo anual, cultivada durante o inverno e a primavera, destinados à alimentação humana e animal (EMBRAPA, 2016). É uma angiosperma da classe das *Liliopsidas*, pertencente à ordem *Poales*, família *Poaceae* e ao gênero *Triticum.* É uma espécie autógama, com flores perfeitas, que apresentam baixa frequência de polinização cruzada (NCBI *taxonomy*, 2016). Este gênero é constituído em um grande número de espécies, na qual a espécie *Triticum aestivum* L. é a mais estudada mundialmente do ponto de vista tecnológico, científico e econômico (BRAMMER et al, 2001). No Brasil, a espécie predominantemente cultivada é a *T. aestivum* L.

Inicialmente, a cultura do trigo foi introduzida no Sul do país, onde estão 90% da produção, mas, com a evolução das pesquisas de melhoramento genético, a cultura se expandiu para as regiões centro-oeste e nordeste (EMBRAPA, 2016). O Brasil ocupa o 13º lugar no ranking mundial na produção de trigo, enquanto que os maiores produtores mundiais são: União Europeia, China, Índia e Rússia (ODEPA, 2012).

A importância do trigo no sistema de produção agrícola está relacionado a opção desta espécie ser utilizada no inverno em rotação de culturas, o que possibilita a manutenção de palhada e favorece o plantio direto (REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 2012)

2.2 ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO TRIGO

O trigo é altamente exigente em nitrogênio, o qual constitui o macroelemento mais limitante na produtividade da cultura, pois determina o número de afilhos ou perfilhos sendo essencial na fase de formação dos nós no início do alongamento (DOBBELAERE e CROONENBORGHS, 2002). O nitrogênio é o principal componente da matéria orgânica do solo, totalizando de 1 a 5% do volume da camada superficial do solo. Para se ter ideia um solo com 3% de matéria orgânica contém 3 t de N ha^{-1} na camada de 20 cm de solo, mas apenas uma pequena fração deste N tornar-se-á disponível durante um ciclo da cultura (EMBRAPA, 2014b).

O N é um nutriente exigido em grandes quantidades pela cultura do trigo exercendo grande influência na produção de grãos. Apenas 1/3 da adubação nitrogenada é utilizado pelas plantas (PENG et al., 2010), pois grande parte é perdido pela a lixiviação de nitrato no solo, eutrofização dos ecossistemas aquáticos, bem como efeitos sobre a diversidade microbiana, afetando o meio ambiente.

Como constituinte essencial dos aminoácidos, o N é necessário para a síntese proteica estando em elevado número de compostos orgânicos, como nucleotídeos, hormônios e vitaminas. Assim, as principais reações bioquímicas em plantas e microorganismos envolvem a presença do N, o que o torna um dos elementos absorvidos em maior quantidade por plantas cultivadas (CANTARELLA, 2007). O N é também integrante da molécula de clorofila, dessa forma, plantas bem nutrida com este nutriente apresentam crescimento vegetativo intenso e coloração verde-escura.

O fertilizante nitrogenado é o principal veículo de adição de N nos agrossistemas e um dos insumos de maior importância em função do seu papel no desempenho produtivo dos vegetais e no atendimento da demanda por alimentos (LOPES, 2007). E 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. Essa recomendação se fundamenta na hipótese de que a matéria orgânica libera N em tempo hábil para o uso das plantas e que o N fornecido pelos fertilizantes complementa a necessidade deste mineral pelas culturas (ARGENTA et al., 2002).

Com a deficiência de nitrogênio, toda a botânica da planta é afetada, inclusive raízes, o que ocasiona redução do tamanho radicular, nas quais refletem em efeitos secundários tais como redução de absorção de água e de outros nutrientes (ARGENTA et al., 2002).

Os principais fertilizantes nitrogenados inorgânicos são a ureia, o nitrato de amônia e o sulfato de amônio. Dentre estes, a ureia se destaca por apresentar elevadas concentração de N (45%) e menor relação custo por unidade de nutriente (COSTA et al., 2004). É uma das fontes de N mais utilizadas na agricultura brasileira, por ser de menor custo e de maior disponibilidade no mercado.

Há um alto custo energético na fabricação dos fertilizantes nitrogenados, principalmente da necessidade de gastos de fontes de petróleo, ou seja, fontes não renováveis. Calcula-se que, para a síntese de uma tonelada de amônia, seja

necessários seis barris de petróleo (GRANGE et al., 2007), e um elevado custo ambiental, pois o N está associado com o manejo inadequado e poluição ambiental, contaminando o solo e os mananciais hídricos (LOPES, 2007).

A capacidade das plantas para obter água e nutrientes minerais do solo está relacionada com sua capacidade para desenvolver um extensivo sistema radicular. A taxa de absorção de íons das raízes diminui na região mais distante do ápice radicular. No entanto, esta tendência varia bastante, dependendo de fatores, como tipo de íon (nutriente), estado nutricional e espécie vegetal (BALDANI, 2009).

No solo, os nutrientes podem se mover para as superfícies radiculares dissolvidos no fluxo em massa de água ou por difusão. No fluxo em massa, os nutrientes são carreados pela água que está se movendo do solo para a raiz. O fluxo em massa ocorre por diferença de pressão, a qual é determinada, primariamente, pela taxa de transpiração. Assim, a quantidade de nutriente suprida por fluxo em massa depende da transpiração e da concentração do nutriente na solução do solo. Quando ambas são altas, o fluxo em massa passa a ter importante papel na aquisição de nutrientes. Em geral, nutrientes como cálcio e o nitrato são transportados para a superfície das raízes por fluxo em massa (EMBRAPA, 2014a).

Na difusão, nutrientes minerais movem-se de uma região de maior para outra de menor concentração. A absorção de nutrientes pela raiz diminui a concentração dos íons nesta região e favorece a difusão em direção à superfície radicular. Quando a difusão é lenta, cria-se uma zona de esgotamento do nutriente próximo à superfície da raiz. Normalmente, a difusão é importante para nutrientes encontrados em baixas concentrações na solução do solo, como é o caso do fósforo (EMBRAPA, 2014a).

2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) EM POACEAS

A microbiota do solo oferece inúmeras alternativas para o desenvolvimento de novas biotecnologias, que visam substituir sistemas agrícolas tradicionais baseados no crescente uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos. A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é o processo de redução do N gasoso (N_2) a amônia (NH_3), sendo que esse processo é realizado por alguns organismos que habitam o solo, denominados fixadores de N, contribuindo com a maior parte do N fixado anualmente na Terra (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O N_2 compõe 78% dos gases atmosféricos, encontra-se em uma forma quimicamente estável, portanto, a assimilação pelos seres vivos é limitada, sendo possível por apenas alguns tipos de microorganismos denominados fixadores de N ou diazotróficos (BALDANI e BALDANI, 2005). Estes microorganismos diazotróficos apresentam um complexo nitrogenase responsáveis pelo rompimento da tripla ligação do N_2 e sua redução a NH_3, uma forma assimilável pelos seres vivos (CANTARELLA, 2007).

A maior absorção de N pelas raízes pode ocorrer em razão da produção, pela bactéria, de auxinas, citocininas e giberelinas (BALDANI e BALDANI, 2005). Essa produção de fitormônios interfere no crescimento das plantas e pode alterar a morfologia das raízes de modo que possibilite maior volume de exploração do solo, e por consequência, mais influxo de nutrientes. As alterações morfológicas proporciona a elongação da zona para formação de raízes, promovendo desta maneira um aumento total do tamanho da raiz e planta e um maior desenvolvimento (SILVA et al., 2004).

A amônia e o nitrato gerado pela FBN ou simplesmente pela decomposição da matéria orgânica do solo tornam-se objetos de intensa competição entre plantas e microorganismos. As plantas apresentam mecanismos que capturam rapidamente esses íons. Suas raízes apresentam regiões que estão em constante divisão, alongamento e diferenciação celular. Além destas características, as raízes possuem a presença de pêlos radiculares, sendo estes responsáveis por aumentar a área da absorção de água e solutos, resultando em uma área de forte demanda de nutrientes (TAIZ e ZAIGER, 2010).

2.4. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS - BPCPs

No Brasil, estudos com bactérias associadas à poaceaes foram iniciados pela Drª. Johana Dobereiner, no final da década de 50. Neste período acreditava-se que a principal contribuição desses microorganismos, para várias espécies de plantas, era somente a fixação de nitrogênio molecular, sendo denominadas de bactérias diazotróficos (BASHAN et al., 2004). A partir daí novos gêneros e espécies vem sendo descritas e estudadas como potenciais inoculantes para diversas espécies, com o desafio de tornar viável e desenvolver meios práticos para substituir, total ou parcialmente, a adubação mineral com N por FBN em poaceaes (CANTARELLA,

2007). Porém, esse grupo de bactérias não esta relacionado apenas com a FBN, mas também por liberarem hormônios vegetais, denominados de BPCV, o que consequentemente auxiliam no crescimento de raízes, maior capacidade de absorção de água e nutrientes, e incremento na produtividade (BASHAN et al., 2004).

Bashan e De-Bashan (2005) destacam também que algumas BPCV são endofíticas. Essa classificação se refere ao grupo de bactérias que possuem capacidade de colonizar tecidos internos de plantas, sem causarem patogenicidade, mas promovendo o crescimento do hospedeiro.

Essa colonização apresenta benefícios tanto aos microorganismos diazotróficos quanto para a planta. O interior das plantas representa um habitat rico em substratos de carbono livre de diversos fatores adversos que limitam a sobrevivência dos diazotrófos, como a competição com outros microrganismos e, além disso, a transferência de compostos nitrogenados para a planta se torna mais eficiente neste tipo de associação (BALDANI et al.,1997).

Segundo Monteiro et al. (2012), as bactérias endofíticas colonizam primeiramente as plantas, aderindo-se à superfície das raízes, em seguida, pela colonização das raízes laterais pela penetração da epiderme e posteriormente ocupando os espaços intercelulares, colonizando o xilema e a parte das plantas. Bashan e De-Bashan (2005), relataram que estas bactérias ainda podem colonizar as plantas por aberturas naturais (estômatos) ou artificiais (ferimentos) para sua entrada.

Esse tipo de colonização, segundo James et al. (2002), foi comprovado com a espécie *H. seropodicae* que encontra-se em raízes laterais, espaços intercelulares da raiz, aerênquima e células corticais, sendo encontradas colônias no xilema, folhas e caules de arroz.

2.4.1 *Azospirillum brasilense*

Dentre as mais estudadas estão às bactérias do gênero *Azospirillum,* principalmente *A. brasilense* que é mais frequente encontrada colonizando a maioria das plantas de regiões tropicais e temperadas (BASHAN et al., 2005). Este gênero compreende bactérias diazotróficas, amplamente encontradas em solos de clima

tropical e subtropical, e em associação com as raízes de poaceaes de grande importância econômica, como milho, trigo, arroz e diversas forrageiras, além de outras espécies vegetais.

São bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes e usualmente uniflageladas. Apresenta grande motilidade exibida pelas células, conferindo a espécie uma vantagem seletiva importante sobre outros microorganismos na rizosfera, onde a disponibilidade de nutrientes é muitas vezes limitada (DOBEREINER, 1992).

As bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* auxiliam, por diversos mecanismos, na nutrição nitrogenada das culturas. Dentre esses mecanismos, destacam-se a produção de hormônios, que interferem no crescimento das plantas e podem alterar a morfologia das raízes, possibilitando a exploração de maior volume de solo (ZAIED et al., 2003).

Várias pesquisas obtiveram resultados positivos com bactérias do gênero *Azospirillum*, na qual promoveram o crescimento e o acúmulo de N em plantas de trigo (SALA et al., 2005), trouxeram benefícios na manutenção dos afilhos férteis, maior extração de N e acúmulo nos grãos (JEZEWSKI et al., 2010), aumento de produção (SALA et al., 2007), translocação mais eficiente deste nutriente para os grãos, grãos mais pesados e mais cheios e maior desenvolvimento radicular (SILVA et al., 2004).

Mendes et al. (2011) observaram a eficiência agronômica no uso da bactéria *A. brasilense*, quando aplicada via tratamento de sementes, para a cultura do trigo, cultivar Quartzo, cultura antecessora milho em Guarapuava-PR. Sala et al. (2007) ao trabalharem com diferentes doses de N, obtiveram maior incremento na produtividade de grãos na ausência do nutriente adicional. Estes autores atribuíram os benefícios causados por essas bactérias à sua capacidade de síntese de fitormônios. Porém, Baldani e Baldani (2005) destacaram que as bactérias diazotróficas de poaceaes não contribuem com quantidades suficientes de N fixado.

2.4.2 *Herbaspirillum seropedicae*

Inicialmente *H. seropedicae* foi considerada uma nova espécie de *Azospirillum* por ter apresentada características de crescimento em meio de cultura semi-sólido (sem N) similares a esse gênero (BALDANI et al., 1986). Apesar deste

grupo de bactérias demonstrarem diversas semelhanças fisiológicas e morfológicas ao gênero *Azospirillum*, estudos de homologia entre DNA: DNA demonstraram a descoberta de um novo gênero denominado *Herbaspirillum*, e *Azospirillum seropedicae* foi renomeado para *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI, 2005; CHUBATSU et al., 2012).

O gênero *Herbaspirillum* pertence à classe Betaproteobacteria e compreende 14 espécies. A maioria das espécies pertencentes a este gênero não são encontradas em associação com plantas e vivem em ambientes aquáticos, em solos, solos poluídos ou até em pulmões de pacientes com fibrose cística. Além disso, algumas espécies pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* são capazes de fixar nitrogênio atmosférico sob condições microaeróbicas, sendo considerados organismos diazotróficos associativos (MONTEIRO et al., 2012).

H. seropedicae é uma bactéria diazotrófica que é conhecida por realizar associação com muitas plantas de interesse econômico, tais com milho, arroz, sorgo, trigo e cana de açúcar (OLIVARES et al., 1997). As espécies do gênero são pertencentes na subdivisão β-Proteobacteria e são gram-negativas. As células contem grânulos de poli-β- hidroxibutirato (PHB), formato espirillum, móveis e com presença de 1-3 flagelos bipolares na espécie *H. seropedicae* (MOREIRA et al, 2010).

A interação planta-bactéria inicia-se quando a bactéria é atraída pelas raízes da planta através do fornecimento de fontes de carbono por meio das raízes, e em seguida ocorre a adesão da bactéria à superfície radicular e de imediato a colonização dos pontos de emergência das raízes laterais e penetração através dos pontos da epiderme radicular (BALSANELLI et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012).

A adesão e entrada de *H. seropedicae* nos tecidos radiculares das plantas é rápida, sendo que é possível observar a colonização da planta 5 a 8 dias após a inoculação (MONTEIRO et al., 2012). Após penetrar nas raízes, as células de *H. seropedicae* rapidamente ocupam os espaços intercelulares se alastrando até os tecidos do xilema, partindo então para a colonização de outros tecidos e partes da planta (GYANESHWAR et al., 2002). A associação entre a bactéria e a planta, *H. seropedicae* pode promover o crescimento diferencial da planta através da produção e suprimento de fatores de crescimento, tais como FBN, produção de fitormônios, proteção do hospedeiro contra patógenos e produção de sideróforos (BALSANELLI et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012).

Grandes avanços vêm sendo realizados no que diz respeito aos mecanismos de fixação e metabolismo de N por meio de análise molecular, principalmente após o sequenciamento completo do genoma de *H. seropedicae* (CHUBATSU et al., 2012; PEDROSA et al., 2011). Apesar de *H. seropedicae* realizar associação com diversas culturas de interesse econômico, os mecanismos de infecção e colonização ainda não estão completamente conhecidos, e o maior entendimento desse processo é necessário para melhorar a utilização desta e de outros organismos endofíticos como promotores de crescimento vegetal. Deste modo, métodos que identifiquem e localizem a bactéria no interior das células das plantas são extremamente necessários (BALSANELLI et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL

Os experimentos foram dirigidos em dois anos (2014 e 2015) em condições de campo, na área experimental pertencente à Cooperativa Agroindustrial C. VALE localizada no município de Palotina, PR, nas coordenadas geográficas de 24º 12' latitude S, longitude 53º 55' W e altitude de 370 m.

O solo da área experimental é classificado como LATOSSOLO VERMELHO Eutroférrico de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2014a). Os valores de temperatura média e precipitação pluviométrica ocorrida durante a condução dos experimentos encontram-se na Figura 1 e Figura 2.

Antes da implantação de cada experimento, foi realizada a análise química do solo na camada de 0-20 cm de profundidade, nos dois anos agrícolas. Para o ano de 2014, o solo apresentou as seguintes características químicas: pH 5,1 $CaCl_2$; MO= 29 g dm^3; P= 8 mg dm^{-3}; Ca^{2+}= 4,51 cmol dm^{-3}; Al^{3+} = 0,1 cmol dm^{-3}; Mg $^{2+}$=1,5 cmol dm^{-3}; K^+= 0,67 cmol dm^{-3}; CTC= 9,32 cmol dm^3 e V= 72%; Para o ano de 2015, as características químicas foram: pH 4,8 $CaCl_2$; MO= 31 g dm^3; P= 8,6 mg dm^{-3}; Ca^{2+}= 4,82 cmol dm^{-3}; Al^{3+} = 0,15 cmol dm^{-3}; Mg $^{2+}$=1,18 cmol dm^{-3}; K^+= 0,79 cmol dm^{-3}; CTC= 9,73 cmol dm^3 e V= 70%.

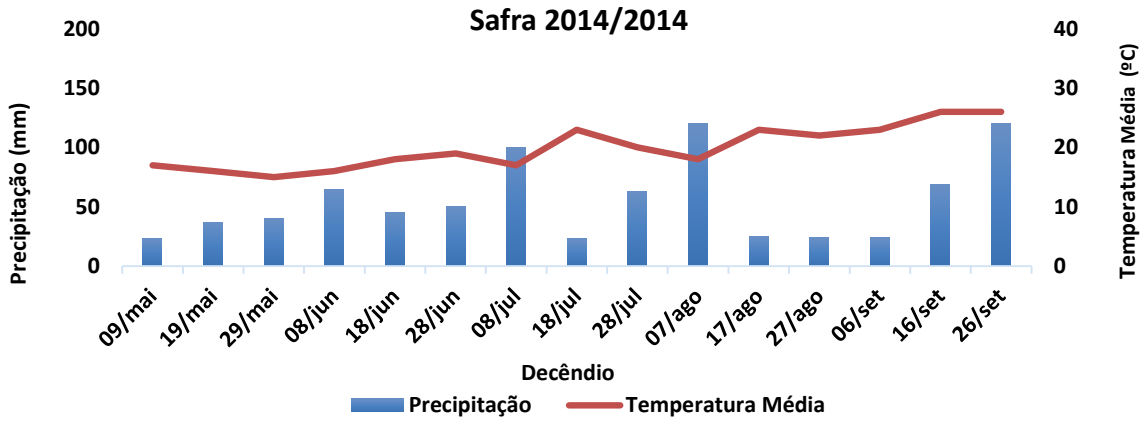

Figura 1: Valores de temperatura média e precipitação acumulada decêndios, registrados durante a condução do experimento, de maio a setembro. Safra 2014/2014. Palotina. PR

.

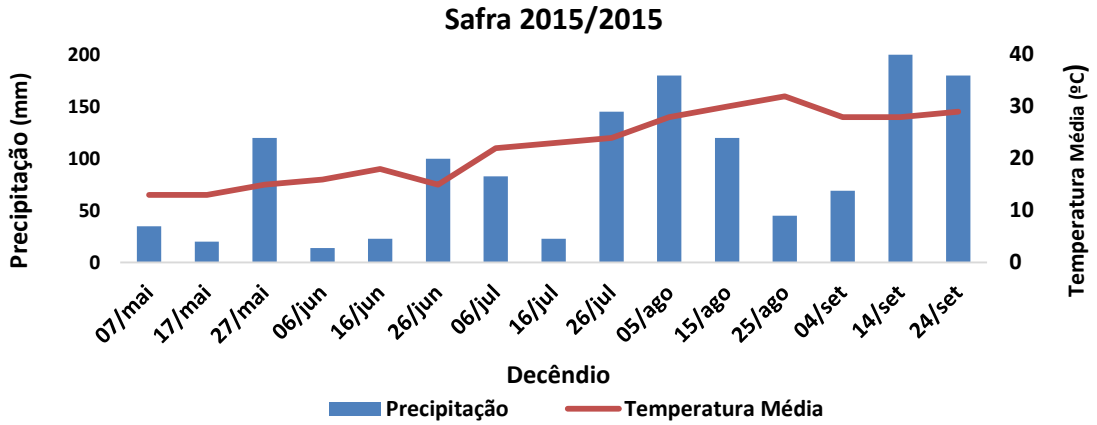

Figura 2: Valores de temperatura média e precipitação acumulada decêndios, registrados durante a condução do experimento, de maio a setembro. Safra 2015/2015. Palotina. PR

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

O delineamento experimental utilizado nos dois experimentos foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial 2 x 4, com quatro repetições. O primeiro fator refere-se às aplicações de nitrogênio em cobertura (0 e 30 kg de N ha^{-1}). O segundo fator refere-se à inoculação de sementes com bactérias diazotróficas: sem inoculação (testemunha), estirpe de *A. brasilense* na concentração $1x10^9$ UFC mL^{-1}, estirpe de *H. seropedicae* na concentração $1x10^9$ UFC mL^{-1} e combinação das duas estirpes.

3.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

As semeaduras foram realizadas nos dias 09/05/2014 (safra 2014) e 07/05/2015 (safra 2015), utilizando-se sementes da cultivar CD 150. A cultivar utilizada é proveniente do germoplasma COODETEC e descende da cultivar CD 104 e CD 108, que se destacou entre as cultivares que estão no mercado há mais tempo. A cultivar apresenta ciclo precoce, média de maturação plena de 122 dias, estatura média 68 cm e moderada resistência ao acamamento (COODETEC, 2014).

Os inoculantes foram fornecidos pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) sendo preparados a partir de uma solução de bactérias pura na concentração de $1x10^9$ UFC mL^{-1}. A inoculação com as bactérias *A. brasilense* e *H.*

seropedicae e a combinação das duas estirpes foram realizadas antes da semeadura, misturados as sementes a fim de proporcionar o total recobrimento e, posteriormente, realizou-se a semeadura. Através da mistura das sementes ao inoculante em uma proporção de 1 mL de inoculante para 1.000 sementes sendo que, no caso da inoculação combinada das estirpes, foi utilizada metade desta proporção de inoculante (0,5 mL) de cada estirpe totalizando, assim, a mesma proporção de 1 mL para 1.000 sementes.

As parcelas foram constituídas por 6 linhas de 5,0 m de comprimento, com espaçamento de 17 cm entre linhas, sendo a área total da parcela de 5,1 m^2. Foi considerado como área útil as 4 linhas centrais, desprezando-se uma linha de plantas de cada lateral, totalizando 3,4 m^2. A profundidade de semeadura utilizada foi de 3 cm, semeadura em linha, no sistema de plantio direto sob a palhada da cultura anterior, a soja.

Foram realizadas adubação fosfatada e potássica de base, nas doses de 40 kg ha^{-1} de P_2O_5 e 30 kg ha^{-1} e K_2O, em ambas as safras, de acordo com a análise do solo.

Para os tratamentos organizados com nitrogênio em cobertura este foi aplicado na forma de ureia, na quantidade de 30 kg ha^{-1} de nitrogênio. A adubação nitrogenada em cobertura foi a lanço, no início do estádio de perfilhamento, quando as plantas apresentavam quatro folhas.

Não houve necessidade de calagem para cultura, em função da porcentagem de saturação por bases, ser superior a 60%, nos dois anos do experimento.

O controle de plantas daninhas foi efetuado com a aplicação do herbicida seletivo Metilsulfurom, na fase de espigamento, com dose de 4 g/ha do produto comercial e com capinas manuais nos estádios de afilhamento e alongamento, nas duas safras. Foi realizado o tratamento de sementes com fungicida carboxina-tiram e o inseticida fipronil, nas doses de 0,2 L e 0,1 L para cada 100 kg de sementes, em ambas as safras.

A colheita foi realizada de forma manual, entre os dias 26 e 27 de setembro na safra de 2014 e 24 a 26 de setembro na safra 2015. As amostras foram processadas na C. Vale (Cooperativa Agroindustrial) utilizando para trilha uma colhedora de parcelas marca WINTERSTEIGER®. As amostras foram submetidas à secagem, até 13% de umidade.

3.4 VARIÁVEIS AGRONÔMICAS

Altura de Plantas (AP): Nos dois anos agrícolas, foram avaliados na época de maturação, a altura das plantas, medindo-se a distância em centímetros, com auxílio de uma régua graduada, do nível do solo ao ápice da espiga, com exclusão das aristas, estimando a média de dez pontos dentro da área útil da parcela.

Índice de Acamamento (IA): Foram avaliados na maturação fisiológica, através de observações visuais, utilizando a seguinte escala de notas: 0: sem acamamento; 1: até 5%; 2: 5 a 25%; 3: 25 a 50%; 4: 50 a 75%; 5: 75 a 100% de plantas acamadas, sendo determinada a percentagem estimada de plantas acamadas dentro da área útil da parcela, para cada tratamento (ARF et al., 2004).

Diâmetro do Colmo (DC): Ao final do ciclo da cultura, foram avaliados o diâmetro do colmo, com o uso de um paquímetro, realizado em 10 plantas escolhidas aleatoriamente dentro da área útil da parcela.

Número de Espiguetas por Espiga (NEE): Foram avaliados através da média de espiguetas em 10 espigas coletadas aleatoriamente dentro da área útil da parcela.

Número de Grãos por Espiga (NGE): Foram determinados pela contagem do número de grão em 10 espigas coletadas aleatoriamente dentro da área útil da parcela.

Massa de Mil Grãos (MMG): A massa de mil grãos foi determinada através da pesagem de três amostras de 100 sementes por parcela, em balança analítica, sendo os valores médios transformados para massa de mil grãos e expressos em gramas, de acordo com as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Produtividade de grãos (PROD): A partir da colheita da área útil determinou-se a massa e a produtividade, e os valores corrigidos para 13% de umidade e transformados para kg ha^{-1}.

Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em raízes de trigo: Na safra 2015, avaliou-se a quantidade de células viáveis extraídas de raízes inoculadas a campo, através da técnica de espalhamento em superfície (spread-plate) para contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Para isso, amostras de raízes foram submetidas à limpeza do solo e esterilizadas superficialmente para a realização da diluição seriada e do plaqueamento das concentrações 10^{-2} e10^{-3} em meio de cultura.

3.5 ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram submetidos à análise de variância (Anexo 1 e Anexo 2) pelo software SAS (SAS Institute INC, 2013). Também foi realizada a análise conjunta dos experimentos (Anexo 3). Para isto, considerou-se a homogeneidade das variâncias através dos quadrados médios residuais das análises individuais (QMRi), em que se considera a razão entre o maior e o menor quadrado médio dos resíduos, cujo resultado deve ser menor que sete para que as variâncias sejam consideradas homogêneas (Anexo 4) (PIMENTEL GOMES, 2012).

As médias foram comparadas pelo teste de média de Tukey ($p<0,05$). Também foi realizada a análise para a quantificação de microrganismos e os resultados foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios obtidos pela análise conjunta para as duas safras, apresentaram diferenças significativas para a altura de plantas, diâmetro do colmo e número de grãos por espiga, sendo as maiores médias na safra de 2014, enquanto que para o variável número de espiguetas por espiga, a maior média foi obtida na safra de 2015 (Tabela 1).

Para estas variáveis, a diferença entre as safras podem ser atribuídas principalmente às altas temperaturas que ocorreram na safra de 2015 (Figura 2). De maneira geral, a alta temperatura, além de reduzir a altura das plantas, reduz também a área foliar. A redução na área foliar é resultado do menor tamanho das folhas, acrescida do menor número de folhas e de perfilho por planta (SOUZA,1999).

Além disso, observa-se que no estádio de espigamento, as temperaturas atingiram valores superiores a 32ºC, cujo valor ideal situa-se entre 18 à 24º C, e acima de 32º C podem causar esterilidade e consequentemente redução na produção (BRINHOLI, 1996). Os efeitos do estresse de calor no rendimento de grãos são mais imediatos e a planta é mais suscetível no período de florescimento e enchimento de grãos. Em termos fisiológicos, promove redução da fotossíntese, aumento da respiração, redução na estabilidade das membranas celulares, desnaturação de proteínas e perda de atividade enzimática.

Tabela 1. Altura de planta (AP), diâmetro do colmo (DC), número de espiguetas por espiga (NEE), número de grãos por espiga (NGE), índice de acamamento (IA) de trigo cultivado em dois anos agrícolas (2014 e 2015), em resposta a inoculação de bactérias diazotróficas associada e não à adubação nitrogenada.

Anos	AP (cm)	DC (cm)	NEE	NGE
2014	60,40 A	2,99 a	25,64 b	18,31 a
2015	59,36 B	2,91 b	26,02 a	15,79 b
CV %	2,87	8,32	12,76	26,27

Médias seguidas de mesma letra minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste F (P > 0,05).

No inicio do estádio de espigamento, o estresse por altas temperaturas, além de reduzir o período de florescimento, provoca uma redução drástica no número de perfilho por planta, que ocorre em função da competição pelos recursos, sendo que os carboidratos produzidos pelas plantas são direcionados, quase que exclusivamente, para as espigas visando à formação e o enchimento dos grãos (KLEPER et al., 1998). Faraooq et al. (2011) observaram que a ocorrência de alta

temperatura durante a antese aumenta a esterilidade das flores, afetando o número de grãos por espiga até provocar a esterilidade completa.

Em relação a inoculação com as bactérias diazotróficas, sem adubação nitrogenada em cobertura, observou-se que as plantas oriundas de sementes que foram inoculadas com *Herbaspirillum* apresentou menor altura em relação as plantas oriundas de sementes que foram inoculadas com *Azospirilum.* Para esta variável, não houve diferença significativa na presença da adubação nitrogenada em cobertura (Tabela 2). Dartora et al. (2013) não verificaram efeito da inoculação com *Azospirillum* e *Herbaspirillum* associada a adubação nitrogenada, sobre a altura da planta na cultura do milho. Por outro lado, Cazeta et al. (2007) relataram que deficiência no suprimento de N pode comprometer os processos de crescimento e altura de plantas. Este fato não ocorreu neste experimento, provavelmente devido ao teor de matéria orgânica presente no solo, associado ao N deixado pela cultura da soja.

Tabela 2. Altura de planta (AP) e diâmetro do colmo (DC) de trigo microbiolizadas com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* cultivadas com e sem adubação nitrogenada em cobertura, em dois anos de cultivo.

Inoculantes	**Altura de Planta (cm)**		**Diâmetro do Colmo (cm)**	
	Com N	**Sem N**	**Com N**	**Sem N**
Sem inoculação	58,73 Aa	61,36 Aa	3,13 Aa	2,66 Bb
Azospirillum	60,07 Aa	61,21 Aa	2,98 Aa	2,76 Ab
Herbaspirillum	60,46 Aa	58,05 Ab	2,97 Aa	3,10 Aa
Azo+ Herba	60,53 Aa	58,98 Aab	3,02 Aa	3,05 Aab

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas nas linhas, e letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P > 0,05).

Para o diâmetro do colmo, na ausência da inoculação, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com N. As plantas fertilizadas com N apresentou valor superior (3,13) ao das plantas que não receberam o N (2,66) (Tabela 2), representando um acréscimo de 18%. O aumento do diâmetro do caule, em função das doses de N, é positivo, visto que, no colmo ocorre armazenamento de assimilados que podem ser translocados, durante o enchimento dos grãos (ZAGONEL e FERNANDES, 2007). Esses autores encontraram respostas variadas das cultivares ao aumento da dose de N para essa característica, o que sugere também a influência de fatores genéticos.

Em relação a inoculação com as bactérias diazotróficas, sem adubação nitrogenada em cobertura, observou-se que as plantas oriundas de sementes que foram inoculadas com *Herbaspirillum* apresentou maior diâmetro do colmo (3,10) em relação as plantas que não receberam N em cobertura (2,66), representando um acréscimo de 16% (Tabela 2). Os incrementos verificados no diâmetro do colmo podem ser associados à produção de fito-hormônios pelas bactérias, como auxinas, giberelinas e citocininas (MOREIRA et al., 2010).

Para a característica número de espiguetas por espiga, a inoculação combinada das estirpes *Azospirillum* + *Herbaspirillum* com adubação nitrogenada em cobertura foi superior em 26% à combinação sem adubação. O mesmo comportamento também foi observado para o número de grãos por espiga, no entanto, o acréscimo foi o dobro do número de grãos obtidos (Tabela 3).

Tabela 3. Número de espiguetas por espiga (NEE) e número de grãos por espiga (NGE) de trigo microbiolizadas com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* cultivadas com e sem adubação nitrogenada em cobertura, em dois anos de cultivo.

Inoculantes	NEE		NGE	
	Com N	Sem N	Com N	Sem N
Sem inoculação	22,66 Ab	25,83 Aa	16,78 Ab	13,79 Aa
Azospirillum	25,37 Aab	25,01 Aa	16,67 Ab	12,46 Aa
Herbaspirillum	28,17 Aa	24,40 Aa	19,77 Ab	15,48 Aa
Azo+ Herba	30,19 Aa	23,96 Ba	27,47 Aa	13,54 Ba

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas nas linhas, e letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P > 0,05).

O efeito da aplicação de doses de N no número de espiguetas por espiga e no número de grãos por espiga, encontrado na literatura, é muito variável. Bredemeier e Mundstock (2001) verificaram aumento no número de espiguetas e no número de grãos por espiga, quando o N foi aplicado por ocasião do estádio de perfilhamento. Por outro lado, Teixeira Filho et al. (2012) não verificaram efeito das doses de N, aplicadas em cobertura, em duas populações de plantas e em duas cultivares de trigo irrigado, na Região do Cerrado. No entanto, Coelho et al. (2009) observaram incremento no número de grãos por espiga, proporcionado pelo aumento das doses de N.

Em relação a inoculação com as bactérias diazotróficas, na presença da adubação nitrogenada em cobertura, observou-se que as plantas oriundas de sementes que foram inoculadas com *Herbaspirillum* apresentou maior número de

espiguetas por espiga (28,17) em relação as plantas oriundas de sementes que não foram inoculadas (22,66), o que representa um acréscimo de 24% (Tabela 3).

Observa-se na Tabela 4, que as plantas originadas de sementes que foram inoculadas com a combinação das estirpes *Azospirillum* + *Herbaspirillum* e que receberam adubação nitrogenada em cobertura apresentaram maior índice de acamamento (2,97) em relação as plantas que não receberam adubação nitrogenada em cobertura (1,43). As plantas que não receberam N em cobertura tiveram uma redução de 51% no índice de acamamento, em relação as plantas que receberam N em cobertura. O aumento no suprimento de N estimula a elongação do caule em cereais. No entanto, esse incremento não é favorável, uma vez que o maior comprimento das plantas vem, geralmente, acompanhado de maior predisposição ao acamamento. Para Soratto et al. (2007) a susceptibilidade ao acamamento pode estar relacionada por desbalanço nutricional, baixa resistência do colmo, massa das espigas, fatores climáticos desfavoráveis, entre outros.

Tabela 4. Índice de acamamento (IA) e massa de mil grãos (MMG) de trigo e microbiolizadas com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* cultivadas com e sem adubação nitrogenada em cobertura, em dois anos de cultivo.

Inoculantes	IA		MMG (g)	
	Com N	Sem N	Com N	Sem N
Sem inoculação	1,83 Aa	1,60 Aa	24,45 Aa	26,21 Aa
Azospirillum	1,98 Aa	2,09 Aa	24,31 Aa	25,74 Aa
Herbaspirillum	1,89 Aa	1,79 Aa	26,55 Aa	26,54 Aa
Azo+ Herba	2,97 Aa	1,43 Ba	27,84 Aa	24,90 Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas nas linhas, e letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P > 0,05).

Plantas com maior diâmetro de colmo geralmente são menos predispostas ao acamamento, dessa forma, o baixo índice de acamamento (1,43) além de ser atribuído a ausência do N em cobertura, pode ser também atribuído as bactérias diazotróficas, uma vez que os incrementos verificados no diâmetro do colmo principalmente por *Herbaspirillum* (Tabela 2) podem ser associados à produção de fito-hormônios pelas bactérias, como auxinas, giberelinas e citocininas (MOREIRA et al., 2010).

Para a massa de mil grãos não foram encontradas diferenças significativas da inoculação e adubação nitrogenada (Tabela 4). Portanto, não foram detectada competição por nutrientes e fotoassimilados dentro da espiga e, como

consequência, a massa unitária dos grãos não foi afetada. Teixeira Filho et al. (2009) e Zagonel et al. (2002) também verificaram que a adubação nitrogenada não influenciou a massa de mil grãos. Por outro lado, as análises de variância conjunta para anos de experimento (Anexo 3 e Tabela 5) identificaram que a massa de mil grãos da safra 2015 foi maior em relação ao ano anterior, no fator adubação, com índices em média de 9% de acréscimo.

Tabela 5. Massa de mil grãos (MMG) de trigo cultivadas em duas safras com e sem adubação nitrogenada.

ANO	MMG (g)	
	Com adubação	**Sem adubação**
2014	24,60 Ab	25,93 Aa
2015	26,97 Aa	25,76 Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas nas linhas, e letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P > 0,05).

Observa-se na Tabela 6, que na safra de 2014, as plantas originadas de sementes que foram inoculadas com a combinação das estirpes *Azospirillum* + *Herbaspirillum* e que receberam adubação nitrogenada em cobertura apresentaram maior produtividade de grãos (2.858 kg ha^{-1}) em relação as plantas originadas de sementes que não foram inoculadas (1.489 kg ha^{-1}), uma diferença de 1.369 kg ha^{-1} em relação à testemunha. Braccini et al. (2012) relataram que a inoculação com as estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* torna-se um manejo eficiente para a cultura do trigo no sentido de diminuir a utilização de fertilizantes nitrogenados contribuindo para melhoria do ambiente, podendo diminuir a aplicação de adubo nitrogenado na cultura do trigo em 50%, levando a economia de insumos e mão de obra na aplicação.

Segundo Sala et al. (2007) a distribuição espacial das raízes, realizada pelas bactérias diazotróficas favorece a absorção de maior volume de nutrientes e água, alcançando melhor potencial de nutrição durante o desenvolvimento do vegetal, gerando ganhos de produtividade. Braccini et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes para a cultura do milho, constatando que a inoculação das sementes com bactérias diazotróficas promoveu aumento da produtividade de grãos.

Tabela 6. Produtividade de grãos de trigo microbiolizadas com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* cultivadas com e sem adubação nitrogenada em cobertura, em dois anos de cultivo.

Inoculantes	Produtividade de grãos (Kg ha^{-1})			
	2014		2015	
	Com N	Sem N	Com N	Sem N
Sem inoculação	1.489,79 Bbβ	2.718,64 Aabα	2.710,87 Aaα	1.994,06 Aaα
Azospirillum	2.757,89 Aaα	3.081,29 Aaα	2.489,56 Aaα	2.375,48 Aaα
Herbaspirillum	2.722,93 Aaα	3.094,84 Aaα	2.529,78 Aaα	2.526,68 Aaα
Azo+ Herba	2.858,36 Aaα	1.943,02 Abα	3.072,57 Aaα	2.761,03 Aaα

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas nas linhas, letras minúsculas nas colunas e letras gregas nos anos não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P > 0,05).

O efeito significativo da adubação nitrogenada associada a combinação da inoculação com estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum,* foi verificado por Sala et al. (2007) e Teixeira Filho et al. (2008). Segundo Saubidet et al. (2002,) há evidências de que em plantas de trigo a inoculação não substitui o adubo nitrogenado, porém, promove a melhor absorção e utilização do N disponível.

Apesar das vantagens que as bactérias diazotróficas proporcionam às plantas sua eficiência é prejudicada, muitas vezes, em função de estarem associadas livremente à planta, seja na rizosfera ou no interior dos tecidos, tornando-se muito vulneráveis ao ambiente (GYANESHWAR et al., 2002). As características do solo têm sido frequentemente associadas à ausência de resposta à inoculação (DOBBELAERE et al., 2002).

Ainda para o ano de 2014, observa-se que mesmo não diferindo estatisticamente, as plantas que receberam N em cobertura e originadas das sementes que foram inoculadas com as estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* de forma isolada, apresentaram produtividade de 2.757 kg ha^{-1} e 2.722 kg ha^{-1}, enquanto que as plantas que não receberam N em cobertura produziram 3.081,29 kg ha^{-1} e 3.094,84 kg ha^{-1}, respectivamente, tendo em média uma redução de produtividade de 10,5 e 12%, respectivamente. A adubação nitrogenada pode diminuir a quantidade de diazotróficos na raiz. Kirchhof et al (1997) observaram que a quantidade de bactérias era menor na presença de altos índices de N mineral. O fertilizante nitrogenado pode alterar o estado fisiológico da planta e consequentemente afetar a população de microorganismos. No entanto, Baldani e Baldani (2005) enfatizaram que altas doses de N não foram fator limitante para os efeitos benéficos causados pelas bactérias fixadoras de nitrogênio. Esses mesmos

autores, atribuem que a maior absorção de N pelas raízes de plantas inoculadas por estirpes bacterianas, é através da excreção de fitohormônios como auxinas, citocininas e giberelinas. Outro fator importante seria a cultura antecessora soja, na qual favorece na disponibilidade de N, isso devido à cultura ser uma espécie que fixa nitrogênio, apresenta uma relação C/N menor o que possibilita a espécie sucessora uma maior disponibilidade deste elemento.

Para o ano de 2015, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 6). No entanto, observa-se que as plantas originadas de sementes que foram inoculadas com a combinação das estirpes *Azospirillum* + *Herbaspirillum* e que receberam adubação nitrogenada em cobertura apresentaram um acréscimo de 13 % na produtividade de grãos em relação as plantas originadas de sementes que não foram inoculadas. Segundo Sala et al. (2007) a distribuição espacial das raízes, realizada pelas bactérias diazotróficas favorece a absorção de maior volume de nutrientes e água, alcançando melhor potencial de nutrição durante o desenvolvimento do vegetal, gerando ganhos de produtividade. Braccini et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes para a cultura do milho, constatando que a inoculação das sementes com bactérias diazotróficas promoveu aumento da produtividade de grãos.

Na Figura 3, pode-se verificar que a inoculação de *Herbaspirillum*, apresentou melhor quantidade de células viáveis totais com a aplicação de nitrogênio. No entanto, não apresentou diferença estatística independente com ou sem adubação nitrogenada. Isto pode confirmar que a associação endofítica deste gênero com raízes de trigo, deve ser considerada mais específica do ponto de vista da interação planta-microrganismo.

Baldani et al. (2000) em estudo de seleção de *Herbaspirillum* na cultura do arroz identificaram poucos benefícios para a cultura. Um dos pontos cruciais para a seleção e manejo desses microrganismos é a especificidade planta-bactéria, levando em consideração os fatores ambientais. Em solos com pequena ou ausente comunidade nativa de diazotróficos, as respostas a inoculação são mais consistentes e a recomendação de inoculante pode fazer parte do manejo da cultura (OKON, 1985).

Dotto et al. (2010) verificaram que a inoculação com *H. seropedicae* resultou em incremento de 8,6% na produtividade do milho. No entanto, a existência de certo grau de especificidade de algumas bactérias diazotróficas em relação ao hospedeiro

torna o genótipo da planta um fator chave na obtenção dos benefícios oriundos da associação planta-bactéria (REIS et al., 2000).

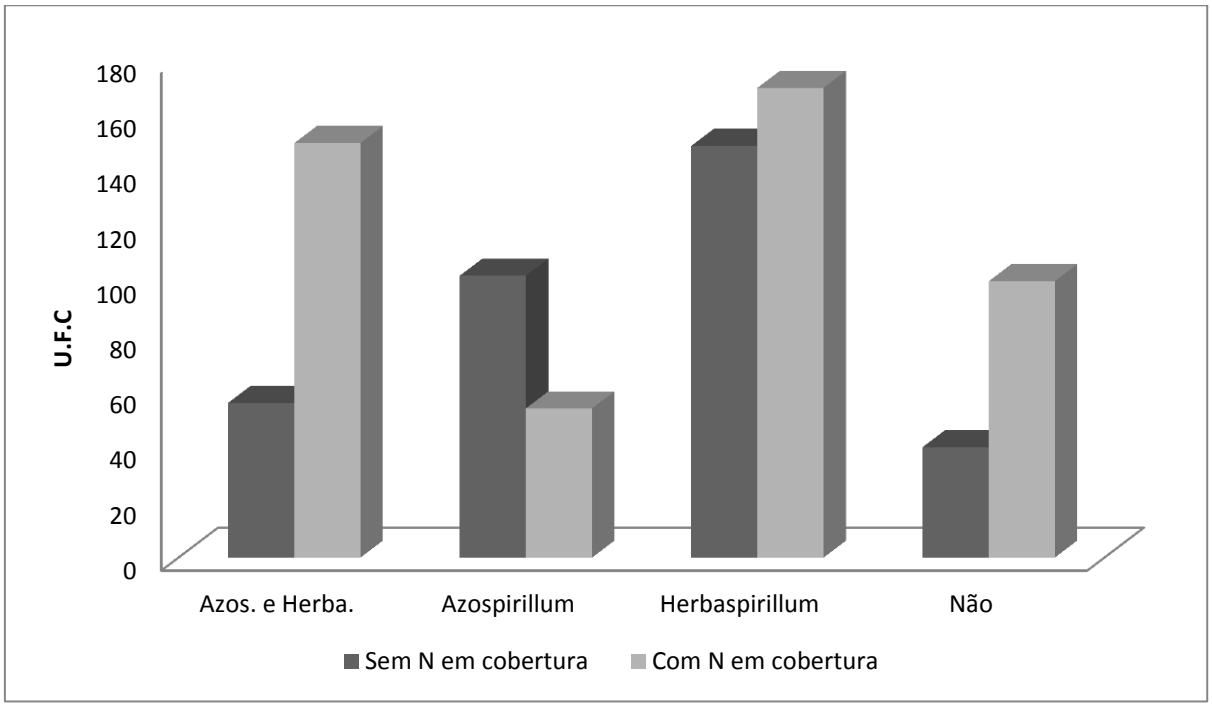

Figura 3. Média de Unidade Formadoras de Colônia (U.F.C) das raízes de plantas de trigo, sob influência de bactérias diazotróficas e testemunha com e sem adubação nitrogenada em cobertura na safra 2015. Palotina,PR.

Segundo Brandão (1992) a interação de *H. seropedicae* com as plantas tenha sido fundamental para obtenção de respostas positivas à inoculação combinada de estirpes haja visto que, apesar de sua contribuição como bactéria promotora do crescimento vegetal ser considerada menor em relação a outras espécies.

O resultado se explica pelo fato de *H. seropedicae* sobreviver pouco no solo, ser endofitico obrigatório, colonizar nichos específicos no interior dos tecidos vegetais tornando mais eficiente a transferência dos compostos nitrogenados produzidos para a planta. Através desta relação mais íntima com a planta, a bactéria se torna menos vulnerável ao ambiente externo e se encontra livre de limitações de substratos de carbono (OLIVARES et al, 1997) e da competição com outros microorganismos edáficos (MOREIRA et al., 2010).

Por outro lado, a redução do número de UFC de *Azospirillum* sob condição de adubação nitrogenada pode apontar para uma menor competitividade destes indivíduos por exsudatos e nutrientes (Figura 3). O *Azospirillum* possui diversas vias metabólicas alternativas que permitem a este microrganismo utilizar uma variedade

de ácidos orgânicos e aromáticos, açúcares e aminoácidos disponíveis na rizosfera sem depender do tecido vegetal para sua sobrevivência**.**

Bactéria predominantemente rizosférica, *A. brasilense*, contribuiu de forma menos expressiva para os resultados da inoculação em relação a *H. seropedicae*, uma vez que é mais vulnerável a estresses ambientais e pode ter sido influenciada pelo próprio pH do solo nas condições de estudo (Figura 3).

A acidez do solo é um dos fatores limitantes ao desenvolvimento das bactérias, sendo que a resposta varia de acordo com a estirpe em questão. A bactéria *Azospirillum* é pouco tolerantes acidez. Este organismo cresce em uma faixa de pH ideal entre 6,0 e 7,0. Já o gênero *Herbaspirillum* toleram drásticas mudanças no pH (5,3 – 8,0) e uma concentração de oxigênio maior que as espécies de *Azospirillum* (MOREIRA et al., 2010).

No referido estudo, o pH do solo, dos dois anos de cultivo foram relativamente baixos para as estirpes bacterianas, 5,1 e 4,8 $CaCI_{2,}$ respectivamente. Segundo Brandão (1992) sob valores extremos de pH o crescimento de microorganismos do solo pode ser prejudicado pelo efeito direto da elevada concentração de íons H^+ e OH^-.

A co-inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, apresentou melhor quantidade de células viáveis totais com a aplicação de nitrogênio, comparando sem adubação nitrogenada.

A resposta positiva das plantas à inoculação com bactérias diazotróficas pode ser atribuída a outros fatores, além da produção de substâncias promotoras do crescimento, tais como proteção contra fitopatógenos, alteração da atividade metabólica através de efeitos sobre as membranas celulares (BASHAN et al., 2004), solubilização de fosfatos, aumento da resistência das plantas ao estresse e a própria fixação biológica de nitrogênio (GRAY e SMITH, 2005).

5 CONCLUSÕES

Na ausência da inoculação, a adubação nitrogenada em cobertura promoveu um acréscimo de 18% no diâmetro do colmo.

Na ausência da adubação nitrogenada em cobertura, a inoculação com *H. seropedicae* promoveu um acréscimo de 16% no diâmetro de colmo, e na presença da adubação nitrogenada esta bactéria promoveu um acréscimo de 24% no número de espiguetas por espiga em relação às plantas que não foram inoculadas.

A inoculação combinada das estirpes *A. brasilense* + *H. seropedicae* com adubação nitrogenada em cobertura promoveu um acréscimo de 26% no número de espiguetas por espiga e o dobro do número de grãos obtidos, em relação à combinação sem adubação.

A inoculação combinada das estirpes *A. brasilense* + *H. seropedicae* com adubação nitrogenada em cobertura promoveu um acréscimo de 48% e 13% na produtividade de grãos, na safra de 2014 e na safra de 2015, respectivamente, em relação as plantas que não foram inoculadas.

A inoculação de *H. seropedicae* apresentou maior quantidade de células viáveis totais com a aplicação de nitrogênio.

A redução do número de UFC de *A. brasilense* sob condição de adubação nitrogenada pode apontar para uma menor competitividade destes indivíduos por exsudatos e nutrientes.

.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARF, O., Rodrigues, R. A. F., Sá, M. D., Buzetti, S., & NASCIMENTO, V. D Manejo do solo, água e nitrogênio no cultivo de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 2, p. 131-138, 2004.

ARGENTA, G.; SILVA, P. D.; MIELNICZUK, J.; BORTOLINI, C. G. Parâmetros de planta como indicadores do nível de nitrogênio na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 519-527, 2002.

BALDANI, V. L. D. OLIVEIRA, E., BALOTA, E., BALDANI, J. L., KIRCHHOF, G., DÖBEREINER, J.,KIRCHHOF, G *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 69, p. 116-116, 1997.

BALDANI, V.L. D; BALDANI, J. I; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5-6, p. 485-491, 2000.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.3 p. 549-579, 2005.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. Plant Growth-Promothing In: HILLEL, D., In **Encyclopedia of soils in the environment**. 1. ed, v.1, p. 103-115, 2005.

BALSANELLI, E., SERRATO, R. V., BAURA, V. A., SASSAKI, G., YATES, M. G., RIGO, L. U., MONTEIRO, R. A. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental microbiology**, v.12, n. 8, p. 2233-2244, 2010.

BRACCINI, A.L.; DAN, L.G.M.; PICCININ, G.G.; ALBRECHT, L.P.; BARBOSA, M.C.; ORTIZ, A.H.T. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with theuse of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 220-228, 2012.

BRAMMER, S. P.; MARTINELLI, P.; MORAES-FERNANDES, M. I. B de; PRESTES A. M.; ANGRA, D. C. **A potencialidade de Agropyron, espécie afim ao trigo cultivado, como fonte de introgressão de genes agronomicamente importantes**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. v.8 Disponível: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do08.htm. Acesso: junho 2016.

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, p.1-15, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 395p, 2009

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Estádios fenológicos do trigo para a adubação nitrogenada em cobertura. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.25, n. 7, p.317-323, 2001.

BRINHOLI, O. **Cultura do sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)**. 196p. 1996.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do Solo**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 375-470, 2007.

COELHO, M.A.O.; SOUZA, M.A.; SEDIYAMA, T.; RIBEIRO, A.C.; SEDIYAMA, C.S. Resposta da produtividade de grãos e outras características agronômicas do trigo Embrapa 22 irrigado ao nitrogênio em cobertura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, n. 4 p.555-561, 2009.

COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola. **Guia de produtos trigo**. Disponível em:http://www.coodetec.com.br/downloads/guia-de-produtos-2014-sul.pdf. Acesso em 09 Jan 2016.

COSTA, K.A.P.; FRANÇA, A.F.S.; OLIVEIRA, I.P. MONTEIRO, F. A., & BARIGOSSI, J. A. F. Composição química-bromatológica do capim-tanzânia em função de doses de nitrogênio, potássio e enxofre. **Ciência Animal Brasileira**., v.25, n. 2, p.83-91, 2004.

CHUBATSU, L. S., MONTEIRO, R. A., SOUZA, E. M., OLIVEIRA, M. A. S., YATES, M. G., WASSEM, R., OLIVEIRA P. F. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. ***Plant and Soil***, v. *356, n.*1-2, p. 197-207, 2012.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, F.V.; MARINI, D.; SANDER. G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.10, p.1023–1029, 2013.

DOBEREINER, J.; PAULA, M. A,; MONTEIRO, E.M.S. et al. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N_2 fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 5, p. 310-313, 1992.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A. 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, n.36. pg. 284-297, 2002.

DOTTO, A.P.; LANA, M.C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n.3, p.376-382, 2010.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed, 353p. 2014a.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Nitrogênio e Qualidade Tecnológica do Trigo**. Embrapa Trigo. 2014b Disponíveil em: https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1727107/artigo---nitrogenio-e-qualidade-tecnologica-do-trigo. Acesso em: 12 Jan. 2016.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Informações técnicas para o trigo e triticale** – Safra 2016. 8.ed Brasília-DF, 2016.

FARAOOQ, M.; BRAMLEY, H.; PALTA, J.A. Heat stress in wheat during reproductive and grain-filling phases. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.30, n.6, p.491-507, 2011.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P. H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology Biochemistry**, v. 39, p. 867-876, 2007.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.395-412, 2005.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant Soil**, v.245, n. 3, p.83-93, 2002.

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

JAMES, E.K; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N. Infection and Colonization of rice Seedlings by the Plant Growth-Promotion Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Mol. Plant Microbe Interac**. v.15, p.894-906, 2002.

JEZEWSKI, T. J.; SILVA, J. A. G.; FERNANDES, S. B. V. Efeito da inoculação de *Azospirillum* em trigo, isolado e associado a estimulante de crescimento no noroeste do RS. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPEL, 2010, PELOTAS/RS. XIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E II MOSTRA CIENTÍFICA DA UFPEL. **Anais**. v. 1, p. 568-571, 2010.

KIRCHHOF, G., SCHLOTER, M., ASSMUS, B., HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. *29*, n.5, p. 853-862, 1997.

KLEPER, B.; RICKMAN, R.W.; WALDMAN, S. CHEVALIER, P. The physiological life cycle of wheat: its use in breeding and crop management. **Euphytica**, v.100, n.1, p.341- 347, 1998.

LADHA, J.K.; PATHAK, H.; KRUPNIK, T.J.; SIX, J.; KESSEL, C.V. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects. **Advances in Agr.** 2005.

LOPES E.S. Fixação biológica do nitrogênio no sistema solo-planta. In: I SIMPÓSIO SOBRE NITROGÊNIO E ENXOFRE NA AGRICULTURA BRASILEIRA, Piracicaba. **Anais...**, IPNI Brasil, p.43-72. 2007.

MENDES, M.C. ROSARIO, J.G. FARIA, M.F. ZOCHE, J.C. WALTER, A.L. Avaliação da eficiência agronômica de A*zospirillum brasilense* na cultura do trigo e os efeitos na qualidade de farinha. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias.** v. 4, n.3, p.95-110, 2011.

MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI, E.; WASSEN, R.; MARIN, A.M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; SCHMIDT, M.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; PANKIEVICZ, V.C.S.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant Soil**, v. 356, n. 1, p. 175-196, 2012.

MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** 2.ed. atualizada e ampliada. Lavras: Ufla,729p. 2006.

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

NCBI Taxonomy. **Base de dados de taxonomia**. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy. Acesso em 05 Jan. 2016.

ODEPA. **Boletín de Trigo – Enero y Febrero 2012**. Santiago. Publicaion de la Oficina de Estudios e Políticas Agrárias (ODEPA) del Ministério de Agricultura, Gobierno de Chile. 44 p, 2012.

OLIVARES, F.L., JAMES, E.K., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe diseasesuscetible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum***. New Phytologist** v.135, n. 4, p 723-737, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106-113, 2009.

OKON, Yaacov. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 9, p. 223-228, 1985.

PEDROSA, F. O., MONTEIRO, R. A., WASSEM, R., CRUZ, L. M., AYUB, R. A., COLAUTO, N. B., MADEIRA, H. M. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. ***PLoS Genet***, v. *7*, n. 5, p.e1002064, 2011.

PENG, S.; BURESH, R. J.; HUANG, J.; ZHONG, X.; ZOU, Y.; YANG, J.;CUI, K. (Improving nitrogen fertilization in rice by site-specific N management. A review. **Agronomy for Sustainable Development,** v.*30*, n.3, p. 649-656, 2010.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 14 ed. Piracicaba: Degaspari, 477p. 2012.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, n.3, p.227-247, 2000.

REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 6., 2012, Londrina, PR. **Atas e resumos...** Londrina: Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale: Embrapa Trigo: 2012., 225p; 2012.

SAUBIDET, M.I.; FATTA, N.; BARNEIX, A.J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v.245, n. 2, p.215- 222, 2002.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G. DE; SILVEIRA, A. P. D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.6, p.833-842, 2007.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, n.3, p.345-352, 2005.

SILVA, A.A. O. FELIPE, A. F.; BACH, E. E. Ação do *Azopirillum brasiliense* e no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Conscientia e Saúde**, v.3, n. 3, p.29-35, 2004.

SOUZA, M.A. **Controle genético e resposta ao estresse de calor de cultivares de trigo.** 152p. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.1999.

SORATTO, R.P.; CARDOSO, S.M.; SILVA, Â.H.; COSTA, T.A.M.; PEREIRA, M.; CARVALHO, L.A. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do painço (*Panicum miliaceum* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1661-1667, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 819p. 2010.

TEIXEIRA FILHO, Marcelo Carvalho Minhoto et al. Desempenho agronômico de cultivares de trigo em resposta a população de plantas e a adubação nitrogenada. **Científica,** v. 36, n. 2, p. 97-106, 2008.

TEIXEIRA FILHO, M.C.M.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M.; SÁ, M. E. DE; ARF, O.; MEGDA, M. M. Response of irrigated wheat cultivars to different nitrogen rates and sources. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, n.5, p.1303-1310, 2009.

TEIXEIRA FILHO, M.C.M.; BUZETTI, S.; ALVAREZ, R.C.F.; FREITAS, J.G.; ARF, O.; SÁ, M. E. Desempenho agronômico de cultivares de trigo em resposta a população de plantas e a adubação nitrogenada. **Científica**, v.36, n.2, p.97-106, 2012.

ZAGONEL, J.; VENÂNCIO, W.S.; KUNZ, R.P.; TANAMATI, H. Doses de nitrogênio e densidade de plantas com e sem um regulador de crescimento afetando o trigo, cultivar OR-1. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.25-29, 2002.

ZAGONEL, J.; FERNANDES, E.C. Doses e épocas de aplicação do regulador de crescimento afetando cultivares de trigo em duas doses de nitrogênio. **Planta Daninha**, v.25, n.2, p.331-339, 2007.

ZAIED, K.A.; EL-HADY, A.H.; AFIFY, A.H. & NASSEF, M.A. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. Pakist. **Journal Biology Science**. v. 6, n.4, p. 344-358, 2003.

ANEXOS

Anexo 1. Resumo da análise de variância para as variáveis agronômicas: altura de planta (AP), diâmetro do colmo (DC), número de espiguetas por espiga (NEE), número de grãos por espiga (NGE), índice de acamamento (IA), massa de mil grãos (MMG) e produtividade (PROD) de trigo cultivado no ano de 2014, em resposta a inoculação de bactérias diazotróficas associada e não à adubação nitrogenada.

Fontes de Variação	GL	Quadrados médios													
		AP (cm)		DC (CM)		NEE		NGE		IA		MMG (g)		PROD (Kg ha^{-1})	
Bloco	4	4,340		0,105		21,89		35,32		0,5757		4,53		116.891,98	
Inoculante	3	4,747		0,104		30,09		91,76		0,0497		12,60		1.326.093,06	
Adub	1	0,265		0,128		18,21		267,71		1,2344		18,27		952.355,89	**
Adub*Inoc	3	19,482		0,216		62,07		106,20	**	0,5968		10,55		1.283.196,30	*
Erro	20	3,487	**	0,075		15,18	*	24,64	*	0,6159		6,66		126.242,88	**
CV (%)		3,09		9,16		15,19		27,11		42,71		10,23		13,62	
Média		60,40		2,993		25,64		18,31		1,84		25,23		2.609,22	

* e ** : significativos a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

Anexo 2. Resumo da análise de variância para as variáveis agronômicas: altura de planta (AP), diâmetro do colmo (DC), número de espiguetas por espiga (NEE), número de grãos por espiga (NGE), índice de acamamento (IA), massa de mil grãos (MMG) e produtividade (PROD) de trigo cultivado no ano de 2015, em resposta a inoculação de bactérias diazotróficas associada e não à adubação nitrogenada.

Fontes de Variação	GL	Quadrados médios							
		AP (cm)	DC (CM)	NEE	NGE		IA	MMG (g)	REND (Kg ha^{-1})
Bloco	4	9,676	0,1011	6,26	25,85		1,008	2,70	128.478,59
Inoculante	3	1,142	0,0469	9,03	21,63		1,173	3,15	477.685,51
Adub	1	0,145	0,1515	18,72	246,51	**	1,140	11,23	708.303,04
Adub*Inoc	3	5,447	0,0858	12,84	12,09		1,506	6,70	277.157,95
Erro	19	2,605	0,0519	8,22	19,34		0,884	6,40	59.991,48
CV (%)		2,72	7,82	11,02	27,85		47,00	9,63	9,61
Média		59,36	2,91	26,02	15,79		2,00	26,27	2.549,03

* e **: significativos a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

Anexo 3. Resumo da análise de variância conjunta para as variáveis agronômicas: altura de planta (AP), diâmetro do colmo (DC), número de espigas por espigueta (NEE), número de grãos por espiga (NGE), índice de acamamento (IA), massa de mil grãos (MMG) e produtividade (PROD) de trigo, cultivado em dois anos agrícolas, em resposta a inoculação de bactérias diazotróficas associada e não à adubação nitrogenada.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios													
		AP (cm)		DC (CM)		NEE		NGE		IA		MMG (g)		PROD (Kg ha^{-1})	
Bloco	4	12,2048		0,156802		24,4377		56,68		1,3180		3,7884		23.505,41	
Inoculante	3	4,8549		0,127589		26,2384		92,76	**	0,8501		9,19575		950.202,81	**
Adub	1	0,0171		0,281369	*	40,3376		526,58	**	2,4860		0,7918		8.699,77	
Ano	1	18,7567	*	0,110016	*	2,2989	*	102,70	*	0,3796		16,9324		35.660,18	
Inoc. e Adu.	3	20,6387	**	0,282171	**	58,8670	**	78,89	*	1,9109	*	17,0843	*	507.014,42	**
Inoc*Ano	3	0,8754		0,034749		11,4896		17,84		0,4636		6,32572		889.703,98	**
Adub*Ano	1	0,1380		0,000299		0,0915		3,92		0,0633		25,6726	*	1.304.625,09	**
Adub*Inoc*Ano	3	3,7614		0,031312		18,7370		40,22		0,1307		0,92378		1.041.884,85	**
Erro	43	2,9598		0,060520		10,8647		20,12		0,6964		6,27699		112.717,41	
CV (%)		2,87		8,32		12,76		26,27		43,52		9,73		13,01	
Média		59,88		2,95		25,82		17,07		1,91		25,74		2.579,60	

* e ** : significativos a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

Anexo 4. Relação entre o maior e o menor quadrado médio residual das análises de variância individuais para altura de planta (AP), diâmetro do colmo (DC), número de espigas por espigueta (NEE), número de grãos por espiga (NGE), índice de acamamento (IA), massa de mil grãos (MMG) e produtividade (PROD) de trigo cultivado em dois anos agrícolas, em resposta a inoculação de bactérias diazotróficas associada e não à adubação nitrogenada.

Anos	Quadrados médios Residuais						
	AP	DC	NEE	NGE	IA	MMG	REND
2014	3,487	0,075	15,18	24,64	0,6159	6,66	126.242,88
2015	2,605	0,0519	8,22	19,34	0,884	6,40	59.991,48
Relação	1,34	1,45	1,85	1,27	1,43	1,04	2,10