

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

**JANAÍNA DARTORA**

**DESEMPENHO AGRONÔMICO DO MILHO EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO  
COMBINADA COM *Azospirillum brasilense* E *Herbaspirillum seropedicae* ASSOCIADA  
À ADUBAÇÃO NITROGENADA**

**Marechal Cândido Rondon  
2012**

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

**JANAÍNA DARTORA**

**INFLUÊNCIA DA ADUBAÇÃO NITROGENADA E INOCULAÇÃO COM  
*Azospirillum brasilense* E *Herbaspirillum seropedicae* NA CULTURA DO MILHO**

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

Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães  
Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria do Carmo Lana

**Marechal Cândido Rondon  
2012**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Juarez e Líbera Dartora e ao meu irmão Lucas Dartora, pois são a base de tudo em minha vida, meu porto seguro e meu exemplo de vida.

Ao meu namorado Anderson Luiz Just pelo companheirismo e apoio.

A todos os amigos e familiares que tornam esta jornada mais agradável.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo milagre da vida e por permitir a conclusão de mais um grande sonho.

À minha família, por estar sempre ao meu lado, incentivando-me constantemente a não desistir e seguir adiante, colaborando fielmente para a realização de mais uma importante fase da minha vida, com todo o carinho, amor, apoio, paciência e compreendendo a minha ausência.

Ao meu namorado, Anderson Luiz Just e toda sua família, pelo apoio, compreensão e incentivo durante esta jornada, estando ao meu lado em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Vandeir Francisco Guimarães por todos estes anos me orientando, com toda a paciência e carinho, pela amizade, ensinamentos e por representar um grande exemplo de vida, servindo de exemplo para a minha formação pessoal e profissional.

Aos Professores Cláudio Tsutsumi, Maria do Carmo Lana e Emerson Fey pelos conselhos, ensinamentos e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Deniele Marini pelo companheirismo, amizade e auxílio no desenvolvimento deste e de outros experimentos durante todo o mestrado.

Aos amigos e colegas, Daiana Raquel Pauletti, Gerson Sander, Edilaine Della Valentina Gonçalves, Artur Soares Pinto Júnior, Fernando Seidel, Luis Offeman, Jéferson Klein, Leandro Rampim, Lucas Dartora e Tiago Just pelo auxílio nas atividades relativas a este trabalho.

Ao Darci Fontoura e à Universidade Federal do Paraná, pela disponibilidade e apoio imprescindível na execução desta pesquisa.

A equipe de trabalhadores da Estação Experimental da UNIOESTE especialmente ao Marcelo Lang pelo auxílio.

À todos que colaboraram de alguma forma, muito obrigada.

“Nada me perturbe. Nada me amedronte. Tudo passa. A paciência tudo alcança. A quem tem Deus nada falta. Só Deus basta.”

Santa Tereza D’Ávila

## RESUMO

### DESEMPENHO AGRONÔMICO DO MILHO EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COMBINADA COM *Azospirillum brasilense* E *Herbaspirillum seropedicae* ASSOCIADA À ADUBAÇÃO NITROGENADA

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o desenvolvimento e a produtividade do milho em resposta à inoculação combinada das bactérias *A. brasilense* e *H. seropedicae* em associação à adubação nitrogenada. O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso em esquema fatorial 4 x 5, com quatro repetições. O primeiro fator constitui-se da inoculação das sementes: testemunha sem inoculação, estirpe de *A. brasilense* (Ab-V5), estirpe de *H. seropedicae* (SmR1) e a combinação das estirpes (Ab-V5 + SmR1); e o segundo fator das doses de nitrogênio (N): 0, 40, 80, 120 e 160 kg ha<sup>-1</sup> de N. Foram avaliadas as variáveis biométricas diâmetro basal do colmo, altura de planta, massa seca de parte aérea e área foliar; teor de NPK nas folhas e grãos; e os componentes da produção altura de inserção, comprimento de espiga, diâmetro de espiga, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira, massa de espiga e produtividade. Verificou-se que não houve interação entre os fatores em estudo, tendo sido observado efeito positivo da inoculação quanto ao desenvolvimento e produção da cultura do milho, especialmente com a inoculação combinada das estirpes, que proporcionou incremento na produtividade da cultura de 922 kg ha<sup>-1</sup> em relação à testemunha. A aplicação de doses crescentes de N em cobertura proporcionou incremento no crescimento e produtividade do milho até a dose de 160 kg ha<sup>-1</sup> de N de forma independente. Quanto à análise de nutrientes, foi verificado efeito da inoculação apenas sobre os teores de N nos grãos e de P foliar, enquanto a adubação nitrogenada influenciou apenas o teor de P foliar.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., bactérias diazotróficas, teor de N foliar

## ABSTRACT

### AGRONOMIC PERFORMANCE OF CORN IN RESPONSE TO COMBINED INOCULATION WITH *Azospirillum brasilense* AND *Herbaspirillum seropedicae* ASSOCIATED WITH NITROGEN

The aim of this work was to evaluate the development and productivity of maize in response to combined of bacteria *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in association with nitrogen fertilization. The experimental design was a randomized complete block with four replications and treatments arranged in a 4x5 factorial. The first factor is from the inoculation of seeds: non-inoculated, strain of *Azospirillum brasilense* (Ab-V5), strain of *Herbaspirillum seropedicae* (SmR1) and the combination of strains (Ab-V5+SmR1); and the second factor of nitrogen (N) rates: 0, 40, 80, 120 e 160 kg ha<sup>-1</sup> of N. Were evaluated biometric variables: basal diameter stem, plant height, shoot dry weight and leaf area; NPK content in leaves and grains; and production components: height of ear height, ear length, ear diameter, number of rows per ear, number of grains per row, weight of ear and productivity. There was no interaction between the factors under study, and was observed a positive effect of inoculation on the development and production of maize, especially with combined inoculation of strains, wich resulted in increased crop yield of 922 kg ha<sup>-1</sup> compared to control. The application of increasing doses of N provided increased growth and productivity of maize until the dose of 160 kg ha<sup>-1</sup> de N. Inoculation effect was observed only on the levels of N in leaf and P in grain, while the nitrogen fertilization only influenced the P content of leaf.

**Key-words:** *Zea mays* L., diazotrophs, leaf N content.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Precipitação pluviométrica acumulada e temperatura média mensal no período de outubro/2010 a março/2011. Estação Experimental “Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa”, Marechal Cândido Rondon, PR.....27
- Figura 2: Altura de planta nos períodos vegetativo (a) e reprodutivo (b) de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.....36
- Figura 3: Diâmetro basal do colmo no período reprodutivo (a) e massa seca de parte aérea no período vegetativo (b) de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.....37
- Figura 4: Altura de inserção da espiga (a) e massa de espiga (b) de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.....42
- Figura 5: Comprimento (a) e diâmetro (b) de espiga de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.....43
- Figura 6: Produtividade do milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.....44
- Figura 7: Teor de P foliar de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.....49

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Marechal Cândido Rondon, UNIOESTE, 2010.....26
- Tabela 2: Diâmetro basal do colmo e altura de planta nos períodos vegetativo e reprodutivo, de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação isolada e combinada das estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1). Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.....33
- Tabela 3: Massa seca de parte aérea e área foliar nos períodos vegetativo e reprodutivo, de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação isolada e combinada das estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1). Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.....34
- Tabela 4: Altura de inserção de espiga (AI), comprimento de espiga (CE), diâmetro de espiga (DE), número de fileiras por espiga (NF), número grãos por fileira (NG), peso de espiga (PE) e produtividade (PROD) de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação isolada e combinada das estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1). Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.....38
- Tabela 5: Teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), em folhas e grãos, de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação isolada e combinada das estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1). Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.....46

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 A cultura do milho.....	12
2.2 Importância do nitrogênio e a adubação nitrogenada.....	13
2.3 Adubação nitrogenada na cultura do milho.....	16
2.4 Fixação biológica de nitrogênio e bactérias diazotróficas.....	17
2.5 Associação de bactérias diazotróficas com gramíneas.....	18
2.6 Aspectos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos de <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	21
2.6.1 <i>Azospirillum brasilense</i> .....	21
2.6.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	23
2.7 Potencial de inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> em gramíneas.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Localização e caracterização da área experimental.....	26
3.2 Delineamento experimental.....	27
3.3 Instalação e condução do experimento.....	27
3.4 Variáveis avaliadas .....	28
3.4.1 Variáveis biométricas.....	29
3.4.2 Análise dos teores de nutrientes em tecidos foliares.....	29
3.4.3 Componentes da produção e produtividade.....	30
3.4.4 Análise dos teores de nutrientes nos grãos.....	30
3.5 Análise de dados.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Variáveis biométricas.....	32
4.2 Componentes da produção.....	38
4.3 Teores de NPK foliar e nos grãos.....	46
5 CONCLUSÕES.....	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

7 ANEXOS.....	59
Anexo I: Resumo da análise de variância para as variáveis diâmetro de colmo, altura de planta, biomassa seca de parte aérea e área foliar, nos períodos vegetativo e reprodutivo, e altura de inserção da espiga, comprimento de espiga, diâmetro de espiga, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira, massa de espiga e produtividade de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação e adubação nitrogenada.....	59
Anexo II: Resumo da análise de variância para as variáveis teor de NPK foliar e teor de NPK nos grãos de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação e adubação nitrogenada.....	60

## 1 INTRODUÇÃO

O milho é o principal cereal produzido no Brasil e tem importante papel no agronegócio brasileiro, com acréscimos contínuos da área plantada e da produtividade. Participa como matéria-prima na fabricação de uma ampla gama de produtos, destacando-se também na produção de álcool combustível.

O nitrogênio (N) é considerado um dos principais fatores de produção envolvidos no incremento da produtividade e do teor protéico dos grãos de milho, sendo que a adubação nitrogenada tornou-se uma prática imprescindível para a cultura visando elevados rendimentos. No entanto, a produção industrial de fertilizantes é um processo energeticamente caro que acarreta alto custo para o produtor, pois os fertilizantes nitrogenados representam 75% dos custos da adubação do milho, o que corresponde a cerca de 40% dos custos totais de produção da cultura (MACHADO et al., 1998).

Mundialmente fatores como o aumento na demanda por alimentos, o esgotamento dos recursos não-renováveis envolvidos na produção de fertilizantes e a conscientização ecológica com relação aos problemas do uso inadequado e abusivo dos fertilizantes químicos, têm levado à pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas à exploração agrícola, visando um sistema de produção mais sustentável. Neste sentido, a associação entre bactérias diazotróficas ou fixadoras de N e gramíneas tem se destacado, pois além da fixação biológica do N, tais bactérias promovem incrementos significativos no desenvolvimento radicular das plantas, resultando em melhor desenvolvimento e aumento no rendimento das culturas (BALDANI et al., 1997).

No Brasil, estudos pioneiros com bactérias diazotróficas em espécies da família Poaceae têm mostrado grande diversidade de microrganismos isolados das mais diversas espécies de plantas forrageiras e cereais, com destaque para as bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, que constituem os dois gêneros mais estudados atualmente.

Nas condições brasileiras, considerando a reposição parcial do fertilizante nitrogenado (50%) requerido por culturas como o milho e o trigo, a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados pelas plantas e o preço médio tradicional dos fertilizantes no mercado nacional a US\$ 1 por kg de N, estima-se que o uso dos inoculantes contendo estirpes selecionadas de *Azospirillum brasilense* pode resultar em uma economia estimada de US\$ 2 bilhões por ano (HUNGRIA, 2011). No entanto, há necessidade de mais estudos a respeito da combinação de estirpes de diferentes espécies e da interação da adubação nitrogenada com a

prática da inoculação, visando desenvolver inoculantes que tornem viável a substituição, total ou parcial, da adubação mineral com N em gramíneas de interesse agrícola.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento e a produtividade do milho em resposta à inoculação combinada das bactérias *A. brasilense* e *H. seropedicae* em associação à adubação nitrogenada.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea da família Poaceae cultivada mundialmente em amplo território. Originalmente americano, o primeiro contato do milho com o homem europeu ocorreu por ocasião da descoberta da América em 1492 (BORÉM, 2005).

O milho atingiu elevado estágio de domesticação, sendo dependente da intervenção humana para sobreviver, pois seus órgãos vegetativos são tipicamente anuais e suas sementes germinam logo após serem formadas sob condições favoráveis, além de não se desprenderem naturalmente das espigas, formando logo após a emergência um aglomerado de plântulas onde é muito grande a concorrência mútua (FORNASIERI FILHO, 1992).

Existem diversas teorias a respeito da origem do milho, no entanto, apesar de hipóteses conflitantes, atualmente considera-se que o milho consiste em uma versão domesticada de seu parente silvestre mais próximo, o teosinto, pois evidências genéticas e citológicas demonstram que o milho e o teosinto são bem aparentados (BORÉM, 2005).

A área total cultivada com milho no Brasil na safra 2010/11 alcançou 13,84 milhões de hectares (ha), apresentando crescimento de 6,5% em relação à safra anterior. Já para a safra de milho 2011/2012, segundo levantamento preliminar da Conab (2011), a perspectiva é boa, com previsão de aumento de área devido ao estímulo provocado pelos bons preços de mercado que se mantiveram praticamente estáveis em plena colheita da Segunda Safra. A previsão para o total da área cultivada com milho na safra 2011/2012 é estimada em 14,33 milhões de ha. Com base nesta previsão serão cultivados aproximadamente 500 mil ha a mais com milho em relação à área da safra passada. Já a produção brasileira de milho esperada para a safra 2011/12 deverá situar-se em cerca de 58,16 milhões de toneladas.

A produção de milho visa atender os mais variados mercados e, embora a maior parcela do produto no Brasil ainda seja destinada a alimentação animal, visando à produção de rações para aves e suínos, o milho também é muito utilizado na indústria alimentícia para a fabricação de óleo comestível, farinhas, cereais matinais, salgadinhos e adoçantes (PEDRINHO, 2009).

A perspectiva global é de aumento na demanda e no preço do produto, já que o milho vem ganhando espaço também em outros setores, como na produção de plástico biodegradável a base de amido de milho (DA RÓZ, 2003) e no setor de biocombustíveis,

visando a substituição do petróleo, um recurso poluidor e não renovável, cujos preços tenderão a alcançar patamares inacessíveis para a maioria da população em poucos anos (LASCA et al., 2005). Além disso, o Protocolo de Kyoto e os programas de agroenergia estão promovendo o crescimento da demanda de álcool-combustível, sendo o milho considerado matéria-prima imprescindível para essa nova caminhada. Neste sentido, os EUA possuem meta de produzir 36 bilhões de litros de álcool em 2012, o que significa um consumo de cerca de 100 milhões de toneladas de milho (FLORIANI, 2010).

O milho é uma das plantas que mais armazenam energia na natureza, pois constitui uma grande e eficiente “fábrica” de energia, composta pelas suas raízes, folhas, colmo e partes florais, armazenando quantidades enormes de energia em um produto concentrado, o grão de milho. Através dessa eficiente “fábrica” de energia torna-se possível o surgimento de uma planta, geralmente com mais de 2,0 m de altura, em cerca de 9 semanas partindo-se de uma semente com pouco mais de 0,3 g que produzirá nos meses seguintes cerca de 1000 sementes iguais à que lhe deu origem (EMBRAPA, 1996).

O milho possui elevado potencial produtivo e acentuada habilidade fisiológica na conversão de carbono mineral, representado pelo CO<sub>2</sub> atmosférico, em compostos orgânicos, mediante utilização de energia gerada pela captação da luz. A grande eficiência de transformação de energia luminosa em energia química deve-se ao processo fotossintético do tipo C<sub>4</sub>, que favorece a concentração contínua de CO<sub>2</sub> em células que circundam os feixes vasculares. As plantas com fotossíntese C<sub>4</sub> também são favorecidas pela reduzida perda de CO<sub>2</sub> na luz (fotorrespiração) e baixo consumo de água por unidade de massa seca produzida. Além disso, nas plantas C<sub>4</sub> há uma maior proximidade entre os feixes vasculares e as células produtoras de carboidratos da bainha vascular das folhas, resultando em eficiente transporte de materiais produzidos e acumulados nas folhas em direção aos grãos em formação (FORNASIERI FILHO, 1992).

## **2.2 Importância do nitrogênio e a adubação nitrogenada**

Dentre os diversos nutrientes essenciais ao desenvolvimento e crescimento das plantas, destaca-se o N, pelas suas funções relevantes na produção e síntese de aminoácidos. O N pode ingressar no sistema solo-planta por deposições atmosféricas, fixação biológica – simbiótica ou não, e adubações químicas ou orgânicas, porém a sua dinâmica é muito complexa em função de interações com ar, solo, plantas e microrganismos do solo. Apresenta-

se em quantidades insuficientes na quase totalidade de nossos solos, onde pode ser encontrado predominantemente ligado a compostos orgânicos (98% do total), constituindo também resíduos de plantas, animais e microrganismos (EMBRAPA, 1996).

Como constituinte essencial dos aminoácidos, o N é necessário para a síntese protéica estando presente em um elevado número de compostos orgânicos, como nucleotídeos, fosfatídeos, alcalóides, diversas enzimas, hormônios e vitaminas (FORNASIERI FILHO, 1992). Assim, as principais reações bioquímicas em plantas e microrganismos 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 nutridas em N apresentam crescimento vegetativo intenso e coloração verde-escura (TANAKA et al., 1997).

A deficiência de N nas plantas manifesta-se na fase de crescimento intenso, através da coloração verde-pálida das folhas novas e clorose nas folhas velhas que se tornam amareladas no sentido do ápice para o centro, seguindo a nervura central e tomando a forma de um V invertido. No caso do fornecimento excessivo de N a planta aumenta a síntese de proteínas e a formação de novos tecidos, usando a maior parte dos carboidratos na elaboração de proteínas e aminoácidos. Em consequência, os tecidos apresentam uma coloração verde-escura e consistência mais tenra, aumentando o perigo de acamamento e a suscetibilidade às adversidades climáticas e doenças foliares, além de retardar a maturação (FORNASIERI FILHO, 1992).

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). Avalia-se que os fertilizantes nitrogenados comercializados atualmente sejam responsáveis por sustentar um terço da população mundial. Porém a expectativa de aumento populacional, e consequente aumento na demanda por alimentos, aliada ao esgotamento das fontes de energia não-renovável prevista para os próximos 50 anos são fatores que preocupam devido à limitação na produção de adubos (LOPES, 2007). O Brasil, particularmente, não atende a sua demanda por adubo nitrogenado necessitando importar o produto e, caso não ocorram investimentos no segmento de produção de fertilizantes, a dependência das importações pode chegar a 75-80% nos próximos 10 anos (FRANCO e NETO, 2007).

Atualmente, dos fertilizantes nitrogenados produzidos no mundo, 99% são fabricados com base na amônia ( $\text{NH}_3$ ), obtida da fusão entre os gases N e hidrogênio, sendo necessárias cerca de 1,3 toneladas de combustível fóssil para fixar 1 tonelada de N em condições de alta

pressão (35 a 100 Mpa) e temperatura (300 a 400°C) através de um processo conhecido como Haber-Bosch (MARIN et al., 2010). O N utilizado neste processo provém do N<sub>2</sub> atmosférico que constitui aproximadamente 78% dos gases da atmosfera, já o hidrogênio (H<sub>2</sub>) pode ser obtido de diversas fontes de matérias-primas e combustíveis, sendo o gás natural o mais expressivo em função da maior eficiência energética e do menor custo de capital, sendo responsável por 75% da amônia produzida no mundo (LOPES, 2007).

Além do alto custo energético envolvido na fabricação dos fertilizantes nitrogenados, existe também um elevado custo ambiental relacionado à utilização deste insumo, pois o N é um dos elementos mais frequentemente associados com o manejo inadequado e poluição ambiental. Cerca de 50% dos adubos nitrogenados aplicados ao solo são perdidos para o ambiente (POTAFÓS, 1998), contaminando o solo e os mananciais hídricos.

O N é absorvido pelas plantas nas formas nítrica (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), sendo a forma nítrica a mais absorvida pelos vegetais (WILLIAMS e MILLER, 2001). As principais fontes de nitrato são a matéria orgânica, através do processo de mineralização, e os adubos que contêm este sal. A forma nítrica é pouco retida pelos colóides, sendo facilmente lixiviada pelas águas da chuva, por isso se recomenda aplicar o N parceladamente, especialmente em solos arenosos e no caso da utilização de doses elevadas, visando seu melhor aproveitamento pelas plantas. Já o amônio pode originar-se do adubo mineral, da passagem da amina para a nitrificação, ou através da simbiose com vegetais da família das leguminosas. A forma amoniacal apresenta a vantagem de ser retida pelas cargas negativas dos colóides do solo retardando sua movimentação e, conseqüentemente, a perda por lixiviação (EMBRAPA, 1996; TANAKA et al., 1997).

Como o N presente no solo apresenta-se preponderantemente na forma orgânica, é necessário para sua liberação e absorção pelas plantas que haja a mineralização, processo que envolve a participação de microrganismos heterotróficos que requerem carbono como fonte de energia. A decomposição da MO é regulada principalmente pela relação C/N do material fazendo com que haja imobilização ou liberação de N pelos microrganismos. O produto final da mineralização é o amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) que pode ser oxidado a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (EMBRAPA, 1996).

O fertilizante aplicado ao solo está também envolvido nas várias reações do N no solo, o que torna complexa a determinação da quantidade exata de N a ser aplicada já que sua disponibilidade no solo é um processo dinâmico e varia com as mudanças no teor de umidade e temperatura do solo, tipo de fertilizante, ocorrência de doenças, pragas e plantas daninhas e práticas de manejo da cultura. Sob condições de campo, sabe-se que a recuperação do N

fertilizante pela cultura raramente ultrapassa 50%, sendo as perdas de N representadas principalmente pelos processos de desnitrificação e/ou volatilização da amônia (YAMADA, 2000).

### **2.3 Adubação nitrogenada na cultura do milho**

O milho é uma cultura que remove elevada quantidade de N e usualmente requer o uso de adubação nitrogenada em cobertura para complementar a quantidade suprida pelo solo quando se deseja elevar o rendimento da cultura. Resultados de experimentos conduzidos no Brasil, sob diversas condições de solo, clima e sistemas de cultivo, mostram resposta generalizada da cultura à adubação nitrogenada. Em geral, 70 a 90 % dos ensaios de adubação com milho realizados em campo no Brasil apresentaram respostas à aplicação de N (EMBRAPA, 2012).

O rendimento da cultura do milho resulta da interação de um conjunto de fatores edafoclimáticos apropriados ao seu desenvolvimento, assim, para a cultura atingir respostas progressivas a elevadas adubações, os demais fatores de produção devem estar em níveis ótimos. Portanto, um solo rico em nutrientes teria pouco ou quase nenhum significado para a cultura se estiver submetido a condições climáticas adversas ou apresentar características físicas inadequadas (FORNASIERI FILHO, 1992). Além disso, o conhecimento da absorção e do acúmulo de nutrientes nas diferentes fases de desenvolvimento da planta é importante, pois permite determinar as épocas em que os elementos são exigidos em maior quantidade e corrigir as deficiências que porventura venham a ocorrer durante o desenvolvimento da cultura (BÜLL, 1993).

O N, responsável pelo aumento da produtividade e da proteína dos grãos de milho, é o único entre os nutrientes minerais que pode ser absorvido pelas plantas em duas formas distintas, tanto na forma de ânion  $\text{NO}_3^-$  como na forma de cátion  $\text{NH}_4^+$  (YAMADA, 2000). Na cultura do milho, o N absorvido nas formas químicas citadas deve sofrer um processo de redução, conhecido como redução assimilatória do nitrato, para ser incorporado aos compostos orgânicos de carbono, tais como os diversos aminoácidos formadores de proteínas, enzimas e coenzimas (MALAVOLTA et al., 1997).

Os fatores que contribuem para o aumento na produtividade do milho, com a elevação das doses de N, são representados pelo crescimento do sistema radicular e aumento do comprimento da espiga e do número de espigas por planta (BÜLL, 1993). A massa da espiga

e o número de plantas com duas espigas crescem com o fornecimento de N; pequenas doses do elemento aplicadas precocemente (antes que a planta atinja 20 cm) proporcionam aumento no número de grãos por espiga (PATERNIANI, 1987).

O N torna-se importante para a planta de milho a partir do momento em que ela apresenta quatro folhas totalmente expandidas, pois esta é a fase em que o sistema radicular em desenvolvimento já demonstra considerável porcentagem de pelos absorventes e ramificações diferenciadas, sendo a adição de N um estímulo a sua proliferação, com conseqüente desenvolvimento da parte aérea. No entanto, é durante o florescimento, caracterizado pela exteriorização do pendão e dos estigmas da espiga, que ocorre a definição do número de grãos por espiga e do potencial de produção (YAMADA, 2000), muito influenciados pelo fluxo de fotoassimilados que ocorre durante este período. Quando não há outros fatores limitantes, a maior disponibilidade de N aumenta o potencial da planta em definir maior número de grãos por espiga e, conseqüentemente, maior potencial produtivo.

Yamada (1995) citou que a adubação nitrogenada tem boa probabilidade de respostas ao uso de 30-40 kg ha<sup>-1</sup> de N na adubação de semeadura, com cobertura nitrogenada feita após a semeadura e sendo recomendável uma segunda cobertura em solos de textura mais arenosa, visando assim, menores perdas e conseqüentemente maior disponibilidade de N para as plantas.

## **2.4 Fixação biológica de nitrogênio e bactérias diazotróficas**

A fixação biológica de N atmosférico (FBN) é um dos mais importantes processos conhecidos na natureza, contribuindo com a maior parte do N fixado anualmente na Terra, aproximadamente 175 milhões de toneladas, ou seja, cerca de 65% do total. Tal proporção faz deste processo biológico o segundo mais importante do planeta depois da fotossíntese, juntamente com a decomposição orgânica (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). O N atmosférico pode também ser fixado por outros processos naturais, não biológicos, como os que ocorrem com a emissão de raios, na combustão e nas manifestações vulcânicas. No entanto, tais processos tem pequena expressão em relação ao total que precisa retornar ao solo para manter equilibrado o balanço do N no ecossistema (LOPES, 2007).

O N gasoso (N<sub>2</sub>), apesar de compor 78% dos gases atmosféricos, encontra-se em uma forma quimicamente muito estável e, por este motivo, sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos é limitada, sendo possível apenas para alguns microrganismos procariotos,

denominados fixadores de N ou diazotróficos (BALDANI et al., 2009). Estes microrganismos diazotróficos são responsáveis pelo rompimento da tripla ligação do  $N_2$  e sua redução a amônia ( $NH_3$ ), uma forma prontamente assimilável presente em compostos orgânicos constituintes de seres vivos e, a partir daí, em formas reativas orgânicas e inorgânicas vitais em sistemas biológicos. O processo de redução de  $N_2$  a  $NH_3$  torna-se possível nestes microrganismos em função da presença de um complexo enzimático chamado nitrogenase (CANTARELLA, 2007).

Considerando as condições energéticas e o alto poder redutor necessários para a quebra da ligação tripla entre as duas moléculas de N na forma gasosa, o processo de formação do complexo nitrogenase ativo requer a expressão de um conjunto de genes, denominados genes *nif* (“nitrogen fixation”). O complexo enzimático conhecido como nitrogenase pode ser descrito como um sistema de dois componentes do tipo metalo-proteína: uma FeMo-proteína, na qual o cofator de FeMo fornece o sítio ativo para a redução do substrato, e uma Fe-proteína, que acopla a hidrólise de ATP para transferência de elétrons durante a reação. Além das proteínas estruturais, o complexo nitrogenase também apresenta diversos centros metálicos (BALDANI et al., 2009).

Algumas características funcionais da nitrogenase confirmam a hipótese de que os genes *nif* evoluíram a partir de genes envolvidos em processos de detoxificação de gases tóxicos presentes na atmosfera terrestre ancestral (FANI et al., 2000), pois trata-se de uma enzima que apresenta baixa especificidade por substrato, sendo também capaz de reduzir outras moléculas com ligações triplas. Além disso, o complexo nitrogenase apresenta elevada sensibilidade a diversos agentes oxidantes, evidenciando que este complexo enzimático evoluiu em condições ambientais livres de elementos como o  $O_2$ , o qual é limitante para uma eficiente transformação do  $N_2$  atmosférico em moléculas de amônia (NORMAND e BOUSQUET, 1989).

## **2.5 Associação de bactérias diazotróficas com gramíneas**

Podem ser caracterizados três grupos de bactérias fixadoras de N, ou diazotrofos: diazotrofos de vida livre, que fixam o N para seu próprio uso; diazotrofos simbióticos, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos e os diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não

estabelecendo uma simbiose (MARIN et al., 2010). No entanto, tratando-se de associação com gramíneas de interesse econômico, pertencem a este último grupo as bactérias que mais tem se destacado, especialmente as pertencentes aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*.

No Brasil, estudos com bactérias diazotróficas associadas a gramíneas foram iniciados pela Dra. Johanna Döbereiner, no final da década de 50 e início da década de 60, quando foram constatadas novas espécies dos gêneros *Beijerinckia* e *Azotobacter* associadas à rizosfera de cana-de-açúcar e grama-batatais, respectivamente (DOBEREINER e RUSCHELL, 1958; DOBEREINER, 1966). A partir daí novos gêneros e espécies vem sendo descritas e estudadas como potenciais inoculantes para milho e outras gramíneas, com o desafio de tornar viável e desenvolver meios práticos para substituir, total ou parcialmente, a adubação mineral com N por FBN em gramíneas (CANTARELLA, 2007).

Avanços sobre as pesquisas de FBN em gramíneas se tornaram possível graças ao desenvolvimento de meios de cultivo especiais, como os meios NFb e JNFb livres de N os quais, sem uma fonte nitrogenada e sob a condição semi-sólida, criam um ambiente ideal para o desenvolvimento dos microrganismos com caráter microaerófilico e para a fixação de N atmosférico. Tal ambiente se assemelha ao que ocorre no solo ou internamente nas plantas, com níveis baixos de oxigênio (OLIVEIRA et al., 2002).

A espécie *Spirillum lipoferum* foi redescoberta no Brasil como bactéria diazotrófica associada à rizosfera e raízes de diversas gramíneas, sendo em seguida reclassificada, passando a fazer parte de um novo gênero denominado *Azospirillum*. A mudança no nome do gênero *Spirillum* adicionando-se o prefixo “azo”, alusivo ao nome utilizado por Lavoisier para denominar o elemento N, se deu em função da capacidade dessas bactérias em fixar N naturalmente (TARRAND et al., 1978).

Diversas espécies de bactérias são capazes de colonizar desde as raízes até as folhas de gramíneas, sendo por isso denominadas endofíticas, havendo diferentes padrões de colonização das plantas e do solo pelas mesmas. Baldani et al. (1997) propôs então dividir as bactérias endofíticas em dois grupos: bactérias endofíticas capazes de colonizar tanto a superfície quanto o interior da raiz, mas que sobrevivem no solo (chamadas endofíticas facultativas), e bactérias endofíticas que colonizam o interior e a parte aérea dos tecidos vegetais, mas que não sobrevivem no solo (endofíticos obrigatórios).

A descoberta de bactérias diazotróficas endofíticas trouxe uma nova dimensão aos estudos das associações de microrganismos diazotróficos e plantas superiores, pois até então a colonização endofítica de plantas era considerada restrita a bactérias fitopatogênicas. A colonização endofítica apresenta benefícios tanto aos microrganismos diazotróficos quanto

para a planta. O interior das plantas representa um habitat rico em substratos de carbono e livre de diversos fatores adversos que limitam a sobrevivência dos diazotrofos, como a competição com outros microrganismos e, além disso, a transferência de compostos nitrogenados produzidos para a planta torna-se muito mais eficiente neste tipo de associação (NEVES, 1985).

Os microrganismos endofíticos penetram nas plantas, geralmente, por aberturas naturais como estômatos, hidatódios, lenticelas, área de emergência de raízes laterais ou ferimentos. Uma das portas de entrada mais utilizadas pelos endófitos são as raízes, uma vez que apresentam ferimentos desenvolvidos durante a emergência de raízes secundárias laterais. Outras opções de entrada são as aberturas causadas por insetos e pela produção de enzimas que facilitam sua penetração. As bactérias também podem penetrar de forma ativa através da degradação enzimática da parede celular da planta pelas enzimas celulolíticas e pectinolíticas (HALLMANN, et al., 1997).

O processo de ligação da bactéria à radícula ou raiz da planta é realizado em duas etapas: a primeira (fase de adsorção ou adesão) dura aproximadamente duas horas, é reversível, e provavelmente envolve apenas proteínas; a segunda (fase de ancoramento) dura de 8 a 16h, é irreversível e provavelmente envolve polissacarídeos de superfície (MICHIELS et al., 1991). A adesão da bactéria à superfície da raiz (rizoplano) necessita ser precedida da multiplicação e atração (taxia) da bactéria pelos sítios de infecção. Esta etapa ainda é considerada o aspecto mais obscuro da interação, pois não se conhecem as macromoléculas secretadas pelas gramíneas hospedeiras, tampouco o grau de especificidade e os mecanismos de taxia pelos quais as bactérias diazotróficas atingem os sítios de adesão. Desta interação física, resulta a adesão radicular, caracterizada pela ligação da célula bacteriana à superfície da planta (BALDANI et al., 2009).

Na fase de ancoragem, para a maioria das bactérias avaliadas é frequente a presença de microfibrilas de origem protéica ou celulósica, interconectando bactérias e ancorando a bactéria à planta (JAMES e OLIVARES, 1998) e a indução da secreção de substâncias mucilaginosas pelas raízes infectadas (BASHAN, 1991). Observa-se nesta fase semelhança ao processo que ocorre na associação simbiótica com rizóbios, pois ocorre formação de diversos agregados bacterianos, tendo sido sugerido que o processo de colonização só se torna viável quando um número mínimo de microrganismos está presente nas raízes (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

As bactérias diazotróficas endofíticas são também consideradas bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), pois além da capacidade de colonizar a superfície das

raízes, rizosfera e tecidos internos das plantas, estimulam o crescimento das plantas através da FBN (HUERGO et al., 2008), aumento na atividade da redutase do nitrato (CASSÁN et al., 2008), produção dos fitohormônios auxina, giberelina e citocinina (OKON e VANDERLEYDEN, 1997) e solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999). Todos estes fatores estimulam o crescimento do sistema radicular e, conseqüentemente, permitem melhor nutrição e desenvolvimento da planta como um todo, o que provavelmente está relacionado também com a maior tolerância a agentes patogênicos observada em plantas colonizadas (CORREA et al., 2008).

No entanto, um dos complicadores da FBN em gramíneas é a transferência do N fixado para a planta, pois ao contrário das bactérias simbióticas, bactérias associativas excretam somente uma parte do N fixado diretamente para a planta associada; posteriormente, a morte e mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de N para as plantas. No entanto, é importante considerar que, ao contrário das leguminosas, a inoculação de gramíneas com bactérias endofíticas ou associativas, ainda que essas consigam fixar N, consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas em N (HUNGRIA, 2011).

Além disso, diferentemente da interação simbiótica entre o rizóbio e plantas da família das leguminosas, em que são formadas novas estruturas anatômicas radiculares ou caulinares, especializadas em fixar o N<sub>2</sub> denominadas nódulos, nenhuma estrutura macroscópica tem sido descrita na associação bactéria diazotrófica-gramíneas. Assim, os microrganismos fixadores simbióticos levam uma vantagem ecológica em relação aos diazotrofos, pois dispõem da fonte primária de energia, por meio da utilização de fotossintatos cedidos pelo hospedeiro, e por isso tornam-se independentes da competição com outros microrganismos (LOPES, 2007).

## **2.6 Aspectos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae***

### **2.6.1 *Azospirillum brasilense***

As bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* pertencem à subdivisão  $\alpha$ -Proteobacteria do Domínio Bacteria, no qual se encontram a maioria das bactérias gram-negativas formato vibrio e/ou espirillum (TARRAND et al., 1978; MOREIRA et al., 2010). São bactérias preferencialmente microaerófilicas e móveis em meio de cultivo, possuindo

flagelo polar bem desenvolvido quando são crescidos em meio líquido. *A. brasilense*, por exemplo, apresenta uma combinação típica de flagelos: um flagelo polar desenvolvido quando as bactérias são crescidas em meio líquido e vários flagelos laterais adicionais, quando cultivadas em meio semi-sólido (MOREIRA et al., 2010).

Os microrganismos do gênero *Azospirillum* colonizam tanto o interior quanto a superfície das raízes de várias gramíneas forrageiras e cereais, sendo denominados diazotrofos endofíticos facultativos (DÖBEREINER e BALDANI, 1982). No solo, as bactérias do gênero *Azospirillum* podem ser encontradas no mucigel presente na rizosfera de plantas, caracterizando uma colonização externa das raízes, enquanto na colonização interna, as células de *Azospirillum* podem penetrar nos espaços intercelulares de raízes e lá se alojarem (BASHAN e LEVANONY, 1991; BALDANI, 1996). Tem sido verificado que a sobrevivência do gênero *Azospirillum* no solo, na ausência das plantas hospedeiras e sob condições nutricionais desfavoráveis, está relacionada a vários mecanismos fisiológicos de proteção, dentre eles: produção de melanina, poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) e polissacarídeos (DEL GALLO e FENDRIK, 1994), formação de cistos (agregados celulares) e mudança na forma da célula.

O padrão de colonização das raízes das gramíneas por espécies de *Azospirillum spp.* mostra uma tendência de especificidade entre grupos de plantas e as bactérias, sendo que *Azospirillum brasilense* ocorre preferencialmente associado a trigo, cevada, aveia, arroz, centeio e milho (DÖBEREINER e DE-POLLI, 1980), embora seja uma bactéria predominantemente rizosférica.

O metabolismo de carbono e N apresentados pelas espécies de *Azospirillum spp.* é bastante dinâmico e variado. Os ácidos orgânicos como malato, piruvato e succinato são as fontes de carbono preferenciais, havendo também uma aparente preferência de frutose sobre glicose. Amônia, nitrato, nitrito e aminoácidos, além de N atmosférico, podem servir como fontes de N (DÖBEREINER, 1992).

Segundo Hartman e Zimmer (1994), bactérias do gênero *Azospirillum* são conhecidas pela sua capacidade de produzir hormônios de crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas “in vitro”, alterando a morfologia e fisiologia das raízes das plantas colonizadas. Tem sido verificado que a liberação destes fitohormônios estimula a formação de pelos radiculares, a taxa de aparecimento de raízes secundárias e da superfície radicular quando as plantas são colonizadas por estas bactérias, o que resulta em aumento da superfície do sistema radicular e permite melhor exploração dos nutrientes e água do solo (OKON et al., 1996), tornando a planta menos sensível aos estresses ambientais.

Barassi et al. (2008), em uma revisão recente de trabalhos sobre as respostas fisiológicas induzidas por *Azospirillum*, relatam a melhoria em parâmetros fotossintéticos das folhas, incluindo o teor de clorofila e condutância estomática, maior teor de prolina na parte aérea e raízes, melhoria no potencial hídrico, incremento no teor de água do apoplasto, maior elasticidade da parede celular, maior produção de biomassa e maior altura de plantas. Bashan et al. (2006) relatam incremento em vários pigmentos fotossintéticos, tais como clorofila a, b, e pigmentos fotoprotetivos auxiliares, como violaxantina, zeaxantina, aeroxantina, luteína, neoxantina e beta-caroteno, que resultariam em plantas mais verdes e sem estresse hídrico.

### 2.6.2 *Herbaspirillum seropedicae*

O gênero *Herbaspirillum* foi estabelecido por Baldani et al. (1986), sendo *H. seropedicae* a primeira espécie descrita. Inicialmente *H. seropedicae* foi considerada uma nova espécie de *Azospirillum* por ter apresentado características de crescimento em meio de cultura semi-sólido (sem N) similares a esse gênero. Porém, após análise do 16S rRNA foi evidenciado que se tratava de um novo gênero de bactéria diazotrófica (Baldani et al., 1986) sendo descobertas posteriormente mais nove espécies.

As espécies do gênero *Herbaspirillum* estão incluídas como um grupo na subdivisão  $\beta$ -Proteobacteria, sendo as células deste gênero gram-negativas contendo grânulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), formato espirillum, móveis e com presença de 1-3 flagelos bipolares no caso da espécie *H. seropedicae* (MOREIRA, 2010).

Representantes do gênero *Herbaspirillum* são microaerofílicos, toleram drásticas mudanças no pH (5,3 – 8,0) e uma concentração de oxigênio maior que as espécies de *Azospirillum* (BALDANI et al., 1986). São também capazes de produzir elevados níveis de auxinas e giberelinas (GRAY e SMITH, 2005), embora em menor quantidade em relação às linhagens de *Azospirillum* (RADWAN et al., 2004).

*H. seropedicae* é um diazotrofo endofítico obrigatório que tem sido isolado do interior de diversos grupos de plantas, desde gramíneas como milho, sorgo, arroz, cana-de-açúcar e forrageiras diversas (BALDANI et al., 1986), fruteiras como bananeira e abacaxizeiro (CRUZ et al., 2001) até algumas palmeiras como o dendezeiro e a pupunheira (FERREIRA et al., 1995). Trata-se da espécie que possui maior distribuição e ocorrência dentre as espécies diazotróficas endofíticas estudadas, apresentando baixa sobrevivência quando inoculada em

solo natural ou esterilizado e desaparecendo em menos de trinta dias após sua inoculação com grande número de células (BALDANI et al., 1996).

*Herbaspirillum* spp. são capazes de colonizar nichos específicos no interior dos tecidos vegetais, o que os torna mais eficientes na transferência dos compostos nitrogenados produzidos para a planta além de não sofrerem limitações de substâncias ricas em carbono (OLIVARES et al., 1997). Por este motivo, encontram-se livres da competição com outros microrganismos edáficos (MOREIRA, 2010).

## **2.7 Potencial de inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em gramíneas**

Estudos de inoculação com bactérias diazotróficas em gramíneas tiveram grande impulso na década de 80, sendo o gênero *Azospirillum* o mais explorado. Entre os experimentos citados por Okon e Labandera-Gonzalez (1994) cerca de 60 a 70% apresentaram incrementos de produção com a inoculação, mas somente 5-30% apresentaram resposta significativa, sendo tal variabilidade associada com diversas fases do processo e ao limitado conhecimento sobre o potencial de uso destes microrganismos (BALDANI et al., 2009).

Diversos inoculantes comerciais a base de *A. brasilense* tem sido lançados no mercado mundial, porém a sua aplicação ainda é restrita devido a limitações e inconsistências no desempenho do processo de colonização da planta pelas bactérias (MORRISEY et al., 2004).

Nos Estados Unidos foi lançado um produto com o nome de Azo-Green<sup>TM</sup> recomendado para aumentar o vigor da semente, aumento do sistema radicular, resistência a geada e uma melhoria geral da sanidade da planta. Na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido um produto de nome comercial de Zea-Nit<sup>TM</sup>, a partir de uma mistura de *A. brasilense* e *A. lipoferum*, que segundo os fabricantes reduziria a aplicação de N necessário à cultura em 30 a 40%. Na África, a companhia Soygro, produziu no período de 1998 a 2001 um inoculante a base de *Azospirillum* e observou efeito de 10-30% sobre o controle não inoculado. Na Índia são também produzidos biofertilizantes contendo *Azospirillum* tais como: “Pro Solutions” e “Nikita Agro Industries” (FALLIK e OKON, 1996).

Na Argentina foi lançado o inoculante Graminante<sup>TM</sup> contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum* que poderia, segundo os fabricantes, aumentar a produção de grãos

em cerca de 20 % (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994). No México tem sido verificado o maior esforço governamental para a utilização de inoculantes para gramíneas. Os resultados mostraram incrementos da ordem de 26% em média na produção avaliando-se 171 locais de plantio em 678 ha, sendo observado maior efeito em locais onde o uso de fertilizante foi menor, em solos arenosos e usando cultivares domésticas.

No Brasil o primeiro inoculante comercial a base de *Azospirillum* foi desenvolvido a partir de uma parceria, em 1996, entre a Embrapa Soja e o grupo da Universidade Federal do Paraná - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que realizaram uma rede de ensaios de laboratório e testes de eficiência agrônômica de *Azospirillum* a campo (HUNGRIA, 2011).

Obedecendo aos critérios da legislação brasileira para inoculantes estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foram testadas e selecionadas estirpes de *Azospirillum* que apresentavam maior sobrevivência no solo, maior promoção de crescimento das plantas e maior adaptação às tecnologias utilizadas nas culturas do milho e do trigo. Nestes ensaios, a inoculação com *Azospirillum* resultou em incremento significativo médio no rendimento de grãos de trigo da ordem de 14% em relação à testemunha e, no caso do milho, de 24% em relação ao tratamento controle. Os resultados apresentados neste estudo resultaram na autorização pelo MAPA de estirpes de *A. brasilense* para a produção de inoculantes para as culturas de milho e trigo (HUNGRIA, 2011).

Baldani (1996) utilizando *H. seropedicae* em experimentos gnotobióticos e em vasos demonstrou que 23 estirpes promoveram um aumento na parte aérea das plântulas de arroz, após trinta dias do plantio, em comparação com a testemunha sem inoculação. Dentre estas, sete foram mais promissoras proporcionando um aumento na FBN em cerca de 50% em relação à testemunha.

Fatores como a seleção de estirpes e a competitividade com outras estirpes nativas ou mesmo outros componentes da microbiota do solo devem ser considerados, pois são cruciais para o sucesso da inoculação. Estudos recentes mostram que o antigo conceito de estirpes homólogas, isto é, dar preferência para a bactéria isolada da própria planta que se deseja estudar pode ser vantajoso, como é exemplo a estirpe Sp245 no trigo (BALDANI et al., 2009). Esta sintonia bactéria-hospedeiro pode indicar que algumas linhagens são mais receptivas do que outras, permitindo buscar neste material genético o diferencial de seleção para que possa ser incorporado em novos programas de melhoramento (REIS, 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Localização e caracterização da área experimental

O experimento foi desenvolvido a campo na safra verão 2010/2011, em plantio direto sobre a palhada de milho, 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 solo é classificado como Latossolo Vermelho Distróférrico de textura argilosa. Antes da instalação do experimento foi realizada coleta de solo na profundidade 0-20 cm para análise química, que foi realizada pelo Laboratório de Química da Unioeste, sendo os resultados representados na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Marechal Cândido Rondon, Unioeste, 2010

Ca	Mg	K	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	CTC	MO	V	P	pH CaCl <sub>2</sub>
-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----							g dm <sup>-3</sup>	%	mg dm <sup>-3</sup>	
2,92	1,52	0,20	0,27	7,19	4,64	11,84	34,18	48,5	18,34	5,30

A precipitação pluviométrica e as temperaturas médias mensais incidentes durante a condução do experimento são apresentadas na Figura 1.

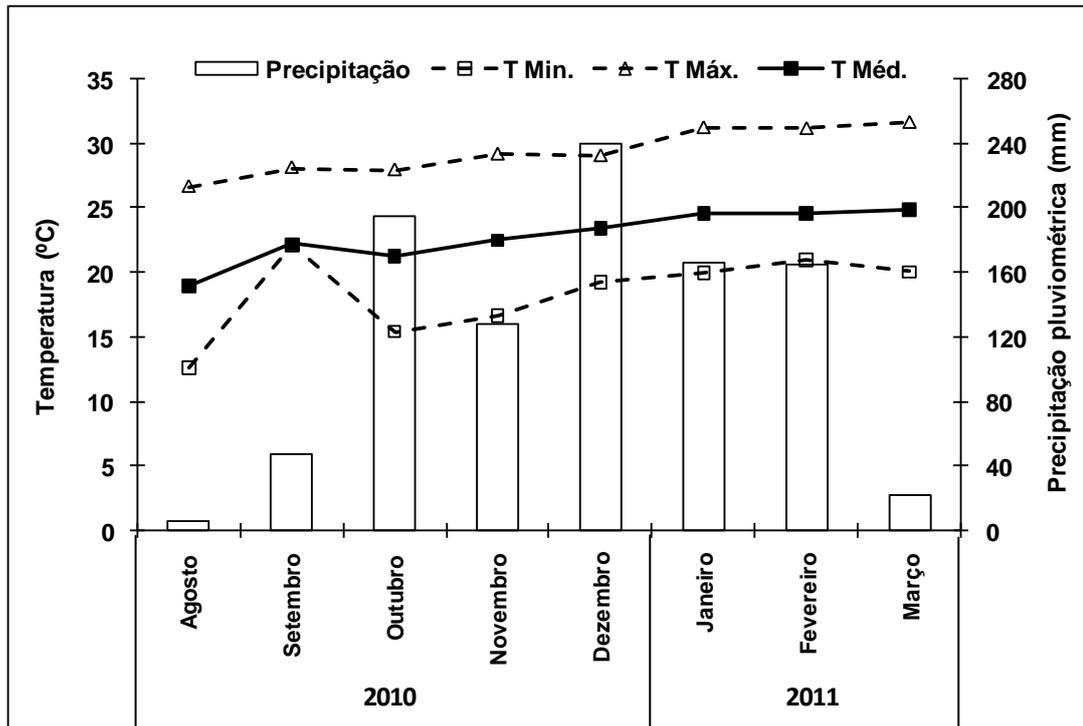


Figura 1: Precipitação pluviométrica acumulada e temperatura mínima, máxima e média mensal no período de agosto/2010 a março/2011. Estação Experimental “Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa”, Marechal Cândido Rondon, PR.

### 3.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial 4 x 5, com quatro blocos, sendo o primeiro fator referente à inoculação das sementes com bactérias: tratamento sem inoculação, estirpe de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5), estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* (SmR1), mistura das duas estirpes (Ab-V5+SmR1). O segundo fator referiu-se às doses de adubação nitrogenada aplicadas à cultura: 0, 40, 80, 120 e 160 kg ha<sup>-1</sup> de N.

### 3.3 Instalação e condução do experimento

Os inoculantes foram fornecidos pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), sendo preparados a partir de uma solução de bactérias pura na concentração de  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> de inoculante. A inoculação com as bactérias *A. brasilense* e *H. seropedicae* foi realizada antes da semeadura. As sementes foram previamente umedecidas com água destilada e

posteriormente misturadas com o inoculante em uma proporção de 1 mL para 1.000 sementes, no caso da inoculação combinada das estirpes foi utilizada metade desta proporção (0,5 mL) de cada bactéria totalizando a mesma proporção de 1 mL para 1.000 sementes.

A semeadura, precedida de marcação da área com semeadora-adubadora, onde foram aplicados adubos à base de potássio e fósforo, foi realizada com auxílio de “matracas”, no dia 06/10/10, colocando-se duas sementes por cova, obtendo-se após desbaste cinco plantas por metro linear. Foi utilizado no experimento o híbrido simples 30R50 Herculex<sup>®</sup>. Cada parcela constou de seis linhas (0,7 m entre linhas) com 5 m de comprimento (21 m<sup>2</sup> por parcela e 1680 m<sup>2</sup> totais). Para o tratamento das sementes, foi utilizada uma mistura com os fungicidas fludioxonil e metalaxyl e os inseticidas deltamethrin e pirimifós-metil na proporção de 10 mL kg<sup>-1</sup> de semente.

A adubação foi realizada com base na análise química do solo e nas recomendações propostas por IAPAR (2003), sendo aplicados no sulco de semeadura, com a semeadora-adubadora, 40 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 50 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O. Como fontes de P e K foram utilizados os fertilizantes superfosfato triplo (42% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e cloreto de potássio (58% de K<sub>2</sub>O), respectivamente. No momento da semeadura foi realizada a adubação nitrogenada na base, aplicando-se 30 kg ha<sup>-1</sup> de N, exceto para os tratamentos sem N. O restante da dose de N foi aplicada em cobertura, entre os estádios V4 e V6, quando as plantas de milho apresentavam cerca de seis folhas totalmente expandidas (WEISMANN, 2008), com aplicação realizada a lança na área total da parcela. A fonte de N utilizada foi uréia (46% de N).

Durante a condução do experimento foi realizada uma aplicação de herbicidas antes do fechamento da cultura utilizando-se uma mistura de herbicidas seletivos para a cultura do milho com os ingredientes ativos triazine (5,0 L ha<sup>-1</sup>) e nicosulfuron (1,5 L ha<sup>-1</sup>). Também foram feitas duas aplicações de inseticida, aos 18 e 30 DAP utilizando produto contendo tiametoxam+lambdaciatotrina como ingredientes ativos (0,25 L ha<sup>-1</sup>), para controle de lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e percevejo-barriga-verde (*Dichelops melacanthus*). Foram seguidas as recomendações do compêndio de defensivos agrícolas, sendo realizada aplicação mecanizada para os produtos mencionados.

### 3.4 Variáveis avaliadas

### 3.4.1 Variáveis biométricas

Foram realizadas duas coletas de plantas para avaliação das variáveis biométricas, uma na fase vegetativa (V8 – plantas com oito folhas totalmente expandidas) e outra na fase reprodutiva (R3 - fase de grão leitoso), sendo retiradas para cada avaliação duas plantas por parcela de forma aleatória dentro da área útil. Antes de coletar as plantas estas foram avaliadas, ainda a campo, quanto à altura entre a superfície do solo e ponto mais alto da planta (utilizando régua graduada) e diâmetro basal do colmo a 5 cm da superfície do solo (com auxílio de paquímetro).

As plantas coletadas foram levadas para o laboratório, onde foram seccionadas em diferentes partes (folhas, colmo+bainha e espigas) para determinação da massa seca de parte aérea. Para a determinação da massa seca, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel, identificadas e levadas à estufa de circulação forçada de ar a  $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  por 72 h, sendo em seguida pesadas em balança de precisão.

A área foliar foi determinada utilizando-se o método de amostragens de acordo com a metodologia de Benincasa (2003). Depois de separadas as folhas, foram retiradas amostras foliares com auxílio de uma amostrador com área conhecida para determinação da área em  $\text{cm}^2$ , a qual considerou-se como área foliar da amostra (AF amostra). Posteriormente o material foi seco em estufa obtendo-se assim a massa seca de amostra (MS amostra) e também a massa seca de folhas (MSF). Dessa forma, obteve-se a área foliar total através da seguinte fórmula:  $AF = [(AF\text{ amostra} \times MSF) / MS\text{ amostra}]$ . Foram utilizadas 10 amostras foliares por parcela.

### 3.4.2 Análise dos teores de nutrientes em tecidos foliares

A coleta de tecido foliar para a análise dos teores de N, P e K foi realizada no período de florescimento, mais precisamente no estágio do “embonecamento”, caracterizado pelo aparecimento dos estilos-estigmas (“cabelo”) na parte de fora da espiga, sendo realizadas amostragens foliares conforme metodologia proposta por Malavolta et al. (1997). Coletou-se a folha oposta e abaixo da inserção da espiga principal de cada planta, num total de 10 folhas por unidade experimental.

As folhas coletadas, após lavagem em água corrente e água destilada para retirada de possíveis contaminantes, foram identificadas e armazenadas em sacos de papel para secagem

em estufa de circulação forçada de ar a  $55\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  por 72 h, sendo moídas posteriormente. Em seguida, foram retiradas amostras de 0,2 g que foram submetidas à digestão sulfúrica. Nos extratos, os teores de N foram determinados através da destilação por arraste de vapores em aparelho semi-micro Kjeldah de acordo com Tedesco et al. (1995). O teor de P foi determinado por espectrofotometria UV-VIS de acordo com Braga e Defelipo (1974), e o teor de K foi determinado por fotometria de chama. As análises de nutrientes foram realizadas no Laboratório de Fertilidade do Solo.

#### 3.4.3 Componentes da produção e produtividade

A colheita do milho foi realizada manualmente, no dia 15/03/11, coletando-se todas as espigas da parcela útil, constituída de duas linhas centrais de 3 m cada, totalizando 4,2 m<sup>2</sup> de área útil por parcela. Para a determinação dos componentes da produção foram amostradas 10 espigas representativas por parcela experimental de forma aleatória. Ainda a campo foi avaliada a altura de inserção de espiga antes da colheita.

Depois de colhidas, as espigas foram levadas ao laboratório onde foram despalhadas manualmente, para determinação das seguintes variáveis: comprimento da espiga (cm), diâmetro da espiga (mm), número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira e massa da espiga.

A produtividade foi determinada com base na produção da área útil de cada parcela e expressa em kg ha<sup>-1</sup> após a correção da umidade dos grãos para 13% (base úmida).

#### 3.4.4 Análise dos teores de nutrientes nos grãos

Amostras dos grãos foram trituradas em moinho tipo facas e passadas em peneiras de 2 mm para determinação dos teores de N, P e K nos grãos, conforme a metodologia já descrita para a determinação dos teores de nutrientes em tecidos foliares.

### **3.5 Análise de dados**

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2008) e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. No caso das respostas das diferentes variáveis em função das doses de N, foi utilizada análise de regressão.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Variáveis biométricas

A análise de variância revelou que não houve efeito significativo para a interação entre os fatores inoculação e adubação nitrogenada para nenhuma das características avaliadas neste estudo (Anexos I e II). Dessa forma, os resultados são apresentados independentemente para cada fator (inoculação e doses de N).

Os resultados relativos ao diâmetro basal do colmo e altura de planta, nas fases vegetativa e reprodutiva, em função da inoculação com estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* de forma isolada e combinada são apresentados na Tabela 2, observa-se que a inoculação proporcionou efeito significativo sobre o diâmetro basal do colmo nas fases vegetativa e reprodutiva.

A combinação das estirpes Ab-V5 e SmR1 inoculada nas sementes no momento da semeadura proporcionou os maiores valores para o diâmetro basal do colmo em relação à testemunha em ambas as fases de avaliação, embora sem diferir das estirpes inoculadas de forma isolada na fase vegetativa e da estirpe Ab-V5 na fase reprodutiva. O incremento proporcionado pela inoculação combinada das estirpes no diâmetro basal do colmo em relação à testemunha foi de 15% na fase vegetativa e está associado ao efeito de promoção do crescimento proporcionado pelas bactérias diazotróficas. Para Okon e Labandera-Gonzalez (1994) este efeito de promoção do crescimento no desenvolvimento inicial da planta é notável, pois estes microrganismos estimulam a densidade e o comprimento de pelos radiculares, assim como a taxa de aparecimento de raízes laterais, resultando em aumento na superfície de contato radicular, o que potencializa o aproveitamento e utilização de água e nutrientes minerais disponíveis no solo (BALDANI et al., 1997). Tais constatações inferem aumento na taxa de crescimento da planta e podem ser associadas ao maior diâmetro basal do colmo observado em plantas inoculadas com a associação de estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* (Ab-V5 + SmR1).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com Verona et al. (2010) que, 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, porém com incremento inferior, de apenas 6%. Dotto et al. (2010), por sua vez,

avaliando os efeitos da inoculação de *H. seropedicae* e níveis de N sobre o comportamento de dois híbridos de milho na mesma região do presente estudo, observaram que a inoculação de *H. seropedicae* não promoveu efeito sobre o diâmetro de colmo das plantas de milho.

Quanto à altura da planta não foi verificado efeito significativo da inoculação com as estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, sendo observados valores médios de 141,7 e 246,6 cm nas fases vegetativa e reprodutiva, respectivamente (Tabela 2), o que pode estar associado a influência do fator genético sobre a altura de plantas. Campos et al. (2000) e Cavallet et al. (2000), em diferentes estudos testando a eficiência agrônômica do inoculante comercial “Graminante” a base de *Azospirillum* spp. e aplicações de N em semeadura e cobertura na cultura do milho, também verificaram que não houve resposta da altura de planta em relação a inoculação.

Tabela 2: Diâmetro basal do colmo e altura da planta nas fases vegetativa e reprodutiva, de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação das sementes, de forma isolada e combinada, das estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1). Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

BACTÉRIA	Diâmetro basal do colmo		Altura da planta	
	Vegetativa	Reprodutiva	Vegetativa	Reprodutiva
	-----mm-----		-----cm-----	
Testemunha	30,4 b	26,6 ab	144,0	246,9
Ab-V5	31,9 ab	25,6 b	141,9	247,1
SmR1	32,0 ab	26,6 ab	141,6	246,3
Ab-V5 + SmR1	35,1 a	27,6 a	139,2	246,2
Média	32,4	26,6	141,7	246,6
C.V. **	12,33	6,33	9,50	3,16

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

\*\*Coeficiente de variação (%).

Os resultados de massa seca da parte aérea e área foliar das plantas de milho, nas fases vegetativa e reprodutiva, em função da inoculação com estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* de forma isolada e combinada são apresentados na Tabela 3. Não foi verificado efeito significativo da inoculação para a massa seca da parte aérea na fase vegetativa, sendo obtido valor médio de 6.446,0 kg ha<sup>-1</sup> de massa seca, enquanto que, na fase reprodutiva, a combinação das estirpes proporcionou média superior à inoculação de Ab-V5 e semelhante aos tratamentos testemunha e inoculação isolada de SmR1. A resposta à inoculação observada para o rendimento de massa seca de parte aérea das plantas confirma novamente o efeito de

promoção do crescimento proporcionado pelo aumento da superfície de absorção das raízes, aumento na formação de pelos radiculares e raízes secundárias, sendo estes efeitos positivos relacionados principalmente a capacidade que as bactérias diazotróficas possuem de produzir fitohormônios como auxinas, giberelinas e citocininas (RADWAN et al., 2004). Além disso, outros efeitos como a solubilização de fosfatos e a própria fixação biológica de nitrogênio podem contribuir para a promoção do crescimento vegetal (GRAY e SMITH, 2005).

Tabela 3: Massa seca da parte aérea e área foliar nas fases vegetativa e reprodutiva, de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação das sementes, de forma isolada e combinada, das estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1). Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011

BACTÉRIA	Massa seca da parte aérea		Área foliar	
	Vegetativa	Reprodutiva	Vegetativa	Reprodutiva
	-----kg ha <sup>-1</sup> -----		-----dm <sup>2</sup> /planta-----	
Testemunha	6.116,5	10.753,2 ab	57,4	53,4
Ab-V5	6.258,4	10.527,8 b	53,0	54,7
SmR1	6.583,3	11.764,6 ab	54,8	56,4
Ab-V5 + SmR1	6.825,9	12.032,9 a	57,6	57,0
Média	6.446,0	11.269,6	55,7	55,4
C.V. (%)**	14,42	15,27	14,37	25,09

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, p<0,05.

\*\*Coeficiente de variação (%).

Embora sem diferir estatisticamente, é possível destacar que na fase reprodutiva, a inoculação combinada das estirpes proporcionou incremento de 12% (1280 kg) na massa seca da parte aérea das plantas em relação à testemunha, atingindo 12.032,9 kg ha<sup>-1</sup> de massa seca de parte aérea, evidenciando efeito positivo da interação planta-bactéria. Quadros (2009), avaliando o desempenho agrônomico de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum* em associação com a adubação nitrogenada, observou incrementos ainda superiores, de até 53% (3770 kg), no rendimento da massa seca da parte aérea para o tratamento inoculado em relação ao tratamento controle, evidenciando o efeito benéfico da inoculação. Verona et al. (2010) também verificaram efeito positivo da inoculação sobre o incremento da massa seca da parte aérea do milho, inclusive sob condição de estresse hídrico.

Quanto à área foliar, não foi verificado efeito significativo da inoculação das sementes com as bactérias diazotróficas em ambas as fases de avaliação, sendo verificados valores

médios para esta variável de 55,7 e 55,4 dm<sup>2</sup> por planta em função da inoculação nas fases vegetativa e reprodutiva, respectivamente (Tabela 3).

Houve efeito da adubação nitrogenada sobre as variáveis altura da planta e massa seca da parte aérea nas fases vegetativa e reprodutiva, diâmetro basal do colmo na fase reprodutiva e área foliar na fase reprodutiva (Figuras 2 e 3).

Foi verificado efeito significativo da adubação nitrogenada quanto à altura da planta em ambas as fases de avaliação. Na fase vegetativa verificou-se ajuste significativo ( $p \leq 0,05$ ) dos dados em um modelo polinomial quadrático (Figura 2a), que permitiu constatar a altura máxima de planta (147,42 cm), que seria obtida teoricamente com a dose de 118 kg ha<sup>-1</sup> de N. Já na fase reprodutiva os dados de altura de planta apresentaram ajuste ao modelo linear crescente ( $p \leq 0,01$ ) em função das doses de N (Figura 2b), sendo possível observar, através do modelo obtido, que houve incremento de 0,05 cm na altura de planta para cada kg de N adicionado ao solo. O incremento na altura de plantas observado neste estudo está associado a capacidade que o N possui em promover o alongamento do caule através da produção de fitohormônios promotores do crescimento e desenvolvimento das plantas. Segundo Marschner (1995) a aplicação de doses elevadas de N nos estádios iniciais de desenvolvimento dos cereais infere no aumento da produção de fitohormônios como auxinas, giberilinas e citocininas, responsáveis pelos processos de divisão e expansão celular.

Outros autores também verificaram efeito significativo da adubação nitrogenada sobre a altura de plantas. Lana et al. (2009), em estudo com diferentes espaçamentos e níveis de N (0, 30, 60 e 90 kg ha<sup>-1</sup>) aplicados ao cultivo do milho, verificaram influência da adubação nitrogenada sobre a altura de plantas com ajuste linear crescente dos dados, verificando acréscimo de 0,07 cm para cada kg de N adicionado. Casagrande e Fornasieri Filho (2002), por sua vez, verificaram altura de planta similar para as diferentes doses de N testadas em estudo com a cultura do milho.

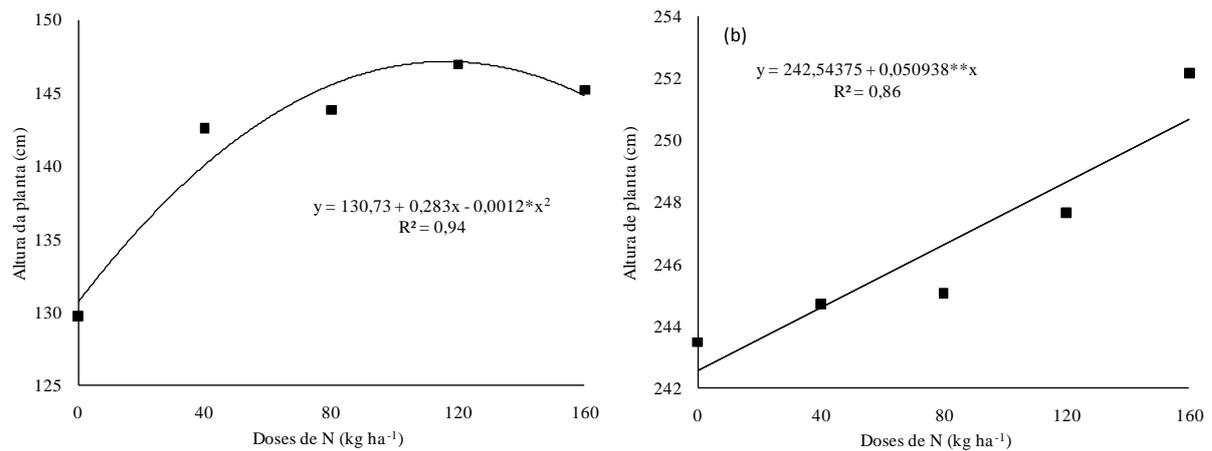


Figura 2: Altura de planta nas fases vegetativa (a) e reprodutiva (b) de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011. \*, \*\*: Significativo pelo teste T de Student  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ , respectivamente.

A adubação nitrogenada influenciou positivamente o diâmetro basal do colmo das plantas de milho apenas na fase reprodutiva (Figura 3a), sendo que esta influência também pode estar relacionada ao estímulo na produção de fitohormônios de crescimento e desenvolvimento proporcionado pelo N. Verificou-se através da análise de regressão que os dados se ajustaram significativamente ( $p \leq 0,01$ ) a uma equação linear crescente, cujo modelo permitiu afirmar que houve acréscimo de 0,009 mm no diâmetro basal do colmo das plantas para cada kg de N adicionado ao solo. Resultado contrário foi obtido por Lucena et al. (2000), avaliando o efeito de doses de fósforo (P) e das mesmas doses de N empregadas neste estudo sobre a cultura do milho, pois os autores não constataram efeito do N sobre o diâmetro do colmo das plantas de milho. Cabe salientar que incrementos no desenvolvimento em diâmetro do colmo do milho relatados neste estudo estão diretamente relacionados com incrementos na produção, já que esta estrutura da planta tem como função atuar no armazenamento de sólidos solúveis que poderão ser utilizados posteriormente, na formação dos grãos (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000), principalmente em situações em que algum estresse biótico ou abiótico comprometa a taxa de produção e translocação de fotoassimilados durante o estágio de enchimento de grãos.

Ao se avaliar a massa seca da parte aérea das plantas nota-se influência da adubação nitrogenada nas fases vegetativa e reprodutiva. A curva de resposta da variação da massa seca da parte aérea na fase vegetativa em função das doses de N aplicadas ao solo (Figura 3b) apresentou efeito polinomial quadrático ( $p \leq 0,05$ ) sendo que, de acordo com a equação obtida, a dose de  $108 \text{ kg ha}^{-1}$  de N permitiria alcançar teoricamente a máxima produção de massa

seca da parte aérea ( $6.844,68 \text{ kg ha}^{-1}$ ). Já na fase reprodutiva, apesar do efeito significativo da adubação nitrogenada, não foi possível ajustar uma equação, sendo verificada produção média de massa seca da parte aérea de  $22.539,28 \text{ kg ha}^{-1}$ , ou seja,  $15.694,60 \text{ kg}$  de biomassa seca acumulada na parte aérea a mais que o acúmulo máximo observado na fase vegetativa.

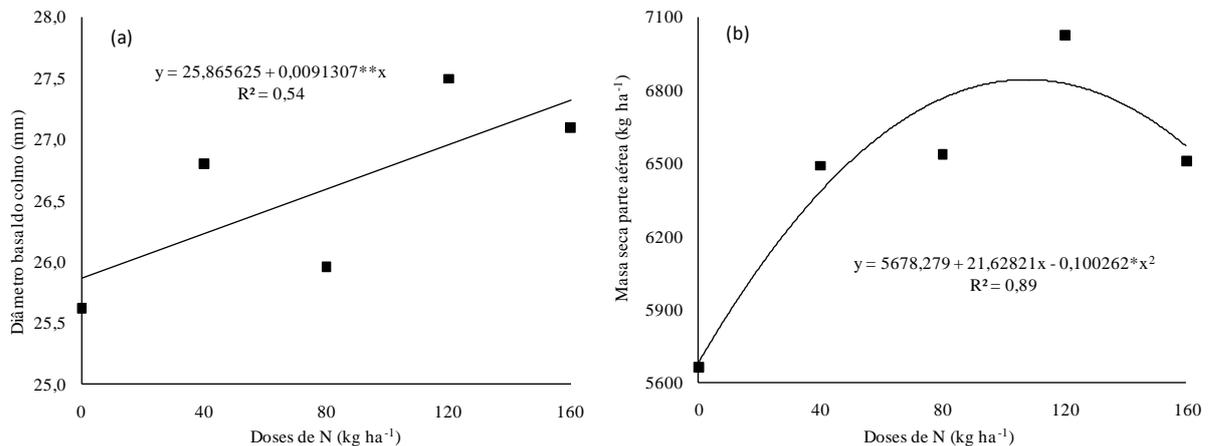


Figura 3: Diâmetro basal do colmo na fase reprodutiva (a) e massa seca da parte aérea na fase vegetativa (b) de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011. \*, \*\*: Significativo pelo teste T de Student  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ , respectivamente.

O estímulo proporcionado pela adubação nitrogenada no desenvolvimento da planta como um todo se deve ao fato do N estar intimamente ligado ao processo de crescimento da planta, pois participa da constituição de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos, fitocromos, pigmentos fotossintéticos etc. (BÜLL, 1993). Além disso, favorece o crescimento do sistema radicular, propiciando à planta condições para maior absorção de água e nutrientes (RAO et al., 1992). Diversos autores têm relatado uma relação linear entre a capacidade fotossintética da planta e o conteúdo de N, pois a fotossíntese necessita de uma quantidade substancial de pigmentos e proteínas para realizar os processos fotoquímicos e carboxilativos, os quais possuem o N em sua estrutura (FIELD e MOONEY, 1986; ANDREEVA et al., 1998).

Quanto à área foliar, foi constatado efeito da adubação nitrogenada apenas na fase reprodutiva, porém também não foi possível ajustar os dados a uma equação, sendo observado valor médio de área foliar de  $55,35 \text{ dm}^2$  por planta em função da adubação nitrogenada.

## 4.2 Componentes da produção

Para os componentes da produção avaliados neste estudo também não foi verificada interação significativa entre os fatores inoculação das sementes com bactérias diazotróficas no momento da semeadura e adubação nitrogenada. Na Tabela 4 são apresentados os resultados para altura de inserção da espiga, comprimento e diâmetro da espiga, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira, massa da espiga e produtividade de plantas de milho em função da inoculação das sementes com estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* de forma isolada e combinada.

Tabela 4: Altura de inserção da espiga (AI), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras por espiga (NF), número grãos por fileira (NG), massa da espiga (ME) e produtividade (PROD) de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação das sementes com bactérias diazotróficas, de forma isolada e combinada, das estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1). Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011

BACTÉRIA	AI	CE	DE	NF	NG	ME	PROD
	-----cm-----		mm			G	kg ha <sup>-1</sup>
Testemunha	138,1 a	18,5 b	51,9 b	15,7	38,6	252 b	10.651
Ab-V5	136,7 ab	18,5 b	51,7 b	15,8	38,8	260 ab	10.537
SmR1	135,2 ab	19,2 a	52,8 a	15,8	39,4	277 a	10.905
Ab-V5+SmR1	131,9 b	19,4 a	52,9 a	15,8	39,9	275 a	11.573
Média	135,5	18,9	52,3	15,8	39,2	266,1	10.916
C.V. (%)**	4,29	3,62	1,72	6,88	4,75	9,56	12,77

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

\*\*Coeficiente de variação (%).

A altura de inserção da espiga foi influenciada significativamente pela inoculação das sementes, sendo verificada média superior para a testemunha em relação à inoculação combinada das estirpes, embora sem diferir estatisticamente da inoculação isolada de cada estirpe. Já Campos et al. (2000) e Dotto et al. (2010) não observaram efeito da inoculação sobre a altura inserção da espiga em seus respectivos estudos. Vale ressaltar, no entanto, que a redução na altura de inserção de espiga pode ser benéfica, uma vez que facilita a colheita mecanizada da cultura e reduz o problema de acamamento de plantas (CASAGRANDE e FORNASIERI FILHO, 2002).

Para comprimento e diâmetro da espiga foi constatado efeito significativo da inoculação das sementes (Tabela 4), sendo observado que a inoculação das sementes com SmR1 e a inoculação combinada desta com Ab-V5 proporcionaram médias superiores em relação à testemunha e à inoculação isolada de Ab-V5. A inoculação combinada das estirpes proporcionou incremento de 5% no comprimento da espiga em relação à testemunha, ou seja, de 18,5 cm para 19,4 cm. Estes resultados aproximam-se dos obtidos por Cavallet et al. (2000), que constataram aumento médio significativo de 6% no comprimento médio das espigas de milho submetido à inoculação de produto comercial a base de *A. brasilense*. Já Dotto et al. (2010) não observaram efeito significativo da inoculação de *H. seropedicae* sobre o comprimento da espiga.

O número de fileiras por espiga e número de grãos por fileira não foram influenciadas significativamente pelos fatores em estudo, tanto inoculação das sementes com bactérias diazotróficas quanto adubação nitrogenada. Foram obtidos valores médios de 15,8 e 39,2 para número de fileiras e número de grãos por fileira, respectivamente, em função da inoculação. Cavallet et al. (2000) também não constataram efeito da inoculação de produto comercial a base de *A. brasilense* sobre o número de fileiras por espiga. Deparis et al. (2007), avaliando o efeito da adubação nitrogenada e potássica no rendimento de grãos de milho, não observaram diferença significativa entre as doses de N testadas para o número de fileiras. Vale salientar que esta é uma característica genética que sofre pouca influência dos fatores de produção.

Quanto à massa da espiga, a inoculação da estirpe SmR1 e a combinação das estirpes também proporcionaram médias superiores em relação à testemunha, porém não diferiram estatisticamente da inoculação isolada de Ab-V5. A inoculação com a estirpe SmR1 e com a combinação das estirpes proporcionou incrementos de 10% e 9%, respectivamente, na massa da espiga em relação à testemunha sem inoculação (Tabela 4). Dotto et al. (2010), por sua vez, não constataram efeito da inoculação sobre a massa de espiga de plantas de milho.

Na Tabela 4 verifica-se que não houve efeito significativo da inoculação das sementes com bactérias diazotróficas no momento da semeadura, sobre a produtividade do milho, sendo observada produtividade média de 10.916 kg ha<sup>-1</sup>, superando o rendimento médio constatado para a cultura na safra 2010/2011 no estado do Paraná que foi de 7.884 kg ha<sup>-1</sup> (SEAB, 2011). Estes resultados podem ser atribuídos às características do híbrido utilizado, o qual apresenta elevado potencial de produção na região de estudo, às práticas de manejo empregadas e às condições climáticas favoráveis incidentes durante a condução do experimento, conforme observado na Figura 1.

Mesmo que a produtividade não tenha sido influenciada significativamente pela inoculação das sementes, observa-se que o tratamento submetido à inoculação combinada das estirpes de Ab-V5 + SmR1 alcançou produtividade média de 11.573 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto o tratamento testemunha apresentou produtividade média de 10.651 kg ha<sup>-1</sup>. O aumento na produtividade proporcionado pela inoculação combinada das estirpes neste caso foi de 922 kg ha<sup>-1</sup> o que representa um incremento de 15 sacas por hectare, ou seja, um ganho de R\$ 309,00 a mais por hectare cultivado, sugerindo a aplicabilidade da inoculação para o cultivo do milho.

A resposta positiva das plantas à inoculação pode ser atribuída a diversos fatores, como a produção de substâncias promotoras do crescimento, vinculada ao aumento na superfície de absorção das raízes (SALOMONE e DÖBEREINER, 1996), proteção contra fitopatógenos, aumento da resistência das plantas ao estresse (HUERGO et al., 2008) e aumento da taxa de acúmulo de matéria seca, principalmente na presença de elevadas dosagens de N, o que parece estar relacionado com o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação de N (DIDONET et al., 1996).

De modo similar, Campos et al. (2000) não observaram resposta significativa da produtividade em relação à inoculação com *Azospirillum* spp. Alves (2007), avaliando o comportamento de genótipos de milho submetidos à inoculação da estirpe ZAE 94 de *H. seropedicae* e doses de N (0, 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup>), constataram também que não houve efeito da inoculação sobre a produtividade da variedade BRS 4157.

No entanto, a maioria dos trabalhos realizados até o momento relata algum efeito benéfico da inoculação com *Azospirillum* e *Herbaspirillum* à cultura do milho. Barros Neto (2008), trabalhando com o mesmo híbrido utilizado neste estudo submetido a dois níveis de adubação nitrogenada (100 e 150 kg ha<sup>-1</sup> de N) com e sem inoculação de produto pré-comercial a base de *A. brasilense*, observou que a inoculação do produto proporcionou aumento significativo na produtividade de grãos de milho na ordem de 9%, passando de 9021 kg ha<sup>-1</sup> para 9814 kg ha<sup>-1</sup>. Zilli et al. (2007), avaliando o efeito da inoculação com *H. seropedicae* e doses de N (0, 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N) sobre o rendimento da cultura do milho em Roraima, constataram efeito positivo da inoculação para o híbrido BRS 1010, sendo proporcionado pelo tratamento apenas inoculado um incremento de 691 kg ha<sup>-1</sup> no rendimento de grãos em relação ao controle, sem diferir dos tratamentos em que foram utilizadas as doses de 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N combinadas ao inoculante.

Os resultados obtidos por Zilli et al. (2007) caracterizam a possibilidade de contribuição da inoculação em suprir parte do N necessário a cultura, também observada por

Quadros (2009), que verificou desempenho equivalente quanto ao rendimento de grãos, entre a inoculação de *Azospirillum* combinada com a adição de 50 kg ha<sup>-1</sup> de N na base e a aplicação isolada de 130 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Outros autores relatam ainda que os efeitos benéficos da inoculação podem ser potencializados com a maior disponibilização de N mineral às plantas. Cavallet et al. (2000) verificaram que a utilização isolada do inoculante “Graminante” no cultivo de plantas de milho proporcionou incremento na produtividade de 357 kg ha<sup>-1</sup> em relação ao controle, enquanto a inoculação associada à adubação nitrogenada, na base e em cobertura, proporcionou incremento ainda maior, de 904 kg ha<sup>-1</sup>. Lopes et al. (2008), avaliando os efeitos da inoculação com *H. seropedicae* e da adubação nitrogenada sobre o rendimento da cultura do milho, observaram incremento significativo de 444 kg ha<sup>-1</sup> na produção de grãos de milho inoculado com *H. seropedicae* em comparação a plantas não inoculadas, sendo verificado incremento ainda maior (863 kg ha<sup>-1</sup>) quando a inoculação foi associada a aplicação de 40 kg ha<sup>-1</sup> de N.

No entanto, a maior disponibilidade de N mineral pode, em alguns casos, prejudicar a resposta à inoculação, como observado por Machado et al. (1998), em experimento com dois níveis de adubação nitrogenada (10 e 100 kg/ha de N) com e sem inoculação de uma mistura de bactérias diazotróficas. Os autores observaram incremento de 1380 kg ha<sup>-1</sup> na produção de grãos de milho quando utilizaram a inoculação associada à adubação de 10 kg ha<sup>-1</sup> de N em relação à testemunha sem inoculação, enquanto a inoculação associada à adubação com 100 kg ha<sup>-1</sup> de N resultou em incremento de apenas 960 kg ha<sup>-1</sup> na produção de grãos.

Segundo Hartmann (1988) a eficiência da fixação biológica em *Azospirillum* spp. é rapidamente reduzida ou até mesmo inibida na presença de maiores concentrações de compostos nitrogenados no solo, principalmente amônio, pois existe um mecanismo de resposta da bactéria a assimilação do amônio, que provoca a inibição rápida e reversível do complexo nitrogenase em *Azospirillum* spp. inibindo, conseqüentemente, a conversão do N atmosférico (N<sub>2</sub>) a uma forma assimilável às plantas.

Quanto à resposta dos componentes da produção à adubação nitrogenada, foi verificado efeito significativo para as variáveis altura de inserção da espiga, comprimento e diâmetro de espiga, massa de espiga e produtividade.

A adubação nitrogenada influenciou a altura de inserção da espiga, sendo verificado através da análise de regressão curva de resposta linear crescente ( $p \leq 0,01$ ) para este parâmetro em função das doses de N testadas (Figura 4a). De acordo com o modelo obtido foi possível verificar incremento de 0,04 cm na altura de inserção de espiga para cada quilo de N

adicionado ao solo. Este resultado corrobora com os obtidos por Lana et al. (2009), que verificaram resposta linear crescente da altura de inserção da espiga em função de doses crescentes de N com incremento de 0,06 cm para cada quilo de N adicionado. Já Casagrande e Fornasieri Filho (2002) não verificaram influência da adubação nitrogenada para esta variável.

Quanto à massa da espiga observou-se ajuste linear crescente ( $p \leq 0,01$ ) dos dados em função da adubação nitrogenada (Figura 4b), sendo verificado através do modelo obtido incremento de 0,18 g na massa de espiga para cada quilo de N adicionado ao solo. Já Ferreira et al. (2001), avaliando o efeito de nutrientes minerais na qualidade dos grãos de milho, verificaram efeito quadrático das doses de N sobre a massa de espiga, obtendo teoricamente valor máximo para esta variável de 10,48 t ha<sup>-1</sup> com a dose de 197,0 kg ha<sup>-1</sup> de N.

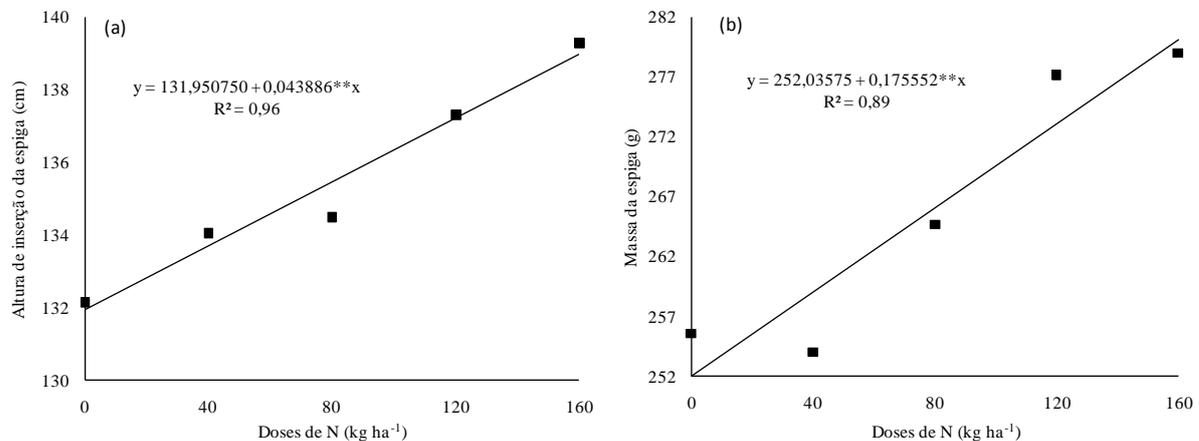


Figura 4: Altura de inserção da espiga (a) e massa da espiga (b) de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011. \*\*: Significativo pelo teste T de Student ( $p \leq 0,01$ ).

A análise de regressão mostrou ajuste linear crescente para os dados de comprimento ( $p \leq 0,01$ ) e diâmetro da espiga ( $p \leq 0,01$ ) em função da adubação nitrogenada (Figura 5a e 5b). De acordo com as funções obtidas foi possível verificar acréscimos de 0,004 cm no comprimento e 0,01 mm no diâmetro de espiga para cada quilo de N adicionado, contribuindo para o aumento da produtividade da cultura do milho (BÜLL, 1993).

A resposta positiva dos componentes da produção à adubação nitrogenada confirma o papel significativo do N no desempenho agrônomo da cultura do milho, seguindo uma tendência de aumento linear da extração de N pela planta com o aumento da produção (COELHO e FRANÇA, 1995). Além disso, o número de ovários e óvulos contidos na espiga, responsáveis diretamente pela formação de grãos, é afetado por diversos fatores, entre eles a

disponibilidade de N (UHART e ANDRADE, 1995).

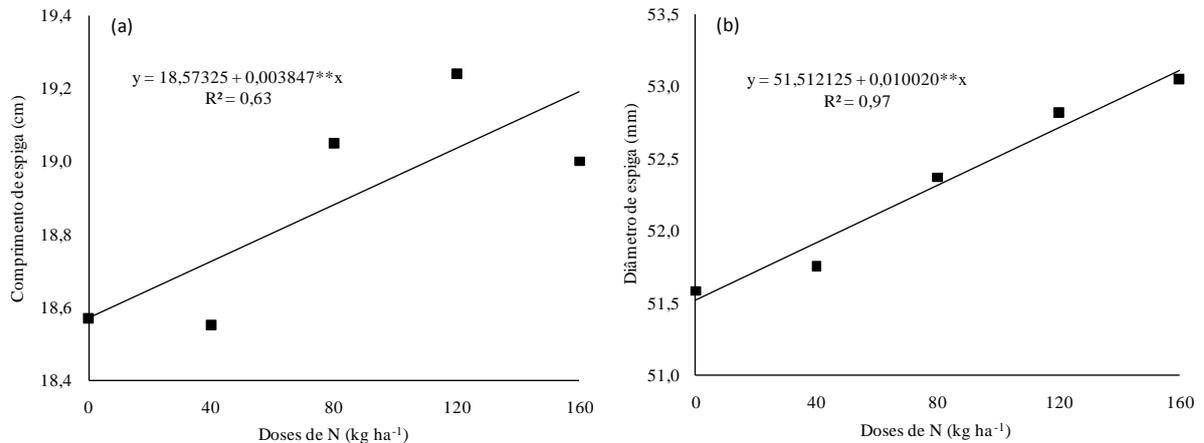


Figura 5: Comprimento (a) e diâmetro (b) de espiga de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011. \*\*: Significativo pelo teste T de Student ( $p \leq 0,01$ ).

Na Figura 6 verifica-se ajuste linear crescente ( $p \leq 0,01$ ) para os dados de produtividade em função da adubação nitrogenada. De acordo com o modelo obtido verifica-se aumento na ordem de  $13,5 \text{ kg ha}^{-1}$  no rendimento da cultura do milho para cada quilo de N adicionado à cultura e que mesmo a maior dose de N testada ( $160 \text{ kg ha}^{-1}$ ) não permitiu mudança de declividade da curva de produção. Portanto a cada  $40 \text{ kg ha}^{-1}$  de N adicionados ao solo neste estudo foi proporcionado um incremento de  $540 \text{ kg ha}^{-1}$ , ou seja, 9 sacas ou R\$ 185,40 a mais por hectare cultivado, acarretando maior lucratividade ao sistema de produção.

Segundo Below (2002), o N está relacionado com o estabelecimento da capacidade do dreno reprodutivo, pois a adubação nitrogenada favorece o crescimento da planta e, conseqüentemente, aumenta a área fotossinteticamente ativa, condicionando maior síntese de fotoassimilados (BÜLL, 1993), o que potencializa a translocação de N e fotoassimilados dos órgãos vegetativos para os grãos (KARLEN et al., 1988; UHART e ANDRADE, 1995), resultando em maior produtividade. Além disso, a adubação nitrogenada influencia não só a produtividade, mas também a qualidade do produto em consequência do teor de proteína nos grãos de milho (SABATA e MASON, 1992; ZHANG et al., 1994).

Diversos autores relatam comportamento linear crescente da produtividade do milho em função da adubação nitrogenada, corroborando com os resultados descritos neste estudo. Duete et al. (2008), avaliando o efeito de doses e parcelamentos de N sobre a cultura do milho, verificaram ajuste linear para os dados de produtividade em função da adubação nitrogenada, obtendo incremento na produtividade de grãos até a maior dose de N testada

(175 kg ha<sup>-1</sup>); Brasil et al. (2010), em estudo sobre o efeito de doses e épocas de aplicação da adubação nitrogenada sobre a cultura do milho, constataram também aumento linear na produtividade de grãos de milho em função da aplicação de N até a maior dose testada (120 kg ha<sup>-1</sup>).

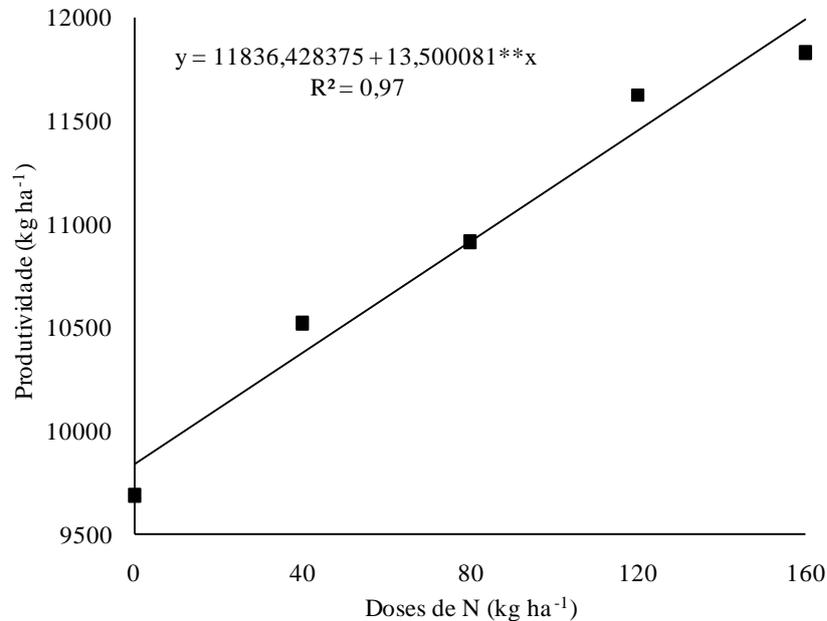


Figura 6: Produtividade do milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011. \*\*: Significativo pelo teste T de Student ( $p \leq 0,01$ ).

No entanto, respostas diferenciadas quanto ao comportamento da produtividade do milho em função da adubação nitrogenada têm sido verificadas. Lucena et al. (2000), utilizando as mesmas doses de N testadas neste estudo, observaram efeito quadrático da curva de resposta da produtividade em função das dosagens de N, cuja função de produção obtida permitiu verificar que o rendimento máximo de grãos (2257,2 kg ha<sup>-1</sup>) seria teoricamente atingido com aplicação de 111,1 kg ha<sup>-1</sup> de N; Ferreira et al. (2001) verificaram também efeito quadrático das doses de N aplicadas ao solo sobre a produtividade do milho, com valor máximo teórico de 8,58 ton ha<sup>-1</sup> para a dose 201,2 kg ha<sup>-1</sup>.

Barros Neto (2008) verificou que a variação da quantidade de N aplicada em cobertura (100 kg ha<sup>-1</sup> e 150 kg ha<sup>-1</sup>) não causou efeito sobre a produtividade do milho cujas sementes foram inoculadas com produto pré-comercial a base de *A. brasilense*, sendo que a adubação com 100 kg de N ha<sup>-1</sup> foi suficiente para garantir produtividades em torno de 10.000 kg de grãos ha<sup>-1</sup>.

Aos 120 dias após a emergência observou-se que nas parcelas que não receberam N, ou que receberam doses menores, as plantas como um todo já se apresentavam bem secas enquanto que, nas parcelas que receberam maiores doses de N, as plantas estavam bem mais verdes, prolongando o período de retranslocação de açúcares e N para os grãos, contribuindo com o aumento da produção.

Contudo, a variabilidade de respostas do milho à inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* isolada ou combinada com N, ainda é grande e está relacionada a diversos fatores, principalmente à interação genótipo da planta e bactéria, exercendo papel decisivo sobre a eficiência das bactérias, pois algumas bactérias apresentam certa especificidade ao hospedeiro. Cabe salientar ainda que a bactéria está associada livremente à planta, seja na rizosfera ou no interior dos tecidos, tornando-se muito vulnerável ao ambiente (GYANESHWAR et al., 2002).

A eficiência dos microrganismos diazotróficos em fixar N depende tanto de fatores genéticos do microrganismo e do macrossimbionte, como da interação destes com os fatores ambientais (FRANCO e NEVES, 1992). Portanto, a atividade e até mesmo a sobrevivência da comunidade bacteriana do solo pode ser influenciada por fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, aeração, salinidade-alcalinidade etc. e até mesmo pela competição com outros microrganismos do solo (antagonismo microbiano) (BRANDÃO, 1992), o que pode estar relacionado em alguns casos com a ausência de resposta das plantas à inoculação com bactérias diazotróficas.

Valores extremos de pH também podem prejudicar o crescimento de microrganismos do solo, não apenas pelo efeito direto da elevada concentração de íons  $H^+$  e  $OH^-$ , mas também pela influência indireta na disponibilidade de nutrientes e na penetração, no interior das células microbianas, de compostos tóxicos presentes no meio (BRANDÃO, 1992). O pH também pode alterar os padrões de exsudação radicular, sendo que a maioria das bactérias fixadoras de N, livres no solo ou associadas às raízes das plantas, é pouco tolerante à acidez em meio de cultura (FRANCO e NEVES, 1992). Observando-se o pH do solo nas condições do presente estudo (Tabela 1) é possível inferir que a ausência de interação entre inoculação e adubação assim como as respostas da inoculação isolada de *A. brasilense* podem estar relacionadas a influência do baixo pH do solo sobre a bactéria, uma vez que esta espécie sobrevive principalmente na rizosfera.

É necessário, portanto, mais estudos em condições de campo com a cultura do milho envolvendo a seleção e combinação entre estirpes eficientes, inclusive de diferentes espécies,

e a associação com a adubação nitrogenada, visando associar bactérias eficientes a genótipos promissores, os quais se beneficiariam dessa associação.

#### 4.3 Teores de NPK foliar e nos grãos

Na Tabela 5 são apresentados os teores de NPK foliar e nos grãos de milho em função da inoculação das sementes com estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, de forma isolada e combinada, no momento da semeadura. Observa-se que o fator inoculação apresentou efeito significativo apenas sobre os teores de P foliar e de N nos grãos.

Tabela 5: Teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), em folhas e grãos, de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação das sementes, de forma isolada e combinada, das estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1). Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011

BACTÉRIA	Teor de N		Teor de P		Teor de K	
	Folha	Grão	Folha	Grão	Folha	Grão
	-----g kg <sup>-1</sup> -----					
Testemunha	30,4	13,3 ab	3,2 b	2,0	53,6	15,0
Ab-V5	32,3	11,23 b	3,3 ab	1,8	53,4	14,7
SmR1	30,0	12,3 ab	3,6 a	2,0	51,8	15,2
Ab-V5+SmR1	32,6	15,5 a	3,5 ab	2,0	50,8	15,2
Média	31,3	13,1	3,4	2,0	52,4	15,0
C.V. (%)**	12,0	33,6	12,08	23,01	8,94	6,85

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, p<0,05.

\*\*Coeficiente de variação (%).

Não houve influência da inoculação sobre o teor de N foliar, obtendo-se valor médio de 31,3 g kg<sup>-1</sup> de N, valor que está dentro da faixa de suficiência considerada por Malavolta et al. (1997) como adequada para o desenvolvimento da cultura do milho (27,5 a 32,5 g kg<sup>-1</sup> de N). Dotto et al. (2010) também não constataram influência da inoculação com *H. seropedicae* sobre o teor de N nas folhas de milho, embora tenham obtido valor médio de 26,8 g kg<sup>-1</sup> de N nas folhas do milho, pouco abaixo da faixa de suficiência. Já o teor de N nos grãos foi influenciado pela inoculação observando-se média superior para a inoculação combinada das estirpes em relação à inoculação isolada de Ab-V5 e semelhante à testemunha e à inoculação

de SmR1. De forma contrária, Dotto et al. (2010) constataram que não houve influência da inoculação com *H. seropedicae* sobre o teor de N nos grãos.

Quanto ao teor de P foliar houve efeito significativo do fator inoculação para esta variável, sendo observada média superior do tratamento inoculado com a estirpe SmR1 em relação à testemunha, sem diferir dos tratamentos inoculação com Ab-v5 e inoculação combinada das estirpes. Os valores observados encontram-se bem próximos do maior valor considerado como adequado por Malavolta et al. (1997) dentro da faixa de suficiência que é de 2,5 a 3,5 g kg<sup>-1</sup> de P. Para o teor de P nos grãos não foi verificado efeito da inoculação, com valor médio para esta variável de 2,0 g kg<sup>-1</sup> de P.

Já para os teores de K, tanto nas folhas como nos grãos, não houve efeito da inoculação sendo observados valores médios de 52,4 g kg<sup>-1</sup> e 15 g kg<sup>-1</sup> de K para folhas e grãos, respectivamente, em função da inoculação. O teor de K foliar encontra-se acima da faixa considerada adequada para o milho, entre 17,5 e 22,5 g kg<sup>-1</sup>, segundo Malavolta et al. (1997). Teor elevado de K na planta pode ser associado com o aumento da produção de grãos, diretamente relacionado com o maior transporte e armazenamento de fotoassimilados nos grãos, já que o K participa do transporte de sacarose e fotoassimilados no sentido da fonte para o dreno (MARSCHNER, 1995).

Quanto à influência da adubação nitrogenada sobre os teores de NPK em tecidos foliares e grãos de milho, foi verificado efeito significativo apenas para o teor de P foliar.

O fator adubação nitrogenada não influenciou o teor de N foliar obtendo-se valor médio de 31,3 g kg<sup>-1</sup> de N em função das doses de N, também dentro da faixa de suficiência citada por Malavolta et al. (1997). Dotto et al. (2010) não observaram efeito da aplicação de N em cobertura sobre o conteúdo foliar de N. Já Casagrande e Fornasieri Filho (2002) relatam que os teores de N foliar foram influenciados pelas doses de N, variando de 36 g kg<sup>-1</sup> a 39 g kg<sup>-1</sup>, para as doses 0 e 90 kg ha<sup>-1</sup> de N, respectivamente.

A ausência de resposta do teor de N foliar em relação à adubação nitrogenada observada neste estudo pode ser atribuída a um fator de diluição causado pelo crescimento contínuo da planta, que acarreta uma redução no percentual de N na parte aérea da planta de milho com o decorrer do ciclo. Na verdade, a quantidade de N na planta continua crescendo, sendo esta absorção de N relativamente mais adiantada que o acúmulo de massa seca durante a maior parte da vida da planta (TROEH e THOMPSON, 2007).

O teor de N nos grãos não foi influenciado pela adubação nitrogenada em cobertura, diferindo dos resultados obtidos por Dotto et al. (2010) que verificaram incremento no conteúdo de N nos grãos com o aumento das doses de N adicionadas ao solo. Deparis et al.

(2007) constataram que a adubação nitrogenada em cobertura não influenciou nos teores de NPK nos grãos.

Houve efeito da adubação nitrogenada sobre o teor de P foliar, obtendo-se através da análise de regressão um ajuste linear dos dados em função da adubação nitrogenada, com incremento de  $0,003 \text{ g kg}^{-1}$  de P para cada quilo de N adicionado ao solo (Figura 7). A principal função do P na planta está relacionada com os fenômenos de armazenamento e transferência de energia na planta, sob a forma de ATP, essencial à fotossíntese, síntese de proteínas, aminoácidos e lipídios, sendo que a planta de milho apresenta elevada exigência deste nutriente por ocasião da formação e desenvolvimento dos grãos, quando, além da absorção do solo, há intensa translocação do elemento para os grãos (FORNASIERI FILHO, 1992).

Embora o milho requeira uma grande quantidade de K para sua grande produção de carboidratos e apresente a maior parte do K em suas folhas e ramos (TROEH e THOMPSON, 2007), não foi verificado efeito das doses de N para o teor de K foliar, observando-se valor médio de  $52,4 \text{ g kg}^{-1}$  em função da adubação nitrogenada, valor acima dos considerados como ideais para a cultura do milho segundo Malavolta et al. (1997). Casagrande e Fornasieri Filho (2002) e Deparis et al. (2007) também não verificaram efeito das doses de N sobre os conteúdos foliares de K.

As doses de N não afetaram os teores de K e P nos grãos, obtendo-se teores médios de  $15,0$  e  $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ , para K e P respectivamente, diferindo dos resultados obtidos por Ferreira et al. (2001) que verificaram aumento significativo nos teores de todos os nutrientes analisados nos grãos, inclusive P e K, com o incremento da adubação nitrogenada. Segundo Fornasieri Filho (1992) os grãos de milho removem quantidades reduzidas de K e seu conteúdo, praticamente, não varia com o teor de K do solo.

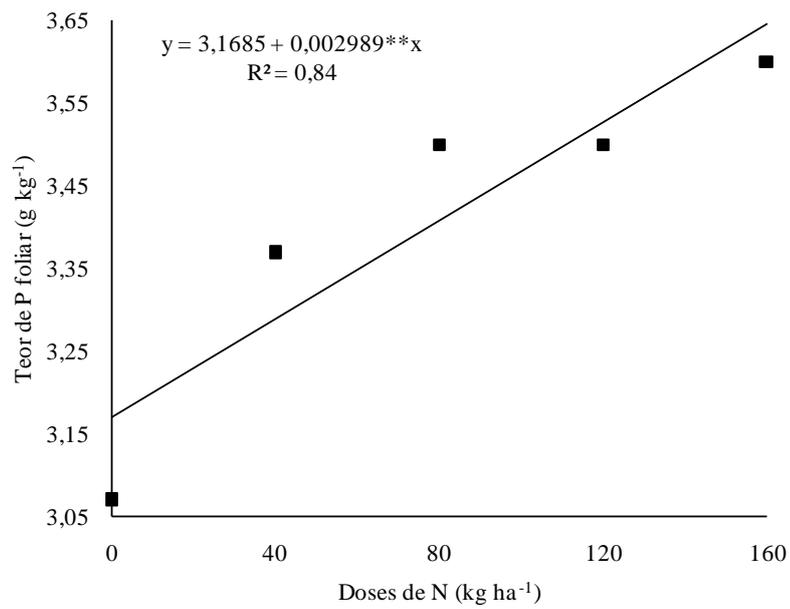


Figura 7: Teor de P foliar de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da adubação nitrogenada. Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011. \*\*: Significativo pelo teste T de Student ( $p \leq 0,01$ ).

## 5 CONCLUSÕES

- Apesar de não haver interação entre a inoculação de bactérias diazotróficas e a adubação nitrogenada para as variáveis avaliadas, a inoculação proporciona efeito positivo quanto ao desenvolvimento e produção da cultura do milho, com destaque para a inoculação combinada das estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1), que proporciona incremento de 12% na massa seca de parte aérea e de 7% ou 922 kg ha<sup>-1</sup> na produtividade de grãos da cultura em relação à testemunha sem inoculação;
- A aplicação de doses crescentes de N em cobertura proporciona incremento no crescimento e produtividade de grãos do milho até a dose de 160 kg ha<sup>-1</sup> de N;
- A prática da inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do milho é uma alternativa viável que além de proporcionar benefícios ao desenvolvimento da planta contribui para uma atividade agrícola mais sustentável, um dos principais focos do cenário atual.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho.** Seropédica, 2007. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ANDREEVA, T.T. et al. The relationship between photosynthesis and nitrogen assimilation in mustard plants exposed to elevated nitrate rates in nutrient solutions. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 45, p. 702-705, 1998.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de planta de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Seropédica, 1996. 238 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

BALDANI, J. I. et al. Characterization of '*Herbaspirillum seropedicae*' nov. sp. a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I. et al. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família *Poaceae* (Antiga *Gramineae*). In: RIBEIRO, M.R. et al. (Eds.) **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira Ciência do Solo, 2009. p. 203-271.

BARASSI, C. A. et al. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F. D.; SALOMONE, I. G. de. (Eds.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 49-59.

BARROS NETO, C. R. de. **Efeito do nitrogênio e da inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense* no rendimento de grãos de milho.** Ponta Grossa, 2008. 28 p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa.

BASHAN, Y. Changes in membrane potential of intact soybean root elongation zone cells induced by *Azospirillum brasilense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 958-963, 1991.

BASHAN, Y; LEVANONY, H. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 137, p. 99-103, 1991.

BASHAN, Y. et al. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, p. 279-285, 2006.

BELOW, F. E. **Fisiologia, nutrição e adubação nitrogenada do milho.** Piracicaba, Potafós. p. 7-12. (Informações Agrônômicas, 99), 2002.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de Crescimento de Plantas: Noções Básicas.** 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 42 p.

- BORÉM, Aluísio (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. UFV, 2005. 969 p.
- BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. **Revista Ceres**, v. 21, p. 73-85, 1974.
- 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.
- BRASIL, E. C.; CRAVO, M. da S.; ASSUNÇÃO, E. A. Doses e épocas de aplicação da adubação nitrogenada sobre a produção de milho cultivado em Latossolo Amarelo distrófico. In: XXIX REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 2010, Guarapari. **Anais...** Guarapari, 2010.
- BÜLL, L. T. Nutrição mineral do milho. In: BULL, Leonardo Theodoro; CANTARELLA, Heitor. (Eds.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafós, 1993.
- CAMPOS, B. C. de; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante “Graminante” na cultura de milho. **Ciência Rural**, v. 30, n.4, p. 713-715, 2000.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F. et al. (Eds.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.
- 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.; SALOMONE, I. G. de. (Eds.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.
- CAVALLET, L. E. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.1, p. 129-132, 2000.
- CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 5 de outubro 2011.
- CORREA, O. S. et al. *Azospirillum brasilense* - plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F. D.; SALOMONE, I. G. de. (Eds.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 87-95.
- COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. de. **Seja o doutor do seu milho: nutrição e adubação**. Piracicaba, Potafós. p. 1-9. (Informações Agrônomicas, 71), 1995.
- CRUZ, L. M. et al. 16S ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 2375-2379, 2001.
- DA RÓZ, A. L. Plástico biodegradável preparado a partir de amido. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 4-5, 2003.

- DEL GALLO, M.; FENDRICK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: OKON, Y. (Ed.). *Azospirillum/plant associations*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 57-75.
- 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.
- DIDONET, A. D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M. H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 16, n. 9, p. 645-651, 1996.
- DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biologia*, v. 1, p. 261-272, 1958.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. nv., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 1, p. 357-365, 1966.
- DOBEREINER, J.; DE-POLLI, H. Diazotrophic Rhizocoenoses. In: STEWART, W.D.P. et al. (Org.). *Nitrogen Fixation*. 18. ed. London: Academic Press, 1980. p. 0301-0333.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, I. J. Bases científicas para uma agricultura biológica. *Ciência e Cultura*, v. 34, n. 7, p. 869-881, 1982.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. 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. 173-179.
- DOTTO, A. P. et al. 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.
- DUETE, R. R. C. et al. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do Nitrogênio (15N) pelo milho em Latossolo Vermelho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, p. 161-171, 2008.
- EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. *Molecular Plant-Microbe Interact*, v. 12, p. 813-819, 1999.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. 204 p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Cultivo do milho: Sistemas de produção. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_6ed/feraduba.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_6ed/feraduba.htm)>. Acesso em 10 jan. 2012.
- FALLIK, E.; OKON, Y. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 28, p. 123-126, 1996.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360 p.

FANI, R.; GALLO, R.; LIÒ, P. Molecular evolution of nitrogen fixation: the history of the *nifD*, *nifK* and *nifK* genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 51, p. 1-11, 2000.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-42, 2008.

FERREIRA, A. C. et al. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis, RJ. **Abstracts...** Angra dos Reis: Embrapa – CNPAB / UFRRJ / The Brazilian Academy of Sciences, 1995. 210p.

FERREIRA, A. C. de B. et al. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 131-138, 2001.

FIELD, C.; MOONEY, H. A. The photosynthesis nitrogen relationship in wild plants. In: GIVNISH, T.J. (Ed.) **On the economy of plant form and function**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. p. 25–55.

FLORIANI, C.G. **Milho – mais alternativas de uso a cada dia, com melhores preços e excelente oportunidade para minas e brasil. 2010.** Disponível em: <[http://www.biomatrix.com.br/artigo\\_detalhada.php?artigo\\_id=34](http://www.biomatrix.com.br/artigo_detalhada.php?artigo_id=34)>. Acesso em 04 out. 2010.

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

FRANCO, J. A. M.; NETO, A. S. Produção dos fertilizantes nitrogenados e suprimento de matéria-prima. In: YAMADA, T.; STIPP e ABDALLA, S. R.; VITTI, G. C. (Eds.). **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007. p. 73-108.

FRANCO, A. A.; NEVES, M. C. P. Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. 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. 219-230.

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. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

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

HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: OKON, Y. (Ed.). ***Azospirillum/plant associations***. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 15-39.

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

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

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

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other ramiflorous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 77-119, 1998.

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.

LASCA, C. de C. et al. Efeito do tratamento químico de sementes de milho sobre a emergência e a produção. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 461-468, 2005.

LOPES, E. S. Fixação biológica do nitrogênio no sistema solo-planta. In: YAMADA, T.; STIPP e ABDALLA, S. R.; VITTI, G. C. (Eds.). **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007. p. 43-72.

LOPES, A. A. de C. et al. Efeito da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade do milho nos períodos de safra e safrinha. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2008, Brasília. **Resumos...** Brasília: Parlamundi, 2008.

LUCENA, L. de F. C. et al. Resposta do milho a diferentes dosagens de nitrogênio e fósforo aplicados ao solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 3, p. 334-337, 2000.

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

MARIN, V. A. et al. **Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical**. Disponível em <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/598661/1/doc091.pdf>> Acesso em 23 fev. 2010.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic Press, 1995. 889 p.

MICHIELS, K. E.; CROES, C. L.; VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2241-2246, 1991.

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

MOREIRA, F. M. de S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99, 2010.

- MORRISSEY, J. P. et al. Are microbes at the root of a solution to world food production. **EMBO reports**, v. 5, n. 10, p. 922-926, 2004.
- NEVES, M. C.P. et al. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, v. 22, p. 1179-1192, 1985.
- NORMAND, P.; BOUSQUET, J. Phylogeny of *nifH* sequences in *Frankia* and in other nitrogen-fixing microorganisms. **Journal of Molecular Evolution**, v. 29, p. 436-447, 1989.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field incubation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, 1994.
- OKON, Y. et al. Physiological properties of *Azospirillum brasilense* and its growth promoting effects in the rhizosphere. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS: THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, PROGRAMME AND ABSTRACTS. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, p.55-56, 1995. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996.
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 366-370, 1997.
- OLIVARES, F.L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana de açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. Seropédica, 1997. 344p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- OLIVEIRA A.L.M. et al. The effect inoculating endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.
- PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 795p.
- PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. Jaboticabal, 2009. 74 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista.
- POTAFOS, INSTITUTO DA POTASSA & FOSFATO. **Manual internacional de fertilidade do solo**. Piracicaba, 177p. 1998.
- 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. E.; 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. **Fertilizer Research**, v. 33, p. 209-217, 1992.

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

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

SABATA, R.J.; MASON, S.C. Corn hybrid interactions with soil nitrogen level and water regime. **Journal of Production Agriculture**, v. 5, p. 137-142, 1992.

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

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO – SEAB. Disponível em <<http://www.agricultura.pr.gov.br>>. Acesso em 02 set. 2011.

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.

TANAKA, R. T.; MASCARENHAS, H. A. A.; BORKERT, C. M. Nutrição mineral da soja. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I.M. **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1997. p. 109-110.

TARRANT, J. J., KRIEG, N. R., DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 24, p. 967-980, 1978.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim técnico, 5).

TROEH, F. R.; THOMPSON, L. M. **Solos e Fertilidade do Solo**. 6. ed. São Paulo: Andrei, 2007. 718p.

UHART, S. A.; ANDRADE, F. H. Nitrogen deficiency in maize. I. Effects on crops growth, development, dry matter partitioning, and kernel set. **Crop Science**, v. 35, p. 1376-1383, 1995.

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.

WEISMANN, M. Fases de desenvolvimento da cultura do milho. In: **Tecnologias e produção: milho safrinha e culturas de inverno**. Maracaju: Fundação MS, 2008. p. 31-38.

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

YAMADA, T. Adubação nitrogenada do milho. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 71, p. 1-3, set. 1995.

YAMADA, T.; STIPP E ABDALLA, S. R. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 91, p. 1-16, set. 2000.

ZHANG, F.; MACKENZIE A.F.; SMITH, D.L. Nitrogen fertilizer and protein, lipid, and non-structural carbohydrate concentrations during the course of maize kernel filling. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.172, p.171-181, 1994.

ZILLI, J. E. et al. **Contribuição da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para o rendimento de grãos de arroz e milho em Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Roraima; 6).

## 7 ANEXOS

Anexo I: Resumo da análise de variância para as variáveis: diâmetro basal do colmo, altura da planta, massa seca da parte aérea e área foliar, nas fases vegetativa e reprodutiva, e altura de inserção da espiga, comprimento da espiga, diâmetro da espiga, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira, massa da espiga e produtividade de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação das sementes com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

		Quadrados médios							
F.V.	G.L.	Diâmetro colmo V	Diâmetro colmo R	Altura planta V	Altura planta R	Massa seca parte aérea V	Massa seca parte aérea R	Área foliar V	Área foliar R
Bloco	3	11,781	12,612**	122,589	847,686**	3889698,305	174837099,319*	35,618	4,546
Bactéria	3	78,550**	12,916**	76,300	4,270	8185035,304	175413242,380*	99,371	53,914
Doses N	4	30,406	9,877*	753,034**	192,167*	15476174,598**	141644259,404*	84,137	872,919**
B X N	12	21,075	1,953	71,240	81,465	3911366,158	31472858,324	52,280	258,895
Resíduo	57	15,915	2,838	181,137	60,763	3454578,776	47396083,414	64,047	192,952
Total	79								
C.V.		12,33	6,33	9,5	3,16	14,42	15,27	14,37	25,09

		Quadrados médios						
F.V.	G.L.	Altura de Inserção da espiga	Comprimento da espiga	Diâmetro da espiga	Número de fileiras	Número de grãos fileira	Massa de espiga	Produtividade
Bloco	3	591,587**	1,322*	2,629*	0,080	5,805	1215,409	1226825,389
Bactéria	3	143,277**	4,285**	6,928**	0,076	6,633	2894,044**	4103749,086
Doses N	4	128,024**	1,500*	6,626**	1,079	4,293	2204,792*	9443145,922**
B X N	12	37,465	0,216	1,556	1,977	2,868	466,026	1313973,816
Resíduo	57	33,817	0,466	0,810	1,181	3,468	647,122	1805781,424
Total	79							
C.V. (%)		4,29	3,62	1,72	6,88	4,75	9,56	13,84

\*, \*\*: Significativos a 5 e 1% pelo teste F, respectivamente; V: fase vegetativa; R: fase reprodutiva.

Anexo II: Resumo da análise de variância para as variáveis teor de N, P e K foliar e teor de N, P e K nos grãos, de plantas de milho, híbrido 30R50, em função da inoculação das sementes com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010/2011

F.V.	G.L.	Quadrados médios					
		NFoliar	PFoliar	KFoliar	NGrão	PGrão	KGrão
Bloco	3	25,308	0,233	909,339**	1,796	0,496	0,974
Bactéria-B	3	34,010	0,598*	36,582	64,785*	0,178	1,161
Doses N-N	4	17,526	0,683**	14,874	22,780	0,246	1,919
B X N	12	13,365	0,183	9,318	14,940	0,140	0,506
Resíduo	57	14,132	0,169	21,950	19,380	0,204	1,060
Total	79						
C.V. (%)		12,0	12,08	8,94	33,6	23,01	6,85

\*, \*\*: Significativos a 5 e 1% pelo teste F.