

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM AGRONOMIA – NÍVEL
MESTRADO E DOUTORADO

ARTUR SOARES PINTO JUNIOR

**DOSES DE INOCULANTE E ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*
ASSOCIADAS À ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO**

Marechal Cândido Rondon

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM AGRONOMIA – NÍVEL
MESTRADO E DOUTORADO

ARTUR SOARES PINTO JUNIOR

**DOSES DE INOCULANTE E ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*
ASSOCIADAS À ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia – Nível Mestrado e Doutorado, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Professor Dr. Vandeir Francisco Guimarães.

Marechal Cândido Rondon

2013

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

P659d	Pinto Junior, Artur Soares Doses de inoculante e estirpes de <i>Azospirillum brasilense</i> associadas à adubação nitrogenada na cultura do milho / Artur Soares Pinto Junior. – Marechal Cândido Rondon, 2013. 118 p. Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2013. 1. Milho. 2. Nitrogênio – Fixação. 3. Hormônios vegetais. I. Guimarães, Vandeir Francisco. II. Título. CDD 22.ed. 633.15 CIP-NBR 12899
-------	--

Ficha catalográfica elaborado por Marcia Elisa Sbaraini Leitzke CRB-9/539



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Biólogo **ARTUR SOARES PINTO JUNIOR**. Aos vinte e oito dias do mês de junho de 2013, às 8 horas, sob a presidência do Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Julgadora da Defesa da Tese do Biólogo Artur Soares Pinto Júnior, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agronomia – Nível Mestrado e Doutorado, com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"DOUTOR EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof. Dr. Claudemir Zucareli (UEL), Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa (Unioeste), Prof. Dr. Eurides Kuster Macedo Júnior (Unioeste), Prof.^a Dr.^a Andréia Cristina Peres Rodrigues da Costa (Unioeste) e Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador).

Iniciados os trabalhos, o candidato apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua tese, intitulada: **"Doses de inoculante e estirpes de *Azospirillum brasilense* associadas à adubação nitrogenada na cultura do milho"**.

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Prof. Dr. Claudemir Zucareli.....	Aprovado
Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa.....	Aprovado
Prof. Dr. Eurides Kuster Macedo Júnior	Aprovado
Prof. ^a Dr. ^a Andréia Cristina Peres Rodrigues da Costa.....	Aprovado
Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador).....	Aprovado

Apurados os resultados, verificou-se que o candidato foi habilitado, fazendo jus, portanto, ao título de **"DOUTOR EM AGRONOMIA"**, área de concentração: **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 28 de junho de 2013.

Prof. Dr. Claudemir Zucareli

Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa

Prof. Dr. Eurides Kuster Macedo Júnior

Prof.^a Dr.^a Andréia Cristina Peres Rodrigues da Costa

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador)

Aos meus pais Artur e Lucia, pelos ensinamentos, exemplos de respeito, honestidade, trabalho e fé.

À minha avó Eliria (in memoriam).

Aos meus irmãos Clovis, Claudemir, Cleide e Alvaro.

A mulher da minha vida Ana Raquel pelo apoio incondicional, principalmente nos momentos de dúvida e incertezas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Universidade Estadual do Oeste de Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia (PPGA), pelo apoio, atenção e pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao amigo e orientador Dr. Vandeir Francisco Guimarães, pela valiosa orientação, ensinamentos e oportunidades.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fixação Biológica de Nitrogênio (INCT), à Fundação Araucária, à Secretaria da Ciência, Tecnologia e ensino Superior (SETI), Universidade Federal do Paraná e a Simbiose-agro pelo apoio e auxílio na condução da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelos recursos e bolsa concedida.

Ao meu pai Artur Soares Pinto e à minha mãe Lucia Canceli Pinto, pelo amor, educação, carinho, atenção e dedicação durante minha vida.

À minha avó Eliria (*in memoriam*) pelo afeto que sempre dedicou ao seu neto.

À minha esposa Ana Raquel Rheinheimer por ser essa pessoa brilhante e especial em minha vida.

E a todos aqueles que participaram em alguma etapa desse processo, meus sinceros agradecimentos.

DOSES DE INOCULANTE E ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* ASSOCIADAS À ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar em condições de campo em diferentes áreas do Sul do Brasil, o efeito associado de fertilização mineral e diferentes dosagens de inoculante formulado a partir das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *Azospirillum brasilense*. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro blocos e dez tratamentos. Os tratamentos foram formados pelas doses de 0, 60 e 120 Kg ha⁻¹ de nitrogênio, sem inoculação das sementes e a dose de 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio + inoculação individual e associada das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7. Foram realizadas avaliações biométricas durante o estágio de oito folhas definitivas (V8), bem como, avaliações dos componentes de produção e da produtividade no final do ciclo da cultura. Também foram avaliados os teores de N, P e K das folhas no início da floração feminina, bem como, os teores desses nutrientes presentes nos grãos. Os resultados obtidos indicam que, independente da área avaliada, a utilização de inoculante a base de *A. brasilense* associado à dose de 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio resulta em incrementos no crescimento, desenvolvimento e produtividade do milho.

PALAVRAS-CHAVE: Fixação biológica de nitrogênio; *Zea mays* L.; Promoção do crescimento vegetal; Fitormônios.

DOSES AND STRAINS OF INOCULANT *Azospirillum brasilense* ASSOCIATED WITH NITROGEN IN THE CULTURE OF CORN

ABSTRACT: This study aimed to evaluate under field conditions in different areas of southern Brazil, the effect associated with mineral fertilizers and different dosages of inoculant formulated from the strains Ab-V5, V6 and Ab-Ab-V7 of *Azospirillum brasilense*. The experimental design was randomized blocks with four blocks and ten treatments. The treatments were formed by the doses of 0, 60 and ha-1 of nitrogen without seed inoculation dose to 120 kg and 60 kg ha-1 nitrogen + individual inoculation and associated strains of Ab-V5, V6 and Ab-Ab -V7. Biometric evaluations were performed during the stage of eight mature leaves (V8), as well as assessments of components of production and productivity at the end of the crop cycle. Levels of N, P and K leaves in early female flowering were also evaluated as well, the levels of these nutrients in grains. The results indicate that regardless of the area evaluated, the use of inoculant base of *A. brasilense* associated with the dose of 60 kg ha-1 of nitrogen results in increases in growth, development and yield of corn.

KEY-WORDS: Biological nitrogen fixation; *Zea mays* L.; Promotion of plant growth, plant hormones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1. Reação catalisada pela nitrogenase.....	35
--	----

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Precipitação pluviométrica acumulada e temperatura máxima, média e mínima mensal no período de outubro de 2011 a março de 2012. Estação experimental “Prof. Dr. Antônio Carlos Pessoa”, Marechal Cândido Rondon, PR.	57
FIGURA 2. Precipitação pluviométrica acumulada e temperatura máxima, média e mínima mensal no período de outubro de 2011 a março de 2012. Estação experimental da UNIOESTE, Pato Bragado, PR.....	57

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Acúmulo mensal de precipitação, médias de temperatura máxima, média e mínima dos quatro locais durante a condução dos experimentos. Marechal Cândido Rondon, PR (A), Pato Bragado, PR (B), Cruz Alta, RS (C) e Ibiraiaras, RS (D)..	102
FIGURA 2. Médias de produtividade de quatro experimentos com a cultura do milho, inoculadas e não inoculadas com <i>A. brasilense</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6.	108

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 1.	Estádios Fenológicos de uma planta de milho.....	19
------------------	--	----

CAPÍTULO 1

TABELA 1.	Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Marechal Cândido Rondon, PR, 2011/2012..	56
TABELA 2.	Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Pato Bragado, PR, 2011/2012.	56
TABELA 3.	Descrição dos tratamentos utilizados no experimento.....	58
TABELA 4.	Diâmetro basal do colmo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA), área foliar (AF) das plantas de milho do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes da bactéria diazotrófica <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação nitrogenada, nos municípios de Marechal Cândido Rondon, PR (L1) e Pato Bragado, PR (L2), UNIOESTE, 2011/2012.....	66
TABELA 5.	Teor de nitrogênio da folha (Nf), teor de fósforo da folha (Pf), teor de potássio da folha (Kf), das plantas de milho do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes da bactéria diazotrófica <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação nitrogenada, nos municípios de Marechal Cândido Rondon, PR (L1) e Pato Bragado, PR (L2), UNIOESTE, 2011/2012.	68
TABELA 6.	Comprimento de espiga (CPE), diâmetro de espiga (DE), número de fileiras por espiga (NFE), das plantas de milho do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes da bactéria diazotrófica <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação nitrogenada, nos municípios de Marechal Cândido Rondon, PR (L1) e Pato Bragado, PR (L2), UNIOESTE, 2011/2012.	70
TABELA 7.	Número de grãos por fileira (NGF), massa de mil grãos (MMG), produtividade (PROD), das plantas de milho do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes da bactéria diazotrófica <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação nitrogenada, nos municípios de Marechal Cândido Rondon, PR (L1) e Pato Bragado, PR (L2), UNIOESTE, 2011/2012.	72

TABELA 8. Teor de nitrogênio dos grãos (Ng), teor de fósforo dos grãos (Pg) e teor de potássio dos grãos (Kg), das plantas de milho do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes da bactéria diazotrófica <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação nitrogenada, nos municípios de Marechal Cândido Rondon, PR (L1) e Pato Bragado, PR (L2), UNIOESTE, 2011/2012.	74
---	----

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011..	96
TABELA 2. Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Cruz Alta, RS, 2011/2012.	96
TABELA 3. Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Ibiraíaras, RS, 2011/2012..	96
TABELA 4. Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Pato Bragado, PR, 2011/2012....	97
TABELA 5. Descrição dos tratamentos utilizados no experimento.....	97
TABELA 6. Contagem de bactérias diazotróficas (UFC mL ⁻¹) nos inoculantes utilizados em cada local de condução dos experimentos.....	98
TABELA 7. Data de realização da semeadura, híbridos de milho utilizados e tratamento de semente utilizado em cada local de condução dos experimentos.....	99
TABELA 8. Médias para diâmetro do colmo (DC), massa seca total (MST), massa de 1000 grãos (M1000), número de grãos por fileira (NGF), teor de nitrogênio dos grãos (NGRA), teor de nitrogênio das folhas (NF) e produtividade (PROD) do híbrido DKB 390, em função da inoculação das sementes com diferentes doses do inoculante a base da bactéria <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação nitrogenada, Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.....	103
TABELA 9. Médias para diâmetro do colmo (DC), massa seca total (MST), massa de 1000 grãos (M1000), número de grãos por fileira (NGF), teor de nitrogênio dos grãos (NGRA), teor de nitrogênio das folhas (NF) e produtividade (PROD) do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes doses do inoculante a base da bactéria <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação nitrogenada, Pato Bragado, PR, 2011/2012.	105

TABELA 10. Médias para diâmetro do colmo (DC), massa seca total (MST), número de grãos por fileira (NGF), massa de 1000 grãos (M1000), teor de nitrogênio dos grãos (NGRA), teor de nitrogênio das folhas (NF) e produtividade (PROD) do híbrido 30F53H, em função da inoculação das sementes com diferentes doses do inoculante a base da bactéria *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada, Cruz Alta, RS, 2011/2012.106

TABELA 11. Médias para diâmetro do colmo (DC), massa seca total (MST), número de grãos por fileira (NGF), massa de 1000 grãos (M1000), teor de nitrogênio dos grãos (NGRA), teor de nitrogênio das folhas (NF) e produtividade (PROD) do híbrido DKB 240 PRO, em função da inoculação das sementes com diferentes doses do inoculante a base da bactéria *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada, Ibiraiaras, RS, 2011/2012.....107

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Cultura do Milho	166
2.2	Ecofisiologia da Cultura do Milho	177
2.2.1	Fenologia.....	177
2.2.2	Temperatura.....	19
2.2.3	Fotoperíodo	22
2.2.4	Radiação solar.....	23
2.2.5	Exigência hídrica	24
2.3	Nitrogênio e a cultura do milho	266
2.3.1	Importância do nitrogênio na cultura do milho	266
2.3.2	Dinâmica do nitrogênio no solo	288
2.4	Fixação biológica de nitrogênio.....	32
2.4.1	Complexo nitrogenase.....	333
2.5	Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas.....	366
2.6	Microrganismos promotores do crescimento vegetal	377
2.7	Espécie <i>Azospirillum brasilense</i>	388
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

CAPÍTULO 1 – INOCULAÇÃO ISOLADA E ASSOCIADA DAS ESTIRPES Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 DA BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DO MILHO

2	INTRODUÇÃO	544
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	566
3.1	Localização e caracterização das áreas experimentais.....	566
3.2	Delineamento experimental	588
3.3	Instalação e condução dos experimentos	588
3.3.1	Correção da fertilidade do solo.....	588
3.3.2	Inoculação das sementes.....	599
3.3.3	Semeadura.....	599
3.3.4	Controle de pragas	60
3.4	Variáveis avaliadas	60

3.4.1	Variáveis biométricas	60
3.4.1.1	Diâmetro basal do colmo	61
3.4.1.2	Área foliar	61
3.4.1.3	Massa seca da parte aérea	61
3.4.2	Análise dos teores de nutrientes em tecidos foliares.....	61
3.4.3	Componentes de produção e produtividade	62
3.4.4	Análise dos teores de N, P e K dos grãos	62
3.5	Análise estatística	63
4	RESULTADOS	64
4.1	Efeito da inoculação no crescimento/desenvolvimento vegetativo do milho	64
4.2	Efeito da inoculação nos teores de N, P e K das folhas de milho	677
4.3	Efeito da inoculação nos componentes de produção e produtividade da cultura do milho	689
4.4	Efeito da inoculação nos teores de N, P e K dos grãos de milho	73
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES	81
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8	ANEXOS.....	899
1	CAPÍTULO 2 – EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE INOCULANTE FORMULADO A PARTIR DAS ESTIRPES Ab-V5 E Ab-V6 DA BACTÉRIA <i>Azospirillum brasilense</i> NA CULTURA DO MILHO.....	91
2	INTRODUÇÃO	93
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	955
3.1	Localização e caracterização das áreas experimentais	955
3.2	Delineamento experimental	977
3.3	Instalação e condução dos experimentos	977
3.3.1	Correção da fertilidade do solo	977
3.3.2	Inoculação das sementes	988
3.3.3	Semeadura	999
3.4	Variáveis avaliadas	999
3.4.1	Variáveis biométricas	999
3.4.1.1	Diâmetro basal do colmo	100

3.4.1.2	Massa seca da parte aérea.....	100
3.4.2	Análise dos teores de nitrogênio das folhas.....	100
3.4.3	Componentes de produção e produtividade.....	100
3.4.4	Análise dos teores de nitrogênio dos grãos.....	101
3.5	Análise estatística	101
4	RESULTADOS	102
5	DISCUSSÃO	1099
6	CONCLUSÕES	11313
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11414

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho em função de seu alto potencial produtivo e sua vasta utilização tanto na alimentação animal quanto na humana, constitui um dos principais cereais cultivados no mundo (DOURADO NETO e FANCELLI, 2004).

O Brasil se destaca na produção de milho ocupando o 3º lugar no ranking mundial, com uma área plantada de 15,8 milhões de hectares, para uma produção de 67 milhões de toneladas. Embora o Brasil tenha potencial para assumir a liderança mundial na produção deste cereal, a produtividade nos solos brasileiros ainda é baixa, cerca de 37,6% inferior a obtida nos Estados Unidos, país que ocupa a 1ª colocação na produção do milho (USDA, 2012; CONAB, 2012).

A cultura do milho tem entre suas características produtivas a alta dependência à fatores edafoclimáticos para expressar seu potencial. Vale ressaltar que, depois da água, um dos principais fatores limitantes para o alto rendimento da cultura é o nitrogênio (FERNANDES, 2006). Este nutriente está diretamente relacionado ao crescimento/desenvolvimento da cultura, influenciando significativamente a produtividade do milho (BULL e CANTARELLA, 1993; UHART e ANDRADE, 1995; ESCOSTEGUY *et al.*, 1997).

Porém, considerando que a maior parte do nitrogênio aplicado na cultura do milho é perdido no sistema solo-planta, e, ainda, que o uso excessivo da fertilização nitrogenada contribui para a contaminação do solo e de recursos d'água (ANGUS; 1995; BUMB, 1995), é crescente a busca por alternativas que venham substituir parcialmente o uso da fertilização nitrogenada em culturas como a do milho.

Assim, a utilização de biofertilizantes à base de microrganismos fixadores de nitrogênio e promotores do crescimento vegetal, pode se tornar uma alternativa viável em função de suprirem parcialmente o uso dos fertilizantes tradicionais, bem como, estimular o crescimento e desenvolvimento vegetal pela ação de substâncias promotoras do crescimento vegetal (COCKING, 2003). Dentre estes destaca-se, para gramíneas, as bactérias promotoras do crescimento vegetal do gênero *Azospirillum* por disponibilizarem o N₂ atmosférico para as plantas, produzirem substâncias promotoras de crescimento (auxinas, giberelinas e citocininas), entre outros efeitos positivos nas características de desenvolvimento e produtividade das plantas.

Várias estirpes com potencial de uso agrícola de *A. brasilense* já foram isoladas e classificadas. Os resultados obtidos são variáveis em função da inoculação de estirpes isoladas ou associação de mais de uma estirpe. Trabalhos com associação de mais de duas estirpes como é o caso do presente estudo são escassos e merecem atenção, pois podem trazer benefícios em função das interações planta-bactéria existentes que ainda são pouco compreendidas. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a inoculação, individual ou associada, das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *A. brasilense*, na cultura do milho, em diferentes áreas agrícolas do Sul do Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do Milho

O milho dentro de sua classificação botânica é uma monocotiledônea, pertencente à família Poaceae, subfamília Paniceae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. (DOEBLEY, 1990). É uma planta herbácea, monóica, anual, completando seu ciclo entre quatro e cinco meses após a emergência das plântulas (PONS e BRESOLIN, 1981). O gênero *Zea* é composto por um grupo de gramíneas nativas do México e da América Central (DOEBLEY, 1990), sendo conhecido na Europa após o retorno de Colombo que trouxe consigo plantas de milho coletadas em Cuba (FREITAS, 2001).

A espécie (*Zea mays*) é um dos principais cereais cultivados no mundo, em função do seu alto potencial produtivo, bem como, por suas características químicas e nutricionais. A cultura fornece vasta variedade de produtos que são utilizados tanto na alimentação animal, em especial a suinocultura, avicultura e bovinocultura de leite, nas formas de farelo, rações e silagem, para a alimentação humana, tanto na forma “in natura”, como milho verde, ou na forma de subprodutos processados como massas, farinhas e pães, bem como, a cada ano aumenta a utilização do cereal para produção do combustível etanol (DOURADO NETO e FANCELLI, 2004; SEAB, 2012).

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a produção mundial do cereal ultrapassou os 870 milhões de toneladas métricas na safra 2011/2012, incrementando em 14,6% a produção em relação à safra 2010/2011, que foi de 829 milhões de toneladas métricas. Segundo a mesma Instituição, os maiores produtores mundiais da cultura ainda são os Estados Unidos, produzindo 375,68 milhões de toneladas, seguido pela China (195 milhões de toneladas) e, ocupando o terceiro lugar, o Brasil, que na safra 2011/2012 produziu 67 milhões de toneladas (USDA, 2012).

A área estimada com milho no mundo na safra 2011/2012 é de 175,2 milhões de hectares, refletindo um aumento de 4% em relação ao ano anterior (USDA, 2012). No Brasil, a área semeada na primeira safra foi de 7,56 milhões de hectares. Porém, observa-se uma tendência de decréscimo na área cultivada no verão em

função da opção, por parte dos agricultores, pelo plantio da soja. Contudo, ocorre à expansão no plantio da segunda safra de milho, chegando a ser cultivado na safra atual (2011/2012) em 7,6 milhões de hectares. A soma das áreas cultivadas com o milho na primeira e a segunda safra na temporada 2011/2012 obteve taxa de crescimento de 9,8% quando comparado à área cultivada na safra anterior (2010/2011). Este acréscimo é resultado do aumento na área plantada nos principais estados produtores, Paraná e Mato Grosso (CONAB, 2012).

Para a próxima safra no Brasil (2012/2013) estima-se um recorde do cultivo deste cereal, tanto em área plantada, quanto em produção (CONAB, 2012). Mesmo sendo esperada uma quebra na safra do Sul do País, principalmente no Estado do Rio Grande do Sul, a produção nacional será maior devido ao aumento da área semeada, maior uso de tecnologias, bem como, em função das condições climáticas favoráveis, que são esperadas para a maioria dos Estados produtores brasileiros (CONAB, 2012).

Entretanto, um dos fatores que ainda influencia negativamente a produção da cultura no Brasil, é a baixa produtividade, tendo alcançado a média de 4.799 Kg ha^{-1} , sendo 37,6% inferior a obtida nos Estados Unidos, mesmo este País tendo passado por uma das maiores secas da história recente, o que resultou em quebra de 60% nos índices produtivos para a cultura na safra passada (CONAB, 2012).

2.2 Ecofisiologia da Cultura do Milho

2.2.1 Fenologia

A espécie *Zea mays* L. é uma planta que possui ciclo vegetativo variável, isso em função dos diferentes genótipos existentes, podendo ser de ciclo precoce, onde a polinização ocorre normalmente 30 dias após a emergência, e também genótipos com ciclos que podem alcançar 300 dias de cultivo. Porém, normalmente nas condições brasileiras, o milho apresenta ciclo entre 110 e 180 dias (superprecoce, precoce e normal), sendo esse período compreendido entre a semeadura e a colheita (FANCELLI e DOURADO NETO, 2005).

Os estádios fenológicos são subdivisões ou particularidades durante o ciclo de uma planta da mesma maneira como são as fases, entretanto, no caso dos estádios fenológicos, não se faz necessário que ocorra uma transformação na planta ao nível que órgãos venham aparecer ou desaparecer, em função de sua ocorrência. Logo os subperíodos são definidos como o tempo decorrido entre duas fases consecutivas (vegetativa e reprodutiva), sendo que nesse caso as necessidades e as estruturas das plantas são praticamente constantes. Desse modo, através da utilização de escalas fenológicas, pode se ter um maior detalhamento do ciclo da planta, já que o tempo decorrido entre duas fases distintas pode ser variável, além de demasiadamente longo. Assim, as aplicações dos estádios fenológicos são importantes para a determinação dos períodos críticos para a cultura em relação à deficiência hídrica, auxiliando nos períodos de maior exigência de água, o que facilita a elaboração de planos de zoneamento agrícola, épocas de aplicação de fertilizantes e defensivos, bem como, para classificar cultivares quanto a sua precocidade (BERGAMASCHI, 2006).

Existem diversas escalas fenológicas para a cultura, porém as mais utilizadas são as descritas por Hanway (1966) e por Ritchie *et al.* (1993). Nesse sentido, Fancelli e Dourado Neto (2005), adaptaram a escala de Hanway (1966), harmoniosamente com o ciclo de desenvolvimento geral apresentado pela cultura, subdividindo-a em cinco períodos: (1) germinação e emergência; (2) crescimento e desenvolvimento; (3) floração; (4) frutificação e (5) maturação fisiológica.

Entretanto, a escala mais utilizada no Brasil foi proposta por Ritchie *et al.* (1993), mesmo esses autores tendo definido esta escala originalmente em híbridos adaptados à região central do Estado de Iowa, nos Estados Unidos, a estabilidade das características morfológicas para a definição de cada fase fenológica utilizada em diversos ambientes e a fácil observação promoveram a aceitação e o uso desta escala em diferentes regiões produtoras (SANGOI *et al.*, 2010).

A avaliação da ontogenia da planta de milho utilizada na escala de Ritchie *et al.* (1993), subdivide o crescimento e desenvolvimento da planta em estádios vegetativos e reprodutivos (SANGOI *et al.*, 2010). Dessa maneira, os estádios referentes ao período vegetativo da cultura são representados pela letra V e por um número que varia de um a 18, que representam o número de folhas totalmente expandidas existentes na planta em determinado momento de seu crescimento vegetativo, sendo consideradas expandidas as folhas que apresentam a região do

colar totalmente visível (RITCHIE *et al.*, 1993). Porém, existem duas exceções na fase vegetativa que são os estádios VE e VT, sendo que estas representam a emergência da cultura e o início do pendramento, respectivamente.

Após o estágio VT, a escala proposta por Ritchie *et al.* (1993) utiliza a letra R associada a um número (de um a seis), que representa as subdivisões que caracterizam o estágio reprodutivo da cultura, desde o espigamento (R1) até o momento da maturação fisiológica representado pela sigla R6 (SANGOI *et al.*, 2010). Na Tabela 1, são apresentados os estádios fenológicos da cultura do milho segundo Ritchie *et al.* (1993).

Tabela 1. Estádios Fenológicos de uma planta de milho.

Estádios vegetativos	Estádios reprodutivos
VE – emergência	A – antese
V1 – primeira folha	R1 – florescimento e fecundação
V2 – segunda folha	R2 – grão leitoso
V3 – terceira folha	R3 – grão pastoso
V6 – sexta folha	R4 – grão farináceo
V9 – nona folha	R5 – grão farináceo-duro
V12 – décima segunda folha	R6 – maturidade fisiológica
V15 – décima quinta folha	
V18 – décima oitava folha	
VT - pendramento	

Fonte: adaptado de Ritchie *et al.* (1993).

Assim, a utilização dos estádios fenológicos para a cultura do milho torna-se importante para o planejamento da melhor época de implantação da cultura, bem como, para os estudos de diferentes materiais genéticos (MATZENAUER, 1997).

2.2.2 Temperatura

De maneira geral, a temperatura influencia o metabolismo das plantas através da atividade enzimática, em função de estar diretamente relacionada com a conformação e reações promovidas pelas enzimas (BONHOMME, 2000). Sob

condições de baixas temperaturas, as enzimas perdem a capacidade plástica de se alterarem, o que pode levar a não ocorrência da reação enzimática. Assim como, quando submetidas a temperaturas extremamente baixas, as enzimas sofrem uma coagulação formando novas estruturas que não possuem a capacidade de catalisar reações na planta. Já com a elevação da temperatura dentro de certos limites, a velocidade das reações enzimáticas é aumentada. Entretanto, a partir de determinada temperatura, a atividade enzimática é reduzida em função do aumento da agitação das moléculas fazendo com que estas venham a sofrer o processo de desnaturação (TAIZ e ZEIGER, 2004).

A cultura do milho é altamente responsiva às condições climáticas desde a germinação até a maturação fisiológica (BRUNINI *et al.*, 2006). São inúmeras as comprovações experimentais que apontam a temperatura como fator decisivo para o desenvolvimento da cultura, ainda que a água e outros fatores climáticos venham a influenciar diretamente nos processos de crescimento e desenvolvimento (SANGOI *et al.*, 2010).

Há uma faixa ótima de temperatura para que os processos fisiológicos venham a ocorrer normalmente na cultura do milho. Pascale (1953) verificou que temperaturas médias do ar na faixa de 25°C fazem com que as plantas venham a atingir seus estádios de crescimento e desenvolvimento mais rapidamente. Entretanto, temperaturas médias diárias abaixo de 19°C podem influenciar negativamente a cultura ocasionando perdas significativas e podendo tornar o cultivo inviável (PASCALE, 1953). Resultados semelhantes foram observados por Maddonni *et al.* (2006) ao trabalharem com diferentes híbridos de milho submetidos a variações de temperatura e luminosidade. Os autores verificaram redução no peso final dos grãos quando a cultura foi submetida a temperaturas médias diárias inferiores a 19°C e menor radiação solar, sendo os resultados justificados em função da menor taxa fotossintética corrente e pela menor partição de fotoassimilados nos grãos.

Temperatura elevada também contribui significativamente para a redução do potencial produtivo da cultura, sendo este, um dos fatores chave e que se associado à baixa disponibilidade hídrica reduz drasticamente a fotossíntese líquida em função do aumento da respiração (FANCELLI e DOURADO NETO, 2005). Esses mesmos autores também relatam que a cada grau de temperatura média diária superior a 21,1°C durante os primeiros 60 dias após a semeadura o período de florescimento é

antecipado de dois a três dias, fenômeno que pode reduzir significativamente o número de grãos das espigas. Contudo, Shaw (1977), descreve que as maiores produtividades para a cultura do milho são alcançadas durante os meses em que as temperaturas oscilam entre 21 e 27°C, não existindo um limite máximo, porém, a produtividade é reduzida quando da existência de temperaturas superiores as descritas anteriormente.

Também, a temperatura média noturna, possui grande influência no crescimento e desenvolvimento da cultura, sendo que temperaturas médias noturnas inferiores a 13°C causam perdas significativas na cultura (PASCALE, 1953), bem como, temperaturas acima de 24°C reduzem a taxa fotossintética líquida em função do aumento da respiração celular (FANCELLI e DOURADO NETO, 2005). Na literatura são encontrados trabalhos que demonstram respostas lineares no aumento da respiração com a elevação da temperatura noturna, influenciando também a translocação de solutos orgânicos e de nutrientes (LANDSBERG *et al.*, 1977). Nesse mesmo sentido, Andrade (1995) verificou que a temperatura noturna de 29,4°C, além de aumentar a senescência foliar, reduziu a produtividade em 60% quando comparado com a temperatura de 18,3°C.

No sul do Brasil, o início da semeadura deve ser realizado quando o solo estiver com temperatura igual ou superior à 16°C, isso porque temperaturas inferiores a esse valor propiciam uma emergência lenta, favorecendo o ataque de patógenos de solo, o que reduz o estande, incrementa a desuniformidade de emergência, bem como, aumenta o período crítico de competição com plantas espontâneas (SANGOI, 1993). Sendo que, semeadura realizada no final do inverno e início da primavera, época em que o solo ainda se encontra com temperaturas mais baixas, estende o período de emergência das plântulas para 13 dias quando comparado com o mesmo material semeado no início do verão que emerge mais rapidamente, em média seis dias após a distribuição das sementes no solo (SANGOI, 1993).

Dessa maneira, à medida que a temperatura do solo aumenta, ocorre um aumento na divisão celular do embrião, acelerando o desenvolvimento, alongação de raízes seminais, coleóptilo e do mesocótilo, resultando na redução do sub-período de semeadura e emergência (DENMEAD e SHAW, 1962). Assim, temperaturas médias do solo entre 25 e 30°C, propiciam melhor emergência, bem como, ótimo crescimento vegetativo das plantas (FANCELLI e DOURADO NETO,

2005). Já temperaturas médias superiores a 32°C, tendem a reduzir significativamente a germinação do grão de pólen, influenciando diretamente o rendimento final da cultura.

A utilização da temperatura média do ar em escala diária (graus-dia) é um dos métodos para relacionar a temperatura e o desenvolvimento da cultura do milho. Essa escala baseia-se no acúmulo térmico diário necessário para que a planta atinja um determinado estágio fenológico do seu desenvolvimento (NESMITH e RITCHIE, 1992).

A estimativa da soma das unidades diárias de calor (UC), a partir da emergência até que o material utilizado venha a atingir um determinado estágio fenológico, ocorre pela diferença da temperatura média diária e as temperaturas mínima e máxima exigidas pela espécie (FANCELLI e DOURADO NETO, 2005). Sendo esse acúmulo de unidades calóricas ou graus-dia mais preciso na avaliação do desenvolvimento da cultura do que o calendário baseado em dias (PEREIRA et al., 2002). Segundo Fancelli e Dourado Neto (2005) este método é usado principalmente para diferenciar o ciclo das cultivares até pendoamento/espigamento. Neste sentido, híbridos hiper-precoces necessitam de menos 780 UC para florescer, híbridos super-precoces entre 780 – 830 UC, precoce entre 831 – 890 UC e os normais ou tardios menos de 890 UC.

Assim torna-se importante o conhecimento das exigências térmicas para a cultura do milho, desde a semeadura até a maturidade fisiológica da cultura, em função da previsão do início e duração de cada estágio fenológico da cultura, sendo esse conhecimento importante para a tomada de decisões no campo (STEWART et al., 1998).

2.2.3 Fotoperíodo

O fotoperíodo é um importante fator climático que afeta diretamente a cultura do milho, de maneira diferente entre cultivares, sendo este representado pela quantidade de horas de luz solar incidente na planta (ANDRADE et al., 1991).

O milho é considerado uma planta neutra ou de dias curtos, sendo seu desenvolvimento afetado pela quantidade de radiação solar, de maneira que as maiores produtividades são alcançadas sob condições de radiação solar elevada (REICHARDT, 1987; FANCELLI e DOURADO NETO, 2005). O fotoperíodo crítico

para a cultura do milho é de aproximadamente de 12h, sendo que, dias com menor tempo de luz estimulam a transformação do meristema apical em primórdio floral (SANGOI *et al.*, 2010). Nesse sentido, cultivares de milho sensíveis ao fotoperíodo submetidas há dias longos, podem aumentar a permanência do período vegetativo, retardando a floração, aumentando a estatura da planta e consequentemente prolongando o ciclo da cultura (ANDRADE *et al.*, 1991). Também, Warrington e Kenamasu (1983) observaram que em condições de fotoperíodo longo, durante a fase indutiva da cultura do milho, ocorre maior produção de primórdios foliares e atraso no processo de floração, o que aumenta a soma térmica até o período da antese.

Andrade *et al.* (1996) ressaltam que o cultivo de milho em altas latitudes, em caso de atraso no processo de semeadura, resulta em exposição da cultura a fotoperíodo mais longo durante a fase indutiva. Isto gera aumento significativo da soma térmica até a floração, fazendo com que o sub-período de enchimento de grãos ocorra em uma fase de acentuada redução de luminosidade prejudicando significativamente o rendimento da cultura. Dessa maneira, os programas de melhoramento da cultura vêm trabalhando no intuito de reduzir a sensibilidade do milho às variações edafoclimáticas, o que possibilitou a expansão da cultura em diversas regiões do globo terrestre (SANGOI *et al.*, 2010).

2.2.4 Radiação solar

A radiação solar é única fonte de energia para a realização dos processos fisiológicos que ocorrem nos vegetais, sendo a fotossíntese, o processo biológico que pode converter a energia solar em energia química (BLACKENSHIP, 2002). Ainda vale salientar que o conhecimento da energia livre que entra em um determinado sistema agrícola, bem como, o metabolismo da cultura em questão são necessários para que possa ser estimado o potencial produtivo da cultura (STEWART *et al.*, 2003). Assim, a produção de biomassa pelas plantas depende da absorção da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos por suas folhas, bem como, da eficiência da planta em converter a radiação solar em energia química pelo processo fotossintético (BERGAMASCHI *et al.*, 2010).

O milho é uma planta que possui metabolismo C4 de fixação de carbono. Esse fato, associado a sua grande área foliar, faz com que a cultura seja altamente eficiente na conversão de energia luminosa em química (ANDRADE, 1996). Neste sentido, o milho tem elevado potencial e habilidade fisiológica na conversão de carbono em compostos orgânicos (FANCELLI e DOURADO NETO, 2005). O carbono estocado na forma de compostos orgânicos são translocados dos órgãos fotossinteticamente ativos (fontes) para órgãos drenos, onde são estocados ou metabolizados. Assim, a produtividade do milho possui uma correlação positiva com a radiação incidente no dossel da cultura (JONG *et al.*, 1982).

A capacidade máxima de conversão de CO₂ em biomassa nas plantas é dependente de condições ótimas, ou seja, não devem sofrer qualquer tipo de estresse. Plantas em condições de déficit hídrico, por exemplo, podem ter sua capacidade de interceptação de radiação reduzida em função do enrolamento das folhas (MÜLLER e BERGAMASCHI, 2005). Nesse sentido, Kunz *et al.* (2007) relataram redução na eficiência fotossintética das plantas de milho, em função do enrolamento das folhas, quando estas foram submetidas a diferentes intensidades de déficit hídrico. Estes resultados corroboram com os obtidos por Bergamaschi *et al.* (2010) que obtiveram redução de até 20% na interceptação da radiação fotossinteticamente ativa nas plantas de milho submetidas a déficit hídrico.

Outro fator determinante para o sucesso da assimilação de CO₂ é a fertilidade do solo, particularmente a quantidade de nitrogênio disponível devido este nutriente ser fator limitante para a formação de fitocromo e clorofila nas folhas (DEWAR, 1996; SCOTT GREN *et al.*, 2003).

2.2.5 Exigência hídrica

A disponibilidade de água geralmente é o principal fator limitante que afeta o potencial produtivo da cultura do milho, sendo que a cultura possui uma exigência de precipitação entre 400 e 600 mm durante o decorrer de seu ciclo (FANCELLI e DOURADO NETO, 2005). Para estes autores, o consumo diário da cultura pode variar entre 3,5 e 4,5 mm durante o estágio vegetativo, e de 5 a 7 mm durante o florescimento e enchimento dos grãos. Entretanto, em condições especiais o consumo pode chegar a 10 mm diários.

O maior consumo de água pela cultura do milho ocorre, principalmente, no período de florescimento, em função do índice de área foliar estar em seu máximo potencial durante esse estágio. Este fato se deve a ser este o momento de determinação do rendimento da cultura e pelos processos fisiológicos ligados à formação do zigoto e o início do enchimento dos grãos, bem como, pela elevada taxa de transpiração das plantas (BERGONCI e BERGAMASCHI, 2002). Nesse estágio de desenvolvimento, a ocorrência de déficit hídrico resulta em maior abortamento das estruturas reprodutivas, reduzindo significativamente o número de grãos produzidos por espiga e diminuindo drasticamente o rendimento final de grãos (ANDRADE *et al.*, 1996; FANCELLI e DOURADO NETO, 2005).

A exigência hídrica da cultura também pode ser mais elevada durante o período de enchimento dos grãos, pois, durante esse período, teoricamente, a radiação solar é elevada e as temperaturas médias diárias variam entre 25 e 30°C o que faz as plantas alcançarem altas taxas fotossintéticas (ANDRADE, 1992). Sendo que, a ocorrência de déficit hídrico durante o enchimento de grãos afeta diretamente a massa de mil grãos, que é um dos principais componentes de produção relacionados à cultura (ANDRADE *et al.*, 1996; FANCELLI e DOURADO NETO, 2005). Nesse sentido, Mojaddaam *et al.* (2012) trabalhando com diferentes lâminas de irrigação em diferentes genótipos de milho no Iran, verificaram que reduções entre 20 e 40 % no fornecimento de água resultou em menor número de grão por fileira, menor massa de mil grãos, bem como, menor produtividade.

O milho é considerado uma das espécies agrícolas mais sensíveis à deficiência hídrica, principalmente, durante o florescimento. Entretanto, a cultura é descrita como uma das que possui maior eficiência no uso da água. Essa aparente aquerência pode ser explicada em função dos diferentes conceitos de tolerância à seca e eficiência do uso da água. A tolerância da seca é a capacidade que uma espécie possui de apresentar produtividade satisfatória sob condições de limitação hídrica. Já a eficiência do uso da água é medida pela relação entre a quantidade de água perdida pela evapotranspiração por uma espécie e sua produção de matéria seca, ou seja, é a habilidade que essa espécie possui em converter a água absorvida em matéria seca (ANDRADE *et al.*, 1996; SANGOI *et al.*, 2010).

Assim, a cultura do milho, quando cultivada sob condições ótimas de fornecimento de água, tende a converter eficientemente o recurso hídrico disponível em massa de matéria seca e consequentemente em altas produtividades.

Entretanto, depois da água, o nitrogênio é um dos principais fatores limitantes na produtividade da cultura do milho, tendo em vista que este nutriente está diretamente relacionado à formação de fitocromo e clorofila, interferindo diretamente nos processos fotossintéticos da planta (DEWAR, 1996; SCOTT GREN *et al.*, 2003).

2.3 Nitrogênio e a cultura do milho

2.3.1 Importância do nitrogênio na cultura do milho

O nitrogênio é o nutriente mais requerido pela cultura do milho, entretanto, em muitas situações, é suprido insuficientemente (AMADO *et al.*, 2002). Segundo estes autores, quando em condições favoráveis de temperatura, radiação solar e água, a quantidade de nitrogênio requerida para alcançar grandes produtividades de grãos pode ultrapassar a 150 Kg ha^{-1} .

O elemento nitrogênio é o único dos nutrientes minerais absorvido pelas plantas em duas formas diferenciadas, sendo uma delas na forma nítrica (NO_3^-) e a outra, na forma amoniacal (NH_4^+). Porém, as plantas de milho absorvem esse nutriente principalmente na forma de NO_3^- , que será reduzido posteriormente a NH_4^+ , por meio da ação sequencial das enzimas nitrato e nitrito redutase (YAMADA, 1996). Assim, a nitrato redutase é responsável pela transformação do NO_3^- em nitrito (NO_2^-) e a nitrito redutase realiza a transformação do NO_2^- para NH_4^+ . O NO_3^- também pode ser acumulado no vacúolo ou ainda exportado para as diferentes partes da planta, sendo o transporte para as folhas realizado via xilema, embora a redistribuição a partir das folhas até os outros órgãos da planta ocorra predominantemente na forma de aminoácidos via floema (FERNANDES, 2006).

Esse nutriente determina o desenvolvimento do milho, aumentando significativamente a área foliar, a biomassa de matéria seca e a produtividade da cultura (UHART e ANDRADE, 1995; ESCOSTEGUY *et al.*, 1997). A influência do nitrogênio no crescimento e desenvolvimento das plantas de milho está carregada na função desse nutriente em constituir moléculas orgânicas de grande importância nas plantas, como: aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e citocromos, além de ser fator chave na formação das moléculas de clorofilas e nos processos de

divisão celular, pois é agente estrutural das bases nitrogenadas (BULL e CANTARELLA, 1993).

A deficiência de nitrogênio afeta diferentes mecanismos nas plantas de milho, entre eles, a área foliar e consequentemente a taxa fotossintética. Influencia também o período de duração das folhas verdes, reduzindo a assimilação de CO₂ pelas plantas, o que reflete diretamente no potencial produtivo da cultura (MALAVOLTA, 2006). A falta de nitrogênio nas plantas, também afeta diretamente o crescimento do sistema radicular do milho, bem como, o tamanho das espigas e a massa dos grãos (MELGAR *et al.*, 1991). A deficiência desse nutriente ainda está relacionada à menor altura, diâmetro do colmo e ao acamamento e quebramento das plantas (GODOY JUNIOR e GRANER, 1964). Nesse sentido, Cruz *et al.* (2005) trabalhando com diferentes épocas e parcelamentos na adubação nitrogenada, verificaram redução significativa nos componentes de produção e produtividade nas plantas que não receberam adubação nitrogenada. Também Cruz *et al.* (2008) trabalhando com adubação nitrogenada na cultura do milho em sistema de plantio direto no Estado de Alagoas, verificaram que a altura de plantas, o diâmetro do colmo e a produtividade da cultura foram reduzidas significativamente em função da aplicação de baixas doses de nitrogênio na cultura.

Em relação à época de aplicação do nitrogênio para a cultura do milho, recomenda-se que este elemento seja aplicado de 30 a 40% na semeadura, e o restante em cobertura, no momento em que as plantas se encontram entre o estágio V4 e V8 (PÖTTKER e WIETHÖLTER, 2004). Porém, segundo Coelho *et al.*, (1992) a grande maioria dos técnicos e agricultores brasileiros relatam que quanto mais fracionada for a adubação nitrogenada, maior será o aproveitamento desse nutriente para a cultura em função da redução de perdas por lixiviação. Dessa maneira é importante ressaltar que, depois da água, o nitrogênio é o principal fator limitante para o crescimento e desenvolvimento da cultura do milho. Porém, deve ser levada em consideração que a quantidade de nitrogênio disponível no solo é variável, sendo influenciada pela cultura antecessora, pelos processos de imobilização, mineralização, bem como, pelas condições edafoclimáticas e sistemas de cultivo (COELHO *et al.*, 1992).

2.3.2 Dinâmica do nitrogênio no solo

Mineralização e imobilização

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante na atmosfera, hidrosfera e biosfera terrestre, entretanto, 99% do N existente não se encontra de forma disponível para a grande maioria dos seres vivos (GALLOWAY *et al.*, 2003). Aproximadamente, 78% do total do ar atmosférico é formado por nitrogênio, porém, este se encontra em uma forma molecular (N_2), não disponível para as plantas.

Existe uma divisão em dois grupos dos componentes de nitrogênio na natureza, sendo o N não reativo e o reativo. Assim, a forma não reativa é a diatômica (N_2) e as formas reativas incluem todas as formas de nitrogênio biologicamente ativas. O N reativo é subdividido em componentes inorgânicos reduzidos nas formas de amônia (NH_3), amônio (NH_4^+), formas inorgânicas oxidadas como óxido de nitrogênio (NO_x), ácido nítrico (HNO_3), óxido nítrico (N_2O) e nitrato (NO_3^-) e ainda na forma de componentes orgânicos, uréia, aminas, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (BEZERRA, 2009).

No solo, o nitrogênio está sujeito a simultâneos processos de mineralização e imobilização (AITA, 1997). A mineralização do N orgânico presente no solo é definida como um processo de transformação do nitrogênio na forma orgânica para a inorgânica. Esse processo é realizado por diferentes microrganismos heterotróficos presentes no solo que utilizam os compostos orgânicos presentes na matéria como fonte de energia (CANTARELLA, 2007). Durante esse processo, inúmeras enzimas, principalmente proteases e desidrogenases, são acionadas para agirem nos vários processos de quebra das ligações existentes nas moléculas de proteínas, peptídeos, aminas, aminoácidos e ácidos nucleicos (MOREIRA e SIQUEIRA 2002; CANTARELLA, 2007).

O processo de mineralização do nitrogênio orgânico do solo pode elevar o pH do solo em função do consumo de prótons que ocorre durante o processo realizado pela microbiota. Nesse sentido, Moreira e Siqueira (2002), destacam que as condições ótimas para a atividade microbiana no solo são: umidade entre 50 e 70 % da capacidade de retenção, temperatura entre 40 e 60°C, presença de oxigênio e pH entre 6 e 7. Porém, os mesmos autores comentam, que, em função da grande

quantidade e variedade de microrganismos existente, as reações de mineralização do nitrogênio ocorrem sob ampla gama de condições de acidez, temperatura e umidade.

A imobilização do N no solo ocorre simultaneamente com a mineralização, entretanto, no sentido contrário. Dessa maneira, a imobilização é definida como mudança do nitrogênio que se encontra na forma inorgânica para a forma orgânica (CANTARELLA, 2007). Esse processo ocorre pela ação de microrganismos especializados que incorporam o N inorgânico presente no solo às suas células, porém, quando estes morrem, o nitrogênio assimilado pode retornar a forma inorgânica, bem com, serem incorporados a células de outros microrganismos.

A incorporação de resíduos orgânicos no solo tende a aumentar o conteúdo de nitrogênio orgânico, sendo esse processo influenciado pelos fatores de frequência e quantidade de aplicação, qualidade do material orgânico, formas de incorporação, variações climáticas, relação C/N e presença de microrganismos no solo (JANSSON e PERSSON, 1982). Entretanto estes mesmos autores descrevem que se o resíduo utilizado possuir altos teores de lignina e baixo teor de nitrogênio, a relação C/N será alta, porém, pode não resultar na imobilização do N em função da lignina ser uma fonte com pouca energia para os microrganismos. Nesse sentido, Kennedy *et al.* (2007) descreve que a decomposição de resíduos vegetais pelos microrganismos presentes no solo tem dependência direta com o maior teor de N presente no resíduo do que o teor de lignina, podendo afetar negativamente a disponibilidade do nitrogênio inorgânico presente no solo.

Para que ocorra equilíbrio entre os processos de mineralização e imobilização do N, a relação C/N presente no resíduo deve ser de 20 a 30, sendo que nestas condições, a disponibilidade do nitrogênio inorgânico presente no solo não será afetada (CANTARELLA, 2007). Dessa maneira, a utilização dos resíduos vegetais pelos microrganismos para a obtenção de energia é dependente do conteúdo de nitrogênio presente no resíduo, sendo que a baixa presença do N no resíduo pode fazer com que o processo pare pela falta do produto (N). Nesse caso, os microrganismos podem vir a buscar o nitrogênio que se encontra disponível no solo, imobilizando a biomassa e, dependendo da condição, podem criar situações de deficiência nas plantas (SILVA *et al.*, 1999).

Volatilização de amônia

A perda do nitrogênio pela volatilização é um dos principais fatores que irão determinar a eficiência da adubação nitrogenada em sistemas agrícolas. O processo consiste na perda do nitrogênio na forma gasosa para a atmosfera (MARTA JÚNIOR, 2003). Esse processo é influenciado por diversos fatores como, pH do solo, temperatura, velocidade do vento, umidade do solo e do ar, teor de matéria orgânica, textura do solo, bem como e pela presença de microrganismos que sintetizam a enzima uréase (LARA CABEZAS *et al.*, 1997; VILAS BOAS, 1999; CANTARELLA e DUARTE, 2004).

A urease é uma enzima extracelular sintetizada por bactérias actinomicetos e fungos presentes no solo e em restos vegetais. Essa enzima é responsável pela hidrólise da uréia, que rapidamente se converte em carbonato de amônio, que se desdobra em gás (NH_3), CO_2 e água (TROEH e THOMPSON, 2007).

Lixiviação de nitrato

O ânion nitrato tem baixa interação química com os minerais do solo, fazendo com que o NO_3^- esteja sujeito à lixiviação para as camadas mais profundas do solo, podendo atingir águas superficiais ou lençóis freáticos (CANTARELLA, 2007). A caracterização da lixiviação do nitrato esta relacionada a fatores que ocorrem simultaneamente, que são a dinâmica da percolação das águas, mineralização da matéria orgânica do solo, a demanda do nitrogênio pela planta e a possibilidade de absorção do nitrogênio em relação à colonização do solo pelas raízes (PONS; CAPILLON; CHEVERRY, 2000).

O processo de lixiviação do N no solo diminui a quantidade desse nutriente nas camadas de maior efetividade do sistema radicular das plantas, sendo a forma mais lixiviada o nitrato, seguido pelo amônio e nitrogênio oriundo da matéria orgânica presente no solo (GONÇALVES; CERETTA; BASSO, 2000). Os mesmos autores também descrevem que o nitrato é a forma mais lixiviada em função da repelência natural de cargas negativas que prevalecem na camada mais superficial do solo.

A lixiviação do nitrato, como já relatado, não é apenas um problema relacionado a fertilidade dos solos agrícolas ou a disponibilidade desse para as plantas. Sabe-se que, elevadas concentrações de nitrato na água utilizada para consumo podem causar doenças de distúrbios fisiológicos em crianças, conhecidos como metahemoglobinemia (bebê azul), doença relacionada ao mau funcionamento do transporte de oxigênio pelas hemácias, bem como, problemas de hipóxia em águas, o que pode resultar em ambientes desfavoráveis para a criação de peixes e crustáceos como já relatado no golfo do México (HOEFT, 2003). Problemas relacionados ao excesso de nitrato no ambiente fizeram com que governos como os dos Estados Unidos e da União Europeia regulamentassem, o controle de práticas agrícolas, limitando as dosagens de fertilizantes nitrogenados (CANTARELLA, 2007).

Nesse contexto, é de extrema importância a busca por tecnologias alternativas que venham reduzir a utilização da adubação nitrogenada no sistema agrícola atual. Assim, a fixação biológica de nitrogênio é um processo natural e já difundido para algumas culturas, que pode vir ser uma solução, ao menos parcial, para a redução da adubação em culturas como a do milho, que necessitam de altas demandas de fertilizantes nitrogenados para o seu desenvolvimento.

Ciclo do nitrogênio

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes que mais limita o crescimento/desenvolvimento vegetal, ficando atrás apenas do carbono (C), do hidrogênio (H) e do oxigênio (O). Esse elemento apesar de ser encontrado em abundância no planeta, pelo fato de ser constituinte de aproximadamente 78% do ar atmosférico, encontra-se na forma de dinitrogênio (N_2), forma essa pouco reativa podendo ser utilizado apenas por um grupo seleto de microrganismos procariotos que possuem o complexo enzimático da nitrogenase, estando indisponível para absorção e assimilação pelas plantas (BHATIA; RUPPEL; NARULA, 2009).

A obtenção do nitrogênio atmosférico requer a quebra da tripla ligação existente entre os dois átomos nitrogênio (N_2) para reduzi-lo a amônia (NH_3) ou a nitrato (NO_3^-). As reações para esse processo são chamadas de fixação de nitrogênio e podem ser obtidas por processos industriais ou naturais (TAIZ e

ZEIGER, 2004). A obtenção do nitrogênio pelo processo industrial exige uma grande demanda de energia, em função de ser realizado sob altas temperaturas (aproximadamente 200°C) e alta pressão (cerca de 200 atmosferas). Sob essas condições, o N_2 se combina com átomos de hidrogênio para a formação de amônia, sendo essa forma de fixação de nitrogênio, conhecida como *Haber-Bosch* (TAIZ e ZEIGER, 2004). Entretanto, como já comentado, o N_2 pode ser fixado por processos naturais. Dentre estes, encontra-se a fixação realizada pela ação de relâmpagos, que irão converter o vapor de água atmosférico e oxigênio em radicais hidroxilas altamente reativas, formando átomos de hidrogênio e de oxigênio livre, que irão reagir com o N_2 , formando o ácido nítrico (HNO_3) que em função das chuvas precipita para o solo terrestre (SCHLESINGER, 1997).

Outro processo de redução do N_2 atmosférico é realizado por reações fotoquímicas entre o óxido nítrico gasoso (NO) e o ozônio (O_3), resultando na produção de HNO_3 . Porém, processos realizados por relâmpagos e reações fotoquímicas contribuem com apenas 10% do nitrogênio fixado naturalmente. A forma de maior significância em relação a redução do N_2 é a realizada pela fixação biológica de nitrogênio (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Cerca de 90% de todo o nitrogênio fixado naturalmente no planeta é realizada pela ação de microrganismos presentes no solo pelo processo de fixação biológica de nitrogênio, processo realizado por bactérias e cianobactérias especializadas que possuem o complexo enzimático nitrogenase, reduzindo o N_2 atmosférico para a forma de amônio (NH_4^+) e, assim, podendo ser absorvido e assimilado pelas plantas. Após a fixação do N_2 em nitrato ou amônio, o N entra em seu ciclo biogeoquímico, no qual pode passar por diferentes formas orgânicas e inorgânicas antes que volte à sua forma molecular.

Assim, a fixação biológica de nitrogênio desempenha um importante papel no aporte de nitrogênio para as espécies vegetais nos diferentes ecossistemas naturais existentes, bem como, para os diferentes sistemas agrícolas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

2.4 Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada um dos processos mais importantes para a manutenção da vida na terra, bem como, o principal processo realizado por microrganismos relacionado à produção agrícola, em função da capacidade que esses possuem em converter o nitrogênio atmosférico em amônio por processos enzimáticos (DOBEREINER, 1997). Dessa maneira, estima-se que no mundo, a fixação biológica de nitrogênio em áreas cultivadas contribua com aproximadamente 32 t ano^{-1} (FILOSO *et al.*, 2006). Assim, a incorporação pela FBN nos diferentes ecossistemas do planeta é bastante elevada, tendo influência direta na economia de energia fóssil, que é normalmente empregada na produção de fertilizantes nitrogenados (REIS *et al.*, 2004).

Os microrganismos diazotróficos responsáveis pela fixação do N_2 podem ser de vida livre, associativos ou realizarem simbioses com plantas leguminosas (DIXON e KHAN, 2004). Esses autores também relatam que o processo de fixação biológica de nitrogênio é parte fundamental do ciclo biogeoquímico do N, uma vez que realiza a manutenção dos níveis de nitrogênio no solo.

Todos os microrganismos que possuem a capacidade de fixar o N_2 atmosférico são procariotos, sendo essa habilidade atribuída aos super-reinos Archaea e Eubacteria (REIS *et al.*, 2004). Já em relação às características fisiológicas, os microrganismos que fixam N_2 , podem ser aeróbicos (*Azobacter*), anaeróbios facultativos (*Klesiella*) ou anaeróbicos (*Clostridium*). Esses microrganismos diazotróficos são encontrados em uma grande variedade de locais, incluindo os de vida livre nos solos e na água, em associação simbiótica no intestino de insetos, em simbiose com espécies vegetais leguminosas e associados a gramíneas (DIXON e KHAN, 2004).

Os microrganismos pertencentes a esses grupos possuem o complexo enzimático da nitrogenase, que atua na hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) e na transferência de elétrons para o processo de redução do N_2 atmosférico até NH_3 (REIS *et al.*, 2004).

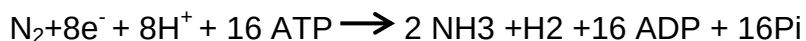
2.4.1 Complexo nitrogenase

A nitrogenase é um complexo enzimático que catalisa a redução biológica do N_2 atmosférico a amônia usando ATP na ausência de oxigênio (DIXON e KAHN,

2004). Este complexo é composto por duas unidades proteínicas distintas denominadas de acordo com a sua composição de metal. O componente menor, a dinitrogenase redutase, é uma enzima dimérica, chamada de ferro proteína, que funciona como um doador de elétrons dependente de ATP para o componente maior heterotetramero, chamado de proteína ferro-molibdênio (Fe-Mo) que possui duas subunidades ($\alpha_2\beta_2$) (HOWARD e REES, 1994; REES e HOWARD, 2000). A codificação das proteínas envolvidas na redução do N_2 é realizada pelo gene *nif* (nitrogen fixation) (REES e HOWARD, 2000). Assim, a ferro proteína é codificada pelo gene *nifH* que irá captar a força redutora e a energia, bem como, contém o sítio ativo para a redução do N_2 (EINSLE, 2002). Já a proteína Fe-Mo, é codificada pelo gene *nifDK* que tem a função de coletar e reduzir o substrato (RAYMOND *et al.*, 2004). A Fe-Mo é caracterizada por possuir dois tipos de centro metálicos, o centro P [8Fe-7S] e o cofator Fe-Mo [homocitrato $MoFe_7S_9$]. Já a Fe-proteína apresenta um centro metálico [4Fe-4S] que atua como um agente de ligação entre as subunidades do dímero (SEEFELDT *et al.*, 2004; DIXON e KAHN, 2004). A hidrólise do ATP para a doação de elétrons realizada pela Fe-proteína é codificada pelo gene *nifH*. Assim, a nitrogenase redutase (Fe-proteína, *nifH*) libera elétrons para a dinitrogenase (Fe-Mo) (ZEHR *et al.*, 2003; SEEFELDT *et al.*, 2004; DIXON e KAHN, 2004).

Os avanços relacionados ao estudo da fixação biológica de nitrogênio, demonstraram que o complexo enzimático da nitrogenase pode atuar com diferentes formações independentemente da presença do molibdênio (Mo). Nesse contexto, Bishop *et al.* (1980) e Robson *et al.* (1986) verificaram que existem sistemas diferenciados ou alternativos para a ação da nitrogenase, onde em condições de ausência, o Mo pode ser substituído por vanádio (V), gerando um complexo enzimático contendo este elemento como cofator. Ainda existe a possibilidade de na ausência do Mo e V uma nitrogenase alternativa ser sintetizada apenas na presença de Fe. Nesse sentido, alguns organismos como, por exemplo, *Azobacter vinelandii* e *Rhodobacter capsulatus*, possuem a capacidade de induzirem a síntese das nitrogenases alternativas contendo vanádio-ferro ou ferro-ferro (EADY, 1996; EINSLE, 2002; SEEFELDT *et al.*, 2004; DIXON e KAHN, 2004).

A estequiometria global da redução do N_2 sob condições normais é a seguinte:



Assim, sob condições normais, a redução do substrato irá envolver três formas de transferência de elétrons, a redução da Fe-proteína por carreadores de elétrons chamados de ferredoxina, a transferência de um elétron da Fe-proteína para a proteína Fe-Mo por um processo dependente de ATP, sendo necessário 2 ATPs para cada elétron transferido, e ainda, a transferência de elétrons para o substrato ligado ao sítio ativo da proteína Fe-Mo e essa reduz o N_2 a $2 NH_3$ e um H_2 (Figura 1).

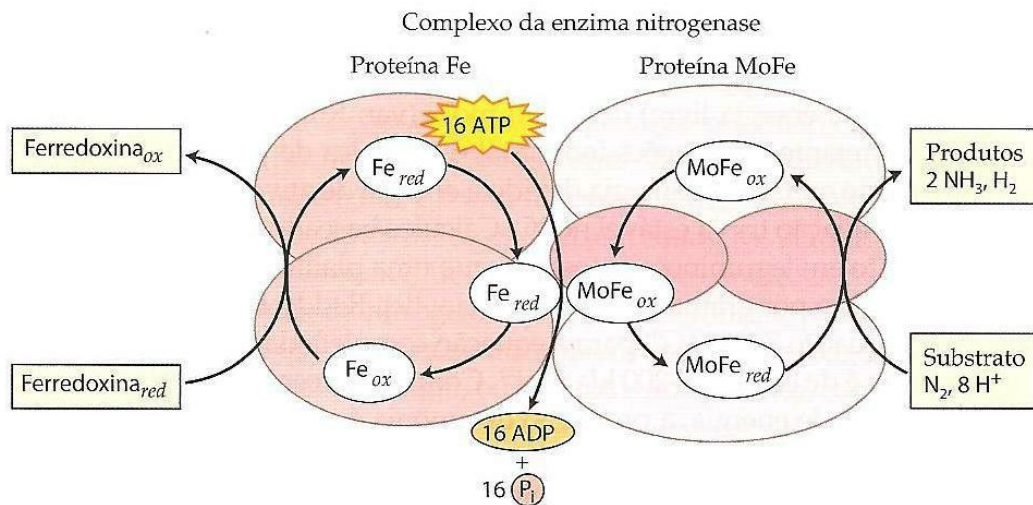


Figura 1. Reação catalisada pela nitrogenase.

Fonte: Taiz e Zeiger (2004).

Dentre os processos de FBN na natureza, pode se destacar a simbiose entre as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e as plantas de soja, isso em função da soja ser uma espécie agrícola de grande importância e altamente dependente do nitrogênio para o alcance de altas produtividades. Sendo que, em condições normais de cultivo, a FBN é capaz de suprir a demanda total de nitrogênio para essa leguminosa (HUNGRIA *et al.*, 2006)

Entretanto, devido aos avanços nas pesquisas relacionados à busca por microrganismos que possam ser utilizados como alternativa para a fixação biológica em gramíneas, essa vem se tornando uma realidade crescente diante do cenário agrícola, demonstrando ótimo potencial da fixação biológica de nitrogênio para culturas como a do milho.

2.5 Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas

A FBN em gramíneas é considerada não-simbiótica ou apenas associativa. Nesse sistema, não há a formação de nódulos e os microrganismos colonizam desde a superfície do sistema radicular das plantas até o interior dos tecidos, sendo, neste caso, chamadas de bactérias endofitas ou endofíticas (DÖBEREINER, 1992).

Na literatura são encontradas diferentes definições para o termo endofíticas. Dessa maneira, Kloepper e Beauchamp (1992), definiram como endofíticos, microrganismos (bactérias e fungos) que colonizam o interior das raízes e promovem efeitos benéficos para as plantas. Döbereiner (1992), descreveu como endofíticas, as bactérias diazotróficas, levando em consideração a habilidade de algumas bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* em colonizarem o interior dos tecidos vegetais sem causar danos.

Os microrganismos endofíticos são atraídos do solo para as raízes das plantas em função da liberação de exsudatos orgânicos (quimiotaxia) e assim, penetram os tecidos do sistema radicular, podendo alcançar os diferentes órgãos, como folhas, caules e flores. Sendo a penetração nos tecidos é realizada por meio de excreção de enzimas hidrolíticas como as celulasas e pectinases ou por aberturas naturais existentes na planta (QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997). Posteriormente, as mesmas disponibilizam N₂ atmosférico em formas assimiláveis as plantas, bem como, estimulam crescimento/desenvolvimento vegetal pela síntese de substâncias promotoras do crescimento (OKON e LABANDERA-GONZALES, 1994).

É crescente o interesse na fixação biológica em plantas não leguminosas, principalmente em gramíneas (BODDEY *et al.*, 1995; KENNEDY *et al.*, 1997; JAMES, 2000). Sendo que, o Brasil possui longa tradição em trabalhos voltados a FBN em gramíneas devido aos trabalhos pioneiros realizados a partir da década de 1970 pela Doutora Joana Döbereiner e seus colaboradores (DÖBEREINER e DAY, 1976; DÖBEREINER *et al.*, 1976). Nas ultimas décadas, houve um aumento significativo do número de trabalhos que evidenciam a contribuição da fixação biológica de nitrogênio em gramíneas de interesse econômico. Entre elas destacam-se a cana-de-açúcar, o arroz, as gramíneas forrageiras e o milho (SHRESTHA e LADHA, 1996; GARCIA de SALOMONE *et al.*, 1996; MALIK *et al.*, 1997; JAMES, 2000; URQUIAGA *et al.*, 2012). Segundo Roesch *et al.* (2006), a cultura do milho

apresenta alto potencial para se explorado em termos de inoculação, isso devido ao fato de ser colonizado simultaneamente por vasta diversidade de bactérias diazotróficas.

Nesse sentido, são encontrados na literatura diversos trabalhos com a inoculação de bactérias associativas em diferentes espécies de gramíneas, demonstrando incrementos na massa seca das plantas, no acúmulo de nutrientes, bem como, na produtividade (SALOMONE e DÖBEREINER, 1996; OKON e VANDERLEYDEN, 1997; CAVALLET *et al.*, 1998; CAVALLET *et al.*, 2000; DOBBELAERE *et al.*, 2002; CAVALCANTI ALVES, 2007; ZILLI *et al.*, 2008; HUNGRIA *et al.*, 2010; HUNGRIA, 2011).

Entretanto, a grande maioria dos pesquisadores atribui os resultados positivos obtidos com a inoculação de bactérias associativas não somente a fixação biológica do N₂, mas principalmente aos efeitos desses microrganismos na promoção do crescimento vegetal em função da síntese de fitohormônios como giberelinas, auxinas e citicininas (BERGAMASCHI, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2006).

2.6 Microrganismos promotores do crescimento vegetal

Um dos fatores mais relevantes se tratando de bactérias diazotróficas endofíticas esta relacionado à promoção do crescimento vegetal. Esses microrganismos podem contribuir tanto para a sanidade vegetal, quanto, para o crescimento e desenvolvimento das plantas em que se encontram associados (GLICK, 1995; KINKEL *et al.*, 2000; STURZ *et al.*, 2000; KUKLINSKY-SOBRA, 2003).

Dessa maneira, Okon e Labandera-Gonzales (1994) verificaram que 60 a 70 % dos experimentos de campo com a associação de bactérias diazotróficas endofíticas, realizados nos últimos 20 anos, foram bem sucedidos, alcançando aumentos entre 5 e 30% no rendimento das plantas. Os aumentos nos rendimentos não são explicados somente na fixação do N₂ devido ao fato dessa contribuição ser considerada baixa, mas também, pela ação de substâncias promotoras de crescimento vegetal sintetizadas por estes microorganismos (BASHAN e HOLGUIN, 1997).

Na literatura são encontrados vários relatos relacionados a existência de mecanismos diretos de promoção do crescimento vegetal promovidos pelas bactérias diazotróficas, além da fixação de nitrogênio. Dentre esses mecanismos, destacam-se a produção de hormônios vegetais como ácido indol 3-acético (AIA), ácido giberélico (GA3), zeatina (Z) e ácido abscísico (ABA) (BASHAN *et al.*, 2004)., bem como, algumas substâncias reguladoras como poliaminas (THULER *et al.*, 2003), particularmente a cadaverina (DAC), a qual pode ser correlacionada com a promoção do crescimento das raízes. Sendo que estes mecanismos, atuando simultaneamente ou em sistema sucessivo, promovem o crescimento das plantas (BASHAN e LEVANONY, 1990; PERRIG *et al.*, 2007). Além disso, esses microrganismos atuam na regulação da 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) que é a enzima precursora da síntese de etileno nas plantas. Assim, a bactéria controla a síntese de etileno, reduzindo os níveis desse hormônio, o que inibe a elongação das raízes, aumentando, dessa forma, a formação de pêlos radiculares, causando assim, modificações na morfologia do sistema radicular da planta (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1998; KHALID *et al.*, 2004; GLICK, 2005; PEDROSA *et al.*, 2011).

Nesse contexto, existem diversas espécies de bactérias diazotróficas com características para promover o crescimento vegetal, porém, dentre elas, a espécie *Azospirillum brasilense* vem demonstrando ótimos resultados a campo, com alto potencial para a produção de inoculantes comerciais, em função da sua capacidade de auxiliar o crescimento e desenvolvimento das diferentes culturas existentes no planeta (BASHAN *et al.*, 2004).

2.7 Espécie *Azospirillum brasilense*

A bactéria *A. brasilense* é um diazotrofo encontrado em associação com importantes espécies vegetais agrícolas, sendo considerada um microrganismo endofítico facultativo, pois, além de colonizar o hospedeiro, pode sobreviver no solo na forma de cisto e, ou, utilizar a poli- β -hidroxibutirato como fonte de carbono (BALDANI *et al.*, 1997). Esta bactéria constitui um dos grupos mais estudados e com numerosos trabalhos sobre sua ecologia, fisiologia e genética (BALDANI *et al.*, 1997; BASHAN e HOLGUIN, 1997; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). A.

brasiliense possui a capacidade de reduzir o N_2 atmosférico em amônio pelo complexo enzimático da nitrogenase, formado por duas proteínas, a dinitrogenase reductase e a dinitrogenase, codificadas pelos genes *nifHDK* (DIXON e KAHN, 2004).

A espécie, *A. brasiliense*, possui alta motilidade, que, aliada à quimiotaxia positiva para determinados ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos, confere a mesma, uma vantagem importante sobre os demais microrganismos existentes na rizosfera das plantas (BARAK *et al.*, 1983; REINHOLD *et al.*, 1985; ZHULIN *et al.*, 1988).

O metabolismo do carbono e do nitrogênio demonstrado pela espécie é muito dinâmico e variado. As fontes de carbono preferidas são os ácidos orgânicos como o malato, piruvato, succinato, frutose e glicose (DÖBEREINER, 1992). Em relação às fontes de nitrogênio além do N_2 atmosférico, essas podem utilizar amônia, nitrito, nitrato e aminoácidos.

A inoculação das plantas com *A. brasiliense* pode resultar em alterações significativas em vários parâmetros relacionados ao crescimento/desenvolvimento das plantas. A grande maioria dos estudos sobre a associação de *A. brasiliense* com plantas foram realizados em diferentes espécies de gramíneas e em menor quantidade com outras espécies (PATRIQUIN *et al.*, 1983; BASHAN *et al.*, 1989; DEL GALLO e FABBRI, 1990; FAVILLI *et al.*, 1993).

Resultados de alguns estudos com a inoculação de *A. brasiliense* em diferentes espécies de cereais, demonstraram efeito positivo nos mais variados caracteres das plantas, como, por exemplo, o aumento do número de grãos, maior massa de matéria seca, maior área foliar, aumento do sistema radicular, aumento no número de espigas, maior porcentagem de germinação de sementes, bem como, incrementos produtivos (BALDANI e DÖBEREINER, 1980; ALBRECHT *et al.*, 1981; BHATTARAI e HESS, 1993; DOBBELAERE *et al.*, 2002; ZILLI *et al.*, 2008; HUNGRIA *et al.*, 2010; HUNGRIA, 2011). Assim, esta bactéria foi recentemente recomendada como inculante para a promoção do crescimento para as culturas do milho e trigo no Brasil.

Nesse contexto, tornam-se indispensável à realização de mais trabalhos relacionados a fixação biológica do nitrogênio e a promoção do crescimento vegetal com os microrganismos já descobertos, bem como, a busca por novas alternativas que venham a reduzir o uso da fertilização nitrogenada em culturas de alta demanda

como a do milho, reduzindo assim, custos de implantação e a contaminação do solo e da água, sendo estes objetivos a serem alcançados no sistema agrícola atual.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALCANTI ALVES, G. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho.** 2007, 65p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

CAVALCANTI ALVES, G. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho.** 2007, 65p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

AITA, C. Dinâmica do nitrogênio no solo durante a decomposição de plantas de cobertura: feito sobre a disponibilidade de nitrogênio para a cultura de sucessão. In: FRIES, M.R.; DALMOLIN, R.S.D. (Coord.) **Atualização em recomendação de adubação e calagem: ênfase em plantio direto.** Santa Maria: Palltti, p. 76-111, 1997.

ALBRECHT, S.L.; BENNET, J.M.; QUESENBERRY, K.H. Growth and nitrogen fixation of *aeschynomene* under water stressed conditions. **Plant and Soil**, v.60, n.2, p.309-315, 1981.

AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.241-248, 2002.

ANDRADE, F.H. Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcarce, Argentina. **Field Crops Research**, v. 41, p.1-12, 1995.

ANDRADE, F.H. et al. **Ecofisiologia del cultivo de maíz.** Buenos Aires: Dekalb Press, 1996. 292p.

ANDRADE, F.H. **Radiación y temperatura determinan los rendimientos máximos de maíz.** Balcarce, Argentina: Instituto Nacional de tecnologia agropecuária. 1992. 34p. (Boletín Técnico, 106).

ANDRADE, F.H., UHART, S.; ARGUISSAIN, G. **Rendimiento potencial de maíz en Balcarce: analisis de los factores que lo determinan.** Balcarce, Argentina: Instituto Nacional de tecnologia agropecuária. 1991. 11p. (Boletín Técnico, 101).

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, v.62, p.45-151, 1998.

BALDANI, V.L.D. et al. *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.69, p.116, 1997.

BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.12, p.433-439, 1980.

BARAK, R.; NUR, I.; OKON, Y. Detection of chemoraxis in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Blatimore, v. 152, p. 643-649, 1983.

BASHAN, Y. et al. *Azospirillum* - plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, p.521-577, 2004.

BASHAN, Y., SINGH, M., AND LEVANONY, H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Canadian Journal of Botany**, v. 67 p. 2429-2434, 1989.

BASHAN, Y.; AND HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p.591-605, 1990.

BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas às raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006, 71p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BERGAMASCHI, H. et al. Intercepted solar radiation by maize crops subjected to different tillage systems and water availability levels. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.12, p.1331-1341, 2010.

BERGONCI, J.I.; BERGAMASCHI, H. Ecofisiologia do milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24., 2002, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Embrapa Milho e Sorgo; Epagri, 2002.

BEZERRA, M. O. **Dinâmica do nitrogênio e sua implicação na qualidade da água em uma bacia hidrográfica com diferentes tipos de uso de solo com ênfase no papel da floresta ripária**. 2009, 131p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciência, Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BHATIA, R. RUPPEL, S. NARULA, N. NifH-based studies on azobacterial diversity in cotton soils of Indian. **Archive Microbiology**, v. 191, n. 11, p. 807-813, 2009.

BHATTARAI T., HESS D. Yield responses of Nepa-lese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.151, p. 67-76, 1993.

BISHOP, P.E.; JARLENSKI, D.M.L.; HETHERINGTON, D.R. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.150, p.1244-1251, 1980.

BLANKENSHIP, R.E. **Molecular Mechanisms of Photosynthesis**. Oxford, United Kingdom: Blackwell Science Ltd.,. 2002.

BODDEY, R.M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.195-209, 1995.

BONHOMME, R. Bases and limits using degree.day units. **European Journal of Agronomy**, v. 13, p. 1-10, 2000.

BRUNINI, O. et al. Características macroclimáticas, agrometeorológicas e restrições ambientais para o cultivo de milho em regiões tropicais baixas. **Infobios**, Campinas, v.1, n.3, 2006.

BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho**: Fatores que afetam a produtividade. Vitoria: **Potafos**, 301p. 1993.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F. et al. (Eds.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, p. 375-470, 2007.

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

CAVALCANTI ALVES, G. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho**. 65p. 2007. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

CAVALETT, L. E. et al. Corn productivity in response to nitrogen application and seed inoculation with *Azospirillum* spp. **Journal Agricultural Environmental Engineering**, v. 4, p. 129-132, 2000.

CAVALLET, L. E. et al. Produtividade do milho em função da aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com o produto comercial "Graminante" à base de *Azospirillum* spp. In: FERTIBIO, 1998, Caxambu. **Resumos....** Caxambu, p. 352, 1998.

COELHO, A. M. et al. Doses e métodos de aplicação de fertilizantes nitrogenados na cultura do milho sob irrigação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.16, p.61-67, 1992. 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento, 2012**. Brasília, 2012. 36 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 15 de Dez. 2012.

CRUZ, C. S. et al. Adubação nitrogenada para o milho cultivado em sistema de plantio direto, no Estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. V. 12, n. 1, p.62-68, 2008.

CRUZ, J. C. et al. **Resposta de cultivares de milho à adubação nitrogenada em cobertura**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 65 p. (Comunicado Técnico 116).

DEL GALLO, M.; FABBRI, P. Inoculation of *Azospirillum brasilense* Cd on chick pea (*Cicer arietinum*). **Symbiosis**, v. 9, p. 283-287 1990.

DENMEAD, O.T.; & SHAW, R.H. Availability of soil water to plants as affected by moisture content and meteorological conditions. **Agronomy Journal**, v.54, p. 385-390, 1962.

DEWAR, R.C. The correlation between plant growth and intercepted radiation: an interpretation in terms of optimal plant nitrogen content. **Annals of Botany**, v.78, p.125-136, 1996.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 621–631, 2004.

DOBBELAERE S. et al. Responses of agronomic-ally important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology** 28:871–879, 2001.

DÖBEREINER J., MARRIEL I. E. AND NERY M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, p. 1464-1473, 1976.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in tropics: Social and economic contribution. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p. 771-774, 1997.

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: SBCS, p. 173-180, 1992.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganism and nitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J.N. (Eds.) **First international symposium on nitrogen fixation**. Washington: Proceedings. p.518-538, 1976.

DOEBLEY, J. 'Molecular evidence for gene flow among *Zea* species'. **BioScience**, v.40, p. 443-448, 1990.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A.L. **Produção de milho**. 2 ed. Guaíba: Agropecuária, 2004, 360 p.

EADY, R.R. Structure-function relationships of alternative nitrogenase. **Chem Ver**, v. 96, p. 3013–3030, 1996.

EINSLE, O. et al. Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-Cofactor. **Science**, v. 297 p. 1696–1700, 2002.

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

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Milho: Tecnologia e Produção**. Piracicaba: ESALQ/ USP/ LVP, 2005. 149 p.

FAVILLI, F., PASTORELLI, R., AND GORI, A. Response of sugar beet to *Azospirillum* bacterization in field experiments. **Agric. Mediterr.**, v.123, p. 281-285, 1993.

FERNANDES, F.C.S. **Dinâmica do nitrogênio na cultura do milho (*Zea mays* L.) em cultivo sucessivo com aveia preta (*Avena strigosa*), sob implantação do sistema plantio direto**. 2006, 197 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

FILOSO, S. et al. Human activities changing the nitrogen cycle in Brazil. **Biogeochemistry**, v. 79, p. 61-89, 2006.

FREITAS, F. de O. **Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (*Zea mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)**. 2001, 125p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2001.

GALLOWAY J. N. et al. The nitrogen cascade. **BioScience** v. 53, p. 341–356, 2003.

GARCIA DE SALOMONE, I.E. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p.249-256, 1996.

GLICK B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiol Letters**, v. 251, p. 1–7, 2005.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p. 109-117, 1995.

GODOY JÚNIOR, C.; GRANER, E.A. Milho: adubação mineral nitrogenada. IV Parcelamento do calnitro. **Revista de Agricultura**, v.39, p. 185-189, 1964.

GONÇALVES, C. N.; CERETTA, C. A.; BASSO, C. J. Sucessões de culturas com plantas de cobertura e milho em plantio direto e sua influência sobre o nitrogênio do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 153-159, 2000.

HANWAY, J.J. Growth stages of corn (*Zea mays* L.). **Agronomy Journal**, Madison, v.55, n.5, p.487-492, 1966.

HOEFT, R. G. **Desafios para a obtenção de altas produtividades de milho e soja nos EUA**. Piracicaba: Potafós, 2003. 4 p. (Informações agronômicas, 104).

HOWARD, J. B. REES, D. C. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 235-264, 1994.

HUNGRIA, M. et al. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, v.288, p.343-356, 2006.

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

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 20 p. (Documentos, 325).

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, p. 197-209, 2000.

JANSSON, S.L.; PERSSON, J. Mineralization and immobilization of soil nitrogen. In: STEVENSON, F.J (ed.). Nitrogen in Agricultural Soils. Agronomy, n° 22, 1982, 229-252 p.

JONG, S.K.; BREWBAKER, J.L.; LEE, C.H. Effects of solar radiation on the performance of maize in 41 successive monthly plantings in Hawaii. **Crop Science**, n. 22, p. 13-18. 1982.

KENNEDY, I.R. et al.. Biological nitrogen fixation in non-legumes field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, v.194, p.65-79, 1997.

KHALID, A. et al. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96 p.473-480, 2004.

KINKEL, L. L.; WILSON, M.; LINDOW, S. E. Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. **Microbial Ecology**, v. 39, p.1-11, 2000.

KLOPPER, J.W.; BEAUCHAMP. C.J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.1219-1232, 1992.

KUNKLINSKY-SOBRAL, J. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003, 174p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2003.

KUNZ et al., Uso da radiação solar pelo milho sob diferentes preparos do solo, espaçamento e disponibilidade hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.11, p.1511-1520, 2007

LANDSBERG, J.J.; CUTTING, C.V. **Environmental effects on crop physiology**. New York: Academic Press, 1977. 388p.

LARA CABEZAS, W.A.R. Volatilização de NNH_3 na cultura de milho: II. Avaliação de fontes sólidas e fluídas em sistema de plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.21, p.489-496, 1997.

MADDONNI, G. A.; OTEGUI, M. E. Intra-specific competition in maize: contribution of extreme plant hierarchies to grain yield, grain yield components and kernel composition. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 97, p. 155-166, 2006.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres. 2006. 638 p.

MALIK, K. A. et al. Association of nitrogen-fixing plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 37-44, 1997.

MARTHA JR., G.B. **Produção de forragem e transformações do nitrogênio do fertilizante em pastagem irrigada de capim-Tanzânia**. 2003, 149p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2003.

MATZENAUER, R. Caracterização fenológica de cultivares de milho em avaliação no Estado do Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, 42 e REUNIÃO TÉCNICA DO SORGO, 25., 1997, Erechim, RS. **Anais...** Erechim, 1997, p.334-341.

MELGAR, R. J. et al. Rates and dates of nitrogen fertilizer application for maize on a latossol in the central Amazonia region. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 289-296, 1991.

MENDONÇA, M. M.; URQUIAGA, S. S.; REIS, V. M. Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.

MOJADDAM, M.; TORKII, T. A.; ABADOUZ, G. R. Effect of Irrigation amount on yield componentes and water use Efficiency of corn hibrids. **American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2012.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. 625p.

MÜLLER, A.G.; BERGAMASCHI, H. Efficiency of interception, absorption, and photosynthetically active radiation use in maize crops (*Zea mays* L.) submitted to diferente water conditions and dry matter estimation by energetic model. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.13, p.27-33, 2005.

NESMITH, D. S. & RITCHIE, J. T. Short and long term responses of corn to a pre anthesis soil water deficit. **Agronomy Journal**, Madison, v.84, p.107-113, 1992.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.7, p.366-370, 1997.

PASCALE, A.J. Mapa fenológico do milho en la Republica Argentina. **Meteoros**, v.3, n.4, p.383-394, 1953.

PATRIQUIN, D. G., DÖBEREINER J., and JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 900-915, 1983.

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v7, n.5, May, p. 1-10, 2011.

PEREIRA, A.R.; ANGELOCCI, L.R.; SENTELHAS, P.C. **Agrometeorologia: Fundamentos e Aplicações Práticas**. Guaíba: Livraria e editora Agropecuária, 2002. 478p.

PERRIG, D. et al. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.1143-1150, 2007.

PONS, A.L.; BRESOLIN, M. **A cultura do milho**. Porto Alegre: IPAGRO-SEAGRI, 1981. 100p.

PONS, Y.; CAPILLON, A.; CHEVERRY, C. Water movement and stability of profiles in drained, clayey and swelling soils: at saturation, the structural stability determines the profile porosity. **European Journal of Agronomy**, London, v, 12, p. 269-279, 2000.

PÖTTKER, D.; WIETHÖLTER, S. Épocas e métodos de aplicação de nitrogênio em milho cultivado no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1015-1020, 2004.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p.254-259, 1997.

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

REES, D. C.; HOWARD, J. B. 2000 Nitrogenase: standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, n.4, 559–566.

REES, D.C.; HOWARD, J B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p.559-566, 2000.

REICHARDT, K. - **A Água em Sistemas Agrícolas**. São Paulo: Editora Manole Ltda. , 1987. 188p.

REINHOLD B, HUREK, T. FENDRIK, L. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. **Journal of Bacteriology**, v. 162, p. 190-195, 1985.

REIS, V. M. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. **How a corn plant develops**. Ames: State University of Science and Technology, 1993. 21p.

ROBSON, R. L. et al. Second gene (nifH*) coding for a nitrogenase iron-protein in *Azotobacter chroococcum* is adjacent to a gene coding for a ferredoxin like protein. **EMBO Journal**, Oxford, v. 5, p. 1159-1163, 1986.

ROESCH, L. F. W. et al. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, n. 9, p. 967-974, 2006.

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

SANGOI, L. Aptidão dos campos de Lages (SC) para produção de milho em diferentes épocas de semeadura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 51-63, 1993.

SANGOI, L. et al. **Ecofisiologia da cultura do milho para altos rendimentos**. Lages: Graphel, 2010, 87p.

SCHLESINGER, W. H. **Biogeochemistry: na analysis of global cheng**. 2nd. San Diego: Academic Press. 1997. 588p.

SCOTT GREEN, D.; ERICKSON, J.E.; KRUGER, E.L. Foliar morphology and canopy nitrogen as predictors of light-use efficiency in terrestrial vegetation. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.115, p.163-171, 2003.

SEAB - Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. **Análise da conjuntura agropecuária safra 2011/12: Milho**. Curitiba: Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná, SEAB, 2012, 18 p.

SEEFELDT L. C.; DANCE I. G.; DENNIS R. D. Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo. **Biochemistry** 43:1401–1409, 2004.

SEEFELDT, L. C., DANCE, I. G.; DEAN, D. R. Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo. **Biochemistry**, v. 43, 1401-1409, 2004.

SHAW, R.H. Climate requirement. In: SPRAGUE, G.F. Corn and corn improvement. **American Society of Agronomy**, Madison, p. 599-617, 1977.

SHERSTHA, R. K.; LADHA, J. K.; Genotypic variation in promotion of rice nitrogen fixation as determined by nitrogen 15N dilution. **Soil Science America Journal**, Madison, v.60, p.1815-1821, 1996.

SILVA, C. A.; VALE, F. R. do; ANDERSON, S. J.; KOBAL, A. R. Mineralização de nitrogênio e enxofre em solos brasileiros sob influência da calagem e fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p.1679-1689, 1999.

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.

STEWART, D. W. et al. Canopy structure, light interception and photosynthesis in maize. **Agronomy Journal**, Madison, v. 95, p. 1465-1474, 2003.

STEWART, D.W.; DWYER, L.M.; CARRIGAN, L.L. Phenological Temperature Response of Maize. **Agronomy Journal**, v.90, p.73-79, 1998.

STURZ, A.V., CHRISTIE, B.R., AND NOWAK, J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p. 1–30, 2000.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THULER, D. S. et al. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. **Letters in applied Microbiology**, v. 37, p. 174-178, 2003.

TROEH, F. R.; THOMPSON, L. M. **Solos e fertilidade do solo**. 6ª 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**, Madison, v. 35, p. 1376-1383, 1995.

URQUIAGA, S. et al. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data of the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, V. 365, P. 5-21, 2012.

USDA (**Departamento de Agricultura dos Estados Unidos**). Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/portugues/>>. Acesso em 10 de Dez. 2012.

VILLAS BÔAS, D. M. F. **Estudo microbiológico de sistemas de lodos ativados com ênfase nas bactérias degradadoras de fenol**. 1999. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

WARRINGTON, I.J, KANEMASU, E.T. Corn growth response to temperature nad photoperiod I. seedling emergêne, tassel initiation and anthesis. **Agronomy Journal**, v.75, p.749-754, 1983.

YAMADA, T. **Adução nitrogenada do milho**: Quanto, como e quando aplicar? Piracicaba: Potafos, p.1-5, 1996.

ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M. & STEWARD, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. **Environ Microbiology**, v. 5, p. 539-554, 2003.

ZHULIN, I. B.; TRATYAKOVA, S. E.; IGNATOV, V. Chmatoxis of *Azospirillum* brasilense towards compouds typical of plant root exudates. **Folia Microbiologica**, Waschington, v. 33, p. 277-280, 1988.

ZILLI, J. E. et al. Rendimento de grãos da cultura do milho inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* no cerrado de Roraima. In: FERTBIO 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: SBSCS, 2008.

CAPÍTULO 1 – INOCULAÇÃO ISOLADA E ASSOCIADA DAS ESTIRPES Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 DE *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DO MILHO

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi avaliar a inoculação, individual ou associada, das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *A. brasilense*, na cultura do milho, em duas áreas agrícolas localizadas no extremo Oeste do Estado do Paraná. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro blocos e dez tratamentos. Os tratamentos foram formados pelas doses de 0, 60 e 120 Kg ha⁻¹ de nitrogênio, sem inoculação das sementes e a dose de 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio + inoculação individual e associada das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7. Foram realizadas avaliações biométricas durante o estágio de oito folhas definitivas (V8), bem como, avaliações dos componentes de produção e da produtividade no final do ciclo da cultura. Também foram avaliados os teores de N, P e K das folhas no início da floração feminina, bem como, os teores desses nutrientes presentes nos grãos. Os resultados da análise conjunta dos experimentos indicaram que todos os tratamentos com a inoculação das sementes resultaram em ganhos significativos para a cultura durante o estágio vegetativo. Os tratamentos com a inoculação da estirpe Ab-V7, e a associação entre as estirpes Ab-V5 + Ab-V6, Ab-V6 + Ab-V7 e Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7 foram favoráveis, resultando em ganhos significativos quanto aos componentes da produção e produtividade do milho.

PALAVRAS-CHAVE: Fixação biológica de nitrogênio; *Zea mays* L.; Promoção do crescimento vegetal; Fitormônios.

INDIVIDUAL INOCULATION AND STRAIN ASSOCIATED Ab-V5, Ab-V6 and V7 *Azospirillum brasilense* OF THE CORN

ABSTRACT: The aim of this work was to evaluate the inoculation, individual or associated strains Ab-V5, Ab-V6 and V7 *A. brasilense*, in corn, in two agricultural areas located in the extreme west of the state of Paraná. The experimental design was randomized block design with four blocks and ten treatments. The treatments were formed by the doses of 0, 60 and 120 kg ha⁻¹ of the nitrogen without seed inoculation and the dose of 60 kg ha⁻¹ of the nitrogen + individual inoculation and associated strains Ab-V5, Ab-V6 and Ab-V7. Biometric evaluations were performed during the final eight leaf stage (V8), as well assessments of components of output and productivity at the end of the crop cycle. We also evaluated the levels of N, P and K of the leaves at the beginning of female flowering, as well the levels of these nutrients in grains. The results of the analysis of the experiments indicated that all treatments with seed inoculation resulted in significant gains for the crop during the vegetative stage. The treatments with the inoculation strain Ab-V7, and the association between strains Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7, Ab-V6 and Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7 were favorable, resulting in significant gains as the components of the production and productivity of maize.

KEY-WORDS: Biological nitrogen fixation; *Zea mays* L.; Promotion of plant growth, plant hormones.

2 INTRODUÇÃO

O milho é um dos principais cereais cultivados, em função de seu alto potencial produtivo, bem como, por suas ótimas características químicas e nutricionais (DOURADO NETO e FANCELLI, 2004). No Brasil, a estimativa da área cultivada com este cereal somando a primeira e a segunda safra em 2012/2013 totalizará aproximadamente 15,8 milhões de hectares, sendo que a produção esperada venha ultrapassar 78 milhões de toneladas (CONAB, 2012).

A cultura do milho, pelo grande potencial produtivo é muito exigente quanto aos fatores edafoclimáticos para expressar seu potencial. Vale ressaltar que, depois da água, um dos principais fatores limitantes para o alto rendimento da cultura do milho é o nitrogênio (FERNANDES, 2006). Este nutriente está diretamente relacionado ao crescimento/desenvolvimento da cultura, influenciando significativamente a área foliar, biomassa e produtividade das plantas, assim como, é constituinte de moléculas orgânicas importantes como, aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e clorofila (BULL e CANTARELLA, 1993; UHART e ANDRADE, 1995; ESCOSTEGUY *et al.*, 1997). Entretanto, além do fato de 65% do nitrogênio aplicado ser perdido no sistema solo-planta, o uso excessivo da fertilização nitrogenada pode contribuir para a contaminação do solo e de recursos d'água com o nitrato (ANGUS; 1995; BUMB, 1995).

No modelo agrícola atual, é crescente a busca por alternativas que venham substituir parcialmente o uso da fertilização nitrogenada em culturas como a do milho. Nesse sentido, o interesse na fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas, principalmente em gramíneas, vem sendo objeto de pesquisa há alguns anos (BODDEY *et al.*, 1995; KENNEDY *et al.*, 1997; JAMES, 2000).

Os biofertilizantes utilizando microrganismos fixadores de nitrogênio podem influenciar o crescimento das plantas aumentando a produtividade através da combinação entre a fixação biológica de nitrogênio e a promoção do crescimento vegetal através da síntese de substâncias hormonais pelos microrganismos. Vários pesquisadores descrevem os benefícios da utilização de microrganismos promotores do crescimento em diferentes espécies de gramíneas como: cana-de-açúcar, arroz, forrageiras e milho (SHRESTHA e LADHA, 1996; GARCIA de SALOMONE *et al.*, 1996; MALIK *et al.*, 1997; JAMES, 2000; URQUIAGA *et al.*, 2012).

Existem diversas espécies de bactérias diazotróficas com características para promover o crescimento vegetal. Dentre elas o *Azospirillum brasilense* vem demonstrando resultados promissores a campo (REYNDERS e VLASSAK, 1982; SALOMONE e DÖBEREINER, 1996; CAVALLET *et al.*, 2000; ZEHNDER *et al.*, 2001; HUNGRIA *et al.*, 2010; GARCIA de SALOMONE *et al.*, 2010), possuindo grande potencial para a produção de inoculantes comerciais, em função da sua capacidade de auxiliar o crescimento e desenvolvimento das diferentes culturas gramíneas (BASHAN *et al.*, 2004).

A bactéria *A. brasilense* é um diazotrofo encontrado em associação com importantes espécies vegetais, sendo considerado um microrganismo endofítico facultativo (BALDANI *et al.*, 1997). Constitui um dos grupos mais estudados atualmente e com numerosos trabalhos sobre sua ecologia, fisiologia e genética (BALDANI *et al.*, 1997; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). *A. brasilense* possui a capacidade de reduzir o N₂ atmosférico em amônio pelo complexo enzimático da nitrogenase, bem como, em sintetizar hormônios como auxinas, citocininas, giberelinas, causando assim, modificações benéficas na morfologia do sistema radicular das plantas, culminando, em melhores condições para o seu desenvolvimento (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1998; KHALID *et al.*, 2004; DIXON e KAHN, 2004; GLICK, 2005; PEDROSA *et al.*, 2011).

Várias estirpes de *A. brasilense* já foram isoladas e classificadas. Os resultados obtidos são variáveis em função da inoculação de estirpes isoladas ou associação de mais de uma estirpe. Trabalhos com associação de mais de duas estirpes como é o caso do presente estudo são escassos e merecem atenção, pois podem trazer benefícios em função das interações planta-bactéria existentes que ainda são pouco compreendidas. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a inoculação, individual ou associada, das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *A. brasilense*, na cultura do milho, em duas áreas agrícolas localizadas no extremo Oeste do Estado do Paraná.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e caracterização das áreas experimentais

Os experimentos foram conduzidos em duas estações experimentais pertencentes à Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, localizadas nos municípios de Marechal Cândido Rondon e Pato Bragado no Estado do Paraná. As coordenadas geográficas das duas estações experimentais são: longitude de 54°22' W, latitude 24°46' S com altitude média de 420 metros e longitude de 54°13' W, latitude 24°37' S e altitude média de 288 metros, respectivamente.

O solo da estação experimental localizada no município de Marechal Cândido Rondon é classificado com Latossolo Vermelho Distroférrico de textura argilosa. Já o solo da estação experimental localizada no município de Pato Bragado é classificado como Latossolo Vermelho distrófico de textura argilosa (EMBRAPA, 2006). Ambas as áreas de condução dos trabalhos são manejadas há pelo menos mais de dez anos sob sistema plantio direto e em sucessão milho-soja.

Antes da instalação dos experimentos foram coletadas amostras de solo na profundidade 0-20 cm para caracterização química, que foi realizada pelo Laboratório de Química da UNIOESTE, *campus* de Marechal Cândido Rondon, PR. Os resultados de ambas as análises são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, PR, 2011/2012.

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

Tabela 2. Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. UNIOESTE, Pato Bragado, PR, 2011/2012.

Ca	Mg	K	Al ³⁺	H+Al	SB	CTC	MO	V	P	pH CaCl ₂
-----cmol _c dm ⁻³ -----							g dm ⁻³	%	mg dm ⁻³	
4,32	1,07	0,60	0,55	5,38	5,99	11,37	16,4	52,68	7,56	4,76

A precipitação pluviométrica e as temperaturas médias mensais incidentes durante a condução dos experimentos são apresentadas nas Figuras 1 e 2.

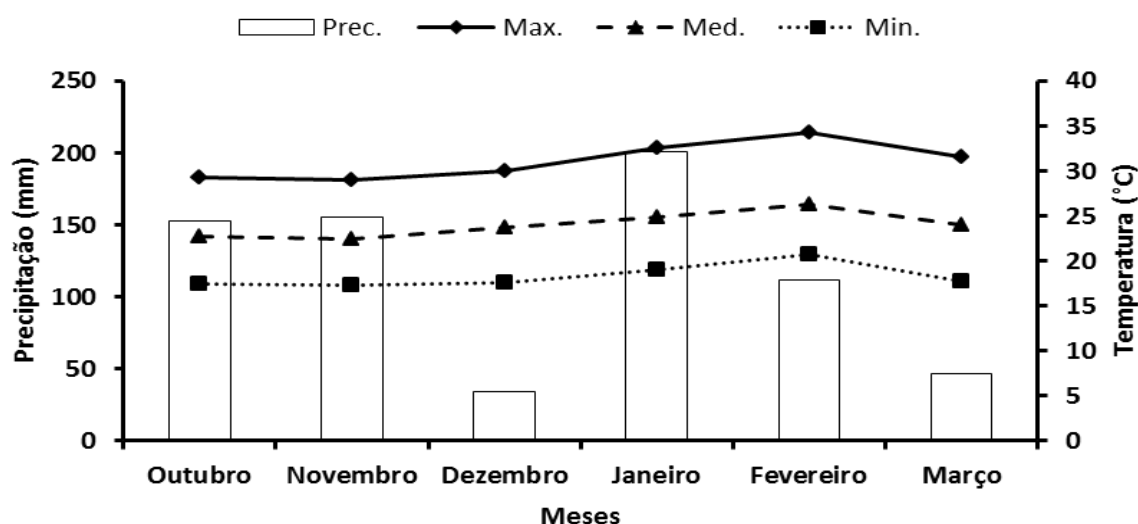


Figura 1. Precipitação pluviométrica acumulada e temperatura máxima, média e mínima mensal no período de outubro de 2011 a março de 2012. Estação experimental “Prof. Dr. Antônio Carlos Pessoa”. UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, PR.

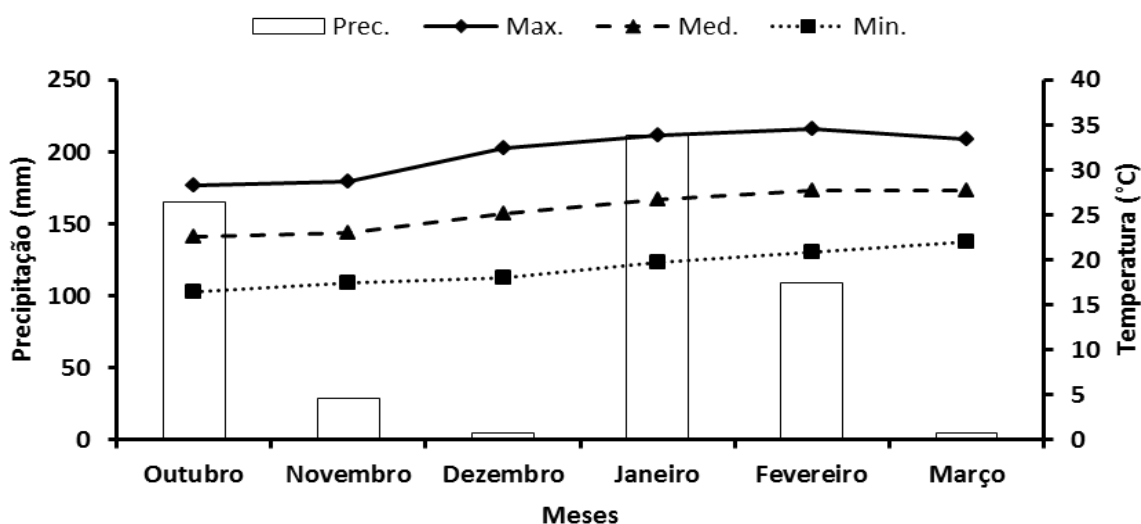


Figura 2. Precipitação pluviométrica acumulada e temperatura máxima, média e mínima mensal no período de outubro de 2011 a março de 2012. Estação experimental da UNIOESTE, Pato Bragado, PR.

3.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro blocos e dez tratamentos, totalizando 40 parcelas experimentais em cada local. A descrição dos tratamentos encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Descrição dos tratamentos utilizados nos experimentos

Tratamentos	Descrição dos tratamentos
0 N	Controle sem aplicação de nitrogênio e sem inoculação
60 N	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio sem inoculação
120 N	Dose de 120 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio sem inoculação
Ab-V5	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e inoculação das sementes com <i>Azospirillum brasilense</i> , estirpe Ab-V5
Ab-V6	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e inoculação das sementes com <i>A. brasilense</i> , estirpe Ab-V6
Ab-V7	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e inoculação das sementes com <i>A. brasilense</i> , estirpe Ab-V7
Ab-V5+Ab-V6	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e inoculação das sementes com <i>A. brasilense</i> , estirpes Ab-V5 + Ab-V6
Ab-V5+Ab-V7	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e inoculação das sementes com <i>A. brasilense</i> , estirpes Ab-V5 + Ab-V7
Ab-V6+Ab-V7	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e inoculação das sementes com <i>A. brasilense</i> , estirpes Ab-V6 + Ab-V7
Ab-V5+Ab-V6+Ab-V7	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e inoculação das sementes com <i>A. brasilense</i> , estirpes Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7

3.3 Instalação e condução dos experimentos

3.3.1 Correção da fertilidade do solo

A preparação de ambas as áreas experimentais foi iniciada 60 dias antes da semeadura, sendo realizada a calagem para elevar a saturação por bases a 70%. Necessidade esta, baseada no resultado da análise química do solo, sendo aplicado 2,5 e 2,04 t ha⁻¹ de calcário (100%) nas áreas experimentais de Marechal Cândido Rondon, PR e Pato Bragado, PR, respectivamente, conforme Pavan et al. (1992).

Conforme os resultados da análise química do solo e necessidades da cultura foram realizados a adubação de correção fosfatada e potássica com o auxílio de semeadora adubadora. No momento do sulcamento da área experimental aplicou-se a adubação de base com 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 40 kg ha⁻¹ de K₂O, em ambos os locais de realização dos experimentos, conforme Pavan et al. (1992).

A adubação nitrogenada foi dividida em três aplicações conforme a necessidade dos tratamentos utilizados, sendo aplicados 40% na semeadura e o restante aplicado em cobertura, em partes iguais, nos estádios V4 e V6, sendo utilizado como fonte a uréia.

3.3.2 Inoculação das sementes

Os inoculantes foram desenvolvidos pela equipe do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas, com sede no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. Os inoculantes contendo as estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 foram preparados separadamente, a partir de uma solução pura na concentração de 1x10⁹ unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹. A inoculação com as diferentes estirpes de *A. brasilense*, tanto individualmente, quanto, em associação foi realizada duas horas antes da semeadura. Para a inoculação individual das estirpes, foram utilizados 6 mL de inoculante para 1000 sementes de milho. Na inoculação combinada entre duas estirpes foi utilizada a metade desta proporção (3 mL da solução de cada estirpe) e, quando da inoculação com as três estirpes, utilizou-se 2 mL de cada solução.

3.3.3 Semeadura

A semeadura (plantio direto) foi realizada nos dias 10 e 14 de outubro de 2012, nos campos experimentais de Marechal Cândido Rondon, PR e Pato Bragado, PR, respectivamente. A mesma foi realizada com o auxílio de semeadora manual, distribuindo-se cinco sementes por metro no sulco de semeadura. Cada parcela experimental foi constituída de seis linhas de 0,70 m de espaçamento com 5 m de

comprimento e 3,5 m de largura, totalizando 17,5 m².

O material vegetal utilizado foram sementes do milho 30F53 (Pionner[®]), cujas principais características são: híbrido simples, ciclo precoce, elevada resposta ao aumento da adubação, redução do espaçamento e aumento da população de plantas. Na região sul é recomendado para o período normal de plantio.

Antes da semeadura e da inoculação, as sementes foram tratadas com fungicida (trichloromethylthio; cyclohex-4enedicarboximide) na dose de 0,2 kg por 100 kg de sementes, bem como, com inseticida (Imidacloprido; Tiodicarbe) na dose de 0,2 L por 100 kg de sementes.

3.3.4 Controle de pragas, doenças e plantas daninhas

Para o controle de pragas, foram realizadas duas aplicações de inseticidas. A primeira aplicação foi realizada com pulverizador costal, quando as plantas se encontravam no estágio V1, utilizando-se dois inseticidas, lufenuron, na dose de 2 mL L⁻¹ e lambdacyhalothrin, na dose de 2 mL L⁻¹. No momento em que as plantas se encontravam no estágio V3, foi realizada a segunda aplicação com os mesmo inseticidas, na mesma dosagem sendo estas realizadas com pulverizador tratorizado. Não foi necessário controle de doenças.

Antes da instalação do experimento a área passou por dessecação e após a semeadura as plantas daninhas foram controladas por meio de controle mecânico através de capina manual.

3.4 Variáveis avaliadas

3.4.1 Variáveis biométricas

No momento em que as plantas se encontravam no estágio vegetativo com oito folhas totalmente expandidas (V8), foram realizadas as avaliações biométricas, sendo retiradas três plantas de forma aleatória dentro da área útil de cada parcela. A partir destas plantas foram realizadas as seguintes avaliações:

3.4.1.1 Diâmetro basal do colmo

Antes da coleta foi realizado em cada planta a medida do diâmetro basal do colmo a 5 cm da superfície do solo, com auxílio de um paquímetro digital.

3.4.1.2 Área foliar

A área foliar foi determinada utilizando-se o método proposto por Benincasa (2003), com a retirada de amostras foliares de 15 cm² em dez folhas escolhidas aleatoriamente, sendo estas consideradas como área foliar da amostra (AF amostra). Posteriormente o material vegetal (amostras de folhas e folhas restantes) foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 65°C ± 2 °C, obtendo-se assim a massa seca da amostra (MS amostra) e a massa seca das folhas (MSF). Dessa forma, obteve-se a área foliar total das três plantas através da seguinte formula: [(AF amostra x MSF)/MS amostra]. Os resultados foram expressos em dm² por planta.

3.4.1.3 Massa seca da parte aérea

As plantas foram acondicionadas em sacos de papel kraft, devidamente identificados e posteriormente levadas para a secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C ± 2 °C por 120 h, em seguida essas foram retiradas dos sacos, pesadas em balança de precisão e os resultados foram expressos em g por planta.

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 do florescimento feminino (estádio R1), caracterizado pelo aparecimento dos estilos-estigmas na parte externa da espiga. Foi coletada a folha localizada abaixo e oposta à inserção da espiga principal de cada planta, num total de 10 folhas por unidade experimental, seguindo a metodologia proposta por Malavolta *et al.* (1997).

Posteriormente, as folhas foram lavadas em água destilada, acondicionadas em sacos de papel Kraft devidamente identificados e secas em estufa de circulação forçada de ar a $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72h. Após este procedimento as folhas foram moídas, retirando-se uma amostra 0,2 g de cada repetição, que posteriormente foram submetidas à digestão sulfúrica. Em seguida determinou-se o teor de nitrogênio do tecido foliar pelo método de destilação por arraste de vapores de acordo com a metodologia proposta por Tedesco *et al.* (1995).

Para a determinação dos teores de fósforo e potássio, retirou-se outra amostra de 0,2 g do tecido foliar moído e seco, sendo estas submetidas à digestão em ácido nítrico seguindo a metodologia proposta por Miyazawa *et al.* (2009). Utilizou-se 4 mL de HNO_3 e 4 mL de H_2O_2 , sendo o teor de P determinado por espectrofotometria UV-VIS de acordo com Braga e Defelipo (1974); O teor de K foi determinado por fotometria de chama.

3.4.3 Componentes da produção e produtividade

A colheita dos experimentos foi realizada nos dias 10 e 14 de fevereiro de 2012, nos campos experimentais de Pato Bragado, PR e Marechal Cândido Rondon, PR, respectivamente. Para este procedimento foram coletadas as espigas existentes em três metros nas três linhas centrais de cada parcela experimental.

Para a determinação dos componentes da produção foram amostradas 10 espigas de cada parcela experimental de forma aleatória, determinando-se os seguintes componentes: comprimento da espiga (cm), diâmetro da espiga (mm), número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileira e massa de mil grãos, sendo essa última determinada segundo Brasil (2009).

A produtividade foi determinada a partir da trilhagem dos grãos de todas as espigas coletadas na área útil de cada parcela experimental, sendo os resultados expressos em Kg ha^{-1} após a correção da umidade dos grãos para 13% (base úmida).

3.4.4 Análise dos teores de N, P e K dos grãos

Após a determinação da produtividade, foram retiradas amostras dos grãos, que foram moídas em moinho de facas (TE 450) com peneira de 2 mm para a determinação dos teores de N, P e K, conforme metodologia descrita anteriormente.

3.5 Análise estatística

Após tabulados, os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2008). Seguindo determinação de Pimentel Gomes (2000) em função do teste de variâncias dos resíduos realizou-se a análise conjunta dos experimentos. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS

Por meio da análise de variância conjunta foi detectado efeito significativo para todas as fontes de variação utilizadas. Entretanto, em relação ao efeito dos tratamentos (T) utilizados, observou-se diferença significativa para as variáveis biométricas e para os componentes da produção, bem como, para a produtividade obtida em ambos os locais (Anexo I), não havendo diferença significativa entre os tratamentos em relação aos teores de P e K das folhas e dos grãos de milho (Anexo II).

4.1 Efeito da inoculação no crescimento e desenvolvimento vegetativo do milho

Os resultados obtidos com a utilização dos tratamentos no presente trabalho sobre as plantas de milho no estágio vegetativo de oito folhas (V8) encontram-se na Tabela 4. Observou-se que a inoculação, isolada da estirpe Ab-V7 ou associação entre Ab-V5 + Ab-V7 e Ab-V6 + Ab-V7, proporcionou incremento significativo no diâmetro do colmo em relação aos demais tratamentos utilizados no experimento realizado em Marechal Cândido Rondon (L1). Nesse mesmo local também foram verificados incrementos significativos para a massa seca da parte aérea das plantas de milho em função da inoculação das sementes, porém, nesse caso todos os tratamentos com *A. brasilense*, exceto a estirpe Ab-V5 inoculada individualmente, foram superiores as doses de 0 e 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio, bem como, igualaram-se a maior dose utilizada (120 Kg ha⁻¹) (Tabela 4).

No experimento realizado em Pato Bragado, os resultados demonstraram a mesma tendência para as variáveis de diâmetro do colmo e massa seca da parte aérea, onde as estirpes Ab-V5 e Ab-V7 inoculadas individualmente ou em associação, bem como, a associação entre as estirpes Ab-V6 + Ab-V7 ou a inoculação tripla de Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7 resultaram em valores superiores aos demais tratamentos utilizados, exceto apenas quando comparados a dose de 120 Kg ha⁻¹ para a variável de diâmetro do colmo das plantas de milho (Tabela 4).

Na avaliação da eficiência apenas entre as estirpes utilizadas, podem ser destacados os resultados referentes à inoculação isolada da estirpe Ab-V7, bem

como, a associação entre Ab-V5 + Ab-V7 para a variável de diâmetro do colmo em ambos locais de realização do estudo (Tabela 4). Para a variável de massa seca da parte aérea, destacaram-se os resultados dos tratamentos que utilizaram a estirpe Ab-V7 isoladamente, bem como, a associação entre Ab-V5 + Ab-V7, Ab-V6 + Ab-V7 e a inoculação com as três estirpes associadas Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7. Ainda analisando-se a Tabela 4, quando se observam os resultados relativos à área foliar das plantas, não foi verificada interação significativa entre os fatores. Assim, são apresentadas apenas as médias gerais dos tratamentos e dos locais de condução dos experimentos. Nesse caso, as médias de todos os tratamentos com *A. brasilense* foram superiores aos demais tratamentos, exceto quando comparados a dose de 120 Kg ha⁻¹ de nitrogênio. Além disso, a média geral da área foliar das plantas de milho do experimento realizado em Pato Bragado foi superior a obtida em Marechal Cândido Rondon (Tabela 4).

Tabela 4. Médias do diâmetro basal do colmo, massa seca da parte aérea, área foliar das plantas de milho do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada, nos municípios de Marechal Cândido Rondon, PR (L1) e Pato Bragado, PR (L2), UNIOESTE, 2011/2012.

Tratamentos	Diâmetro basal do colmo (cm)			Massa seca da p. aérea (g por planta)			Área foliar (dm ²)		
	Local		Média	Local		Média	Local		Média
	L1	L2		L1	L2		L1	L2	
0 Kg ha ⁻¹ de N	24,19 cA	25,40 bA	24,79	33,00 cB	51,50 bA	42,25	45,50	69,75	57,62c
60 Kg ha ⁻¹ de N	24,68 cA	26,29 bA	25,48	40,00 cB	56,00 bA	48,00	57,00	75,75	66,37b
120 Kg ha ⁻¹ de N	26,83 bA	28,72 aA	27,78	55,00 aA	59,25 bA	57,12	68,75	77,25	73,00a
Ab-V5*	26,13 bB	28,47 aA	27,30	46,25 bB	66,50 aA	56,37	66,00	81,00	73,50a
Ab-V6	26,50 bA	26,34 bA	26,42	49,00 aA	54,00 bA	51,50	64,75	72,25	68,50a
Ab-V7	29,10 aA	29,50 aA	29,30	57,25 aB	70,50 aA	63,87	71,75	86,00	78,87a
Ab-V5+Ab-V6	29,21 aA	27,15 bB	28,18	59,00 aA	60,75 bA	59,87	74,50	79,25	76,87a
Ab-V5+Ab-V7	27,66 aA	29,23 aA	28,45	51,25 aB	68,50 aA	59,87	64,50	83,75	74,12a
Ab-V6+Ab-V7	27,07 bB	29,41 aA	28,24	48,50 aB	66,00 aA	57,25	61,00	78,25	69,62a
Ab-V5+Ab-V6+Ab-V7	26,72 bB	29,25 aA	27,98	46,50 aB	66,50 aA	56,50	59,25	82,50	70,87a
Média	26,81	27,98		48,57	61,95		63,30B	78,57A	
CV(%)	4,84			13,18			11,04		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

*Todos os tratamentos com inoculação receberam 60 kg ha⁻¹ de N.

4.2 Efeito da inoculação nos teores de N, P e K das folhas de milho

Os teores de N, P e K das folhas de milho foram semelhantes, não diferindo entre os tratamentos com inoculação ou doses de nitrogênio utilizadas no trabalho em questão. Porém, em relação ao local de condução dos experimentos verificou-se a superioridade para os teores de N, P e K das folhas de milho coletadas no experimento realizado em Pato Bragado, tendo esses alcançados valores de 23,77, 1,81 e 19,41 para N, P e K, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Médias do teor de nitrogênio da folha, teor de fósforo da folha, teor de potássio da folha, das plantas de milho do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada, nos municípios de Marechal Cândido Rondon, PR (L1) e Pato Bragado, PR (L2), UNIOESTE, 2011/2012.

Tratamentos	Teor de N da folha (g Kg ⁻¹)			Teor de P da folha (g Kg ⁻¹)			Teor de K da folha (g Kg ⁻¹)		
	Local		Média	Local		Média	Local		Média
	L1	L2		L1	L2		L1	L2	
0 Kg ha ⁻¹ de N	22,82	19,08	20,95	1,27	1,90	1,56	17,11	17,72	17,42
60 Kg ha ⁻¹ de N	21,48	21,25	21,37	1,40	1,85	1,62	12,64	18,26	15,45
120 Kg ha ⁻¹ de N	21,97	25,04	23,50	1,32	1,78	1,55	12,84	18,29	15,56
Ab-V5*	21,16	24,75	22,95	1,25	1,85	1,55	14,79	19,59	17,19
Ab-V6	21,20	23,49	22,35	1,09	1,90	1,49	15,07	17,71	16,39
Ab-V7	20,47	25,12	22,79	1,12	1,90	1,51	13,57	17,69	15,63
Ab-V5+Ab-V6	20,32	23,95	22,13	1,17	1,82	1,50	12,96	23,77	18,36
Ab-V5+Ab-V7	20,53	25,85	23,19	1,11	1,76	1,43	13,30	18,77	16,04
Ab-V6+Ab-V7	21,95	25,54	23,74	1,29	1,77	1,53	12,89	23,79	18,34
Ab-V5+Ab-V6+Ab-V7	21,97	23,59	22,78	1,22	1,61	1,41	15,10	18,50	16,80
Média	21,39B	23,77A		1,22B	1,81A		14,03B	19,41A	
CV(%)	12,76			12,15			27,19		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

*Todos os tratamentos com inoculação receberam 60 kg ha⁻¹ de N.

4.3 Efeito da inoculação nos componentes de produção e produtividade da cultura do milho

Na Tabela 6, encontram-se as médias do comprimento de espiga, diâmetro de espiga e número de fileiras por espiga de milho, em função dos tratamentos com e sem inoculação de *A. brasilense*. Na avaliação do experimento realizado em Marechal Cândido Rondon, observou-se efeito significativo para o comprimento de espiga em relação aos demais tratamentos quando realizada a inoculação das sementes com a estirpe Ab-V7, bem como, para a associação entre Ab-V6 + Ab-V7 e Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7, tendo estas alcançado, respectivamente, percentuais de 15,19; 16,46 e 17,72% em relação ao tratamento com a dose de 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio sem inoculação. Em relação ao experimento realizado em Pato Bragado, observou-se que a inoculação com a estirpe Ab-V7 e a associação entre Ab-V5 + Ab-V6, resultou no maior comprimento de espiga na comparação com o restante dos tratamentos utilizados no trabalho (Tabela 6).

Os resultados da avaliação do diâmetro das espigas de milho revelaram que não houve interação significativa entre os tratamentos utilizados no trabalho. Assim, foram apresentadas apenas a média acumulada de cada tratamento e de ambos os locais de condução. Dessa maneira, podem ser destacadas as médias obtidas com a inoculação individual da estirpe Ab-V7, bem como, a associação entre Ab-V5 + Ab-V6, Ab-V6 + Ab-V7, Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7 e a dose de 120 Kg ha⁻¹ de nitrogênio, sendo estas superiores as obtidas nos demais tratamentos. Além disso, a média acumulada do diâmetro das espigas colhidas no experimento conduzido em Marechal Cândido Rondon foi superior a obtida no experimento realizado em Pato Bragado (Tabela 6).

O número de fileiras por espiga, também foi influenciado significativamente pelos tratamentos utilizados, podendo ser destacada a inoculação com a associação das estirpes Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7, tendo esta superado os demais tratamentos no experimento realizado em Marechal Cândido Rondon, bem como, a inoculação com Ab-V6, Ab-V5 + Ab-V6, Ab-V6 + Ab-V7 e Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7 para o experimento de Pato Bragado (Tabela 6).

Tabela 6. Médias do comprimento de espiga, diâmetro de espiga, número de fileiras por espiga, das plantas de milho do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada, nos municípios de Marechal Cândido Rondon, PR (L1) e Pato Bragado, PR (L2), UNIOESTE, 2011/2012.

Tratamentos	Comprimento da espiga (cm)			Diâmetro da espiga (mm)			Número de fileiras por espiga		
	Local		Média	Local		Média	Local		Média
	L1	L2		L1	L2		L1	L2	
0 Kg ha ⁻¹ de N	20,25 cA	16,50 bB	18,37	57,00	46,75	51,87 b	21,00 cA	16,50 bB	18,75
60 Kg ha ⁻¹ de N	19,75 cA	16,75 bB	18,25	57,25	47,00	52,25 b	21,25 cA	16,50 bB	18,87
120 Kg ha ⁻¹ de N	21,75 bA	16,50 bB	19,12	60,00	47,25	53,62 a	22,75 bA	16,25 bB	19,50
Ab-V5*	21,00 cA	16,00 bB	18,50	56,50	46,50	51,50 b	22,50 bA	16,50 bB	19,50
Ab-V6	20,00 cA	16,25 bB	18,12	56,50	48,00	52,25 b	22,25 bA	17,25 aB	19,75
Ab-V7	22,75 aA	18,25 aB	20,50	61,25	49,00	55,12 a	22,00 bA	16,75 bB	19,37
Ab-V5+Ab-V6	21,00 cA	17,50 aB	19,25	58,00	48,25	53,25 a	21,50 cA	17,50 aB	19,50
Ab-V5+Ab-V7	20,25 cA	17,00 bB	18,62	57,25	47,00	52,12 b	22,25 bA	16,75 bB	19,50
Ab-V6+Ab-V7	23,00 aA	16,50 bB	19,75	59,50	48,00	53,75 a	22,25 bA	17,50 aB	19,87
Ab-V5+Ab-V6+Ab-V7	23,25 aA	16,75 bB	20,00	58,00	48,50	53,25 a	23,75 aA	17,75 aB	20,75
Média	21,30	16,80		58,15 A	47,62 B		22,15	16,92	
CV(%)	3,93			3,17			3,37		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

*Todos os tratamentos com inoculação receberam 60 kg ha⁻¹ de N.

Encontram-se na Tabela 7 os resultados obtidos para o número grãos por fileira, massa de mil grãos e produtividade do milho em função da inoculação ou não das sementes com *A. brasilense*. Todos os tratamentos em que foram utilizados a inoculação das sementes com *A. brasilense* foram significativamente superiores em relação ao número de grãos por fileira quando comparados aos tratamentos com as doses de 0 e 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio, exceto, as estirpes Ab-V6 e Ab-V5, quando testadas em ambos os locais. Entretanto, não houve diferença significativa entre a inoculação com *A. brasilense* e a máxima dose de adubação nitrogenada (120 Kg ha⁻¹).

A massa de mil grãos foi influenciada pelos tratamentos em ambos os locais de condução do trabalho. Pode se observar que para Marechal Cândido Rondon as médias dos tratamentos Ab-V7 e Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7 foram superiores a todos os demais, alcançando percentuais superiores em relação aos tratamentos com 0, 60 e 120 Kg ha⁻¹ de nitrogênio. Já para Pato Bragado o comportamento dos tratamentos para massa de mil grãos demonstrou que a dose de 120 Kg ha⁻¹ de nitrogênio foi significativamente superior aos demais. Também pode ser observado em Pato Bragado que a inoculação associada entre as três estirpes (Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7) foi superior aos demais tratamentos, bem como, as demais estirpes inoculadas individualmente ou em associação superaram as doses de 0 e 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio (Tabela 7).

Os resultados para a produtividade de grãos demonstraram que não houve interação entre os fatores tratamentos e locais de condução dos experimentos. Assim, foram apresentadas apenas médias gerais de cada tratamento, bem como, de cada local de condução. A comparação das mesmas demonstrou que a inoculação individual com a estirpe Ab-V7, bem como, a associação entre Ab-V6 + Ab-V7 e Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7 resultaram em médias superiores de produtividade em relação aos demais tratamentos utilizados no trabalhos (Tabela 7). Também pode ser destacadas as médias dos tratamentos com a inoculação isolada da estirpe Ab-V6 e a associação entre Ab-V5 + Ab-V6 e Ab-V5 + Ab-V7 que obtiveram médias iguais a dose máxima de nitrogênio (120 Kg ha⁻¹) e superioridade quando comparadas as doses de 0 e 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio (Tabela 7).

Além disso, a média geral de produtividade do experimento conduzido em Marechal Cândido Rondon foi superior a obtido no experimento conduzido em Pato Bragado (Tabela 7).

Tabela 7. Médias do número de grãos por fileira (NGF), massa de mil grãos (MMG), produtividade (PROD), das plantas de milho do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada, nos municípios de Marechal Cândido Rondon, PR (L1) e Pato Bragado, PR (L2), UNIOESTE, 2011/2012

Tratamentos	Número de grãos por fileira			Massa de mil grãos (g)			Produtividade (kg ha ⁻¹)		
	Local		Média	Local		Média	Local		Média
	L1	L2		L1	L2		L1	L2	
0 Kg ha ⁻¹ de N	31,25 bA	27,50 bA	29,50	290,75 dA	226,50 eB	258,62	6253,00	2638,75	4445,87 c
60 Kg ha ⁻¹ de N	31,25 bA	27,75 bA	29,37	287,75 dA	243,87 dB	265,81	6476,75	3183,25	4830,00 c
120 Kg ha ⁻¹ de N	35,75 aA	34,25 aA	35,00	295,25 cA	270,87 aB	283,06	7042,00	3969,50	5505,75 c
Ab-V5*	35,00 aA	30,25 bB	32,62	288,62 dA	258,12 cB	273,37	5640,25	3380,50	4510,37 c
Ab-V6	33,00 bA	33,00 aA	33,00	300,25 cA	252,25 cB	276,25	7274,50	3331,25	5302,87 c
Ab-V7	37,50 aA	37,50 aA	37,50	324,00 aA	255,62 cB	289,81	7465,00	4394,25	5929,62 a
Ab-V5+Ab-V6	34,50 aA	33,50 aA	34,00	308,37 bA	252,50 cB	280,43	7209,25	3424,25	5316,75 b
Ab-V5+Ab-V7	34,50 aA	33,75 aA	34,12	311,12 bA	255,75 cB	283,43	6628,50	3692,25	5760,37 b
Ab-V6+Ab-V7	35,75 aA	32,25 aA	34,00	311,50 bA	251,37 cB	281,43	7991,75	4093,25	6042,50 a
Ab-V5+Ab-V6+Ab-V7	38,25 aA	34,75 aA	36,50	329,87 aA	263,37 bB	296,62	8850,75	4494,75	6672,75 a
Média	34,67	33,47		304,75	253,02		7083,17A	3660,20B	
CV(%)	7,32			2,42			14,78		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

*Todos os tratamentos com inoculação receberam 60 kg ha⁻¹ de N.

4.4 Efeito da inoculação nos teores de N, P e K dos grãos de milho

Na Tabela 8, encontram-se os resultados obtidos para os teores de N, P e K dos grãos de milho colhidos nos dois locais de realização dos experimentos. Evidenciou-se que para nenhum dos nutrientes avaliados foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos utilizados no trabalho. Entretanto, na comparação das médias gerais obtidas em cada local de condução dos experimentos nota-se que os teores de N e P obtidos dos grãos colhidos em Marechal Cândido Rondon, PR (L1) foram superiores aos obtidos em Pato Bragado, PR (L2). Já em relação ao teor de K não foram observadas diferenças entre as médias gerais dos locais de realização dos experimentos (Tabela 8).

Tabela 8. Médias do teor de nitrogênio dos grãos (Ng), teor de fósforo dos grãos (Pg) e teor de potássio dos grãos (Kg), das plantas de milho do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada, nos municípios de Marechal Cândido Rondon, PR (L1) e Pato Bragado, PR (L2), UNIOESTE, 2011/2012.

Tratamentos	Teor de N dos grãos (g Kg ⁻¹)			Teor de P dos grãos (g Kg ⁻¹)			Teor de K dos grãos (g Kg ⁻¹)		
	Local		Média	Local		Média	Local		Média
	L1	L2		L1	L2		L1	L2	
0 Kg ha ⁻¹ de N	17,69	16,57	17,13	2,13	1,37	1,75	39,06	40,01	39,54
60 Kg ha ⁻¹ de N	17,91	16,76	17,34	2,43	1,30	1,87	36,95	40,69	38,82
120 Kg ha ⁻¹ de N	18,29	17,38	17,83	2,46	1,22	1,84	42,59	40,37	41,48
Ab-V5*	18,00	18,28	18,14	2,41	1,39	1,90	44,31	42,70	43,50
Ab-V6	17,74	17,51	17,62	2,57	1,64	2,10	46,66	40,53	43,59
Ab-V7	19,57	18,75	19,16	2,49	1,43	1,96	46,34	44,41	45,37
Ab-V5+Ab-V6	18,76	18,14	18,45	2,54	1,40	1,97	43,91	47,11	45,51
Ab-V5+Ab-V7	18,45	15,86	17,16	2,37	1,54	1,95	47,31	37,76	42,54
Ab-V6+Ab-V7	17,48	17,94	17,71	2,45	1,30	1,87	43,54	46,33	44,93
Ab-V5+Ab-V6+Ab-V7	19,45	17,27	18,37	2,36	1,29	1,82	40,58	42,20	41,39
Média	18,34 A	17,45 B		2,42 A	1,39 B		43,12	42,21	
CV(%)	7,57			15,3			14,03		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

*Todos os tratamentos com inoculação receberam 60 kg ha⁻¹ de N.

5 DISCUSSÃO

A busca por tecnologias que venham substituir total ou parcialmente o uso de fertilizantes nitrogenados em culturas como o milho tornou-se foco de vários estudos nos últimos anos. O custo energético, a redução das reservas de energia não renováveis e a contaminação ambiental resultante do uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados são pontos fundamentais para o aumento do interesse das instituições de pesquisa e pesquisadores, pela busca de fertilizantes biológicos com potencial para o cenário agrícola atual.

No presente trabalho realizado a campo, foi observado que a inoculação com *A. brasilense* proporcionou incremento significativo no crescimento das plantas de milho durante o período vegetativo da cultura (Tabela 4). Os resultados obtidos estão de acordo com vários outros encontrados na literatura com a cultura do milho como: Fulchieri e Frioni (1994); Dobbelaere *et al.* (2001); Dobbelaere *et al.* (2002); Dobbelaere; Vanderleyden e Okon (2003); Díaz-Zorita *et al.* (2005); Mehnaz *et al.* (2006); Karawal (2012). Em geral, para estes autores, a inoculação com bactérias diazotróficas resultou em incrementos em crescimento durante o período vegetativo da cultura.

Estes resultados são justificados não apenas pelo fato das bactérias diazotróficas fixarem o N₂ atmosférico, mas também pelas mesmas sintetizarem substâncias que estão relacionadas com a promoção do crescimento vegetal, como as auxinas (DEY *et al.*, 2004), giberelinas (NARULA *et al.*, 2006), citocininas (CASTRO *et al.*, 2008), solubilizantes de sais minerais como fósforo e ferro (HAYAT *et al.*, 2010) e enzimas, bem como, pela indução de mecanismos de resistência das plantas (PATHMA *et al.*, 2011). Além disso, algumas espécies de bactérias diazotróficas possuem a capacidade de manter baixos níveis de etileno nas plantas (GLICK *et al.*, 1999).

O etileno é um hormônio gasoso e seu modo de ação tem papel chave em múltiplas alterações fisiológicas nas plantas (VOGEL *et al.*, 1998). Entretanto, sob condições de estresse, os níveis desse hormônio podem ser elevados. Isso pode ser prejudicial, em função da antecipação dos processos de senescência e demais processos moleculares que podem prejudicar o crescimento das plantas. O mecanismo primário para a redução dos níveis de etileno é através da síntese da enzima ACC-desaminase (ACCd) que é responsável pela inibição da síntese da

ACC. Dessa maneira, vários autores descrevem o gênero *Azospirillum* como um diazotrofo que possuem a atividade da desaminase do ACC (GOVINDASAMY *et al.*, 2008; DUAN *et al.*, 2009). Além disso, como já mencionado, as bactérias do gênero *Azospirillum* possuem diferentes vias para a síntese de ácido indol-acético (AIA) produzindo níveis significativos desse hormônio. Esse tem papel chave nos processos de expansão celular, e conseqüentemente no aumento do número de raízes laterais, aumentando a superfície de contato do sistema radicular, culminando em maior absorção de água e nutrientes pelas plantas (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1988; BARAZANI e FRIENDMAN, 1999; BISWAS *et al.*, 2000; KHALID, *et al.*, 2004; SALA *et al.*, 2005; PEDROSA *et al.*, 2011). Dessa maneira, a atuação simultânea desses mecanismos pode levar ao maior crescimento e desenvolvimento do vegetal (MARTINEZ-VIVEROS *et al.*, 2010), fato este observado no presente trabalho.

Quando realizada a análise do teor de nitrogênio das folhas e dos grãos, não foram observadas diferenças significativas entre as plantas inoculadas e não inoculadas (Tabelas 5 e 8). Estes resultados discordam dos obtidos por Ribaud *et al.* (2001) que reportaram maior acúmulo de nitrogênio nas folhas de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum* sp.. Hungria *et al.* (2010) trabalhando com a inoculação de diferentes estirpes de *A. brasilense* nas culturas do milho e trigo, verificaram maior aporte de nitrogênio nas folhas das plantas inoculadas, porém, esse não foi observado para os grãos em ambos os casos. O aumento do teor de nitrogênio nas plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* comumente relatado pode ser resultado da fixação de N₂, bem como, pela ação dos mecanismos de promoção do crescimento, que podem incrementar a capacidade das plantas em absorver nitrogênio (DOBBELAERE *et al.*, 2001).

Além disso, observou-se no presente trabalho diferenças entre as médias de cada local de condução dos experimentos para os teores de N, P e K das folhas e grãos de milho (Tabelas 5 e 8). Na avaliação dos teores de N, P e K das folhas coletadas no início do período reprodutivo observou-se maior teor desses nutrientes para o experimento realizado em Pato Bragado (Tabela 5), que também apresentou maior massa seca da parte aérea e área foliar das plantas (Tabela 4). Contudo, esta superioridade não refletiu em maior produtividade para este local (Tabela 7).

Verifica-se que a partir do mês de novembro ocorreu a redução da precipitação na área experimental localizada em Pato Bragado (Figura 2). No mês

de dezembro, quando as plantas se encontravam no início do florescimento feminino, o volume de chuvas ficou próximo de zero. Na área experimental localizada em Marechal Cândido Rondon a redução da precipitação também ocorreu, porém, em menor intensidade (Figura 1). Fato este que poderiam explicar o menor teor de nutrientes nos grãos provenientes das plantas do experimento de Pato Bragado, bem como a menor produtividade (Tabelas 7 e 8).

Santos e Carlesso (1998) relatam que a deficiência hídrica pode provocar alterações no comportamento da planta de maneira que a recuperação vai depender do genótipo, duração, severidade e estágio de desenvolvimento vegetal. O estresse gerado pela falta d'água pode ocasionar redução da área foliar, menor taxa fotossintética, bem como, influenciar negativamente a taxa de translocação de solutos (TAIZ e ZEIGER, 2004). Estes mesmos autores descrevem que a rápida expansão foliar pode ser desfavorável para a planta caso essa venha ser submetida à deficiência hídrica. Além disso, em situações de déficit hídrico também deve ser levada em consideração a capacidade de armazenamento de água no solo, pois a textura e características físicas do solo são fator chave para a retenção de água (KIEHL, 1979).

Os componentes da produção, bem como, a produtividade obtida em ambos os locais de condução dos experimentos com a cultura do milho, também foram influenciados positivamente pela inoculação com *A. brasilense* (Tabelas 6 e 7). Resultados semelhantes foram obtidos por Díaz-Zorita *et al.* (2005) ao trabalharem com a inoculação de *A. brasilense* nas culturas do milho e trigo em 221 localidades na Argentina. Estes autores verificaram que 75 a 95% dos experimentos realizados resultaram em respostas positivas para produtividade em ambas as culturas. Nesse sentido, Hungria *et al.* (2010) verificaram, nas parcelas inoculadas com *A. brasilense*, incrementos produtivos de 27 e 31% para as culturas do milho e trigo, respectivamente. Também, Canellas *et al.* (2011) verificaram incrementos na produtividade da cultura do milho de 20 e 65% em relação ao tratamento controle para as plantas inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae*, associado a aplicação de substâncias húmicas.

Os incrementos em relação à produtividade da cultura do milho com a inoculação de bactérias diazotróficas estão relacionados em parte com a fixação biológica do N₂, bem como, com promoção do crescimento vegetal pela ação de substâncias regulatórias (DEY *et al.*, 2004; NARULA *et al.*, 2006; CASTRO *et al.*,

2008; HAYAT *et al.*, 2010; PATHMA *et al.*, 2011).

A produtividade da cultura do milho foi inferior em ambos os locais de condução dos experimentos quando comparado com a média regional, bem como, ao potencial produtivo do híbrido utilizado. A redução foi mais acentuada na área experimental de Pato Bragado, PR que obteve média produtiva de 3660 Kg ha⁻¹, sendo essa inferior em aproximadamente 3400 Kg ha⁻¹ quando comparada a média obtida na área experimental de Marechal Cândido Rondon, PR (7083 Kg ha⁻¹). A menor produtividade da cultura foi consequência da redução dos componentes da produção, como por exemplo, o número de fileiras por espiga, número de grãos por espiga e massa de mil grãos, sendo estes consideravelmente afetados por alguns dos tratamentos utilizados em ambos os experimentos. A explicação para este fato pode estar relacionada às condições de temperatura e precipitação antes e durante o período de florescimento da cultura nos dois locais em que foram conduzidos os experimentos. Observa-se nas figuras 1 e 2, que o acúmulo mensal de precipitação para os meses de novembro e dezembro na área experimental de Marechal Cândido Rondon, PR foi de 155,2 e 33,8 mm, respectivamente. Em Pato Bragado, PR o acúmulo para o mesmo período foi de 28,4 e 4,2 (novembro e dezembro, respectivamente). Outro fator climático que merece ser destacado são as médias de temperatura durante o período de floração da cultura (dezembro). Observa-se nas figuras 1 e 2, que as temperaturas médias foram de 23,65 e 25,05°C e as máximas de 30,01 e 32,42°C nas áreas de Marechal Cândido Rondon, PR e Pato Bragado, PR, respectivamente.

Apesar dos efeitos da deficiência hídrica e altas temperaturas, que resultaram em redução da produtividade, principalmente em Pato Bragado, os resultados obtidos demonstraram que a inoculação com *A. brasilense*, principalmente com a estirpe Ab-V7 e a associação entre Ab-V6 + ABV7 e Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7 superaram os demais tratamentos, apresentando incrementos significativos para a produtividade da cultura do milho nestas condições (Tabela 7).

A produtividade do milho é dependente do número de grãos por unidade de área e da quantidade de fotoassimilados disponíveis para esses grãos (FANCELLI e DOURADO NETO, 2005). O período de aproximadamente três semanas, que envolve o pendramento-espigamento é o de maior sensibilidade da cultura do milho à deficiência hídrica. Em condições de falta de umidade e alta temperatura do ar, há aumento na defasagem entre o florescimento masculino e feminino. A elongação do

estilo-estigma é muito sensível à falta de umidade, pois 95% do peso fresco desta estrutura é constituído pela água (SANGOI, *et al.*, 2010). Assim, o aumento da defasagem entre a antese e o espigamento faz com que os grãos de pólen sejam liberados e não encontrem o estilo-estigma receptivo. Além disso, os grãos de pólen que venham a alcançar o estilo-estigma muitas vezes não germinam em função do ressecamento dessas estruturas, que ocorrem principalmente sob condições de baixa umidade relativa do ar e temperatura elevada (SANGOI *et al.*, 2010).

A capacidade das bactérias do gênero *Azospirillum* em reduzirem os efeitos deletérios causados pelo déficit hídrico vem sendo objeto de trabalho de vários pesquisadores. Nesse sentido, Sarig *et al.* (1992) verificaram que plantas de sorgo inoculadas com *Azospirillum* sp. tiveram sua condutividade hidráulica aumentada entre 25 e 40% em relação as plantas não inoculadas. Também Manoharam *et al.* (2012) trabalhando com plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* sob diferentes regimes de irrigação, verificaram que a inoculação resultou em incrementos de 19, 16 e 31% para as variáveis de altura de planta, massa seca da planta e produtividade de grãos, respectivamente. Reier Bakken (1997) descreve que a inoculação com *Azospirillum* sp. propicia à planta um ambiente mais favorável reduzindo os estresses causados pela falta d'água, em função dos mecanismos promotores de crescimento relacionados a síntese hormonal, resultando em plantas com sistema radicular de melhor qualidade e consequentemente mais aclimatadas a estresses ambientais.

Vale destacar ainda que a grande maioria dos estudos relacionados à síntese de hormônios vegetais pelo gênero *Azospirillum* estão envolvidos na produção de ácido indol-acético (AIA) por este ser um dos principais reguladores de várias funções nas plantas (ANTOUN e PRÉVOST, 2005; DODD *et al.*, 2010). Esses microrganismos também sintetizam ácido abscísico, sendo um hormônio relacionado a respostas da planta em condições de deficiência hídrica (BRAY, 2002; TAIZ e ZEIGER, 2004; PERRIG *et al.*, 2007). Nesse sentido, Zawoznik *et al.* (2011) trabalhando com a inoculação de *A. brasilense* em plantas de cevada submetidas a diferentes níveis de salinidade, verificaram que as plantas inoculadas suportaram em melhores condições o estresse induzido. Os mesmos autores ainda verificaram aumento nos níveis de aquaporina nas plantas inoculadas com *A. brasilense* em comparação com as plantas não inoculadas. As aquaporinas são proteínas que estão presentes no sistema radicular das plantas formando canais de água nas

membranas das células, sendo que sua síntese, sob condições de estresse, pode estar diretamente relacionada à ao aumento da síntese de ácido abscísico nos vegetais (KALDENHOFF *et al.*, 1996; SHINOZAKI *et al.*, 1998).

Neste contexto, os resultados do presente trabalho demonstram que as rizobactérias promotoras de crescimento, tais como *A. brasilense*, são eficazes no estabelecimento das plantas melhorando sua capacidade de suportar situações de estresse, como a seca e limitação de nutrientes.

As estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 utilizadas no presente trabalho foram selecionadas a partir de vários ensaios realizados em ambiente controlado e a campo pela equipe do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas. Estas estirpes têm demonstrado respostas positivas tanto na fixação do N₂, quanto, na promoção do crescimento vegetal, por possuírem, entre outros mecanismos, a característica de sintetizarem hormônios relacionados ao crescimento das plantas. No Brasil, já existem empresas que produzem inoculantes para gramíneas a partir das estirpes Ab-V5 e Ab-V6. Entretanto, essa tecnologia ainda não é totalmente aceita por técnicos e agricultores. Dessa forma, é importante que se realizem novos ensaios em diferentes regiões do Brasil que confirmem a eficiência dos materiais já existentes, bem como, a busca por novas possibilidades que venham a aumentar a gama de opções para a substituição dos produtos convencionais.

6 CONCLUSÕES

A inoculação das sementes com *A. brasilense* resultou em ganhos significativos para a cultura do milho durante o período vegetativo.

Os tratamentos com a inoculação da estirpe Ab-V7, e a associação entre as estirpes Ab-V5 + Ab-V6, Ab-V6 + Ab-V7 e Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7 demonstraram os maiores incrementos nos componentes da produção e na produtividade da cultura em ambos locais avaliados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ESCOSTEGUY, P.A.V.; RIZZARDI, M.A.; ARGENTA, G. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em duas épocas de semeadura. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 21, p. 71-77, 1997.
- HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Ann Microbiol**, v.60, n.4, p.579–598, 2010.
- HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals Microbiology**, v. 60, p.579–598, 2010.
- JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, p. 197-209, 2000.
- KENNEDY, I.R. et al.. Biological nitrogen fixation in non-legumes field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, v.194, p.65-79, 1997.
- PATHMA, J.; KENNEDY, R.K.; SAKTHIVEL, N. Mechanisms of fluorescent pseudomonads that mediate biological control of phytopathogens and plant growth promotion of crop plants. In: MAHESHWARI, D.K. (ed) **Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses**. Berlin: Springer, p. 77–105, 2011.
- SHRESTHA, R.K.; J.K. LADHA, 1996. Genotypic variation in promotion of rice nitrogen fixation as determined by nitrogen 15N dilution. **Soil Science Society of America Journal**, v. 60, p. 1815-1821, 1996.
- UHART, S. A.; ANDRADE, F. H. Nitrogen deficiency in maize. I. Effects on crops growth, development, dry matter partitioning, and kernel set. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1376-1383, 1995.
- ANGUS, Modelling N fertilization requirements for crops and pastures. In: BACON (ed.) **Nitrogen fertilization in the environment**. New York: Marcel Dekker, p. 109-127, 1995.
- ANTOUN, H., PRE´VOST, D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), PGPR: **Biocontrol and Biofertilization**. Springer, Dordrecht, v. 34, p. 1–38, 2005.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, v.62, p.45-151, 1998.
- BALDANI, V.L.D. et al. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.69, p.116, 1997
- BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major growth factor secreted from plant growth mediating bacteria? **J. Chem. Ecol.**, v.25, p.2397–2406, 1999.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. 2ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41p.

BISWAS, J.C., L.K. LADHA AND F.B. DAZZO, Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.64, p. 1644-1650, 2000.

BODDEY, R.M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.195-209, 1995.

BRAGA J. M.; DEFELIPO B. V. Determinação espectrofotométrica de P em extratos de solo e material vegetal. **Revista Ceres**, v. 21, p. 73-85, 1974.

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

BRAY, E. A. Absciscic acid regulation of gene expression. During water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. **Plant Cell and Environment**, v. 25, n.1, p. 153-161, 2002.

BULL, L.T. & CANTARELLA, H. Cultura do milho. Fatores que afetam a produtividade. Vitória: **Potafos**, 301p. 1993.

BUMB, B.L. World nitrogen supply and demand: an overview. In: BACON, P.E. (Ed.) **Nitrogen fertilization in the environment**. New York: Marcel Dekker, p.1-40, 1995.

CANELLAS, L. P. et al. **A combination of substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). Plant and soil**. Disponível em: <<http://rd.springer.com/article/10.1007/s11104-012-1382-5#>>. Acesso em 12 de Nov. 2012.

CASTRO, G.S.A.; BORGIANI, J.C.; SILVA, M.G.; GAZOLA, E.; ROSOLEM, C.A. Tratamento de sementes de soja com inseticidas e um bioestimulante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.10, p.1311-1318, 2008.

CASTRO, R.O.; CANTERO, E.V.; BUCIO, J.L. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signalling. **Plant Signal Behav**, v.3, n.4, p.263–265, 2008.

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. C. dos S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, p. 129-132, 2000.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento, 2012**. Brasília, 2012. 36 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 15 dezembro de 2012.

DEY, R. et al. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiol Res**, v.159, p.371–394, 2004.

DÍAZ-ZORITA, M.; BALIÑA, R.M.; FERNANDEZ-CANIGIA, M. V. **Resultados de ensayos de investigación y de desarrollo aplicado**. Pilar: Bs. As. 2005, 39p.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 621–631, 2004.

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

DOBBELAERE, S. et al. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 36, n. 4, p. 284-297, 2002.

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

DODD, I. et al. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals Applied Biology**, v. 157, p.361–379, 2010.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A.L. **Produção de milho**. 2 ed. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360 p.

DUAN, J. et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from Southern Saskatchewan. **Microbiology and Ecology**, v. 57, p. 423–436, 2009.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.34, n.7, p.869-881, 1982.

DÖBEREINER, J.; SALOMONE, I.G. de. Biological dinitrogen fixation in maize. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: o milho em perspectiva. 1992, Belo Horizonte. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, p.282-294. 1995.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2006. 306p.

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

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Milho: Tecnologia e Produção**. Piracicaba: ESALQ/ USP/ LVP, 2005. 149 p.

FERNANDES, F.C.S. Dinâmica do nitrogênio na cultura do milho (*Zea mays* L.) em cultivo sucessivo com aveia preta (*Avena strigosa*), sob implantação do sistema plantio direto. 2006, 197p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

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

FULCHIERI, M.; FRIONI, L. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): Effect on yield in field experimente in central Argentina. **Soil Biology Biochemistr**y, v. 26, p. 921-923, 1994.

GARCÍA DE SALAMONE, I.E.; et al. Field response of rice paddy crop to inoculation with *Azospirillum*: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. **Plant and Soil**, v.336, p. 351- 362, 2010.

GARCIA DE SALOMONE, I.E. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p.249-256, 1996.

GLICK B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiol Letters**, v. 251, p. 1–7, 2005.

GLICK, B.R. et al. **Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria**. London, UK: Imperial College Press, 1999. 276p.

GOVINDASAMY, V., et al. Isolation and characterization of ACC deaminase gene from two plant growth-promoting rhizobacteria. **Current Microbiology**, v. 57, p. 312–317, 2008.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion. **Ann microbiology**, v. 60, p. 579-598, 2010.

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

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, p. 197-209, 2000

KALDENHOFF, R., KÖLLING, A., RICHTER, G. Regulation of the Arabidopsis thaliana aquaporin gene AthH2 (PIP1b). **Journal Photochemistry and Photobiology Biology**, v. 36, p. 351–354, 1996.

KARAWAL, A. Screening of growth promoting rhizobacteria from maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*). **Ajfad Scholarly Perr Reviewed**, v. 12, p. 6170-6185, 2012.

KENNEDY, I.R. et al.. Biological nitrogen fixation in non-legumes field crops: facilitating the evolution of in effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, v.194, p.65-79, 1997

KHALID, A. et al. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield od wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96 p.473-480, 2004.

KIEHL, E.J. **Manual de edafologia**. São Paulo: Ceres, 1979. 215p

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

MALIK, K. A. et al. Association of nitrogen-fixing plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 37-44, 1997.

MANOHARAN, M. J. et al. Survival of *Azospirillum brasilense* flacculated cells in alginate and inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 198-206, 2012.

MARTINEZ-VIVEROS O., et al. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of plant Nutrition and Soil Science**, v.10, p. 293–319, 2010.

MEHNAZ S.; LAZAROVITS G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbiology and Ecology**, v. 51, p. 326–335, 2006.

MIYAZAWA, M. et al. Análise química de tecido vegetal. In: SILVA, F. C. et al. (Eds.). **Manual de análises químicas de solo, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA Tecnologia, p. 237-260, 2009.

NARULA, N., et al. Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. **Plant soil Environment**, v. 52, p.119–129, 2006.

PATHMA, J.; KENNEDY, R.K.; SAKTHIVEL, N. Mechanisms of fluorescent pseudomonads that mediate biological control of phytopathogens and plant growth promotion of crop plants. In: MAHESHWARI, D.K. (ed) **Bacteria in agrobiolgy**: plant growth responses. Berlin: Springer, p. 77–105, 2011.

PAVAN, M.A. et al. Manual de análise química de solo e controle de qualidade. Londrina:IAPAR, 1992. 40 p. (IAPAR. Circular 76)

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v7, n.5, May, p. 1-10, 2011.

PERRIG, D. et al. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.1143-1150, 2007.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 14. ed. Piracicaba, 2000. 477p.

REIER BAKKEN, L. Culturable and nonculturable bacteria in soil. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (eds) **Modern soil microbiology**. New York: Dekker, p. 47-61, 1997.

REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. **Plant Soil**, v. 66, p. 217-273, 1982.

RIBAUDO, C. M., et al. Response of zeas to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. **Biology Plant**, v. 44, p. 631-634, 2001.

SALA, V.M.R., et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p.345-352, 2005.

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

SANGOI, L. et al. **Ecofisiologia da cultura do milho para altos rendimentos**. Lages: Graphel, 2010, 87p.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Deficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.2, p. 287-294, 1998.

SARIG, S.; OKON, Y.; BLUM, A. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on growth dynamics and hydraulic conductivity of *Sorghum bicolor* roots. **Journal of Plant Nutrition**, v.15, p. 805 -819, 1992.

SHERSTHA, R. K.; LADHA, J. K.; Genotypic variation in promotion of rice nitrogen fixation as determined by nitrogen 15N dilution. **Soil Sci. Am. J.**, Madison, v.60, p.1815-1821, 1996.

SHINOZAKI, K., et al. Molecular responses to water stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Research**. v. 111, p. 345–351, 1998.

STEENHOUT 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.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 147p. (Boletim Técnico, 5)

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

URQUIAGA, S. et al. Evidence from field nitrogen balance and 15N natural abundance data of the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 365, p. 5-21, 2012.

VOGEL, J.E. et al. Isolation and characterization of *Arabidopsis* mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. **Genetics**, v.149, p.417-427, 1998.

ZAWOZNIK, M.S., et al. Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum* inoculated barley seedlings. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, p.1389–1397, 2011.

ZEHNDER, G.W. et al. Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.39–50, 2001.

8 ANEXOS

Anexo I. Resumo da análise de variância para as variáveis de diâmetro basal do colmo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA), área foliar (AF), teor de nitrogênio da folha (Nf), teor de fósforo da folha (Pf), teor de potássio da folha (Kf), comprimento de espiga (CPE), diâmetro de espiga (DE), número de fileiras por espiga (NFE), número de grãos por fileira (NGF), massa de mil grãos (MMG), e produtividade (PROD) do híbrido de milho 30F53, em função da inoculação das sementes com bactérias diazotróficas da espécie *A. brasilense* e adubação nitrogenada, UNIOESTE, 2011/2012.

F.V.	G.L.	Quadrado médio					
		DC	MSPA	AF	N f	P f	K f
B (L)	6	1,70 ^{ns}	46,19 ^{ns}	103,07 ^{ns}	2,92 ^{ns}	0,17 ^{**}	37,07 ^{ns}
T	9	15,95 ^{**}	322,79 ^{**}	288,84 ^{**}	6,38 ^{ns}	0,03 ^{ns}	9,54 ^{ns}
L	1	27,16 ^{**}	3577,81 ^{**}	4666,51 ^{**}	113,16 ^{**}	6,85 ^{**}	578,88 ^{**}
TxL	9	4,06 [*]	98,86 ^{**}	87,59 ^{ns}	14,14 ^{ns}	0,03 ^{ns}	21,38 ^{ns}
Resíduo	54	1,75	53,06	61,36	8,30 ^{ns}	0,03	20,67
C.V. (%)		4,94	13,18	11,04	12,76	12,15	27,19
Média geral		27,39	55,26	70,93	12,76	1,52	16,72

F.V.	G.L.	Quadrado médio					
		CPE	DE	NFE	NGF	MM	PROD
B (L)	6	2,53 ^{**}	2,99 ^{ns}	0,29 ^{ns}	12,4 ^{1ns}	72,92 ^{ns}	4158144,07 ^{**}
T	9	5,31 ^{**}	9,62 ^{**}	2,41 ^{**}	43,48 ^{**}	1955,34 ^{**}	3728556,22 ^{**}
L	1	405,0 ^{**}	2215,51 ^{**}	546,01 ^{**}	5,51 ^{ns}	10719,01 ^{**}	234335157,01 ^{**}
TxL	9	3,27 ^{**}	1,19 ^{ns}	1,20 ^{**}	21,31 ^{**}	901,12 ^{**}	950556,04 ^{ns}
Resíduo	66	0,059	0,395	0,019	6,07	45,37	630119,87
C.V. (%)		3,93	3,17	3,37	7,31	2,42	14,78
Média geral		19,05	52,88	19,53	33,73	278,88	5371,68

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

Anexo II. Resumo da análise de variância para as variáveis teor de nitrogênio dos grãos (Ng), teor de fósforo dos grãos (Pg) e teor de potássio dos grãos (Kg) do híbrido de milho 30F53, em função da inoculação das sementes com bactérias diazotróficas da espécie *A. brasilense* e adubação nitrogenada, UNIOESTE, 2011/2012.

F.V.	G.L	Quadrado médio		
		N g	P g	K g
B (L)	6	1,66ns	0,42**	70,89ns
T	9	3,33ns	0,07ns	44,20ns
L	1	15,86*	21,29**	16,74ns
TxL	9	1,87ns	0,04ns	37,14ns
Resíduo	54	1,83	0,08	35,81
C.V. (%)		7,57	15,03	14,03
Média geral		17,89	1,90	42,67

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

CAPÍTULO 2 – EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE INOCULANTE, FORMULADO A PARTIR DAS ESTIRPES Ab-V5 E Ab-V6 DE *Azospirillum brasilense*, NA CULTURA DO MILHO.

RESUMO: O presente trabalho teve por objetivo avaliar em condições de campo, o efeito de diferentes dosagens de um inoculante para a cultura do milho, formulado a partir das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*. Foram conduzidos quatro experimentos em quatro áreas agrícolas, sendo duas localizadas no estado do Paraná e duas no Rio Grande do Sul. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro blocos e seis tratamentos. Os tratamentos foram formados pelas doses de 0, 60 e 120 Kg ha⁻¹ de nitrogênio sem inoculação das sementes e a dose de 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio associada à inoculação com 100, 150 e 200 mL do inoculante para 50 Kg de sementes. Durante o estágio vegetativo da cultura avaliou-se o diâmetro do colmo e a massa seca da parte aérea das plantas. Também foram avaliados o número de grãos por espiga, a massa de mil grãos e a produtividade da cultura. Além disso, foram quantificados os teores de nitrogênio das folhas e dos grãos de milho. Os resultados obtidos indicaram que o inoculante formulado a base das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* associado à dose de 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio, resultou em incrementos no desenvolvimento vegetativo da cultura nos quatro experimentos realizados. Quando se considera as doses de inoculante testadas, a mais eficiente foi a de 200 mL para 50 Kg de sementes, que resultou nos maiores incrementos no número de grãos por espiga, massa de mil grãos e na produtividade dos experimentos realizados em Marechal Cândido Rondon, PR e Pato Bragado, PR. Assim, o inoculante utilizado demonstrou ser eficiente influenciando positivamente o crescimento, desenvolvimento e produtividade da cultura do milho.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias diazotróficas; Fixação biológica de nitrogênio; Adubação nitrogenada; Promoção do crescimento vegetal.

**EFFECT OF DIFFERENT INOCULANT DOSES, FORMULATED FROM STRAIN
Ab-V5 AND Ab-V6 FOR *Azospirillum brasilense*, IN MAIZE.**

ABSTRACT: The present study aimed to evaluate under field conditions, the effect of different doses of the inoculant for corn, made from strains Ab-V5 and Ab-V6 *A. brasilense*. Four experiments were conducted in four agricultural areas, two located in the state of Parana and two in Rio Grande do Sul. The experimental design was a randomized block design with four blocks and six treatments. The treatments were formed by the doses of 0, 60 and 120 kg ha⁻¹ of the nitrogen without seed inoculation and the dose of 60 kg ha⁻¹ of nitrogen associated with inoculation with 100, 150 and 200 mL of inoculum to 50 kg of seeds. During the vegetative stage were evaluated stem diameter and dry mass of the shoots. We also evaluated the number of grains per spike, the thousand grain weight and yield. In addition, we quantified the levels of nitrogen in the leaves and corn kernels. The results indicated that the inoculant formulated the basis of strains Ab-V5 and Ab-V6 *A. brasilense* associated with the dose of 60 kg ha⁻¹ nitrogen, resulted in increases in vegetative growing in four experiments. When considering the doses of inoculum tested, the most efficient was to 200 mL for 50 kg of seeds, which resulted in greater increases in the number of grains per spike, thousand grain weight and yield of the experiments conducted in Marechal Cândido Rondon, PR and Pato Bragado, PR. Thus, the inoculant used demonstrated to be effective positively influencing the growth, development and yield of maize.

KEY-WORDS: Diazotrophs; biological nitrogen fixation, nitrogen fertilization; promotion of plant growth.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho fornece vasta variedade de produtos que são utilizados na alimentação animal, em especial a suinocultura, avicultura e bovinocultura de leite, nas formas de farelo, rações e silagem. Na alimentação humana, este cereal é utilizado tanto na forma “in natura”, como milho verde, quanto na forma de produtos processados como massas, farinhas e pães (DOURADO NETO e FANCELLI, 2004).

O nutriente mais requerido para a cultura do milho é o nitrogênio, que, em muitas situações, é suprido insuficientemente (AMADO *et al.*, 2002). Segundo estes autores, quando em condições favoráveis de temperatura, radiação solar e água, a quantidade de nitrogênio requerida para alcançar grandes produtividades de grãos pode ultrapassar 150 Kg ha⁻¹.

O uso crescente de fertilizantes nitrogenados visando a obtenção de altas produtividades na cultura do milho, além de gerar impacto ambiental provocado pela lixiviação deste produto, eleva os custos de produção (PEDRINHO *et al.*, 2010). Dessa maneira, é crescente a preocupação em relação à contaminação ambiental pelo uso excessivo de fertilizantes, se fazendo necessário encontrar alternativas que possam substituir ao menos parcialmente o uso de fertilizantes nitrogenados. A utilização de biofertilizantes à base de microrganismos fixadores de nitrogênio e promotores do crescimento vegetal, pode se tornar uma alternativa viável em função de suprirem parcialmente o uso dos fertilizantes tradicionais, bem como, estimular o crescimento e desenvolvimento vegetal pela ação de substâncias promotoras do crescimento vegetal (COCKING, 2003).

Dentre as bactérias promotoras do crescimento vegetal em gramíneas podem ser destacadas as do gênero *Azospirillum*, em função de colonizarem rapidamente as plantas e serem considerados organismos dominantes da rizosfera (ROESCH *et al.*, 2006).

Os efeitos positivos da bactéria *Azospirillum sp.* para a cultura do milho, bem como para outras gramíneas, tem sido motivo de pesquisas no Brasil e em outros países nas últimas décadas. Segundo Okon e Vanderleyden (1997), essas bactérias além de disponibilizarem o N₂ atmosférico, possuem também a característica de produzirem substâncias promotoras de crescimento (auxinas, giberelinas e citocininas). Estes mesmos autores, ao avaliarem resultados de 22 anos de pesquisa com a inoculação a campo de *Azospirillum spp.* concluíram que a

utilização dessa tecnologia resulta em ganhos na estrutura das plantas, aumentando a área do sistema radicular resultando em maior absorção de água e nutrientes. Tal constatação é justificada pelo fato de a inoculação modificar a morfologia do sistema radicular, aumentando não apenas o número de radículas, mas, também, o diâmetro das raízes laterais e adventícias.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar em condições de campo, o efeito de diferentes doses de um inoculante para a cultura do milho, formulado a partir das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* em quatro áreas agrícolas localizadas nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização e caracterização das áreas experimentais

Foram utilizados, neste trabalho, os dados resultantes de quatro experimentos com a cultura do milho, realizados em quatro municípios da região Sul do Brasil, durante as safras de 2010/2011 e 2011/2012. Em seguida são apresentadas as características de cada local de condução dos trabalhos:

Marechal Cândido Rondon, PR: conduzido durante a safra 2010/2011, na Estação Experimental Antônio Carlos dos Santos Pessoa, pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. A referida área encontra-se sob Latitude de 24°33'S, Longitude 54°04'W, e altitude de 420 metros, sendo o solo classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico (EMBRAPA, 2006). O clima da região segundo classificação de Köppen denomina-se Subtropical Úmido Mesotérmico com verões quentes (temperatura média superior a 22°C) com tendência a concentração de chuvas e invernos com geadas pouco frequentes (temperatura média inferior a 18°C), e precipitação média anual de 1500 mm.

Crua Alta, RS: conduzido durante a safra 2011/2012 na Estação Experimental do Curso de Agronomia da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ). O município está localizado a uma longitude de 53° 37'27" W, latitude 28° 34'04" S e altitude média de 460 metros. O clima da região é subtropical, conforme classificação de Köppen. Apresentando precipitação média anual de 1300mm e temperatura média de 20°C. O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico típico textura argilosa (EMBRAPA, 2006).

Ibiraíaras, RS: Conduzido em uma propriedade particular. O município encontra-se sob Latitude de 28°22'12"S e longitude de 51°38'09"W, e altitude de 247 metros. O clima da região segundo classificação de Köppen denomina-se Subtropical com temperatura média superior de 20,6°C, e temperatura média inferior de 15,9°C e precipitação média anual de 1953 mm. O solo da área experimental é classificado como Neossolo.

Pato Bragado, PR: conduzido durante a safra 2011/2012 na estação experimental de Pato Bragado, PR, pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. A referida área encontra-se sob a latitude de 24°39'43"S e longitude de 54°15'53"W, e

altitude de 247 metros. O clima da região segundo classificação de Köppen denomina-se Subtropical Úmido Mesotérmico com verões quentes (temperatura média superior a 22°C) com tendência a concentração de chuvas e invernos com geadas pouco frequentes (temperatura média inferior a 18°C), e precipitação média anual de 1500 mm.

Antes da instalação dos experimentos foram coletas amostras de solo na profundidade 0-20 cm para realização da análise química, que foi realizada pelo Laboratório de Química da UNIOESTE, *campus* de Marechal Cândido Rondon, PR. Os resultados de ambas as análises se encontram nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1. Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.

Ca	Mg	K	Al ³⁺	H+Al	SB	CTC	MO	V	P	pH CaCl ₂
-----cmol _c dm ⁻³ -----							g dm ⁻³	%	mg dm ⁻³	
3,04	1,23	0,18	0,20	8,33	4,50	12,83	23,92	35,07	14,07	4,77

Tabela 2. Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Cruz Alta, RS, 2011/2012.

Ca	Mg	K	Al ³⁺	H+Al	SB	CTC	MO	V	P	pH CaCl ₂
-----cmol _c dm ⁻³ -----							g dm ⁻³	%	mg dm ⁻³	
2,60	0,90	0,20	0,25	7,70	4,10	11,80	23,60	34,40	32,10	5,00

Tabela 3. Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Ibiraiaras, RS, 2011/2012.

Ca	Mg	K	Al ³⁺	H+Al	SB	CTC	MO	V	P	pH CaCl ₂
-----cmol _c dm ⁻³ -----							g dm ⁻³	%	mg dm ⁻³	
4,0	1,5	0,22	0,30	6,69	6,01	12,70	41,0	47,35	20,6	5,2

Tabela 4. Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Pato Bragado, PR, 2011/2012.

Ca	Mg	K	Al ³⁺	H+Al	SB	CTC	MO	V	P	pH CaCl ₂
-----cmol _c dm ⁻³ -----							g dm ⁻³	%	mg dm ⁻³	
4,32	1,07	0,60	0,55	5,38	5,99	11,37	16,4	52,68	7,56	4,76

2.2 Delineamento experimental

Os experimentos foram implantados em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições e seis tratamentos, totalizando 24 parcelas experimentais. A descrição dos tratamentos encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5. Descrição dos tratamentos utilizados no experimento.

Tratamentos	Descrição dos tratamentos
0 N	Controle sem aplicação de nitrogênio e sem inoculação
60 N	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e sem inoculação
120 N	Dose de 120 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e sem inoculação
Az 100	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e inoculação das sementes com <i>Azospirillum brasilense</i> , estirpe Ab-V5 + Ab-V6, na dose de 100 mL 50 kg ⁻¹ de sementes
Az 150	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e inoculação das sementes com <i>A. brasilense</i> , estirpe Ab-V5 + Ab-V6, na dose de 150 mL 50 kg ⁻¹ de sementes
Az 200	Dose de 60 Kg ha ⁻¹ de nitrogênio e inoculação das sementes com <i>A. brasilense</i> , estirpe Ab-V5 + Ab-V6, na dose de 200 mL 50 kg ⁻¹ de sementes

2.3 Instalação e condução dos experimentos

2.3.1 Correção da fertilidade do solo

Conforme os resultados da análise química do solo e necessidades da cultura foram realizados a adubação de correção fosfatada e potássica com o auxílio de

semeadora adubadora, sendo aplicados 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 40 kg ha⁻¹ de K₂O nos experimentos realizados em Marechal Cândido Rondon, PR e Pato Bragado, PR. Para a correção do solo das áreas experimentais dos municípios de Cruz Alta e Ibiraiaras, RS, foram aplicados 300 kg ha⁻¹ na formulação 00-20-20 (0% de N, 20% de P₂O₅ e 20% de K₂O) e 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 40 kg ha⁻¹ de K₂O, respectivamente.

A adubação nitrogenada, conforme a definição dos tratamentos, foi dividida em três aplicações, sendo 40% na semeadura e o restante aplicado em cobertura nos estádios V4 e V6. Estes fornecidos na forma de uréia.

2.3.2 Inoculação das sementes

O inoculante utilizado foi fornecido pela Empresa Simbiose Indústria e Comércio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos LTDA. Este encontra-se em fase de registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e possui em sua formulação as estipes Ab-V5 e Ab-V6 da bactéria *A. brasilense*.

A inoculação foi realizada duas horas antes da semeadura, utilizando-se as doses de 100, 150 e 200 mL de inoculante para 50 kg de sementes, conforme a necessidade dos tratamentos já descritos.

O controle de qualidade dos inoculantes utilizados nos experimentos foi realizado pela estimativa do número mais provável (NMP) usando a Tabela de MacCrady em meio semi-sólido NFB (*Azospirillum spp.*) de acordo com metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995). Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Contagem de bactérias diazotróficas (UFC mL⁻¹) nos inoculantes utilizados em cada local de condução dos experimentos.

Local	Presença de bactérias diazotróficas
	UFC mL ⁻¹
Marechal Cândido Rondon, PR	2,61 x 10 ⁸
Cruz Alta, RS	1,36 x 10 ⁸
Ibiraiaras, RS	2,25 x 10 ⁸
Pato Bragado, PR	6,62 x 10 ⁸

2.3.3 Semeadura

A semeadura foi realizada com o auxílio de semeadora manual (matracas), distribuindo-se 5 sementes por metro no sulco de semeadura. Cada parcela experimental foi constituída de 6 linhas de 70 cm de espaçamento com 5 metros de comprimento e 3,5 de largura, totalizando 17,5 m². As sementes de milho utilizadas nos experimentos foram tratadas com fungicida Captan 750 TS (trichloromethylthio; cyclohex-4enedicarboximide) na dose de 0,2 kg por 100 kg de sementes, bem como, com o inseticida CropStar (Imidacloprido; Tiodicarbe) na dose de 0,2 L por 100 kg de sementes.

A data de realização da semeadura e os híbridos de milho utilizados em cada local de condução dos experimentos encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7. Data de realização da semeadura, híbridos de milho utilizados e tratamento de semente utilizado em cada local de condução dos experimentos.

Local	Data	Híbrido de milho
Marechal Cândido Rondon, PR	05/10/2010	DKB 390
Cruz Alta, RS	21/10/2012	30F53H
Ibiraíaras, RS	22/10/2012	DKB 240 PRO
Pato Bragado, PR	14/10/2012	30F53

2.4 Variáveis avaliadas

2.4.1 Variáveis biométricas

No momento em que as plantas se encontravam no estágio vegetativo com oito folhas totalmente expandidas (V8), foram realizadas as avaliações biométricas, sendo retiradas três plantas de forma aleatória dentro da área útil de cada parcela experimental. Foram mensuradas as seguintes variáveis:

2.4.1.1 Diâmetro basal do colmo

Antes da coleta foi realizado em cada planta a medida do diâmetro basal do colmo a 5 cm da superfície do solo (com auxílio de um paquímetro digital).

2.4.1.2 Massa seca da parte aérea

As plantas foram acondicionadas em sacos de papel kraft, devidamente identificados e posteriormente levadas para a secagem em estufa de circulação forçada de ar a $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 120 h, em seguida as mesmas foram retiradas dos sacos, pesadas em balança de precisão e os resultados foram expressos em g planta^{-1} .

2.4.2 Análise dos teores de nitrogênio das folhas

A coleta de tecido foliar para a análise dos teores de N, foi realizada no período do florescimento caracterizado pelo aparecimento dos estilos-estigmas na parte externa da espiga, sendo coletada a folha localizada abaixo da inserção da espiga principal de cada planta, num total de 10 folhas por unidade experimental, seguindo a metodologia proposta por Malavolta *et al.* (1997).

Posteriormente, as folhas foram lavadas em água destilada, armazenadas em sacos de papel Kraft identificados e, as plantas secas em estufa de circulação forçada de ar a $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72h. Após este procedimento, as folhas foram moídas, sendo retirada uma amostra de cada de 0,2 g que foram submetidas à digestão sulfúrica. A partir dessa foi determinado o teor de nitrogênio do tecido foliar por destilação por arraste de vapores de acordo com a metodologia proposta por Tedesco *et al.* (1995).

2.4.3 Componentes da produção e produtividade

Para a determinação dos componentes de produção foram amostradas 10

espigas de cada parcela experimental de forma aleatória, determinando-se os componentes de produção, diâmetro de espiga (mm), número de grãos por fileira e massa de mil grãos, sendo essa última determinada segundo Brasil (2009).

A produtividade foi determinada a partir da trilhagem dos grãos de todas as espigas coletadas na área útil de cada parcela experimental, sendo os resultados expressos em Kg ha^{-1} após a correção da umidade dos grãos para 13% (base úmida).

2.4.4 Análise dos teores de nitrogênio dos grãos

Após a determinação da produtividade, foram retiradas amostras dos grãos para posterior moagem em moinho de facas e passadas em peneira de 2 mm para a determinação dos teores de N, conforme metodologia descrita anteriormente.

2.5 Análise estatística

Após tabulados os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2008) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

Na figura 1, são apresentadas as médias mensais de precipitação pluviométrica observadas durante os meses de condução dos experimentos. Observa-se que durante a safra 2010/2011, em Marechal Cândido Rondon, PR (Figura 1A) e 2011/2012, em Ibiraiaras, RS (Figura 1D) a precipitação foi adequada para o desenvolvimento da cultura (Tabelas 8 e 11).

Na avaliação da precipitação ocorrida durante a safra 2011/2012 nos municípios de Pato Bragado, PR e Cruz Alta, RS pode-se observar que as médias mensais de precipitação ocorridas durante os meses de novembro e dezembro foram inferiores ao esperado (Figura 1 B e 1C), o que comprometeu a produtividade da cultura em ambos os locais (Tabelas 9 e 10).

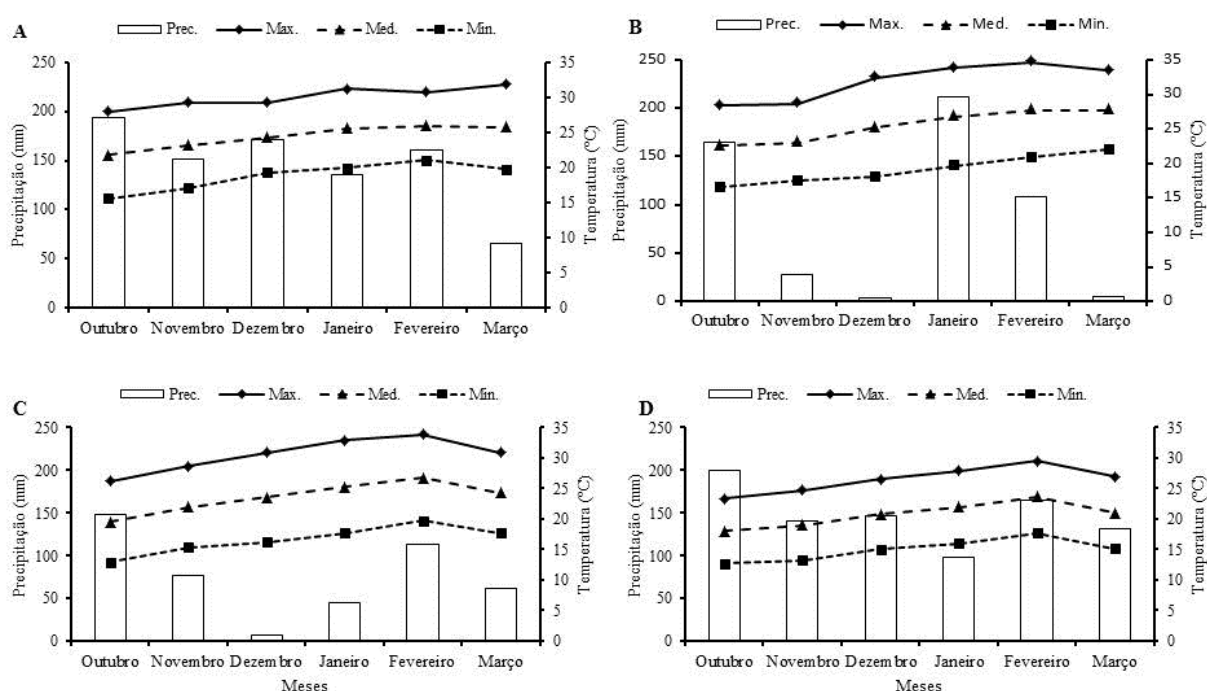


Figura 1. Acúmulo mensal de precipitação, médias de temperatura máxima, média e mínima dos quatro locais durante a condução dos experimentos. Marechal Cândido Rondon, PR (A), Pato Bragado, PR (B), Cruz Alta, RS (C) e Ibiraiaras, RS (D).

Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos no experimento realizado no município de Marechal Cândido Rondon, PR. Pode-se observar que houve diferença significativa para a maioria das variáveis analisadas, exceto em relação aos teores de nitrogênio dos grãos e das folhas de milho. Em relação ao diâmetro do colmo das plantas de milho, observa-se que o tratamento que utilizou 60

kg ha⁻¹ de nitrogênio associado à inoculação das sementes com *A. brasilense* (estirpes Ab-V5 + Ab-V6) na dosagem de 200 mL para 50 kg de sementes resultou em plantas com colmos mais espessos quando comparado aos demais tratamentos. Também, podem ser destacados os resultados de diâmetro do colmo obtidos pelos tratamentos com as doses intermediárias de inoculante (100 e 150 mL para 50 Kg de sementes), que foram semelhantes estatisticamente às plantas fertilizadas com 120 kg ha⁻¹ de nitrogênio, sendo superiores estatisticamente ao controle sem nitrogênio e ao tratamento fertilizado com 60 kg ha⁻¹ de nitrogênio, ambos sem inoculação de *A. brasilense*.

Quanto à massa seca total, verifica-se que a inoculação das sementes com 200 mL de inoculante associado a 60 kg ha⁻¹ de nitrogênio resultou em plantas com maior massa se comparada aos tratamentos não inoculados, exceto em relação à dose de 120 kg ha⁻¹ de nitrogênio que se manteve em igualdade (Tabela 8).

Tabela 8. Médias para diâmetro do colmo (DC), massa seca total (MST), massa de 1000 grãos (M1000), número de grãos por fileira (NGF), teor de nitrogênio dos grãos (NGRA), teor de nitrogênio das folhas (NF) e produtividade (PROD) do híbrido DKB 390, em função da inoculação das sementes com diferentes doses do inoculante a base da bactéria *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada, Marechal Cândido Rondon, PR, 2010/2011.

Tratamentos	D.C	MST	M1000	NGF	NGRA	NF	PROD
	mm	-----g-----		--	-----g Kg ⁻¹ -----		Kg ha ⁻¹
0 N	24,19 c	96,72 d	340,68 c	33,20 b	32,23	47,01	5383 c
60 N	24,68 c	117,96 cd	373,63 b	35,07 ab	34,18	51,35	6094 bc
120 N	26,83 b	163,49 ab	386,96 a	35,15 ab	34,32	51,64	6191 bc
Az 100	26,19 b	137,11 bc	375,56 b	35,05 ab	33,96	51,47	6476 bc
Az 150	26,50 b	140,60 abc	390,07 a	36,35 a	35,64	49,36	6623 b
Az 200	29,10 a	169,68 a	392,10 a	37,52 a	34,17	49,71	8024 a
C.V. (%)	4,79	16,04	6,63	5,47	7,97	9,88	10,37

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey a 0,05% de probabilidade.

Considerando-se ainda os resultados apresentados na Tabela 8 verifica-se que a inoculação das sementes do Híbrido DKB 390 com *A. brasilense* nas doses de 150 e 200 mL por 50 Kg de sementes, resultou em espigas com maior número de grãos por fileira quando comparado com o tratamento controle (0 N). Em relação aos

demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas. Para a massa de mil grãos do híbrido DKB 390, pode-se observar que os tratamentos com a dose de 120 kg ha⁻¹ de nitrogênio e *A. brasilense* nas doses de 150 e 200 mL de inoculante por 50 Kg de sementes, resultaram em grãos com maior massa em relação aos demais tratamentos utilizados.

A produtividade do híbrido DKB 390 (Dekalb[®]) foi influenciada positivamente quando realizou-se a inoculação das sementes com a dose de 200 mL do inoculante formulado a base das estipes Ab-V5 e Ab-V6 da bactéria *A. brasilense* para 50 Kg de sementes, tendo alcançado médias de produtividade significativamente superiores em relação aos demais tratamentos utilizados (Tabela 8).

Os resultados obtidos no experimento realizado no município de Pato Bragado, PR com o híbrido de milho 30F53 (Pioneer[®]) são apresentados na Tabela 9. Observa-se que houve efeito significativo dos tratamentos com a inoculação das sementes apenas para as variáveis de número de grãos por fileira e produtividade. Pode-se verificar que a utilização do tratamento com *A. brasilense* na dose de 200 mL para 50 Kg de sementes resultou em espigas com maior número de grãos por fileira quando comparado aos demais tratamentos, exceto em relação a *A. brasilense* na dose de 150 mL para 50 Kg de sementes, tendo este superado os tratamentos que não utilizaram a inoculação.

Em relação à produtividade alcançada no município de Pato Bragado, observa-se que esta foi baixa se comparada aos patamares produtivos da região Oeste do Estado do Paraná (Tabela 9). Isso pode ser explicado em função do baixo acúmulo de precipitação ocorrido na região durante a safra 2011/2012 neste município (Figura 1B). Entretanto, fica evidente a influência positiva da inoculação das sementes com *A. brasilense* independente da dose de inoculante aplicado. A tecnologia em questão resultou em valores superiores de produtividade em relação aos tratamentos controle (0 N) e a dose de 60 kg ha⁻¹ de nitrogênio. Também pode ser observado, que o tratamento com a maior dose de nitrogênio (120 kg ha⁻¹) se manteve em igualdade a todos os tratamentos utilizados no presente trabalho.

Tabela 9. Médias para diâmetro do colmo (DC), massa seca total (MST), massa de 1000 grãos (M1000), número de grãos por fileira (NGF), teor de nitrogênio dos grãos (NGRA), teor de nitrogênio das folhas (NF) e produtividade (PROD) do híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com diferentes doses do inoculante a base da bactéria *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada, Pato Bragado, PR, 2011/2012.

Tratamentos	D.C	MST	M1000	NGF	NGRA	NF	PROD
	mm	g		--	g Kg ⁻¹		Kg ha ⁻¹
0 N	23,79	166,28	301,75	21,52 c	16,12	11,59	2439 b
60 N	25,54	216,84	304,75	22,19 c	17,28	12,47	2438 b
120 N	25,02	195,07	307,25	21,20 c	16,40	17,72	2874 ab
Az 100	25,08	184,19	297,75	23,62 bc	17,06	19,47	3405 a
Az 150	25,30	205,58	297,75	25,80 ab	17,28	20,56	3460 a
Az 200	23,94	200,05	312,25	27,85 a	17,81	19,03	3564 a
C.V. (%)	4,79	15,24	6,63	3,04	7,97	9,88	17,96

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey a 0,05% de probabilidade.

Observa-se que o diâmetro do colmo foi influenciado positivamente pela inoculação das sementes com *A. brasilense*. Quando se utilizou 60 Kg de nitrogênio + *A. brasilense* nas doses de 150 e 200 mL por 50 kg de sementes estes tratamentos foram superiores estatisticamente para esta variável. O número de grãos por fileira respondeu à aplicação de nitrogênio e inoculação de *A. brasilense*, sendo estes tratamentos superiores à testemunha sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio. Verifica-se também na Tabela 10, que houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao teor de nitrogênio das folhas, porém, observa-se que o tratamento controle (sem aplicação de nitrogênio e sem inoculação) foi superior quando comparado à dose de 60 kg ha⁻¹ + *A. brasilense* na dose de 100 mL para 50 kg de sementes.

Em relação à produtividade obtida no experimento realizado no município de Cruz Alta, PR com o híbrido 30F53H, observa-se que estas foram inferiores a média de produtividade da região, tendo esse fato ocorrido em função da baixa de precipitação durante os meses de condução do experimento (Figura 1C). Para tanto, não foram observadas diferenças significativas em relação à produtividade entre os tratamentos utilizados no trabalho (Tabela 10).

Tabela 10. Médias para diâmetro do colmo (DC), massa seca total (MST), número de grãos por fileira (NGF), massa de 1000 grãos (M1000), teor de nitrogênio dos grãos (NGRA), teor de nitrogênio das folhas (NF) e produtividade (PROD) do híbrido 30F53H, em função da inoculação das sementes com diferentes doses do inoculante a base da bactéria *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada, Cruz Alta, RS, 2011/2012.

Tratamentos	D.C	MST	M1000	NGF	NGRA	NF	PROD
	mm	g		--	g Kg ⁻¹		Kg ha ⁻¹
0 N	23,53 b ¹	188,98	290,78	24,47 b	12,91	14,58 a	3466
60 N	23,52 b	232,41	289,02	26,23 ab	14,65	12,69 ab	3466
120 N	23,16 b	191,11	295,78	30,41 a	15,16	11,81 ab	3827
Az 100	24,08 b	197,80	293,95	30,04 a	15,09	11,59 b	2684
Az 150	26,86 a	189,53	285,95	29,23 a	14,87	12,25 ab	3462
Az 200	27,32 a	228,14	300,26	29,95 a	14,44	12,03 ab	4095
C.V. (%)	4,05	14,77	5,86	7,97	8,52	9,80	18,32

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey a 0,05% de probabilidade.

Na Tabela 11 são apresentados os valores médios referentes ao desempenho agrônomo do híbrido DKB 240 PRO (Dekalb[®]) no município de Ibiraiaras, RS, em função dos tratamentos. A análise dos dados demonstrou que das características avaliadas, o diâmetro do colmo, a massa seca total e o teor de nitrogênio das folhas foram influenciados pelos tratamentos utilizados.

Para os resultados de diâmetro do colmo das plantas de milho que as médias obtidas em função da inoculação das sementes com as doses de 100 e 150 mL do inoculante, foram superiores quando comparadas aos tratamentos com a dose de 60 Kg ha⁻¹ sem a inoculação das sementes e ao tratamento controle (sem aplicação de nitrogênio e sem inoculação). Porém, quando comparado aos demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas (Tabela 11).

Em relação à massa seca das plantas de milho, pode se observar que a inoculação com a dose de 150 mL do inoculante associados à dose de 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio resultou em valores superiores quando comparado à dose de 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio sem a inoculação das sementes, sendo que para os demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas (Tabela 11).

O teor de nitrogênio nas folhas de milho foi influenciado pelos tratamentos, o tratamento controle (sem nitrogênio e sem inoculação) resultou em valores significativamente inferiores aos obtidos nos demais tratamentos utilizados no presente trabalho (Tabela 11).

Tabela 11. Médias para diâmetro do colmo (DC), massa seca total (MST), número de grãos por fileira (NGF), massa de 1000 grãos (M1000), teor de nitrogênio dos grãos (NGRA), teor de nitrogênio das folhas (NF) e produtividade (PROD) do híbrido DKB 240 PRO, em função da inoculação das sementes com diferentes doses do inoculante a base da bactéria *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada, Ibiraiaras, RS, 2011/2012.

Tratamentos	D.C	MST	M1000	NGF	NGRA	NF	PROD
	mm	g		--	g Kg ⁻¹		Kg ha ⁻¹
0 N	31,34 b	167,10 ab	438,90	40,0	13,41	13,40 b	6517
60 N	30,57 b	155,49 b	439,57	40,3	15,09	16,41 a	5896
120 N	33,94 ab	176,35 ab	443,76	39,8	14,87	15,97 a	6572
Az 100	36,18 a	179,17 ab	444,55	40,6	13,56	16,41 a	7114
Az 150	37,52 a	216,13 a	447,25	40,5	14,22	16,92 a	6438
Az 200	33,96 ab	180,40 ab	452,41	39,5	14,00	15,75 a	5811
C.V. (%)	5,29	13,19	7,18	4,21	12,50	6,05	12,35

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey a 0,05% de probabilidade.

Em uma análise geral das médias de produtividade dos quatro experimentos realizados (Figura 2), pode se observar que a utilização do inoculante a base das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*, indiferente da dose (100, 150 e 200 mL) e híbrido de milho utilizado, resultou em incrementos de 446, 522 e 900 Kg ha⁻¹, respectivamente, quando comparados com o tratamento com a dose de 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio sem inoculação das sementes. Quando realizada a mesma comparação, porém, com a média do tratamento com a dose de 120 Kg ha⁻¹ dos quatro experimentos, os ganhos foram de 53, 109 e 507 Kg ha⁻¹, em relação aos tratamentos, Az 100, Az 150 e Az 200, respectivamente (Figura 2). Considerando-se o desempenho de cada tratamento utilizado nos experimentos, observa-se que a aplicação 60 Kg ha⁻¹ + *A. brasilense* na dose de 200 mL para 50 Kg de sementes, resultou em maior incremento médio na produtividade (5373,5 Kg ha⁻¹).

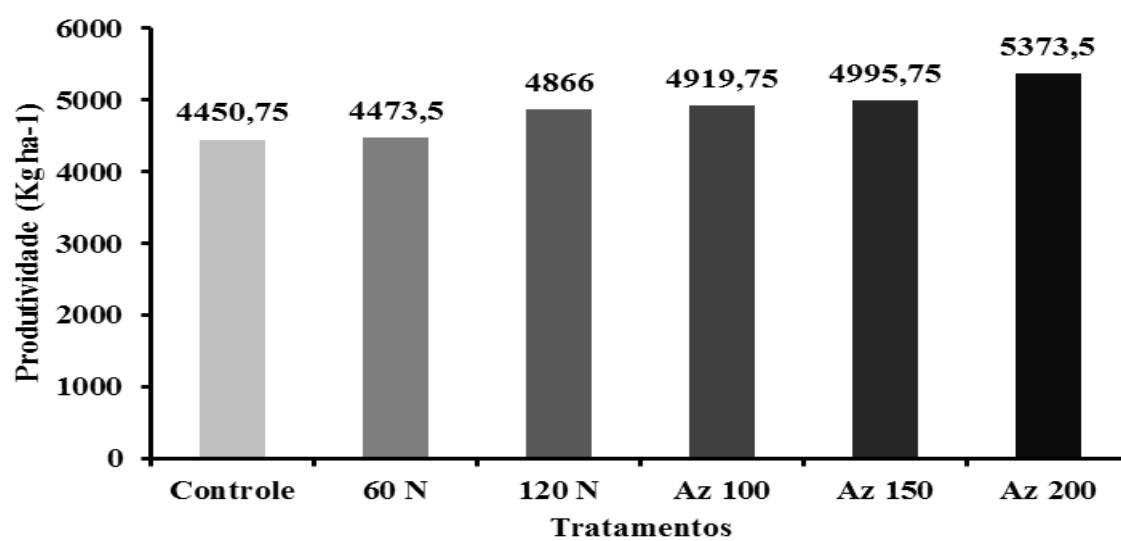


Figura 2. Médias de produtividade de quatro experimentos com a cultura do milho, inoculadas e não inoculadas com *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 associada a aplicação de 60 Kg ha⁻¹ de nitrogênio.

4 DISCUSSÃO

De maneira geral a utilização de *A. brasilense*, teve efeito significativo, possibilitando incrementos nos estágios vegetativo e reprodutivo das plantas de milho.

Um ponto que deve ser destacado são as características do inoculante utilizado nos experimentos, sendo que este continha como princípio ativo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 da bactéria *A. brasilense*. Ambas as estirpes possuem recomendação do Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA). Também, deve ser considerado o fato de que a contagem do número de células viáveis por mL de inoculante encontrava-se no mínimo em $1,36 \times 10^8$, contagem essa acima do mínimo recomendado pelo MAPA para a formulação de inoculantes de gramíneas, demonstrando que o material fornecido pela empresa produtora está dentro dos padrões de qualidade exigidos.

Em relação aos resultados obtidos em cada local de realização dos experimentos, observou-se que a influência das condições climáticas foi fator limitante para os índices de produtividade em ao menos dois locais de realização dos trabalhos. O baixo acúmulo de precipitação mensal (Figuras 1 B e C) ocorrida durante a safra 2011/2012 nos municípios de Pato Bragado, PR e Cruz Alta, RS, resultou na redução de mais de 50% na produção se comparado à média produtiva de ambas as regiões. Entretanto, nos experimentos realizados nos municípios de Marechal Cândido Rondon, PR e Ibiraiaras, RS a precipitação se manteve dentro das expectativas, não tendo esse fator influenciado nos índices de produtividade em ambos os locais.

A avaliação isolada de cada local de realização dos experimentos, bem como, do híbrido utilizado, demonstrou que no experimento realizado em Marechal Cândido Rondon, PR, a inoculação com *A. brasilense* foi positiva, tendo influenciado significativamente as variáveis de diâmetro do colmo, massa seca total, massa de mil grão e produtividade (Tabela 8). Da mesma forma, os resultados obtidos em Pato Bragado, PR, também apresentaram efeito positivo da inoculação com *A. brasilense*, tendo o uso dessa tecnologia incrementado significativamente o número de grãos por fileira e a produtividade final do híbrido 30F53 (Tabela 9).

Quanto aos resultados do experimento realizado em Cruz Alta, RS, as respostas para a produtividade de grãos não foram significativas para a inoculação

com *A. brasilense*. Entretanto, foram observados ganhos de 18 e 7% na produtividade quando comparado ao tratamento que utilizou 200 mL de inoculante, com os de 60 e 120 kg ha⁻¹ de nitrogênio, respectivamente. Durante o período vegetativo da cultura a inoculação proporcionou ganhos significativos na espessura do colmo e massa da parte aérea das plantas (Tabela 10).

Okon e Labandera-Gonzáles, (1994) ao avaliarem vinte anos de estudos com a inoculação de *Azopsirillum* sp. verificaram efeito positivo em 60 a 70% dos experimentos. Nesse sentido, os efeitos benéficos da inoculação com *A. brasilense* vêm sendo difundidos em diversos trabalhos na literatura (DÖBEREINER e BALDANI, 1982; REYNDERS e VLASSAK, 1982; BODDEEY *et al.*, 1986; DÖBEREINER e SALOMONE, 1995; SALOMONE e DÖBEREINER, 1996; CAVALLET *et al.*, 2000; ZEHNDER *et al.*, 2001; HUNGRIA *et al.*, 2010; GARCIA de SALOMONE *et al.*, 2010), que atribuem o maior desenvolvimento das plantas, bem como, os incrementos obtidos em produtividade, as características que essas bactérias possuem em sintetizar fitormônios relacionados ao crescimento vegetal como as auxinas, giberilinas e citocininas e ainda pela disponibilização do N₂ presente no solo em formas absorvíveis para as plantas. Além disso, as bactérias fixadoras de nitrogênio podem controlar os níveis de etileno nas plantas, reduzindo efeitos que o excesso desse hormônio pode causar (GROSH *et al.*, 2003; GOVINDASAMY *et al.*, 2008; DUAN *et al.*, 2009).

As rizobactérias promotoras do crescimento vegetal, incluindo as da espécie *A. brasilense* são eficazes em influenciar a capacidade das plantas para que estas venham a se restabelecer mais rapidamente sob condições estressantes. Neste sentido, a efetividade dos efeitos benéficos de *A. brasilense* no crescimento e desenvolvimento das plantas pode ser, além de outros efeitos, atribuída a baixa disponibilidade de água no solo. Segundo Cavallet *et al.* (2000), a inoculação com *A. brasilense* modifica a morfologia do sistema radicular das plantas, incrementando o diâmetro das raízes laterais e adventícias, bem como, aumentando o número de pelos radiculares. Dessa maneira, o incremento do sistema radicular das plantas em função da inoculação com *A. brasilense* proporciona maior longevidade dos tecidos durante os períodos de seca, aumentando também a atividade fotossintética, o acúmulo de fotoassimilados para os grãos ou ainda a absorção de nutrientes pelas plantas (DIDONET *et al.*, 2000). Além disso, sabe-se que a contribuição da fixação biológica de nitrogênio por essa espécie de bactéria para culturas como milho e trigo

é entre 5 e 18 %, se fazendo necessário considerar a ação dos mecanismos de promoção do crescimento e não apenas a contribuição pela fixação biológica de nitrogênio (BASHAN *et al.*, 1989), o que explica as muitas respostas negativas em relação ao acúmulo de nitrogênio nos tecidos das plantas inoculadas.

A deficiência hídrica associada a altas temperaturas pode alterar a fisiologia das plantas de milho, reduzindo acentuadamente a taxa de crescimento das gemas axilares, pois essa cultura tende a priorizar o crescimento apical. Essa característica faz com que ocorra uma defasagem temporal entre o desenvolvimento do pendão e da espiga (SANGOI, 1996). Devido ao período de liberação de pólen ocorrer rapidamente, uma pequena defasagem entre a o florescimento masculino e feminino pode comprometer a fertilização, reduzindo o número de grãos por espiga e o rendimento da cultura (BOLAÑOS e EDMEADES, 1996). Além disso, os grãos de pólen que alcançam o estilo estigma podem não germinar em função de seu ressecamento, que pode ocorrer sob condições de baixa umidade relativa e altas temperaturas (SANGOI *et al.*, 2010). Assim, pode se fazer uma relação entre os resultados obtidos no experimento realizado no município de Pato Bragado, PR, pois se verificou uma grande redução no número de grãos por espiga nesse local, o que refletiu na produtividade da cultura. Porém nesse caso, a inoculação com *A. brasilense* pode ter influenciado positivamente, reduzindo os efeitos deletérios resultantes da baixa umidade e altas temperaturas (Tabela 9).

No experimento realizado em Ibiraiaras, foi observada baixa influência para a inoculação com *A. brasilense*, sendo verificado o efeito apenas para a variável de diâmetro do colmo das plantas de milho do híbrido DKB 240 PRO (Tabela 11). A não diferença de produtividade entre os tratamentos com e sem inoculação, bem como, entre as doses de nitrogênio utilizadas no experimento realizado no município de Ibiraiaras pode ser explicada em função da área utilizada para a realização do experimento possuir um histórico da alta tecnologia relacionada à fertilização, excelentes condições climáticas para o desenvolvimento da cultura, utilização de plantio direto a mais de 20 anos, sendo realizada a manutenção anual do resíduo orgânico com a semeadura de plantas de cobertura durante o inverno. A associação dessas técnicas de manejo aliada a alta fertilidade do solo verificada na análise química (Tabela 3) influenciou o crescimento e desenvolvimento da cultura de tal maneira, que não houve resposta de nenhum dos tratamentos utilizados.

A utilização do sistema de plantio direto após vários anos pode incrementar consideravelmente a quantidade de nitrogênio presente no solo (WIETHOLTER, 1997). Nesse sentido, Cerretta (1995), verificou que após nove anos em solo sob plantio direto os incrementos na quantidade de nitrogênio foram de aproximadamente 92% na forma de ácidos húmicos, sendo essa considerada uma das frações mais estáveis de matéria orgânica presente no solo.

Os resultados demonstraram que a utilização do inoculante para a cultura do milho, tendo como princípio ativo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 da bactéria *A. brasilense*, quando associado à aplicação de doses intermediárias de nitrogênio resultou em médias equivalentes ou até superiores em relação à utilização da dose de fertilizante nitrogenado recomendada para a cultura.

5 CONCLUSÕES

O inoculante formulado à base das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* resultou em incrementos no desenvolvimento vegetativo da cultura nos quatro experimentos realizados.

Entre as dosagens do inoculante utilizadas, a mais eficiente foi a de 200 mL do inoculante para 50 Kg de sementes que resultou nos maiores incrementos no estágio reprodutivo e na produtividade dos experimentos realizados em Marechal Cândido Rondon, PR e Pato Bragado, PR.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. C. dos S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, p. 129-132, 2000.

AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.241-248, 2002.

BODDEY, R.M. et al. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 95, p.109-121, 1986.

BOLANOS, J.; EDMEADES, G.O. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 48, p.65-80, 1996

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

CAVALETT, L. E. et al. Corn productivity in response to nitrogen application and seed inoculation with *Azospirillum* spp. **Journal Agricultural Enviromental Engineering**, v. 4, p. 129-132, 2000.

CERETTA, C.A. **Fracionamento de N orgânico, substâncias húmicas e caracterização de ácidos húmicos de solo em sistema de culturas sob plantio direto**. 1995, 127p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

COCKING, E. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, v. 252, p. 169 – 175, 2003.

DIDONET, D.A. et al. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido à inoculação de *Azospirillum*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, p. 401-411, 2000.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, Embrapa-SPI; Itaguaí, RJ, Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, 1995. 60p.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A.L. **Produção de milho**. 2 ed. Guaíba: Agropecuária, 2004, 360 p.

DUAN, J. et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from Southern Saskatchewan. **Microbiology and Ecology**, v. 57, p. 423–436, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2006. 306p.

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

GARCÍA DE SALAMONE, I.E. et al. Field response of rice paddy crop to inoculation with *Azospirillum*: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. **Plant and Soil**, v.336, p. 351- 362, 2010.

GHOSH S, et al. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 41, p.277–281, 2003.

GOVINDASAMY V, et al. Isolation and characterization of ACC deaminase gene from two plant growth-promoting rhizobacteria. **Current Microbiology**, v. 57, p. 312–317, 2008.

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

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

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.7, p.366-370, 1997.

PEDRINHO, E.A.N., et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v.69, p.905-911, 2010.

REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. **Plant Soil**, v. 66, p. 217-273, 1982.

ROESCH, L. F. W. et al. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, n. 9, p. 967-974, 2006.

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

SANGOI, L. **An ideotype of maize for conditions of high temperature and low moisture**. 1996, 350p. Tese (Doutorado em Crop Production and Plant Physiology) - Iowa State University of Science and Technology, 1996.

SANGOI, L. et al. **Ecofisiologia da cultura do milho para altos rendimentos**. Lages: Graphel, 2010, 87p.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 147p. (Boletim Técnico, 5).

WIETHÖLTER, S. Adubação nitrogenada para trigo cultivado apos as culturas de soja e de milho, em sistema plantio direto. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DO SISTEMA PLANTIO DIRETO, 2., 1997, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1997. p. 221-224

ZEHNDER, G.W. et al. Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.39–50, 2001.