

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

JANAÍNA DARTORA

**POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO POR ESTIRPES DE
BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS NA CULTURA DO MILHO**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2015

JANAÍNA DARTORA

**POTENCIAL DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO POR ESTIRPES DE
BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS NA CULTURA DO MILHO**

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

Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2015

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

Dartora, Janaina

D226p Potencial de promoção do crescimento por estirpes de bactérias associativas na cultura do milho / Janaina Dartora.
- Marechal Cândido Rondon, 2015.
103 p.

Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2015.

1. Milho. 2. Adubos e fertilizantes. 3. Nitrogênio - Fixação. 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 da Engenheira Agrônoma **JANAÍNA DARTORA**. Aos vinte e três dias do mês de fevereiro de 2015, às 08h, sob a presidência do Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Engenheira Agrônoma Janaína Dartora, 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 **"DOUTORA EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini (UEM), Prof. Dr. José Barbosa Duarte Júnior (Unioeste), Prof. Dr. Marcelo Andreotti (Unesp), Prof. Dr. Eurides Küster Macedo Júnior (Unioeste) e Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador).

Iniciados os trabalhos, a candidata apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua tese, intitulada: **"Potencial de promoção de crescimento por estirpes de bactérias associativas 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. Alessandro Lucca Braccini.....Aprovado
Prof. Dr. José Barbosa Duarte JúniorAprovado
Prof. Dr. Marcelo Andreotti.....Aprovado
Prof. Dr. Eurides Küster Macedo Júnior.....Aprovado
Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador).....Aprovado

Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de **"DOUTORA 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, 23 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini

Prof. Dr. José Barbosa Duarte Júnior

Prof. Dr. Marcelo Andreotti

Prof. Dr. Eurides Küster Macedo Júnior

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

Aos meus pais Juarez e Líbera Dartora
pela educação e princípios.

Ao meu marido Anderson Luiz Just pela
compreensão e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por permitir a conclusão de mais esta etapa.

À minha família, pais, irmão, tios, primos, avós, madrinha, sogro e sogra, cunhados, enfim todos por estarem sempre ao meu lado, compreendendo cada ausência, e incentivando-me a seguir adiante sem cobranças ou críticas.

Ao meu marido, Anderson Luiz Just pelo amor, compreensão e incentivo durante esta jornada, pela paciência dedicada em todos os momentos difíceis me encorajando a não desistir e vencer todas as dificuldades.

Ao Professor Dr. Vandeir Francisco Guimarães por todos os anos de orientação, pela confiança, carinho, amizade, ensinamentos e por servir de exemplo pessoal e profissional, mesmo que a distância e os compromissos diários dificultassem nossa comunicação.

Aos Professores Edmar Vasconcellos e Lindolfo Storck pelos ensinamentos, conselhos e auxílio nas questões relacionadas à análise estatística dos experimentos.

A todos os amigos por cada palavra de apoio, me trazendo paz e serenidade para continuar esta caminhada, em especial à Edilaine Della Valentina Gonçalves por não medir esforços em me ajudar a cada etapa mesmo com tantos compromissos a cumprir.

Aos amigos e colegas que auxiliaram de alguma forma na execução dos trabalhos envolvidos nesta tese: Edilaine Della Valentina Gonçalves, Cid Renan Jacques Menezes, Wilson Tatto, Endrigo Antônio de Carvalho, Joice Mari Assmann, Laura Alexandra Madella, Mariângela Brito Freiburger, Lucas Dartora e Tiago Just.

À Universidade Estadual de Londrina e à Pioneer Sementes[®], pelo fornecimento do material (inoculantes e sementes) necessário para este estudo.

À Unioeste e toda sua equipe, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), que de forma gentil e acessível sempre auxiliaram em tudo o que foi necessário, estimulando o aluno a não desistir de seus objetivos.

Ao Iapar, e toda sua equipe de funcionários, por viabilizar a execução deste estudo em sua área experimental, fornecendo a estrutura e apoio necessários.

A todos que colaboraram de alguma forma, muito obrigada.

*“Nada me perturbe. Nada me amedronte. Tudo passa. A paciência tudo alcança. A quem tem
Deus nada falta. Só Deus basta.”
(Santa Tereza D’Ávila)*

RESUMO

DARTORA, Janaína. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Fevereiro - 2015. **Potencial de promoção do crescimento por estirpes de bactérias associativas na cultura do milho.**

Orientador: Vandeir Francisco Guimarães.

A seleção de estirpes específicas e eficientes constitui um fator chave para o sucesso da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP's). O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de inoculação de estirpes de BPCP's sobre o desempenho produtivo da cultura do milho, híbrido 30F53, na safra verão 2012/13 e 2013/14. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições e parcelas subdivididas, cujas subparcelas foram constituídas de anos de cultivo (2012/13 e 2013/14) e as parcelas, por nove tratamentos relacionados à inoculação de estirpes de BPCP's: controle (sem N e sem inoculação); 30 kg ha⁻¹ N na semeadura; 160 kg ha⁻¹ N (30 kg ha⁻¹ N na semeadura + 130 kg ha⁻¹ N em cobertura); inoculação das estirpes Ab-V5; HM053; L26; L27; 4331; e 8121, associadas a 30 kg ha⁻¹ N na semeadura. Foram avaliadas as variáveis: altura de planta, diâmetro basal do colmo, massa seca de parte aérea, área foliar; índices de clorofila *a*, *b* e total; teores de macro e micronutrientes nas folhas e grãos, altura de inserção, comprimento de espiga, diâmetro de espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileira, massa de espiga e produtividade. Existe influência das condições de cultivo de cada ano no desempenho das estirpes de BPCP's avaliadas. A estirpe de *Azospirillum brasilense* HM053 apresenta elevado potencial de inoculação sob condições favoráveis ao desenvolvimento da cultura do milho, enquanto a estirpe de *Rhizobium* sp. 8121 mostra-se promissora mesmo que o metabolismo vegetal seja afetado por estresse de natureza abiótica. A adubação de semeadura e em cobertura com N, em comparação à inoculação associada à adubação nitrogenada de semeadura, promove maior desempenho produtivo do milho em condições desfavoráveis e maior incremento no teor foliar de N e de clorofila. Os teores foliares de macro e micronutrientes das plantas de milho não são afetados pela inoculação das estirpes de BPCP's, porém os teores de P, Ca, Mg e Zn nos grãos são influenciados de forma positiva pela inoculação da estirpe HM053. A produtividade apresenta forte correlação com a maior parte das variáveis, em especial com a área foliar, índices de clorofilas *a*, *b* e total e teor foliar de N na planta.

Palavras-chave: *Zea mays* L., Rizobactérias, Seleção de estirpes, Adubação nitrogenada.

ABSTRACT

DARTORA, Janaína. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, February - 2015. **Potential of growth promotion by strains of associative bacteria in maize.** Advisor: Vandeir Francisco Guimarães.

The selection of particular and efficient strains is a key factor for the success of the inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB). This study aimed to evaluate the potential for inoculation of strains of PGPB on performance of the maize crop, hybrid 30F53, in the summer harvest 2012/13 and 2013/14. The experimental design was a randomized block with four replications and split plot, whose subplots were composed of crop years (2012/13 and 2013/14) and the plots for nine treatments related to inoculation with strains of PGPB: control (no N and without inoculation); 30 kg ha⁻¹ N at sowing; 160 kg ha⁻¹ N (30 kg ha⁻¹ N at sowing + 130 kg ha⁻¹ in topdressing; inoculation of strains Ab-V5; HM053; L26; L27; 4331; and 8121, associated with 30 kg ha⁻¹ N at sowing. Were evaluated the parameters: plant height, basal stem diameter, shoot dry mass, leaf area; contents of chlorophyll *a*, *b* and total; macro and micronutrients contents in the leaves and grains, insertion height, ear length, ear diameter, number of kernels rows per ear, number of kernels per row, mass ear and grain productivity. There is influence of crop conditions of each year in the performance of strains PGPB's evaluated. The HM053 strain of *A. brasilense* has high potential for inoculation under conditions favorable to the development of maize, while the 8121 strain of *Rhizobium* sp. shows to be promising when the plant metabolism is affected by abiotic stress nature. Nitrogen fertilization at sowing and topdressing, compared to inoculation associated with nitrogen fertilizer at sowing, promotes greater productive corn performance in unfavorable conditions and greater increase in leaf N content and chlorophyll content. Foliar levels of macro and micronutrients of corn plants are not affected by inoculation with strains of PGPB, but the P, Ca, Mg and Zn in the grains are influenced positively by inoculation of HM053 strain. Corn yield has a strong correlation with most of the variables, especially the leaf area, chlorophyll *a*, *b* and total contents and foliar N in the plant.

Keywords: *Zea mays* L. Rhizobacteria. Selection of strains. Nitrogen fertilization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Precipitação pluvial acumulada e temperatura máxima, mínima e média em decêndios no período de outubro de 2012 a março de 2013 e de novembro de 2013 a abril de 2014. Iapar, Pato Branco, PR.	41
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Pato Branco, 2012.....	42
Tabela 2 - Altura de planta, diâmetro basal do colmo, massa seca da parte aérea e área foliar, nas fases vegetativa (V) e reprodutiva (R), de plantas de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo, no caso da interação. Iapar, Pato Branco – PR.....	48
Tabela 3 - Altura de planta (AP), diâmetro basal do colmo (DCO), massa seca da parte aérea (MSPA) e área foliar (AF), nas fases vegetativa (V) e reprodutiva (R), de plantas de milho híbrido (30F53) em função de anos de cultivo. Iapar, Pato Branco – PR.....	52
Tabela 4 - Teores foliares de clorofila a, b e total, nas fases vegetativa (V) e reprodutiva (R), de plantas de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo, no caso das interações. Iapar, Pato Branco.....	54
Tabela 5 - Teores foliares de clorofila a, b e total, nas fases vegetativa e reprodutiva, de plantas de milho híbrido (30F53) em função de anos de cultivo. Iapar, Pato Branco – PR.....	57
Tabela 6 - Teores foliares N, P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, B e Mn de plantas de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com estirpes de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo, no caso das interações. Iapar, Pato Branco – PR.....	59
Tabela 7 - Teores foliares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), zinco (Zn), boro (B) e manganês (Mn) de plantas de milho híbrido (30F53) em função de anos de cultivo. Iapar, Pato Branco – PR.....	65
Tabela 8 - Teores de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, B e Mn em grãos de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com estirpes de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo, no caso das interações. Iapar, Pato Branco – PR.....	70
Tabela 9 - Teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), zinco (Zn), boro (B) e manganês (Mn) em grãos de milho híbrido (30F53) em função de anos de cultivo. Iapar, Pato Branco – PR.....	71
Tabela 10 - Altura de inserção da espiga (AI), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras por espiga (NF), número grãos por fileira (NG), massa da espiga (ME) e produtividade (PROD) de plantas de milho híbrido (30F53) em função da	

inoculação das sementes com estirpes de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo, no caso das interações. Iapar, Pato Branco – PR	73
Tabela 11 - Coeficientes de correlação de Pearson entre produtividade (PROD), altura de planta (ALT), diâmetro basal do colmo (DCO), massa seca da parte aérea (MSPA), área foliar (AF), teor de clorofila a (CLA), teor de clorofila b (CLB), teor de clorofila total (CLT), altura de inserção de espiga (AI), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), massa da espiga (ME) e teor de nitrogênio foliar (N) de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo. Iapar, Pato Branco – PR	75
Tabela 12 - Coeficientes de correlação parcial entre produtividade (PROD), altura de planta (ALT), diâmetro basal do colmo (DCO), massa seca da parte aérea (MSPA), área foliar (AF), teor de clorofila a (CLA), teor de clorofila b (CLB), teor de clorofila total (CLT), altura de inserção de espiga (AI), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), massa da espiga (ME) e teor de nitrogênio foliar (N) de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo. Iapar, Pato Branco – PR	76
Tabela 13 - Altura de inserção da espiga (AI), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras por espiga (NF), número grãos por fileira (NG), massa da espiga (ME) e produtividade (PROD) de plantas de milho híbrido (30F53) em função de anos de cultivo. Iapar, Pato Branco – PR.....	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.1.1 Objetivos Específicos	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 A CULTURA DO MILHO	13
2.2 NITROGÊNIO	16
2.2.1 Dinâmica do Nitrogênio no Sistema Solo-Planta-Atmosfera	16
2.2.2 Adubação Nitrogenada na Cultura do Milho	18
2.2.3 Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas	20
2.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)	22
2.3.1 Aspectos Gerais e Associação de BPCP's com Gramíneas	22
2.3.2 Bioquímica da Associação Planta x Bactéria e Promoção do Crescimento por BPCP's	27
2.3.3 Potencial de Inoculação de BPCP's em Milho e Seleção de Estirpes	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL	41
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
3.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	43
3.4 AVALIAÇÕES	44
3.4.1 Variáveis Biométricas	44
3.4.2 Análise dos Teores de Macro e Micronutrientes em Tecidos Foliareos	44
3.4.3 Análise do Teor de Clorofila	45
3.4.4 Componentes da Produção e Produtividade	45
3.4.5 Análise dos Teores de Macro e Micronutrientes nos Grãos	46
3.4.6 Análise de Dados	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 VARIÁVEIS BIOMÉTRICAS	47
4.2 TEOR DE CLOROFILA	53
4.3 TEORES DE MACRO E MICRONUTRIENTES NAS FOLHAS	58
4.4 TEORES DE MACRO E MICRONUTRIENTES NOS GRÃOS	68
4.5 COMPONENTES DA PRODUÇÃO	72
5 CONCLUSÕES	80

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o principal cereal produzido no Brasil, apresentando importante papel no agronegócio brasileiro, com ampla diversidade de uso e elevado potencial produtivo.

O nitrogênio (N) é considerado um dos principais fatores de produção envolvidos no incremento da produtividade do milho, pois constitui o nutriente absorvido em maior quantidade pela cultura, tornando necessária a adição de N ao solo visando complementar seu reservatório natural. A obtenção de N pelas plantas pode ocorrer via fixação natural, biológica ou não, e através da adição de fertilizantes nitrogenados, a qual representa o principal veículo de adição de N na forma e quantidade requeridas pelas plantas aos sistemas agrícolas de produção.

O processo de adição de N via fertilizantes sintéticos implica em elevado custo, tanto econômico quanto ambiental, pois cerca de 50% do N adicionado como fertilizante é perdido por lixiviação e/ou na forma de gases. Além disso, as indústrias brasileiras não são capazes de atender a demanda interna do produto, sendo necessária a importação, o que encarece ainda mais sua aquisição. Nesse contexto, uma alternativa visando otimizar o uso de fertilizantes nitrogenados inorgânicos e substituir, no mínimo parcialmente, a adubação mineral nitrogenada no milho, consiste no aproveitamento dos benefícios da associação de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) à cultura do milho.

Diversos estudos relatam o efeito de promoção do crescimento através da inoculação de BPCP's na cultura do milho, especialmente do gênero *Azospirillum*, sendo os efeitos positivos dessa interação planta-bactéria associados principalmente ao aumento da superfície de absorção radicular, resultante da produção de fito-hormônios (auxinas, giberelinas e citocininas) pelas bactérias. No entanto, outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal, como a solubilização de fosfatos, a fixação biológica de N e o aumento da atividade de enzimas específicas, também são associados às BPCP's.

Lana et al. (2012) relatam efeito positivo da inoculação com *A. brasilense* na ausência de N em cobertura, com incremento de 15,4% na produtividade de milho em relação ao tratamento sem inoculação. Quadros (2009) verificou que a inoculação de *A. brasilense*, juntamente com a adição de 50 kg ha⁻¹ na semeadura, proporcionou desempenho equivalente à aplicação de 130 kg ha⁻¹ de N para a mesma produtividade de grãos, confirmando que a inoculação pode suprir parte do N necessário à cultura. Outros estudos destacam também a promoção do crescimento em milho proporcionada por outros gêneros de BPCP's, como:

Sphingomonas spp. (PEDRINHO et al., 2010), *Burkholderia* spp. (ALVES, 2007), *Herbaspirillum* spp. (DOTTO et al., 2010; ARAÚJO et al., 2013) e *Rhizobium* spp. (HAHN, 2013, PERES, 2014).

No entanto, embora já existam produtos comerciais no mercado, fatores como genótipo da planta, condições de cultivo, estirpes com baixo potencial e ineficiência do processo de inoculação têm sido apontados como causas da variabilidade nas respostas do milho à inoculação destes microrganismos associativos. Considerando que a seleção de estirpes eficientes constitui um fator chave para o sucesso da inoculação, estudos que busquem contemplar a complexidade desse fator devem ser estimulados visando minimizar os custos de produção da cultura e o impacto ambiental da adubação nitrogenada (HUNGRIA et al., 2010).

Portanto, a inoculação de estirpes de BPCP's com afinidade ao genótipo da planta hospedeira associada à adubação nitrogenada pode representar uma alternativa sustentável para obtenção de maiores produtividades.

1.1 OBJETIVO GERAL

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de promoção do crescimento por estirpes de bactérias associativas na cultura do milho.

1.1.1 Objetivos Específicos

- a) Comparar a inoculação de estirpes de BPCP's a fim de verificar qual proporcionaria maior incremento na produtividade da cultura do milho em dois anos de cultivo;
- b) Avaliar a adubação nitrogenada em duas doses (30 e 160 kg ha⁻¹ N) em comparação à inoculação de estirpes de BPCP's sobre as variáveis biométricas, fisiológicas, químicas e produtivas do milho;
- c) Avaliar o teor foliar de macro e micronutrientes acumulados nas plantas de milho inoculadas ou não com estirpes de BPCP's, associada à adubação nitrogenada;
- d) Verificar a correlação entre produtividade de grãos do milho e variáveis biométricas, índice de clorofila, teor foliar de N e componentes da produção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea cultivada mundialmente em amplo território. Apresenta relevante papel socioeconômico por constituir matéria-prima impulsionadora de diversos complexos agroindustriais (ALBUQUERQUE et al., 2013), representando um produto estratégico tanto para a nutrição humana quanto para a alimentação animal (CRUZ et al., 2008). Em termos de nutrição humana, o milho é consumido nas formas "in natura", fubá e farinha, enquanto na alimentação animal, seu grão representa o maior componente de rações para aves e suínos. Na bovinocultura, é utilizado como volumoso, na forma de silagem de grão úmido ou de planta inteira, enquanto na indústria, pode ser transformado em vários subprodutos a partir do óleo e do amido de milho (PEIXOTO, 2014).

A área total cultivada com milho no Brasil na safra 2014/15 totalizou 15.361,1 mil hectares, representando uma redução de 439,6 mil hectares em relação à safra 2013/14, em função da maior competitividade da cultura da soja (CONAB, 2015). A produtividade média do milho no país é de 5.146 kg ha⁻¹, considerada baixa em relação à produtividade média obtida nos EUA, a qual está estimada em 10.860 kg ha⁻¹ na safra 2014/2015, segundo o Departamento de Agricultura norte-americano (USDA, 2015).

Embora existam diversas teorias a respeito da origem do milho, considera-se que o milho consiste em uma versão domesticada de seu parente silvestre mais próximo, o teosinto, em função de evidências genéticas e citológicas (BORÉM, 2005). No processo de evolução do milho a partir do teosinto, houve uma concentração da energia da planta em um colmo principal, suprimindo-se a emissão e o desenvolvimento de perfilhos, os quais geralmente não sobrevivem até o final do ciclo e, se sobrevivem, não produzem espigas viáveis, sendo considerados agentes causadores de estresse à cultura (VARGAS, 2010).

A ampla adaptação do milho a diferentes condições de clima e solo resulta da grande diversidade genética adquirida por milhares de anos de domesticação, seleção e melhoramento. Tal adaptação faz do milho o cereal de maior cobertura geográfica no mundo, sendo cultivado desde o nível do mar até 4.000 metros de altitude e de regiões extremamente áridas com índice pluviométrico de 400 mm ano⁻¹ até regiões tropicais com mais de 1.500 mm ano⁻¹ (PEIXOTO, 2014). No entanto, diversos fatores de produção influenciam o crescimento e desenvolvimento da cultura, sendo necessário associar níveis considerados ótimos de fatores climáticos (água, temperatura, radiação solar etc.) a técnicas de manejo adequadas (adubação,

população de plantas, profundidade de plantio etc.) para que a cultura expresse ao máximo o seu potencial genético de produção (CRUZ et al., 2006).

O milho pertence ao grupo das plantas C₄, pois apresenta uma característica anatômica peculiar em relação às folhas, com células distintas no mesófilo e na bainha perivascular (PIMENTEL, 1998). Um corte transversal na folha C₄ mostra a diferença estrutural fundamental do tecido assimilatório, em que os parênquimas paliçádico e lacunoso arranjam-se ao redor da bainha vascular em duas camadas de células dispostas concêntricamente organizando-se em forma de “coroa” (MOHR e SCHOPFER, 1995).

Na via C₄, o CO₂ atmosférico é fixado em um ácido orgânico com três carbonos (3C) presente nas células do mesófilo, o fosfoenolpiruvato (PEP), produzindo ácido oxaloacético (4C). Os ácidos orgânicos de 4C migram para a bainha perivascular, onde são descarboxilados liberando CO₂ para ser incorporado à ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) no ciclo de Calvin-Benson e um ácido orgânico de 3C (piruvato ou alanina) que retorna ao mesófilo para regeneração do substrato da carboxilação primária. A via C₄ representa um meio de intensificar a concentração do CO₂ na bainha perivascular e, conseqüentemente, aumentar a eficiência de síntese de açúcares, pois o elevado teor de CO₂ na bainha favorece a maior atividade carboxilase da rubisco, em detrimento da atividade oxigenase (PEISKER e HENDERSON, 1992; PIMENTEL, 1998).

A elevada taxa fotossintética das plantas C₄ se deve à alta afinidade por CO₂, diminuindo a concentração relativa de O₂ e limitando a fotorrespiração (MOHR e SCHOPFER, 1995), uma vez que o CO₂ é essencialmente “bombeado” das células do mesófilo para as células da bainha vascular. Além disso, tanto o ciclo de Calvin (C₃) quanto à fotorrespiração, ocorrem nas células da bainha vascular, possibilitando que qualquer CO₂ liberado pela fotorrespiração seja refixado pela via C₄ nas células do mesófilo. Como consequência, a taxa de fotossíntese líquida das plantas C₄ é maior que nas plantas C₃ (RAVEN, 1996).

Em função da condutância mesofílica superior a das plantas C₃, maior afinidade pelo substrato e ausência de fotorrespiração, as plantas C₄ apresentam também elevada eficiência no uso de água (E.U.A.), de 2 a 5 g de CO₂ fixado kg⁻¹ de H₂O transpirada, contra 1 a 3 g de CO₂ fixado kg⁻¹ de H₂O transpirada nas plantas C₃ (FURBANK e TAYLOR, 1995). No entanto, a maior eficiência no uso de água das plantas C₄ nem sempre assegura uma maior produtividade e a maior economia de água não permite afirmar que sejam mais tolerantes aos baixos potenciais hídricos foliares. As plantas C₄ utilizam menor quantidade de N do que as plantas C₃ para a síntese das enzimas de carboxilação, no máximo 35% do N que chega até a

folha é gasto para a síntese dessas enzimas, enquanto nas plantas C3 mais de 50% do N é gasto para a síntese da rubisco (SINCLAIR e HORIE, 1989). Dessa forma, as plantas C4 se tornam menos dependentes de alta disponibilidade de N para produzir matéria seca (MARSCHNER, 1995), havendo maior disponibilidade do nutriente para o crescimento de outros órgãos (PIMENTEL, 1998).

A quantidade de água consumida pela planta de milho, durante o seu ciclo, está em torno de 600 mm e os efeitos da deficiência hídrica ocasionam danos em qualquer fase do seu desenvolvimento. Na fase vegetativa, em função do menor alongamento celular e redução da massa vegetativa, ocorre uma diminuição na capacidade de disponibilizar CO₂ para fotossíntese, afetando diretamente a produção de grãos. Durante o florescimento, em que é determinado o número de grãos por espiga, a deficiência hídrica pode ocasionar dessecação dos estilo-estigmas, aborto dos sacos embrionários, distúrbios na meiose, aborto das espiguetas e morte dos grãos de pólen resultando em redução na produtividade de mais de 20% em função de dois dias de estresse e de mais de 50% sob estresse de quatro a oito dias. Na fase de enchimento de grãos, por sua vez, o déficit hídrico afeta o metabolismo da planta e o fechamento de estômatos, reduzindo a taxa fotossintética, a produção de fotossimilados e a sua translocação para os grãos (MAGALHÃES e DURÃES, 2006; CRUZ et al., 2006).

A condição ótima de temperatura para a cultura do milho varia com os diferentes estádios de crescimento e desenvolvimento da planta, no entanto, a temperatura ideal para o desenvolvimento, da emergência à floração, está compreendida entre 24 e 30 °C. Considerando que a temperatura da planta é basicamente a mesma do ambiente que a envolve, flutuações periódicas na temperatura influenciam os processos metabólicos que ocorrem no interior da planta, ocorrendo oscilação dentro dos limites extremos tolerados pela planta de milho, compreendidos entre 10 e 30 °C (CRUZ et al., 2006). A amplitude térmica mínima de 15-20 °C, assegurada por maiores latitudes ou por altitudes acima de 720 m, proporciona produtividades satisfatórias para o milho (YAMADA e STIPP-ABDALLA, 2006). Segundo Pimentel (1998), as maiores produtividades para o milho são obtidas em altitudes de 1.500 a 2.000 m, em função do maior foto período, com temperaturas diurnas de 30 a 33 °C e noturnas abaixo de 25 °C, pois a menor temperatura noturna reduz as perdas por fotorrespiração. Para o autor, apesar do desenvolvimento da planta ser mais lento em altitude elevada, com prolongamento do ciclo em função das temperaturas mais baixas, caso haja temperaturas médias adequadas, é possível atingir maiores produtividades comparado com menores altitudes.

As temperaturas do dossel e do solo influenciam as relações fonte/dreno da planta, principalmente nos drenos reprodutivos, pois a distribuição da massa de matéria seca total da planta nos diferentes drenos é modificada. No início da fase reprodutiva, as altas temperaturas causam a paralização do crescimento e do desenvolvimento do grão, pela supressão de fotoassimilados e pelo desbalanço hormonal, que reduz os teores de citocininas do grão, a qual confere termo tolerância quando em altos níveis nos grãos (CHEIKH e JONES, 1994).

O fotoperíodo, representado pelo número de horas de luz solar diárias, apresenta pouca variação de ano para ano nas condições brasileiras, sendo o milho considerado uma planta de dias curtos com pouca sensibilidade às variações do fotoperíodo. No entanto, a planta precisa acumular quantidades distintas de energia ou unidades calóricas em cada estágio de crescimento e desenvolvimento. A unidade calórica é obtida pela soma térmica necessária para concluir cada estágio do ciclo da planta, desde a semeadura até o florescimento masculino. O somatório térmico é calculado pelos valores de temperaturas máximas e mínimas diárias, sendo 30 °C e 10 °C, respectivamente, as temperaturas referenciais para o cálculo. Com base nas exigências térmicas da planta classificam-se as cultivares em normais ou tardias (890-1.200 graus-dias ou G.D.), precoces (831-890 G.D.) e superprecoces (780-830 G.D.) (CRUZ et al., 2006).

2.2 NITROGÊNIO

2.2.1 Dinâmica do Nitrogênio no Sistema Solo-Planta-Atmosfera

O N representa um nutriente essencial para as plantas devido às funções que desempenha no metabolismo vegetal, sendo necessário para a síntese proteica e constituição de diversos compostos orgânicos, como nucleotídeos, fosfatídeos, alcaloides, enzimas, hormônios e vitaminas (FORNASIERI FILHO, 1992). O N é também integrante da molécula de clorofila e está diretamente envolvido na fotossíntese, na regulação hormonal e nos processos que controlam a hereditariedade. A concentração de N nas plantas é da ordem de 1 a 5% em termos de matéria seca (SANTOS, 1991), no entanto, níveis elevados de N alteram a composição da célula vegetal, aumentando a proporção de protoplasma em relação à parede celular, originando folhas mais suculentas e suscetíveis a condições ambientais desfavoráveis e à ação de pragas e doenças além de estender o ciclo vegetativo da cultura (RODRIGUES e COUTINHO, 2000).

A taxa de crescimento das plantas é influenciada pelo teor de N devido ao efeito sobre o desenvolvimento do sistema radicular da planta e, conseqüentemente, na absorção de

água e nutrientes. O N promove a expansão do sistema radicular quando quantidades adequadas do nutriente estão disponíveis e a inibe quando há excesso de N no início da estação de crescimento. A deficiência de N leva ao amarelecimento das folhas e posterior senescência precoce, acompanhada por redução ou paralisação do crescimento. O excesso de N, por sua vez, origina desenvolvimento vegetativo exagerado, refletido em desequilíbrio nutricional com consequências negativas na produção final (RODRIGUES e COUTINHO, 2000).

O N pode ingressar no sistema solo-planta por deposições atmosféricas, fixação biológica – simbiótica ou não, e adubações químicas ou orgânicas, porém a sua dinâmica é muito complexa em função das interações com ar, solo, plantas e microrganismos do solo. Apresenta-se em quantidades insuficientes na quase totalidade dos solos, onde pode ser encontrado predominantemente ligado a compostos orgânicos (98% do total) (EMBRAPA, 1996), sendo necessário suplementar o reservatório natural de N por meio da aplicação de fertilizantes nitrogenados. Os fertilizantes nitrogenados constituem um dos mais altos custos da agricultura, sendo que a ureia, o fertilizante nitrogenado mais consumido, é derivada do petróleo, um recurso energético não renovável. Além do alto custo energético envolvido na fabricação dos fertilizantes nitrogenados, a mobilidade e consequente susceptibilidade do N a perdas a partir do sistema solo-planta (RODRIGUES e COUTINHO, 2000), resultam em elevado custo ambiental, pois cerca de 50% dos adubos nitrogenados aplicados ao solo são perdidos para o ambiente (POTAFÓS, 1998), contaminando o solo e os mananciais hídricos.

As principais formas de absorção de N pelas plantas são os íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), havendo influência da forma de N absorvida pela planta tanto na rizosfera quanto no metabolismo vegetal (RODRIGUES e COUTINHO, 2000). A absorção do íon amônio leva à acidificação do solo nas proximidades das raízes, devido à extrusão de prótons que acompanham a absorção do cátion, enquanto a absorção de nitrato, origina aumento do pH da rizosfera em função da liberação de íons bicarbonato como troca ao excesso de ânions orgânicos formados na planta (SANTOS, 1991).

As plantas absorvem o N predominantemente na forma de nitrato (NO_3^-), que precisa de redução assimilatória originando NH_4^+ para ser incorporado aos compostos orgânicos de carbono, tais como aminoácidos, enzimas e coenzimas, processo que consome duas moléculas de NADH por íon NO_3^- reduzido (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Do ponto de vista energético, a absorção de amônio seria preferível pelas plantas, porém os limites de tolerância para o NH_4^+ são baixos, uma vez que em elevada concentração ocorrem reações tóxicas que podem retardar o crescimento vegetal e restringir o fornecimento de potássio

(RODRIGUES e COUTINHO, 2000). As principais fontes de nitrato são a matéria orgânica (MO), pelo processo de mineralização, e os adubos que contêm este íon, enquanto o amônio pode originar-se do adubo mineral, da passagem da amina para a nitrificação, ou pela simbiose com leguminosas (EMBRAPA, 1996).

Como o N presente no solo apresenta-se preponderantemente na forma orgânica, é necessário que haja a mineralização para sua liberação e absorção pelas plantas, processo que envolve a participação de microrganismos heterotróficos que requerem carbono como fonte de energia. A decomposição da M.O. é regulada principalmente pela relação carbono/nitrogênio (C/N) do material fazendo com que haja imobilização ou liberação de N pelos microrganismos (EMBRAPA, 1996). Além de fatores ambientais como a temperatura e umidade, que influenciam nas taxas de mineralização, a relação C/N dos materiais orgânicos adicionados ao solo tem sido o parâmetro mais utilizado para prever a mineralização líquida do N, que resulta do balanço da mineralização e imobilização biológica. Quando os teores de N nos materiais a decompor são baixos em relação ao carbono presente (>30:1), os microrganismos utilizam N mineral do solo, enquanto que, se o material adicionado contém muito N (<20:1), relativamente ao carbono, os níveis de N mineral no solo não diminuem e inicia a liberação de N a partir da mineralização do material orgânico (RODRIGUES e COUTINHO, 2000).

2.2.2 Adubação Nitrogenada na Cultura do Milho

O N é o elemento mineral absorvido em maior quantidade e mais limitante na produtividade do milho, exercendo importante função nos processos bioquímicos e fisiológicos da planta (BÜLL, 1993). A disponibilidade de nutrientes influencia o conteúdo de fito-hormônios e o crescimento dos tecidos da planta, sendo os efeitos do N mais proeminentes sobre o crescimento de raízes e produção/exportação de citocininas para a parte aérea (PIMENTEL, 1998).

A produtividade da cultura do milho resulta da interação de um conjunto de fatores edafoclimáticos apropriados ao seu desenvolvimento, aliados ao genótipo da planta. Entre os diversos fatores abióticos envolvidos nesta interação (água, luz, nutrientes, concentração do CO₂ na atmosfera), os nutrientes podem ser manejados com maior praticidade. Dentre os nutrientes, destaca-se o N como nutriente absorvido em maior quantidade e mais influente sobre a produtividade de grãos de milho, devido a sua relação com importantes processos

fisiológicos da planta e à presença na composição dos aminoácidos, principais integrantes das proteínas contidas nos grãos (YAMADA, 1997; GAVA et al., 2010).

O N torna-se importante para a planta de milho a partir do momento em que ela apresenta quatro folhas totalmente expandidas, pois nesta fase o sistema radicular em desenvolvimento já demonstra considerável porcentagem de pelos absorventes e ramificações diferenciadas, sendo a adição de N um estímulo a sua proliferação. O período do florescimento, caracterizado pela exteriorização do pendão e dos estigmas da espiga, é bastante influenciado pelo fluxo de fotoassimilados, pois neste período são definidos o número de grãos por espiga e parte do potencial de produção da planta (YAMADA e STIPP-ABDALLA, 2000), estimulados pela maior disponibilidade de N.

De acordo com Fancelli (2002), a definição do potencial de produção do milho ocorre entre a emissão da quarta e sexta folha, por isso, na fase inicial de desenvolvimento do milho, a cultura exige a disponibilidade de no mínimo 25 kg ha⁻¹ de N, sendo obtidos os melhores resultados com o fornecimento de 30 a 45 kg ha⁻¹ de N por ocasião da semeadura. Yamada (1995) cita que a adubação nitrogenada tem boa probabilidade de respostas ao uso de 30-40 kg ha⁻¹ de N na adubação de semeadura.

Diversos experimentos realizados sob diferentes condições de solo, clima e sistemas de cultivo, demonstram resposta generalizada da cultura do milho à adubação nitrogenada (FERREIRA et al., 2009; GAVA et al., 2010; SANTOS et al., 2010). No entanto, existe uma tendência a exageros nas quantidades aplicadas por parte do agricultor, devido à expressiva resposta das plantas à adubação nitrogenada, o que pode resultar em problemas na saúde humana, na sanidade animal e ao ambiente, além do prejuízo econômico. Por isso, é importante conhecer a dinâmica do N no solo visando estabelecer corretamente as recomendações de adubação nitrogenada (RODRIGUES e COUTINHO, 2000) e aproveitar ao máximo as fontes alternativas do nutriente.

A determinação da quantidade de N a aplicar na cultura do milho é baseada principalmente na expectativa de produtividade e no teor de MO do solo, visto que, quanto maiores os teores de MO dentro da mesma classe de teores de argila, maior é a capacidade do solo em suprir N (ARGENTA et al., 2002). Gava et al. (2010), avaliando doses de N-fertilizante no milho, observaram que, em média, apenas 22% do N total acumulado na parte aérea do milho proveio da fonte fertilizante e 78% de outras fontes, como a MO do solo, confirmando o potencial de mineralização do N-orgânico do solo.

A adoção de práticas que estimulam a manutenção e incremento da MO do solo, como a rotação de culturas e a utilização de plantas de cobertura é fundamental visando o

suprimento natural de N no solo, além de favorecer o desenvolvimento dos microrganismos do solo (BROCH e RANNO, 2012; FEIDEN, 2001). Segundo Feiden (2001), a rotação de culturas, os policultivos e o manejo de plantas espontâneas favorecem a comunidade edáfica pelo fornecimento de diferentes tipos de exsudatos e restos culturais, estimulando a diversidade biológica.

Segundo Cruz et al. (2006), dentre as espécies utilizadas como plantas de cobertura, a aveia preta, a ervilhaca-peluda e o nabo-forrageiro merecem destaque como plantas antecessoras de inverno, devido aos benefícios físico-químicos proporcionados ao solo. Segundo os autores, a associação das culturas de milho e aveia de forma planejada, no sistema de rotação, proporciona elevado potencial de produção de fitomassa, com elevada relação C/N, garantindo a manutenção da cobertura do solo por maior tempo na superfície. Para Broch e Ranno (2012) as espécies ervilhaca peluda, crambe, nabo forrageiro e canola constituem algumas opções de culturas de outono-inverno que favorecem a nutrição do milho subsequente, em função da sua capacidade de exploração do solo e reciclagem de nutrientes, possibilitando uma redução nas doses de N em cobertura no milho semeado sobre a palhada destas culturas, pois as respostas à adubação nitrogenada são menores. Segundo Boddey et al. (1998), adubos verdes têm possibilitado a reposição das perdas de N do solo com a exportação para a planta, contribuindo para a conservação e/ou melhoria da qualidade dos solos tropicais.

Cruz et al. (2006) destacam ainda que a cobertura vegetal representa a essência do sistema plantio direto (SPD), pois atua na interceptação das gotas de chuva, evitando o impacto direto sobre a superfície do solo e reduzindo a desagregação das partículas. Outras vantagens da cobertura do solo são a melhoria na capacidade de infiltração de água e controle de plantas daninhas, redução da variação térmica e evaporação de água do solo, além do estímulo ao desenvolvimento de microrganismos do solo.

2.2.3 Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas

O elevado custo dos adubos nitrogenados e a preocupação com os problemas ambientais causados pelo excesso de sua utilização, tal como a contaminação da água e solo com nitratos (CAMPOS et al., 2003), tem incentivado o estudo do processo natural de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) (CONCEIÇÃO et al, 2009). Assim como a fotossíntese, a FBN é considerada um dos processos biológicos mais importantes, no qual alguns gêneros de bactérias captam o N presente no ar, tornando-o assimilável pelas plantas.

Trata-se de uma verdadeira fábrica biológica, capaz de suprir as necessidades das plantas e substituir a adubação nitrogenada parcial ou totalmente, de acordo com a cultura (AGROSUSTENTÁVEL, 2014).

O N é o nutriente que mais influencia a produção agrícola, principalmente na região tropical, onde está presente a maior parte dos solos pobres da América Latina. Em solos pobres em N, somente culturas com sistema de FBN eficiente, como as leguminosas em simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* e algumas gramíneas, como a cana-de-açúcar associada com bactérias diazotróficas endofíticas, podem crescer de forma praticamente independente da disponibilidade de N do solo (DÖBEREINER; URQUIAGA; BODDEY, 1995). Segundo Reis (2007), a FBN realizada por bactérias diazotróficas, constitui uma das alternativas que auxiliam na redução da aplicação de fertilizantes e aumento da eficiência de sua utilização, um desafio para o qual a inoculação com essas bactérias pode representar uma alternativa eficiente.

A soja representa o exemplo de maior impacto econômico da FBN associada a culturas agrícolas no Brasil, pois pelo processo de FBN é fornecido todo o N necessário à cultura, mesmo para cultivos de elevada produtividade. A tecnologia é hoje adotada em toda a área cultivada com soja no país, aproximadamente 32 milhões de hectares, e sua utilização resulta em economia anual em torno de sete bilhões de dólares (AGROSUSTENTÁVEL, 2014; CONAB, 2015). Para a cana-de-açúcar, que apresenta baixa resposta à fertilização nitrogenada entre a maioria das variedades, o potencial da FBN nas variedades mais eficientes alcança 71% das necessidades da cultura e representa uma economia em N-fertilizante equivalente a US\$ 200 milhões anualmente (BODDEY et al., 2001; URQUIAGA et al., 2013). Suman et al. (2008) constataram que variedades de cana, com maior número de bactérias diazotróficas, além de apresentar maior potencial de FBN, quando submetidas à metade da dose de N recomendada, atingiram níveis de produtividade similares aos de plantas com a dose completa de N.

Dentre os cereais, o cultivo de arroz inundado é o mais promissor. A Embrapa Agrobiologia iniciou um programa de seleção de genótipos de arroz com alto potencial de FBN e verificou que esta proporcionou valores de 21 a 30% de N acumulado pelas plantas, equivalente a 33–60 kg ha⁻¹, indicando a possibilidade de melhoramento genético da cultura visando à alta eficiência da FBN (URQUIAGA et al., 2013). Piccinin et al. (2013) avaliaram a eficiência da inoculação de sementes com *A. brasilense* na produtividade da cultura do trigo e verificaram que as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 são eficazes e podem proporcionar redução de até

50% na aplicação de N fertilizante na cultura, pois a inoculação de *A. brasilense* associada com 50 kg ha⁻¹ N não diferiu significativamente da aplicação isolada de 100 kg ha⁻¹ N.

O grande interesse na fixação biológica em gramíneas tropicais (C4) é devido à maior facilidade de aproveitamento de água em relação às leguminosas (C3), maior efetividade fotossintética, e maior habilidade em extrair água e nutrientes pelo sistema radicular fasciculado em relação ao sistema pivotante. Além disso, as gramíneas são largamente utilizadas como alimento pelo homem, por isso, mesmo que apenas uma parte do N pudesse ser fornecida pela associação com bactérias fixadoras, a economia em adubos nitrogenados seria igual ou superior àquela verificada com as leguminosas que podem ser autossuficientes em N (DÖBEREINER, 1992). No caso de pastagens de gramíneas, em especial as pertencentes ao gênero *Brachiaria*, a contribuição da FBN associativa é pequena (15 a 25 kg ha⁻¹ ano⁻¹), torna-se significativa devido à ocupação de grandes extensões de área (URQUIAGA et al., 2013).

A FBN também possui papel relevante na redução da emissão de gases de efeito estufa relacionada às etapas de produção e transporte de adubos nitrogenados que devido ao consumo de energia fóssil representam entre 40 e 50% das emissões totais relacionadas aos fertilizantes. Em média, estima-se que o uso de 1 kg de fertilizante nitrogenado emite o equivalente a 10 kg de CO₂. Além disso, estudos indicam que a fixação de 90 milhões de toneladas de N equivale ao sequestro de quase um bilhão de toneladas de carbono por ano. Por estes motivos, a FBN é uma das tecnologias agrícolas contempladas pelo Programa Agricultura de Baixo Carbono (ABC), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), cuja meta é incrementar a FBN na produção de 5,5 milhões de hectares e reduzir a emissão de 10 milhões de toneladas de CO₂ equivalente até 2.020 (AGROSUSTENTÁVEL, 2014).

2.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)

2.3.1 Aspectos Gerais e Associação de BPCP's com Gramíneas

O solo é um ecossistema natural no qual se prolifera ampla variedade de microrganismos, sendo o termo “rizosfera” usado para descrever a porção do solo (1 a 3 mm ao redor das raízes) onde tal proliferação é induzida pela presença de sistemas radiculares de plantas. Bactérias que vivem na rizosfera são chamadas “rizobactérias” e possuem a

habilidade de colonizar raízes de plantas e/ou o ambiente ao seu redor (CASSÁN et al., 2009a).

O termo bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) provém da expressão “plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)”, proposta por Kloepper e Schroth (1978) em trabalho cujos dados de pesquisa tornaram aceita pela comunidade científica internacional a expressão que designaria o grupo. As BPCP’s compreendem um grupo amplo de microrganismos, capazes de colonizar a superfície radicular, a rizosfera, a filosfera e também os tecidos internos da planta, referindo-se a quaisquer bactérias que vivam na rizosfera e afetem de forma benéfica o crescimento de uma ou mais espécies vegetais (FREITAS, 2007). Apesar da denominação do grupo ter sido estabelecida em 1978, o interesse dos pesquisadores ocidentais pelos benefícios das BPCP’s às plantas já despertava em meados do século XX, com estudos da então União Soviética sobre bactérias benéficas em raízes de plantas. No entanto, o difícil acesso aos trabalhos soviéticos, associado à falta de análises estatísticas, dificultava a aceitação desses estudos por parte dos ocidentais (BURR e CAESAR, 1985).

Segundo Moreira et al. (2010), diversas espécies de BPCP’s foram isoladas de raízes e partes aéreas de culturas de importância agrícola como: gramíneas e palmeiras (BALDANI et al., 1997; FERNANDES; FERNANDES; RODRIGUES, 2001; SALA et al., 2005), orquídeas (LANGE e MOREIRA, 2002), tubérculos (BALOTA; LOPES; DÖBEREINER, 1997; BALOTA., et al 1999), cafeeiros (JIMÉNEZ-SALGADO et al., 1997), araucárias (NERONI e CARDOSO, 2007) e frutíferas (WEBER et al., 1999). Em função dos benefícios proporcionados às plantas, a identificação e possível manipulação da associação entre BPCP’s e plantas superiores têm sido consideradas estratégia básica da agricultura moderna em diversos países, tais como Austrália, Bélgica, Egito, Nova Zelândia, Rússia, Holanda e EUA, nos quais o uso de preparados microbianos na produção vegetal está consolidado. Em Cuba, por exemplo, vários inoculantes, compostos de isolados de *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Azospirillum* e *Burkholderia* são comercialmente produzidos e usados em diferentes culturas (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999).

O efeito de promoção do crescimento das plantas proporcionado pelas BPCP’s tem sido correlacionado com diversos mecanismos, dentre os quais a fixação biológica de nitrogênio - FBN (HUERGO et al., 2008), a supressão de patógenos causadores de doenças (WHIPPS, 2001), a melhoria da ciclagem de nutrientes minerais como o N e fósforo (RYAN et al., 2008), o aumento na atividade da redutase do nitrato (CASSÁN et al., 2008), a

produção dos fito-hormônios auxina, giberelina e citocinina (OKON e VANDERLEYDEN, 1997) e a solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999).

Devido à capacidade de realizar a FBN, as BPCP's podem ser caracterizadas como microrganismos diazotróficos endofíticos os quais, devido a presença do complexo enzimático nitrogenase, são capazes de romper a tripla ligação do N₂ atmosférico reduzindo-o a amônia (NH₃), uma forma prontamente assimilável pela planta (CANTARELLA, 2007). A característica endofítica das BPCP's, por sua vez, se deve à capacidade de colonização das raízes até as folhas de plantas associadas, havendo diferentes padrões de colonização das plantas e do solo. Segundo Baldani et al. (1997), as bactérias endofíticas podem ser divididas em dois grupos: bactérias endofíticas obrigatórias, que colonizam o interior e parte aérea dos tecidos vegetais, mas não sobrevivem no solo, e bactérias endofíticas facultativas, capazes de colonizar tanto a superfície quanto o interior da raiz, sobrevivendo também no solo, como é o caso do gênero *Azospirillum*.

A descoberta de BPCP's diazotróficas endofíticas trouxe uma nova dimensão aos estudos das associações de microrganismos e plantas superiores em função dos benefícios proporcionados a essa relação. O interior das plantas representa um habitat rico em substratos de carbono e livre de diversos fatores adversos, como a competição com outros microrganismos e condições ambientais desfavoráveis, que limitam a sobrevivência dos diazotrofos e viabiliza a transferência de compostos nitrogenados produzidos pelos microrganismos para a planta de forma muito mais eficiente (BASHAN e DE-BASHAN, 2010). Além disso, o estabelecimento dentro de nichos protegidos do oxigênio e de outros fatores permite aos microrganismos endofíticos expressar seu máximo potencial para fixação de N (KENNEDY et al., 1997). No entanto, eficiência similar a da simbiose de bactérias nodulíferas (rizóbio) com leguminosas no solo não pode ser alcançada, pois não há evidências de relação tão complexa e organizada, a qual resulta de um processo evoluído que minimiza perdas do N fixado por interferência de fatores químicos, físicos e biológicos (MOREIRA et al., 2010).

As BPCP's diazotróficas podem ser caracterizados em três grupos: diazotrofos de vida livre, que fixam o N para seu próprio uso; diazotrofos simbióticos, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, formando em alguns casos estruturas diferenciadas denominadas nódulos, e os diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas e sem estabelecer simbiose (MARIN et al., 2013). As BPCP's diazotróficas associativas assumem papel importante na interação com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes, contribuindo para o fornecimento de

Na diversos ecossistemas, tanto natural quanto manejado (MOREIRA et al., 2010), destacando-se neste grupo as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* em associação com gramíneas de interesse econômico.

No Brasil, os estudos relacionados à associação entre BPCP's e gramíneas iniciaram com a pesquisadora Dra. Johanna Döbereiner. Seu primeiro trabalho, em 1953, identificou a ocorrência de bactérias do gênero *Azotobacter* em solos ácidos, associadas à rizosfera de grama-batatais. Cinco anos depois, Döbereiner e Ruschel (1958) isolaram e descreveram a bactéria *Beijerinckia fluminensis* da rizosfera de cana-de-açúcar, em solos tropicais (MOREIRA et al., 2010). Nos anos 70, com a introdução do método de redução do acetileno e o desenvolvimento de meios de cultivo especiais, houve um grande avanço nos estudos da FBN em gramíneas, tornando-se este o principal foco da pesquisa (BALDANI e BALDANI, 2005).

Os estudos envolvendo a associação de *Azospirillum* spp. tem relatado efeitos de melhoria do crescimento, desenvolvimento e produtividade de importantes culturas agrícolas ao redor do mundo, especialmente gramíneas, com eficiência em torno de 60 a 70% (OKON e LABANDERA-GONZALES, 1994). Para Okon e Vanderleyden (1997) o gênero *Azospirillum* spp. é capaz de proporcionar incrementos na produtividade das culturas sob diversas condições de clima e solo, com benefícios que vão além da FBN, interferindo também no aumento da superfície de absorção das raízes da planta e pelo aumento do volume de substrato do solo explorado. Tal constatação é justificada pelo fato da inoculação modificar a morfologia do sistema radicular, aumentando não apenas o número de radículas, mas também o diâmetro médio das raízes laterais e adventícias, devido à produção de substâncias promotoras de crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas (BÁRBARO; BRANCALIÃO; TICELLI, 2008).

Diversos estudos relatam os efeitos da associação entre *Azospirillum* e gramíneas de interesse econômico. Salomone e Döbereiner (1996), avaliando a resposta de genótipos de milho à inoculação de quatro estirpes de *Azospirillum* spp. isoladas na Argentina e três de raízes de sorgo e milho isoladas no Brasil, constataram aumento da massa de grãos, variando de 1.700 a 7.300 kg ha⁻¹ entre os genótipos, com influência das condições de solo, ambiente e genótipos. Ramos et al. (2010) conduziram estudo em laboratório visando avaliar o desenvolvimento do milho submetido a inoculação com *A. lipoferum* associada ou não a adubação nitrogenada em cobertura (30 kg ha⁻¹ de N). Os autores observaram que a presença da bactéria e/ou do adubo nitrogenado favoreceu a massa seca da raiz e da parte aérea e que,

no conjunto das respostas das características avaliadas, os melhores resultados foram obtidos com a inoculação associada à adubação nitrogenada.

Cassán et al. (2009a) avaliaram os efeitos da inoculação, de forma isolada ou combinada, de estirpes de *A. brasilense* (Az39) e *Bradyrhizobium japonicum* (E109), na germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas de milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* L.). Os autores observaram que tanto a inoculação isolada quanto a combinada, aumentaram significativamente o comprimento e a massa de matéria seca da parte aérea das plântulas de soja e milho e que o número de nódulos recém-formados e porcentagem de plantas noduladas foram superiores em plântulas de soja inoculadas com Az39+E109. Segundo os autores, os efeitos positivos da inoculação na germinação de sementes e crescimento inicial das plântulas se deve à capacidade das bactérias de excretar substâncias promotoras do crescimento vegetal em concentração suficiente para produzir mudanças morfológicas e fisiológicas em tecidos novos da planta.

Schultz et al. (2012), avaliando a eficiência da inoculação de uma mistura de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*; *H. seropedicae*; *H. rubrisubalbicans*; *A. amazonense* e *B. tropica*) em duas variedades de cana-de-açúcar, não verificaram efeito da inoculação sobre a variedade RB72454 nas duas colheitas avaliadas, porém na segunda soqueira da variedade RB867515, os autores observaram efeitos positivos da inoculação sobre o desenvolvimento e produtividade de forma similar à adição de 120 kg ha⁻¹ de N. Segundo os autores esse efeito positivo estava associado ao aumento da eficiência do sistema radicular em absorver nutrientes e água de camadas mais profundas do solo, proporcionando às soqueiras maior resistência ao estresse hídrico ocorrido nos dois meses após as colheitas da cana-planta e da primeira soqueira.

Sala et al. (2005) avaliaram o efeito da adubação nitrogenada e do genótipo da planta na ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas associadas à cultura do trigo, e observaram que parte dos isolados de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* avaliados promoveu o crescimento e o acúmulo de N nas plantas. Das e Saha (2003) avaliaram o efeito de *Azotobacter* e *Azospirillum*, na presença de 50 kg ha⁻¹ N, sobre o aumento gradual de N e sua transformação nos solos da rizosfera de arroz. Após a inoculação, os autores constataram proliferação de *Azotobacter* e *Azospirillum* nas raízes e verificaram que a inoculação isolada ou combinada das bactérias proporcionou incremento substancial nas diferentes frações do teor de N nos solos da rizosfera.

2.3.2 Bioquímica da Associação Planta x Bactéria e Promoção do Crescimento por BPCP's é 2,3,1

As bactérias do gênero *Azospirillum* constituem as BPCP's mais amplamente estudadas em associação aos cereais e gramíneas (BASHAN e LEVANONY, 1991), com destaque para as espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* (BASHAN e MITIKU, 1991). Ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais, na quantidade de 103 a 106 unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC g⁻¹), e apresentam distribuição ecológica ampla, sem apresentar preferência por plantas cultivadas ou ervas daninhas, perenes ou anuais, com efeitos positivos também em plantas sem histórico anterior de associação com *Azospirillum* (BASHAN e HOLGUIN, 1997). Tal versatilidade confere baixa especificidade em relação à planta hospedeira e às diversas vias metabólicas alternativas, permitindo ao microrganismo utilizar diversos ácidos orgânicos e aromáticos (LOPEZ-DE-VICTORIA e LOVELL, 1993).

As bactérias do gênero *Azospirillum* constituem microrganismos procariotos, situados no Domínio Bacteria na subdivisão α -Proteobacteria, no qual se encontram a maioria das bactérias gram-negativas formato vibrio e/ou espirilo (TARRAND et al., 1978; MOREIRA et al., 2010). São bactérias preferencialmente microaerófilas e móveis em meio de cultivo, que possuem flagelo polar bem desenvolvido quando desenvolvidas em meio líquido. *A. brasilense*, por exemplo, apresenta uma combinação típica de flagelos: um flagelo polar desenvolvido quando as bactérias são crescidas em meio líquido e vários flagelos laterais adicionais, quando cultivadas em meio semissólido (MOREIRA et al., 2010).

De acordo com a classificação proposta por Baldani et al. (1997), *A. brasilense* é considerada bactéria endofítica facultativa, ou seja, pode colonizar a superfície e interior da raiz, além de sobreviver no solo. No solo, as bactérias do gênero *Azospirillum* podem ser encontradas no mucigel presente na rizosfera de plantas, caracterizando uma colonização externa das raízes, enquanto na colonização interna, as células de *Azospirillum* podem penetrar nos espaços intercelulares de raízes e lá se alojarem (BASHAN e LEVANONY, 1991; BALDANI et al., 1996). O metabolismo de carbono e N apresentado pelas espécies de *Azospirillum* é bastante dinâmico e variado. Os ácidos orgânicos como malato, piruvato e succinato são as fontes preferenciais de carbono, com aparente preferência de frutose sobre glicose. Amônia, nitrato, nitrito e aminoácidos, além de N atmosférico, podem servir como fontes de N (DÖBEREINER, 1992).

A sobrevivência de bactérias do gênero *Azospirillum* no solo, na ausência das plantas hospedeiras e sob condições nutricionais desfavoráveis, está relacionada a vários mecanismos

fisiológicos de proteção, dentre eles: produção de melanina, acúmulo de poli- β -hidroxibutirato (PHB) e polissacarídeos (BASHAN e HOLGUIN, 1997), formação de cistos (agregados celulares) e mudança na forma da célula (MOREIRA et al., 2010). Bashan; Levanony; Whitmoyer (1991) estudaram a colonização da superfície radicular por *A. brasilense* em plantas de soja sob condições normais e de estresse hídrico e observaram que, nas plantas submetidas ao estresse hídrico, as células de *A. brasilense* ocorreram em menor quantidade e sob a forma de cisto. Porém, quando eliminadas as condições de estresse hídrico, as células bacterianas foram revertidas para a forma vibroide, com aumento na população bacteriana, evidenciando a formação de cistos como uma resposta natural da bactéria ao estresse hídrico na rizosfera.

As espécies do gênero *Herbaspirillum* estão incluídas como um grupo na subdivisão β -Proteobacteria, sendo as células deste gênero gram-negativas, formato espirillum, contendo grânulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB) (MOREIRA, 2010). Representantes do gênero *Herbaspirillum* são microaerofílicos, toleram drásticas mudanças no pH (5,3 – 8,0) e uma concentração de oxigênio maior que as espécies de *Azospirillum* (BALDANI et al., 1986). São também capazes de produzir elevados níveis de auxinas e giberelinas (GRAY e SMITH, 2005), embora em menor quantidade em relação às linhagens de *Azospirillum* (RADWAN et al., 2004).

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

Os microrganismos endofíticos penetram nas plantas, geralmente, por aberturas naturais como estômatos, hidatódios, lenticelas, área de emergência de raízes laterais ou ferimentos (HALLMANN et al., 1997), sendo as raízes uma das portas de entrada mais utilizadas pelos endófitos por meio da região entre a epiderme e a coifa (JAMES et al., 2002). Outras opções de entrada são as aberturas causadas por insetos e a penetração de forma ativa através da degradação enzimática da parede celular pelas enzimas celulolíticas e pectinolíticas (HALLMANN et al., 1997).

O processo de ligação da bactéria com a raiz da planta é realizado em duas etapas pelos fenômenos de adesão e ancoramento. A etapa primária, que envolve a fase de adesão ou adsorção, dura aproximadamente duas horas, é reversível, frágil e governada, provavelmente, por proteínas bacterianas. A segunda etapa, que envolve a fase de ancoramento, dura de 8 a 16

horas, é irreversível, forte e envolve polissacarídeos de superfície extracelular bacteriana (DEL GALLO e HAEGI 1990; MICHIELS et al., 1991). A fixação segura da BPCP é essencial para a associação em longo prazo com as raízes de plantas hospedeiras por três motivos: proporcionar à planta o aproveitamento das substâncias excretadas pela bactéria, evitando que sejam consumidas na rizosfera por outros microrganismos antes de atingir a planta; impedir que a bactéria, não fixada seguramente, seja levada pela água para longe do rizoplano, perecendo no meio circundante deficiente em nutrientes; e ocupar os sítios de associação nas raízes por BPCP em lugar de colonizadores agressivos, possivelmente não-benéficos (BASHAN e HOLGUIN, 1997).

A adesão da bactéria à superfície da raiz (rizoplano) necessita ser precedida da multiplicação e atração (taxia) da bactéria pelos sítios de infecção. Esta etapa ainda é considerada um aspecto obscuro da interação, pois não se conhece as macromoléculas secretadas pelas gramíneas hospedeiras, tampouco o grau de especificidade e os mecanismos de taxia pelos quais as bactérias diazotróficas atingem os sítios de adesão. Desta interação, resulta a adesão radicular, caracterizada pela ligação da célula bacteriana à superfície da planta (BALDANI et al., 2009). Karpati et al. (1995) sugeriram que o mecanismo de adesão de *Azospirillum* a raiz da planta é mediado por lecitinas ligadas à superfície da célula bacteriana, como a aglutinina de gérmen de trigo.

Na fase de ancoramento é frequente para a maioria das bactérias a presença de microfibrilas de origem proteica ou celulósica, interconectando bactérias e ancorando-as às plantas (JAMES e OLIVARES, 1997), assim como a indução da secreção de substâncias mucilaginosas pelas raízes infectadas (BASHAN, 1991). Estudos sobre a fixação de *Azospirillum* revelaram que os sítios preferidos para colonização são as zonas de alongação e de pelos radiculares, onde a bactéria forma um tipo de agregado de microrganismos apoiado em material fibrilar maciço, viabilizando o processo de colonização (BASHAN e LEVANONY, 1991; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

As bactérias da ordem Rhizobiales são gram-negativas, aeróbicas, pertencentes ao filo alpha-Proteobacteria, as quais são genericamente identificadas como rizóbios (ZAKHIA e LAUJUDIE, 2001). Os rizóbios podem atuar no crescimento pela síntese de fito-hormônios, síntese de algumas enzimas que modulam o nível de hormônios da planta, FBN, assim como a solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico (VESSEY, 2003; HARA e OLIVEIRA, 2004). Dentre os gêneros de bactérias capazes de influenciar positivamente na fisiologia das plantas, destaca-se a família Rhizobiaceae pela capacidade de fixação de N, cujos benefícios em associação com leguminosas são consolidados, com

estirpes recomendadas como inoculantes comerciais no Brasil para as culturas de soja e feijão. Segundo Cassán et al. (2009a) existem evidências de que rizobactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio podem ser aplicadas também em certas gramíneas de interesse econômico.

O modo de ação pelo qual *Azospirillum* afeta o crescimento das plantas ainda apresenta lacunas, porém o fato de *Azospirillum* influenciar o metabolismo da célula vegetal externamente à planta sugere que as bactérias são capazes de excretar e transmitir um sinal (ou mais) que atravessa a parede celular da planta. Tal sinal é reconhecido pelas membranas celulares, iniciando uma cadeia de eventos que resulta em alteração do metabolismo nas plantas inoculadas. Apesar da natureza deste sinal molecular ser ainda desconhecida, é proposto que as membranas de plantas, extremamente sensíveis a qualquer alteração, constituam um alvo primário para *Azospirillum* na raiz da planta e que sua resposta possa servir como um indicador preciso da atividade de *Azospirillum* em nível celular (BASHAN et al., 1992; BASHAN e HOLGUIN, 1997).

Bashan e De-Bashan (2010) propõem como mecanismos principais de promoção do crescimento vegetal por BPCP's a produção de fito-hormônios e consequente estímulo ao desenvolvimento radicular, a FBN, a solubilização de fosfatos e a mitigação de estresses. Segundo os autores, os efeitos hormonais são geralmente apresentados, de forma justificada ou não, como a maior contribuição de BPCP's às plantas, pois um estímulo fito-hormonal promove alterações no sistema radicular das plantas inoculadas com formação de pelos radiculares e raízes secundárias. Essas modificações no sistema radicular proporcionam aumento na superfície de absorção e na capacidade de exploração de água e nutrientes do solo, tornando a planta menos sensível aos estresses ambientais e proporcionando o desenvolvimento de plantas mais vigorosas e produtivas (BASHAN e HOLGUIN 1997; BASHAN et al., 2004).

Auxina, giberelina e citocinina são os principais fito-hormônios produzidos por BPCP's (OKON e VANDERLEYDEN, 1997; DOBBELAERE et al., 2003). A produção de auxinas por *Azospirillum* spp. desempenha um papel importante na promoção do crescimento de plantas (SPAEPEN et al., 2007), com destaque para o ácido indol-3-acético (IAA), o qual pode beneficiar diretamente o sistema radicular da planta estimulando o desenvolvimento de raízes laterais e o alongamento das raízes (DOBBELAERE et al., 2003, PATTEN e GLICK, 1996). Outras moléculas de auxina também têm sido detectadas em *Azospirillum*, como ácido indol-3-butírico (IBA) (FALLIK et al., 1989), ácido indol-3-acetaldeído (COSTACURTA et al., 1994) e ácido fenil acético (SOMERS et al., 2005), porém com menor volume de evidências diretas e indiretas sobre seu efeito nas plantas (BASHAN e DE-BASHAN, 2010).

As auxinas estão envolvidas em inúmeros mecanismos fisiológicos da planta, porém seu principal efeito está relacionado ao processo de alongação celular, induzido quando as auxinas são transportadas para dentro da célula, onde são ionizadas e liberam H^+ no citoplasma, ativando a bomba de prótons associada à ATPase membranar (H^+ -ATPase) (PIMENTEL, 1998). A ativação da bomba eletrogênica promove a extrusão de prótons que acidificam a parede celular, rompendo as ligações entre as fibrilas de celulose ou ativando enzimas de degradação de celulose, o que permite a expansão celular (KASAMO e SAKAKIBARA, 1995).

Didonet e Magalhães (1993) avaliaram a inoculação de *Azospirillum* em plântulas de trigo e verificaram a indução do alongamento e ramificação radicular, associando o estímulo ao crescimento radicular à produção de IAA e íon nitrito pelo metabolismo bacteriano. Segundo os autores, a associação trigo-*Azospirillum* pode ter produzido mudanças na membrana celular, expressas pelo aumento da extrusão de prótons, observadas em raízes intactas e também em segmentos radiculares excisados. Tal efeito está associado com a acidificação da parede celular, afrouxando a estrutura da parede e proporcionando a alongação celular (MASUDA, 1990).

Malhotra e Srivastava (2009) estudaram a influência das limitações nutricionais sobre a biossíntese de IAA por *A. brasilense* e observaram que em condições de estresse (deficiência de carbono e N) a viabilidade celular reduziu em comparação com o controle ao longo das gerações, porém os níveis de IAA obtidos foram melhores. Os autores observaram também que em 30 dias de cultivo, a população bacteriana foi mantida em densidade específica produzindo IAA em todas as fases, inclusive estacionária, o que torna a bactéria qualificada para a promoção do crescimento quando o efeito dura semanas ou meses após a inoculação, demonstrando também sua competência rizosférica (BASHAN e DE-BASHAN, 2010).

As citocininas são produzidas em meio de cultura por diversas rizobactérias, (STRZELCZYK; KAMPERT; LI, 1994; TIEN; GASKINS; HUBELL, 1979). Representam fito-hormônios que podem afetar o crescimento da planta positiva ou negativamente, porém ainda é questionável se modificam a morfologia radicular das plantas inoculadas por conta própria ou se os níveis de combinação com giberelina e auxina é que induzem o efeito observado, uma vez que o balanço auxina/citocinina na planta é crucial durante a divisão e diferenciação celular dos tecidos (BASHAN e DE-BASHAN, 2010).

As giberelinas (GAs) são fito-hormônios que controlam uma grande variedade de processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, como a promoção da divisão e

elongação celular e a germinação de sementes. No processo de germinação de sementes, as GAs produzidas pelo embrião são exportadas para a camada de aleurona, onde promovem a transcrição do gene que codifica para a enzima alfa-amilase, responsável pela hidrólise do amido, promovendo a liberação de hexoses para o crescimento embrionário (PIMENTEL, 1998; RICHARDS et al., 2001). Bashan e De-Bashan (2010) destacam que, apesar da capacidade de *Azospirillum* de sintetizar e metabolizar GAs “in vitro” e na planta, até o momento tem sido constatado que a melhoria da germinação de sementes coincide com alta produção de GA pela bactéria (CASSAN et al., 2009a), porém isso não comprova ligação direta da GA ao fenômeno.

Há relatos também de envolvimento do ácido abscísico (ABA) e do etileno com *Azospirillum* (COHEN; BOTTINI; PICCOLI, 2008; RIBAUDO et al., 2006). O ABA está envolvido na resposta das plantas aos estresses ambientais e seu efeito mais conhecido está relacionado ao controle do fechamento estomático nas folhas. Em condições de estresse hídrico, o ABA produzido nas raízes é translocado pelo xilema para as folhas, onde rapidamente altera o potencial osmótico de células-guarda, provocando o fechamento estomático e a redução na atividade fotossintética e na transpiração da planta (BASHAN e DE-BASHAN, 2010). Neste processo de mitigação do estresse, ABA e GAs foram investigados com a inoculação de *Azospirillum* e os resultados indicaram que a produção de fito-hormônios de estresse, como o ABA (COHEN; BOTTINI; PICCOLI, 2008), está entre os mecanismos envolvidos na redução do estresse hídrico de plantas inoculadas juntamente com as auxinas (COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1995) e GAs (BOTTINI; CASSAN; PICCOLI, 2004), porém tais evidências ainda são incipientes.

O etileno está relacionado principalmente aos processos de quebra de dormência de sementes e senescência da planta. Elevados níveis de etileno podem ser sintetizados pela planta como uma resposta a estresses bióticos e abióticos, causando murcha e senescência da planta (GLICK et al., 1999). A enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminase, um dos precursores da síntese de etileno, é comumente encontrada em microrganismos do solo, principalmente em BPCP's, capazes, portanto, de degradar ACC e induzir uma redução na concentração de etileno nas raízes, aumentando a tolerância das plantas aos estresses. Com base na constatação de elevados níveis de IAA e etileno em plantas inoculadas, desenvolveu-se uma proposta de que a promoção do crescimento por *A. brasilense* envolve uma via sinalizadora que tem etileno como regulador central, porém são poucos os casos do envolvimento de etileno com *Azospirillum* em comparação com outras

BPCP's nas quais este é um dos principais mecanismos de atuação (BASHAN e DE-BASHAN, 2010).

Um novo grupo de compostos envolvidos na promoção do crescimento por *Azospirillum* spp. são as poliaminas, consideradas reguladores do crescimento de plantas, em especial a cadaverina, a qual tem sido correlacionada com a promoção do crescimento da raiz e mitigação do estresse osmótico em algumas espécies vegetais (CASSÁN et al., 2009b). *A. brasilense* estirpe Az39 é conhecida por produzir poliaminas em meio de cultura, tais como espermidina, espermina (PERRIG et al., 2007) e putrescina (THULER et al., 2003) e também cadaverina, em meio quimicamente definido e em plantas de arroz inoculadas com a estirpe. A cadaverina foi correlacionada à promoção do crescimento da raiz em pinheiro e soja (GAMARNIK e FRYDMAN, 1991; NIEMI; HAGGMAN; SARJALA, 2001), à resposta ao estresse osmótico no nabo (AZIZ; ARTIN-TANGUY; LARHER, 1997) e ao controle da atividade estomática em feijão de fava (LIU et al., 2000). Cassán et al. (2009b) avaliaram a capacidade da bactéria *A. brasilense* Az39 de produzir cadaverina em plantas de arroz e verificaram que *A. brasilense* promoveu o crescimento das raízes e ajudou a mitigar o estresse osmótico nas plântulas de arroz, devido à produção de cadaverina.

Apesar dos inúmeros experimentos, em casa de vegetação e campo, que repetidamente demonstram alguma contribuição da FBN, com base em aumento da atividade nitrogenase microbiana dentro das raízes inoculadas, é relevante salientar que a FBN por bactérias aeróbias é um processo que demanda muita energia, exigindo fosforilação oxidativa eficiente, uma vez que o O₂ é tóxico para o complexo nitrogenase. As bactérias fixadoras de N têm desenvolvido diversas estratégias para lidar com esse “paradoxo O₂”, porém ainda é discutido se uma melhoria na tolerância do processo de fixação de N ao O₂ poderia contribuir para o desenvolvimento de estirpes mais eficientes para a inoculação ou se as adaptações ambientais específicas de *Azospirillum* são suficientes para permitir a proliferação ideal e fixação de N em seu habitat natural (MARCHAL e VANDERLEYDEN, 2000).

A teoria da nitrato redutase (NR) bacteriana foi considerada uma alternativa à FBN como explicação para o acúmulo de N em plantas de trigo após inoculação por *Azospirillum*, porém esta linha de pesquisa não foi aprofundada (BASHAN e DE-BASHAN, 2010). Ferreira et al. (1987) avaliaram o metabolismo do N em plantas de trigo inoculadas com estirpes de *A. brasilense* e com mutante (NR⁻) sob condições controladas e observaram que em baixo nível de NO₃⁻ os mutantes apresentaram atividade nitrogenase menor que as estirpes NR⁺, indicando o possível papel da nitrato redutase bacteriana na assimilação de NO₃⁻ pela planta

de trigo e que o N acumulado na planta poderia ser resultante de um aumento na assimilação de nitrato.

O aumento da absorção de nutrientes pelas raízes inoculadas tem sido associado também a uma melhoria da atividade de efluxo de prótons de raízes inoculadas, pois a inoculação das plântulas de trigo com *A. brasilense* aumentou significativamente o efluxo de prótons das raízes 5 h após a inoculação em comparação com plantas não inoculadas (BASHAN, 1990). Segundo Bashan e De-Bashan (2010) a atividade de efluxo de prótons está diretamente relacionada com o balanço de íons nas raízes da planta e seus efeitos precisam ser mais investigados, pois as alterações no metabolismo radicular podem induzir melhor absorção de água e nutrientes, mesmo sem a proliferação de raízes induzida por fito-hormônios.

Embora *Azospirillum* não seja conhecido como um típico agente de controle biológico de fitopatógenos, uma vez que não metaboliza substâncias químicas supressivas diretas ou enzimas hidrolíticas, alguns mecanismos que possibilitam reduzir os danos de fitopatógenos têm sido atribuídos a *Azospirillum*, como competição ambiental e deslocamento de patógenos, melhoria geral das plantas na resistência a infecção e possível inibição do crescimento fúngico via produção de substâncias tóxicas microbianas. No entanto, os mecanismos envolvidos na redução da doença não foram elucidados, sendo necessários mais estudos sobre a atuação de *Azospirillum* como agente de controle biológico (BASHAN e DE-BASHAN, 2010).

Estudos relatam o potencial de *Azospirillum* spp. na solubilização de fosfato devido à capacidade de produzir diferentes ácidos orgânicos que auxiliam na solubilização de fósforo (P) conforme o açúcar presente nos exsudatos radiculares. Pesquisas com foco na solubilização mineral e *Azospirillum* são potencialmente úteis para o estudo da sobrevivência e interações das bactérias no solo (BASHAN e DE-BASHAN, 2010). Para Pidello et al. (1993) os efeitos de *Azospirillum* nas plantas ocorrem também em função da influência da bactéria na melhoria de parâmetros do solo, tais como pH e potencial redox. Segundo os autores, *Azospirillum* ocasiona uma modificação global do ambiente do solo, sendo capaz de influenciar o número e/ou fisiologia da microflora celulolítica, o que pode afetar tanto as plantas quanto o solo.

Em função da diversidade de mecanismos envolvidas nas respostas à inoculação de *Azospirillum*, recentemente tem sido retomada a proposta do modelo da hipótese aditiva sugerido há 20 anos. O modelo da hipótese aditiva considera múltiplos mecanismos atuando simultaneamente ou em sucessão na planta como resposta ao processo de associação com *Azospirillum*, sendo que os mecanismos podem variar de acordo com a espécie vegetal,

estirpe de *Azospirillum* e condições ambientais que prevalecem durante a interação. Dessa forma, mesmo que um mecanismo isolado não seja suficiente para explicar os efeitos de promoção do crescimento e conseqüente aumento de produtividade da cultura, quando combinado com outros mecanismos, resulta num efeito geral positivo para a planta. Essa teoria inclusiva possibilita fechar as lacunas entre as teorias concorrentes e pode levar a novas percepções a respeito de sobreposição e cooperação entre os diferentes mecanismos que afetam o crescimento das plantas estudados até o momento (BASHAN e DE-BASHAN, 2010).

Segundo os autores, apesar dos estudos intensivos da fisiologia e biologia molecular de *Azospirillum* e das lacunas que ainda restam a respeito do exato modo de ação das bactérias nas plantas, três fatos são incontestáveis: a maioria das estirpes pode fixar N, mas apenas uma fração deste é transferida para a planta; muitas estirpes, mas não todas, são capazes de produzir hormônios vegetais “in vitro” ou em associação com plantas, mas esses hormônios podem ser transferidos de forma limitada ou nula; uma resposta geral de crescimento positivo em numerosas espécies de plantas é evidente na maioria dos casos, mas nem sempre este efeito se reflete em termos de produtividade econômica (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994; DÍAZ-ZORITA e FERNÁNDEZ-CANIGIA, 2009).

2.3.3 Potencial de Inoculação de BPCP's em Milho e Seleção de Estirpes

Os efeitos de promoção do crescimento vegetal e a possibilidade de reduzir, no mínimo parcialmente, o uso de fertilizantes nitrogenados têm estimulado os estudos sobre a associação de *A. brasilense* com o milho, resultando na disponibilização no mercado agrícola de diversos insumos biológicos, chamados inoculantes.

Os inoculantes são desenvolvidos de forma a proporcionar um microambiente adequado e seguro para prevenir o rápido declínio da bactéria introduzida no solo e garantir sua sobrevivência, uma vez que esta precisa enfrentar diversas tensões a partir de sua transferência para o competitivo ambiente do solo (BASHAN, 1998). As pesquisas com inoculação de *A. brasilense* em gramíneas, como o milho, têm apresentado resultados promissores, porém relatos de desempenho irregular e problemas de instabilidade no comportamento das bactérias têm sido observados (FREITAS, 2007), limitando o uso comercial dos inoculantes. Os principais fatores relacionados à imprevisibilidade dos resultados são: competitividade do inoculante com a população nativa de microrganismos do solo, dificuldades na formulação do inoculante, eficiência e especificidade do inoculante e

baixa sobrevivência das estirpes inoculadas no solo (BODDEY e DÖBEREINER, 1988; BASHAN e HOLGUIN, 1997).

A rizosfera pode ser definida como “a região do solo que recebe influência direta das raízes, possibilitando a proliferação microbiana”, pois é rica em exsudatos, secreções, mucigel e lisados celulares que permitem aos microrganismos desempenhar seu papel nas transformações da MO e nos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes. Os exsudatos radiculares influenciam o crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera pela alteração do ambiente do solo circundante, servindo como substrato para o crescimento seletivo de microrganismos do solo. Os microrganismos, por sua vez, influenciam a composição e a quantidade de vários componentes dos exsudatos radiculares, por meio de seus efeitos no metabolismo das células da raiz, bem como no estado nutricional das plantas (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007). No entanto, alterações significativas nas propriedades físico-químicas do solo, causadas pela adição ou remoção de nutrientes e/ou práticas de cultivo, podem causar mudanças na comunidade microbiana do solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Em condições de campo, principalmente quando a bactéria é introduzida com a inoculação, a multiplicação e o estabelecimento na rizosfera são fatores importantes para obtenção dos benefícios propiciados pelas BPCP's associadas às gramíneas, uma vez que precisam competir com os microrganismos nativos existentes no solo (BALDANI et al., 1986). Os microrganismos fixadores simbióticos, por sua vez, tornam-se independentes dessa competição, apresentando uma vantagem ecológica em relação aos diazotrofos associativos, pois dispõem da fonte primária de energia, por meio da utilização de fotossintatos cedidos diretamente pelo hospedeiro (LOPES, 2007). Para Reis e Teixeira (2005), o principal problema da associação de espécies não leguminosas com bactérias diazotróficas é a ausência da formação de uma estrutura macroscópica que proteja e agrupe as bactérias, ao contrário da interação simbiótica rizóbio-leguminosa, em que se formam os nódulos. Dessa forma, a competitividade com outras estirpes nativas ou outros componentes da microbiota do solo constitui aspecto relevante que influencia no desempenho de *Azospirillum* (ROSENBLUETH e MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

No Brasil, o primeiro inoculante comercial a base de *Azospirillum* foi desenvolvido a partir de uma parceria, em 1996, entre a Embrapa Soja e o grupo da Universidade Federal do Paraná - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que realizaram uma rede de ensaios de laboratório e testes de eficiência agrônômica de *Azospirillum* a campo. Obedecendo aos critérios da legislação brasileira para inoculantes estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estirpes de *A. brasilense* que

apresentaram maior sobrevivência no solo, maior promoção de crescimento das plantas e maior adaptação às tecnologias utilizadas nas culturas do milho e do trigo foram selecionadas. A inoculação com *A. brasilense* resultou em incremento significativo médio na produtividade de grãos de trigo da ordem de 14% em relação ao controle e de 24% no caso do milho, resultando na autorização pelo MAPA das primeiras estirpes de *A. brasilense* (Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7) para a produção de inoculantes comerciais para milho e trigo (HUNGRIA et al., 2010; HUNGRIA, 2011).

Segundo a Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII), três empresas fabricantes de inoculantes no Brasil possuem produto contendo estirpe de bactéria *A. brasilense* à disposição dos agricultores devidamente registrado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual exige testes de eficiência agrônômica, dentro do protocolo da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola – RELARE (ARAUJO, 2008; ZAPPELINI e GUIRAU, 2012). Os produtos hoje disponíveis no mercado podem ser encontrados em via sólida (com base em turfa) ou líquida, com maior oferta de inoculante líquido, o qual pode ser misturado às sementes com tambor rotatório, com a máquina de tratamento de sementes, ou outros mecanismos que sejam eficientes na distribuição do produto (HUNGRIA, 2011).

O processo de obtenção de um inoculante envolve, inicialmente, o isolamento das bactérias, e respectivo cultivo *in vitro*, para posterior inoculação nas plantas em ambiente controlado (câmara de crescimento, casa de vegetação etc.). Em seguida, são avaliadas as estirpes mais promissoras em condições de campo e aquelas cuja eficiência na associação com a cultura de interesse for comprovada passam a ser utilizadas na fabricação de inoculantes (SEVILLA et al., 2001; HUNGRIA, 2011). No entanto, considerando a amplitude da contribuição de bactérias diazotróficas nativas do *continuum* solo-planta, o isolamento e a classificação das bactérias em relação ao seu *habitat* não é um procedimento simples, pois a mesma estirpe bacteriana pode colonizar rizosfera, rizoplano e endosfera (BARBOSA CONSALTER; VARGAS MOTTA, 2012). Além disso, diversas espécies podem ocorrer numa mesma planta, o que dificulta a identificação de quais estão contribuindo de forma mais efetiva e em qual magnitude (MOREIRA et al., 2010).

Mesmo após estabelecer a melhor combinação planta-BPCP para a produção comercial de inoculantes persiste outro aspecto relevante, relacionado à aplicação bem sucedida do inoculante. Para que as bactérias cheguem até a raiz no momento preciso requerido pela planta é necessário que as técnicas de inoculação sejam práticas e econômicas

e que o produto forneça inóculo suficiente para a planta, além de apresentar longa viabilidade e atender à legislação vigente (DE-BASHAN et al., 2007). Para uma inoculação eficiente, Hungria (2011) destaca alguns cuidados essenciais: distribuir o inoculante líquido nas sementes de forma uniforme; evitar deixar as sementes expostas ao sol ou no depósito de sementes com temperatura acima de 35°C; aplicar o inoculante após o tratamento das sementes com fungicida, inseticidas e/ou micronutrientes; e realizar a semeadura em até 24 h após a inoculação.

Outro fator chave que contribui para o sucesso da inoculação com *Azospirillum* e outras BPCP's é a escolha da estirpe bacteriana (s), pela avaliação e seleção de estirpes eficientes para inoculação de culturas específicas (HUNGRIA et al., 2010). Segundo Bárbaro et al. (2008) é necessária a seleção de estirpes de *Azospirillum* adaptadas às condições locais e às culturas e cultivares usadas em cada região, selecionando-se, por testes de campo, aquelas mais adaptadas às situações de clima e manejo, para possível recomendação em um produto comercial. Para Campos, Theisen e Gnatta (2000), a associação de estirpes eficientes à formulação adequada do produto facilita a aplicação e favorece o bom desempenho do inoculante, permitindo maior aceitação por parte do agricultor.

Alguns estudos apresentam evidências da existência de especificidade em nível de estirpe bacteriana de *Azospirillum* com a planta e do conceito de estirpes homólogas, ou seja, a preferência da planta para a bactéria isolada dela mesma, como é o exemplo da estirpe Sp245 em trigo (SALOMONE e DÖBEREINER, 1996; DE-BASHAN et al., 2007; BALDANI et al., 2009). Esta sintonia bactéria-hospedeiro pode indicar que algumas linhagens são mais receptivas do que outras, permitindo buscar neste material genético o diferencial de seleção a ser incorporado em novos programas de melhoramento (REIS, 2007).

Rangel-Lucio et al. (2011), visando avaliar a afinidade de estirpes de *A. brasilense* no milho, isolaram estirpes sobressalentes pela atividade nitrogenase de diferentes variedades de milho (Palomero, Toluqueño, Cacahuacintle, Ccónico, Chalqueño e H-20, e de Teocintle) no México e as re-inocularam nas mesmas variedades. Pelos resultados de volume da raiz, população bacteriana e atividade da nitrogenase, verificaram que houve algum grau de afinidade de uma estirpe homóloga de *Azospirillum* obtida a partir das variedades H-28 e Chalqueño, pois a re-inoculação nestas mesmas variedades estimulou um reconhecimento regressivo da estirpe pela variedade (Chalqueño) que evolutivamente antecedeu o milho de origem mais recente (H-28).

Hahn (2013) avaliou a eficiência da inoculação de rizóbios simbiotes de leguminosas e bactérias diazotróficas associativas na promoção do crescimento de híbridos de

milho e verificou respostas diferenciadas entre os híbridos às BPCP's avaliadas. Além das respostas positivas à inoculação combinada de isolados de *Azospirillum* e à inoculação com rizóbio na produção de massa seca de parte aérea e teor de N na massa seca da parte aérea, o autor relata que para haver um efeito estimulante significativo dos micro-organismos sobre a fisiologia da planta, é necessário haver um reconhecimento ao nível bioquímico entre as duas partes e a interação planta/bactéria deve ser capaz de estabelecer populações bacterianas significativas na superfície radicular ou endofiticamente.

O comportamento de *Azospirillum* reflete do ambiente em que atua (solo e rizosfera), pois depende da nutrição balanceada e metabolismo da planta, com resposta das diversas espécies e estirpes a uma variedade de atrativos que se correlacionam com a qualidade dos exsudados radiculares típicos da rizosfera (RANGEL-LUCIO et al., 2011). Além disso, num ambiente onde a competição por fontes de carbono é a força maior que comanda a flutuação populacional, os microrganismos diazotróficos precisam ser versáteis para sobreviver (REIS e TEIXEIRA, 2005). Penot et al. (1992) verificaram uma grande diversidade no metabolismo da fonte de carbono entre as estirpes de *Azospirillum* sp. isoladas de cultivares de milho em solos franceses, independentemente da sua origem.

Sukiman e New (1990) classificaram quatro estirpes de *Azospirillum* de acordo com o número de células adsorvidas nas raízes de plântulas de arroz, trigo e trevo e buscaram correlacionar esses resultados com o sucesso das estirpes na colonização da rizosfera e interior das raízes das plantas cultivadas em vaso. Em geral, os autores não verificaram relação entre os dados de adsorção inicial e o sucesso das estirpes em colonizar a rizosfera das plantas hospedeiras ou o interior das raízes.

De-Bashan et al. (2007) afirmam que o mecanismo de colonização radicular de *Azospirillum* varia conforme a estirpe bacteriana, a espécie vegetal, as condições ambientais (umidade do solo, temperatura e pH), fatores químicos, fisiológicos e nutricionais, e que a interação entre essas variáveis cria diferenças no grau e padrão da colonização radicular, tamanho da população e sítios de colonização. Os autores relatam ainda que não se sabe se os mecanismos de ação de *Azospirillum* também se expressam de acordo com a estirpe, porém tem sido demonstrada capacidade das estirpes de alterar características da planta, como a proporção raiz/parte aérea (massa seca). Contudo, a afinidade entre estirpes e plantas afeta a capacidade de estabelecimento da bactéria ao genótipo da planta hospedeira, o que limita a elaboração de um inoculante comercial eficiente a base de *Azospirillum* (RANGEL-LUCIO et al., 2011), tornando necessário mais estudos com ênfase no desempenho de cada isolado ou estirpe bacteriana para cada cultura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL

O experimento foi desenvolvido a campo nas safras de verão 2012/13 e 2013/14 na Estação Experimental do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, localizado no município de Pato Branco – PR. A área experimental está localizada na região fisiográfica do Terceiro Planalto Paranaense, entre as coordenadas de 25°07' S de latitude e 52°41' W de longitude, com altitude média de 700 m. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cfa em transição para Cfb. As informações meteorológicas de pluviosidade e temperaturas durante a condução do estudo são apresentadas na Figura 1.

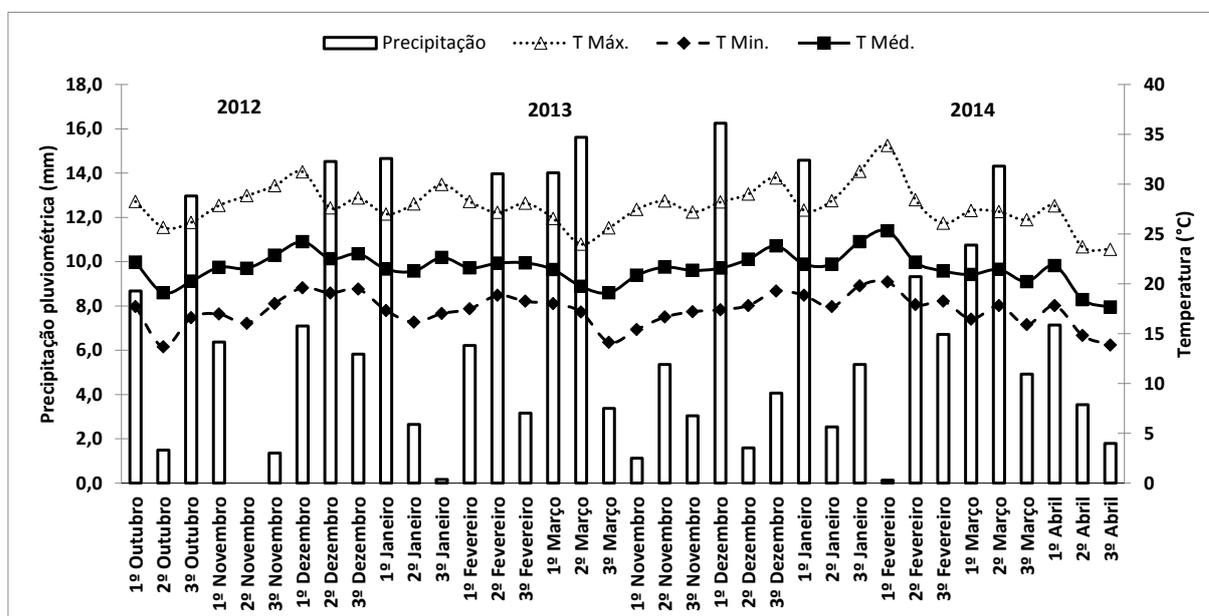


Figura 1 - Precipitação pluvial acumulada e temperatura máxima, mínima e média em decêndios no período de outubro de 2012 a março de 2013 e de novembro de 2013 a abril de 2014. Iapar, Pato Branco, PR.

O solo da área experimental foi classificado como Latossolo Vermelho distroférrico, relevo ondulado e textura argilosa, cujo teor de argila na camada de 0 a 20 cm é de 620 g kg⁻¹ (ou 62%). Antes da instalação do experimento foi realizada coleta de solo na profundidade 0-20 cm para análise química, efetuada no Laboratório de Solos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, cujos resultados constam da Tabela 1. Em solos com altos teores de matéria orgânica, próximo de 50 g dm⁻³, uma saturação por bases (V) de 50% é suficiente (DUARTE et al., 2014), por isso não foi realizada calagem apesar do V% estar abaixo de 70, recomendado para a cultura do milho.

Tabela 1- Caracterização química da camada de 0-20 cm do solo da área experimental. Pato Branco, 2012

pH	MO	P	K	Ca	Mg	Al ³⁺	H+Al	SB	V	CTC
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³		-----cmol _c dm ⁻³ -----					%	
4,5	44,2	10,3	0,23	3,91	1,64	0,26	4,96	5,78	54	11

Antes da instalação do experimento, no cultivo de inverno, a área foi cultivada por um consórcio de quatro culturas de cobertura: nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.), ervilha forrageira (*Pisum arvense* L.), ervilhaca (*Vicia sativa* L.) e aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.), cuja semeadura foi realizada em 15/05/2012. O manejo das plantas de cobertura foi realizado com rolo faca no dia 23/08/2012 sendo a área dessecada no dia 16/10/2012 com o herbicida não seletivo glifosato (2,5 L ha⁻¹). Entre os cultivos de milho das safras verão 2012/13 e verão 2013/14 utilizou-se a aveia preta, cultivar Iapar 61, a qual foi semeada a lanço para cobertura da área, no dia 19/06/2013 e dessecada com glifosato (2,5 L ha⁻¹) no dia 30/10/2013.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento estatístico foi em blocos casualizados (DBC), com quatro repetições, em esquema de parcelas subdivididas. As subparcelas foram constituídas de dois anos de cultivo correspondentes às safras 2012/13 e 2013/14. As parcelas, por sua vez, foram constituídas por nove tratamentos relacionados à inoculação de estirpes de bactérias com potencial para promoção do crescimento de plantas:

- 1- Controle (sem N e sem inoculação);
- 2- 30 kg ha⁻¹ N na semeadura;
- 3- 160 kg ha⁻¹ N (30 kg ha⁻¹ N na semeadura + 130 kg ha⁻¹ N em cobertura);
- 4- 30 kg ha⁻¹ N na semeadura + inoculação com *Azospirillum brasilense*, estirpe Ab-V5;
- 5- 30 kg ha⁻¹ N na semeadura + inoculação com *Azospirillum brasilense*, estirpe HM053;
- 6- 30 kg ha⁻¹ N na semeadura + inoculação com *Azospirillum* sp., estirpe L26;
- 7- 30 kg ha⁻¹ N na semeadura + inoculação com *Azospirillum* sp., estirpe L27;
- 8- 30 kg ha⁻¹ N na semeadura + inoculação com *Enhydrobacter* sp. estirpe 4331;
- 9- 30 kg ha⁻¹ N na semeadura + inoculação com *Rhizobium* sp. estirpe 8121.

3.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

Utilizou-se a semente de milho do híbrido simples 30F53 Herculex[®], a qual foi inoculada com estirpes de BPCP, 12 horas antes da semeadura, na proporção de 20 mL para cada kg de semente previamente umedecida com água destilada (6 mL por kg de semente). Os inoculantes foram fornecidos pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, sendo preparados a partir de uma solução de bactérias pura na concentração de 1×10^9 UFC mL⁻¹ de inoculante. As estirpes HM053 e AbV5 já estão registradas pelo Ministério da Agricultura, porém as demais foram isoladas recentemente. As estirpes L26 e L27 foram isoladas de raízes de milho da variedade Sol da Manhã, no município de Santo Antônio de Goiás – GO, enquanto as estirpes 4331 e 8121 foram isoladas de raízes de milho híbrido (duplo), AG 2040, no município de Londrina – PR.

A semeadura foi realizada com auxílio de “matracas”, nos dias 25/10/2012 e 14/11/2013 colocando-se duas sementes por cova, obtendo-se, após desbaste, cinco plantas por metro linear visando obter uma densidade de 65.000 plantas/ha. As linhas de semeadura foram marcadas com semeadora-adubadora, a qual realizou a distribuição dos adubos contendo P₂O₅ e K₂O. Cada parcela constou de seis linhas (0,8 m entre linhas) com 5 m de comprimento (24 m² por parcela e 864 m² totais), considerando-se como área útil as duas linhas centrais de 3 m cada (4,8 m²).

A adubação foi realizada com base na análise química do solo e nas recomendações propostas por IAPAR (2003), de modo que aplicou-se no sulco de semeadura 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 50 kg ha⁻¹ de K₂O, em ambos os experimentos. Como fontes de P e K utilizou-se os fertilizantes superfosfato simples (18% de P₂O₅) e cloreto de potássio (58% de K₂O), respectivamente. No momento da semeadura foi realizada a adubação nitrogenada, aplicando-se 30 kg ha⁻¹ de N, exceto para o tratamento controle. O restante da dose de N, no caso do tratamento com 160 kg ha⁻¹ de N, foi aplicada em cobertura entre no estádio V6, quando as plantas de milho apresentavam seis folhas totalmente expandidas (WEISMANN, 2008). A fonte de N utilizada foi a ureia (46% de N).

Durante a condução do primeiro cultivo de milho realizaram-se duas aplicações de herbicidas seletivos com os ingredientes ativos tembotriona (0,24 L ha⁻¹ do p.c.) e atrazina + simazina (6,0 L ha⁻¹ do p.c.), aos 26 e 32 dias após a semeadura (DAS), respectivamente. Foram também realizadas três aplicações de inseticidas para controle de lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) com os ingredientes ativos clorpirifós (0,4 L ha⁻¹ do p.c.), lufenurom (0,3 L ha⁻¹ do p.c.) e metomil (0,6 L ha⁻¹ do p.c.), aos 26, 32 e 42 DAS, respectivamente.

Durante a condução do segundo cultivo de milho foram realizadas duas aplicações de herbicidas seletivos com os ingredientes ativos tembotriona (0,24 L ha⁻¹ do p.c.) e atrazina (6,0 L ha⁻¹ do p.c.), aos 18 e 27 DAS, respectivamente, e duas aplicações de inseticidas com os ingredientes ativos clorpirifós (0,4 L ha⁻¹ do p.c.) e lufenurom (0,3 L ha⁻¹ do p.c.), aos 18 e 27 DAS, respectivamente.

3.4 AVALIAÇÕES

3.4.1 Variáveis Biométricas

Realizaram-se duas coletas de plantas para avaliação das variáveis biométricas, uma no estágio vegetativo (estádio V8 – plantas com oito folhas totalmente expandidas) e outra no estágio reprodutivo (estádio R1 - “embonecamento” ou aparecimento dos estilos-estigmas na parte de fora da espiga), retirando-se duas plantas dentro da área útil da parcela de forma aleatória para cada avaliação. Antes da coleta das plantas, avaliou-se o diâmetro basal do colmo a cinco centímetros da superfície do solo (com auxílio de paquímetro) e a altura do dossel, medida entre o colo e o ponto mais alto da planta (com auxílio de régua graduada).

As plantas amostradas foram coletadas e levadas para o laboratório do IAPAR, onde foram seccionadas em diferentes partes (folhas e colmo+bainha), as quais foram acondicionadas em sacos de papel, identificadas e levadas à estufa de circulação forçada de ar a 65 °C ± 2 °C por 72 h, sendo em seguida pesadas em balança de precisão, obtendo-se a massa seca da parte aérea.

A área foliar foi determinada utilizando-se a metodologia de Benincasa (2003). Depois de separadas as folhas da planta, foram retiradas sub-amostras foliares com auxílio de uma amostrador esférico com área conhecida (177,9 cm²), a qual foi considerada como área foliar da amostra (AF amostra). Posteriormente o material foi seco em estufa obtendo-se a massa seca de amostra (MS amostra) e também a massa seca de folhas (MSF). Dessa forma, obteve-se a área foliar total com uso da fórmula: $AF = [(AF \text{ amostra} \times MSF) / MS \text{ amostra}]$. Foram utilizadas 10 amostras foliares por parcela.

3.4.2 Análise dos Teores de Macro e Micronutrientes em Tecidos Foliare

A coleta de tecido foliar para a análise química de nutrientes foi efetuada no estágio do aparecimento dos estilo-estigmas (R1), sendo realizadas amostragens foliares conforme metodologia proposta por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Para tal, coletaram-se 10 folhas

opostas e abaixo da inserção da espiga principal de cada planta, sendo utilizada a porção média da folha para análise.

As folhas coletadas foram lavadas em água corrente e destilada para retirada de possíveis contaminantes, identificadas e armazenadas em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada de ar a $55\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 72 h, sendo posteriormente moídas em moinho de facas tipo Willey, modelo MA340, Marconi[®]. Em seguida, as amostras foram conduzidas para a análise química, para determinação dos teores foliares de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, B e Mn de acordo com a metodologia descrita no do Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes da Embrapa (SILVA, 2009). A extração dos macro e micronutrientes foi realizada por HCl 1M com leitura no ICP-OES. O teor de N foi determinado por espectrofotometria com azul de salicílico após digestão sulfúrica das amostras.

3.4.3 Análise do Índice de Clorofila

Nos estágios vegetativo e reprodutivo da cultura, coincidindo com a avaliação biométrica, realizou-se a avaliação dos índices de clorofila *a*, *b* e total com o medidor eletrônico do índice de clorofila clorofiLOG - CFL 1030 Falker[®], que possui área ativa de medição de 9 mm². As medições de clorofila foram realizadas em dez plantas por parcela, tomando-se as medidas na porção média da última folha completamente expandida de cada planta, evitando regiões de nervura e danificadas por pragas e patógenos.

A combinação dos valores de transmitâncias nos três diferentes comprimentos de onda analisados, dois na faixa do vermelho (próximos aos picos de absorção da clorofila) e um no infravermelho próximo, gera o Índice de Clorofila Falker (IFC) que é a unidade de medida em índice adimensional do ClorofiLOG (FALKER, 2014), que em alguns aparelhos é chamada de SPAD.

3.4.4 Componentes da Produção e Produtividade de Grãos

A colheita do milho foi realizada manualmente em 26/03/13 e 16/04/2014, coletando-se todas as espigas da parcela útil. Para a determinação dos componentes da produção foram amostradas 10 espigas por unidade experimental de forma aleatória, avaliando-se: comprimento da espiga, diâmetro da espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileira e massa da espiga. Ainda a campo, avaliou-se a altura de inserção da espiga com auxílio de régua graduada.

A produtividade foi determinada com base na produção da área útil de cada parcela e expressa em kg ha^{-1} após a correção da umidade dos grãos para 13% (base úmida). A umidade das amostras foi determinada por método não-destrutivo indireto, com uso do medidor de umidade elétrico digital G800 Gehaka[®].

3.4.5 Análise dos Teores de Macro e Micronutrientes nos Grãos

Amostras dos grãos foram secas em estufa e trituradas em moinho tipo facas e peneiradas em malha de 2 mm para determinação dos teores de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, B e Mn nos grãos, conforme metodologias já descritas para a determinação dos nutrientes em tecidos foliares.

3.4.6 Análise de Dados

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa GENES (CRUZ, 2006), pelo qual também foram realizadas as análises de correlação, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VARIÁVEIS BIOMÉTRICAS

A análise de variância revelou efeito significativo pelo teste F para altura de planta e área foliar nos estágios vegetativo e reprodutivo em função da inoculação com estirpes de BPCP's; altura de planta, diâmetro basal do colmo e área foliar no estágio reprodutivo e massa seca de parte aérea no estágio vegetativo em função de anos de cultivo; e interação entre os fatores inoculação e anos de cultivo para o diâmetro basal do colmo no estágio vegetativo (Tabela 2). Os resultados são apresentados independentemente para cada fator (inoculação e anos de cultivo) assim como para a interação entre os fatores.

Com relação à área foliar, apesar do efeito significativo (pelo teste F) da inoculação nos estágios vegetativo e reprodutivo do milho, para o teste de médias não houve diferença significativa entre os tratamentos no nível de significância testado. Foram obtidos valores médios de 142 e 181 dm²/planta de área foliar nos estágios vegetativo e reprodutivo, respectivamente (Tabela 3). Basi (2013), avaliando a forma de inoculação de *A. brasilense* (tratamento de sementes e sulco de semeadura) e sua associação com a adubação nitrogenada, não verificou efeito significativo da inoculação sobre a área foliar do milho, ao contrário de Marini (2012), que observou incremento de 11% na área foliar do milho inoculado com produto comercial à base de *A. brasilense* em relação ao tratamento controle.

Para a altura de planta no estágio vegetativo, observou-se que a inoculação da estirpe HM053 proporcionou aumento desta variável em relação ao tratamento controle, com incremento de 35 cm ou 28%, sem diferir, contudo, dos demais tratamentos. No estágio reprodutivo, a inoculação da estirpe HM053 e do isolado L26, assim como a adubação com 160 kg ha⁻¹ N, foram superiores ao controle e similar aos demais tratamentos (Tabela 3). Ramos et al. (2010), avaliando o desenvolvimento do milho variedade Assum Preto, em função da adubação nitrogenada e inoculação com *A. lipoferum*, verificaram para a altura de plantas no período vegetativo, que a inoculação de *Azospirillum* associada ou não com adubação nitrogenada (30 kg ha⁻¹ N) superou o tratamento controle e também o uso isolado da adubação. Lana et al. (2012) avaliaram o desenvolvimento e produtividade do milho em resposta à inoculação com *A. brasilense* associada à adubação nitrogenada e verificaram que não houve resposta da altura de plantas aos fatores em estudo. Segundo Albuquerque et al. (2013), a altura de plantas é uma característica genética influenciada pelo ambiente em que a planta se desenvolve, no qual a disponibilização de nutrientes tem grande impacto.

Tabela 2- Resumo da análise de variância para as variáveis: altura de planta (ALT), diâmetro basal do colmo (DCO), massa seca da parte aérea (MSPA), área foliar (AF), altura de inserção da espiga (AI), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras de grãos por espiga (NF), número de grãos por fileira (NG), massa da espiga (ME) e produtividade de grãos (PROD) de plantas de milho, híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com estirpes de *A. brasilense* e dois anos de cultivo. Uniãoeste/Iapar, Pato Branco – PR

F.V.	G.L.	Quadrados médios							
		ALT V ¹	ALT R	DCO V	DCO R	MSPA V	MSPA R	AF V	AF R
Bloco	3	347,36	107,01	7,20	13,88	354487,62	16002192,82	165,56	640,59
Inoculação	8	962,61**	626,70**	20,86	11,65	1403010,13	17720173,56	2869,62**	3447,62**
Erro A	24	194,33	103,58	5,18	6,02	837471,67	10813006,38	749,76	999,32
Ano	1	108,78	693,78**	342,74	532,47**	19957351,07**	16400047,20	254,97	102623,38**
I X A	8	103,96	80,42	17,97**	5,04	376628,72	5523244,12	452,48	591,08
Erro B	27	114,88	77,15	3,89	6,29	694672,24	5984044,78	646,64	645,90
Total	71								
CV (%) ² P		9,10	3,99	8,53	10,25	21,45	32,22	19,26	17,43
CV (%) S		7,00	3,44	7,39	10,48	19,53	23,97	17,88	14,01

F.V.	G.L.	Quadrados médios						
		AI	CE	DE	NF	NG	ME	PROD
Bloco	3	105,895	5,333	9,285	0,611	24,236	3681,572	2668276,127
Inoculação	8	68,296	2,504	7,632**	0,347	12,188	2682,960	2707034,788
Erro A	24	45,756	1,380	2,116	0,444	8,840	1374,047	863648,615
Ano	1	1034,367**	89,067**	130,600**	2,000*	561,125**	50238,160	236448172,296
I x A	8	47,744	3,127	6,702	0,750	11,125	3228,421*	2024619,514**
Erro B	27	40,149	1,699	3,868	0,444	11,236	1351,213	549209,308
Total	71							
CV (%) P		6,12	7,19	2,94	4,22	9,43	16,75	18,36
CV (%) S		5,74	7,98	3,97	4,22	10,63	16,61	14,64

*, **: Significativos a 5 e 1% pelo teste F, respectivamente; ¹V: estágio vegetativo; R: estágio reprodutivo. ²P: parcelas; S: subparcelas.

Tabela 3 - Altura de planta, diâmetro basal do colmo, massa seca da parte aérea e área foliar, nos estágios vegetativo (V) e reprodutivo (R), de plantas de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo, no caso da interação. Uniãoeste/Iapar, Pato Branco – PR

TRATAMENTO	Altura de planta		Diâmetro basal do colmo		MS da parte aérea		Área foliar		
	V	R	V	R	V	R	V	R	
	-----cm-----		-----mm-----		----kg ha ⁻¹ ----		dm ² /planta		
			2012/13	2013/14					
Controle	127 b	235 b	22,6 aA	24,1 dA	21,6	3.393	7.164	100	138
30 kg ha ⁻¹ N	146 ab	249 ab	24,6 aB	27,7 abcdA	23,3	4.044	9.323	128	165
160 kg ha ⁻¹ N	159 ab	264 a	23,7 aB	30,3 abcA	25,7	4.356	12.197	154	201
Ab-V5*	160 ab	256 ab	25,8 aB	31,6 abA	24,2	4.660	11.023	155	185
HM053	162 a	260 a	26,9 aA	26,9 bcdA	23,4	4.773	9.631	160	180
L26	160 ab	262 a	24,7 aB	32,0 aA	25,3	4.455	11.097	146	210
L27	154 ab	255 ab	22,6 aB	28,9 abcA	24,1	4.009	9.645	137	178
4331	156 ab	258 ab	25,5 aA	26,4 cdA	23,4	4.191	10.307	144	186
8121	155 ab	258 ab	24,0 aB	31,8 aA	24,4	4.518	11.472	157	188
Média	153	255	24,5	28,9	23,9	4.267	10.206	142	181
CV (%)	9,1	4,0	7,4		10,2	21,4	32,2	19,3	17,4

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

Azospirillum brasilense estirpe Ab-V5, *A. brasilense* estirpe HM053, isolados L26, L27, *Enhydrobacter* sp. estirpe 4331 e *Rhizobium* sp. estirpe 8121.

*Todos os tratamentos com inoculação receberam 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura.

Ao desdobrar a interação para o diâmetro basal do colmo no estágio vegetativo, observa-se que no ano 2012/13 não foi verificada diferença entre os tratamentos relacionados à inoculação, porém, no ano 2013/14 a inoculação do isolado L26 e da estirpe de *Rhizobium* sp. 8121 superou a inoculação com as estirpes HM053 e 4331, embora sem diferir dos demais tratamentos, inclusive da adubação com 160 kg ha⁻¹ N. O diâmetro basal do colmo foi superior em 2013/14 em relação à 2012/13 para todos os tratamentos quanto ao fator inoculação, em função do efeito de promoção do crescimento proporcionado pelas bactérias, exceto para o controle e estirpes HM053 e 4331, para os quais não foi verificada diferença estatística entre os anos de cultivo (Tabela 3).

Ramos et al. (2010) verificaram que a inoculação de *A. lipoferum* superou o tratamento controle e não diferiu da adubação nitrogenada isolada ou associada à inoculação para o diâmetro do coleto de plantas de milho. Dartora et al. (2013) avaliaram o desenvolvimento e a produtividade do milho em resposta à inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* associada à adubação nitrogenada e relatam que a combinação das estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* proporcionou incremento de 15% no diâmetro basal do colmo em relação ao controle no estágio vegetativo da cultura.

Incrementos no desenvolvimento em diâmetro do colmo do milho estão diretamente relacionados com incrementos na produção, já que esta estrutura da planta tem como função atuar no armazenamento de sólidos solúveis que poderão ser utilizados posteriormente, na formação dos grãos (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000). No entanto, o maior diâmetro basal do colmo verificado no segundo ano de cultivo (2013/14) para a maioria dos tratamentos relacionados à inoculação não foi associado a um maior potencial de armazenamento de reservas e sim aos danos ao colmo das plantas causados por rajadas de vento no início do desenvolvimento da cultura (V6), prejudicando o crescimento em altura e espessura dos colmos.

Os coeficientes de correlação linear de Pearson demonstram que o diâmetro basal do colmo apresentou elevada correlação com a produtividade de grãos (0,722), assim como com os índices de clorofila *b* (0,708) e total (0,701). Correlação ainda mais elevada foi observada entre diâmetro basal do colmo e área foliar das plantas (0,821), para os quais também houve correlação parcial, ou seja, ao isolar o efeito dos demais caracteres essas variáveis continuam correlacionadas (Tabelas 14 e 15). Tais resultados permitem inferir que aumento no diâmetro basal do colmo está relacionado com aumento na produção de pigmentos fotossintéticos e aumento da área foliar fotossinteticamente ativa da planta, resultando em maior produção de fotoassimilados e possível maior produtividade de grãos.

Os resultados de altura da planta e diâmetro basal do colmo demonstram, em geral, que a inoculação das bactérias associativas, combinadas com 30 kg ha⁻¹ N não diferiu da adubação com 160 kg ha⁻¹ N. Segundo Siqueira et al. (1999), quando as plantas são colonizadas por *Azospirillum*, verifica-se um aumento da densidade de pelos radiculares, da taxa de aparecimento de raízes secundárias e da superfície radicular, em função da produção de fito-hormônios pela bactéria, com modificações não apenas no crescimento, mas, também, na morfologia e densidade de pelos radiculares. Tal efeito estimula a absorção de água e nutrientes do solo favorecendo o desenvolvimento da planta como um todo, efeito também evidenciado em outras bactérias associativas promotoras de crescimento de plantas.

Para a massa seca da parte aérea não foi verificada efeito da inoculação, obtendo-se médias de 4.267 e 10.207 kg ha⁻¹ para essa variável nos estágios vegetativo e reprodutivo, respectivamente (Tabela 3). Dartora et al. (2013) também não constataram efeito da inoculação de BPCP's sobre a matéria seca da parte aérea no estágio vegetativo do milho, obtendo valor médio de 6.446 kg ha⁻¹. Porém, no estágio reprodutivo, os autores verificaram que a inoculação combinada das estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* proporcionou incremento de 12% na matéria seca da parte aérea em relação ao controle, embora sem diferença estatística. Peres (2014), avaliando a eficiência da inoculação e co-inoculação de feijão com *Rhizobium tropici* e *A. brasilense* sob duas lâminas de irrigação, verificou no primeiro ano de cultivo, que a co-inoculação possibilitou a maior massa seca da parte aérea e não diferiu de *A. brasilense* para a lâmina de irrigação recomendada enquanto que, com 75% da lâmina recomendada, os tratamentos com *A. brasilense* e *R. tropici* resultaram em maior massa e não diferiram da co-inoculação.

Matéria seca se refere a toda matéria seca orgânica que é produzida de atividades essenciais de fotossíntese e metabolismo proteico e, como o carbono fixado se torna parte dos tecidos vegetais, a produção total de matéria seca de plantas cultivadas é correlacionada com a taxa fotossintética. A maior produção de massa seca está também relacionado com maior produtividade de grãos, pois o acúmulo de massa seca nos grãos depende da taxa e duração do crescimento da cultura e da disponibilidade de reserva de assimilados de outras partes da planta, haja vista que 80 a 90% dos carboidratos acumulados nos grãos derivam da atividade fotossintética após antese (FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2006). A massa seca da parte aérea apresentou fraca correlação (0,258) com a produtividade e correlação moderada (0,480), inclusive parcial, com a área foliar da planta (Tabelas 14 e 15).

Quanto ao efeito de anos de cultivo, para a altura de planta no estágio reprodutivo foi observada maior altura no ano 2013/14 em função do maior estiolamento das plantas. Para o

diâmetro basal do colmo e a área foliar no estágio reprodutivo, assim como para a massa seca de parte aérea no estágio vegetativo, foram observadas médias superiores no ano de 2012/13 em relação à 2013/14, refletindo o melhor desenvolvimento das plantas naquele ano em que as plantas não foram prejudicadas por estresse abiótico, como ocorrido em 2013/14 (Tabela 4).

Tabela 4 - Altura de planta (AP), diâmetro basal do colmo (DCO), massa seca da parte aérea (MSPA) e área foliar (AF), nos estágios vegetativo (V) e reprodutivo (R), de plantas de milho híbrido (30F53) em função de anos de cultivo. Uniãoeste/Iapar, Pato Branco – PR

ANO	AP		DCO		MSPA		AF	
	V	R	V	R	V	R	V	R
	-----cm-----		-----mm-----		-----kg ha ⁻¹ -----		-----dm ² /planta-----	
2012/2013	152	252 b	24,5	26,7 a	4.794 a	10.684	144	219 a
2013/2014	154	258 a	28,9	21,2 b	3.741 b	9.730	140	144 b
Média	153	255	26,7	23,9	4.267	10.206	142	181
CV (%)	7,00	3,44	7,39	10,48	19,53	23,97	17,88	14,01

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

As condições climáticas incidentes durante o período de condução do experimento foram favoráveis ao desenvolvimento da cultura nos dois anos de cultivo, em termos de volume de precipitação pluvial acumulada e temperaturas médias (Figura 1). A precipitação média acumulada em cada ciclo de cultivo ultrapassou 1.000 mm, superando os 600 mm necessários à planta de milho durante seu ciclo (MAGALHÃES e DURÃES, 2006), portanto, não houve problemas relacionados à deficiência hídrica. No entanto, embora com condições climáticas em geral favoráveis durante o ciclo, o cultivo do milho no ano de 2013/14 foi prejudicado em função de um temporal que atingiu a área experimental no mês de dezembro de 2013, com fortes rajadas de vento. Neste período, as plantas estavam entre os estádios V6 e V8 (cerca de 40 a 50 DAS) e os ventos fortes causaram o “tombamento” das plantas de forma desuniforme entre blocos e parcelas, causando danos irreversíveis ao desenvolvimento das plantas em função desse estresse.

Segundo Weismann (2008), queda de 10 a 25% na produtividade pode ocorrer se no estágio V8 a distribuição total das folhas for alterada mediante a ocorrência de granizo, geada, ataque severo de pragas e doenças ou outro fator biótico/abiótico. Além disso, no estágio V8 a planta finaliza a definição do número de fileiras de grãos na espiga, portanto, a produtividade pode ser seriamente comprometida em função de estresse neste estágio.

4.2 ÍNDICE DE CLOROFILA FOLIAR

A análise de variância revelou efeito significativo pelo teste F da interação entre os fatores inoculação de BPCP's e anos de cultivo para o índice de clorofila *a* no estágio reprodutivo e para os índices de clorofila *b* e total nos estágios vegetativo e reprodutivo; e para o índice de clorofila *a* no estágio vegetativo em função de anos de cultivo (Tabela 5).

Não houve resposta do índice de clorofila *a* no estágio vegetativo em função da inoculação, obtendo-se valor médio para essa variável de 35. Desdobrando-se as interações, verifica-se para o índice de clorofila *a* no estágio reprodutivo, que não houve diferença entre os tratamentos quanto à inoculação no ano 2012/13 enquanto que, no ano 2013/14, a adubação com 160 kg ha⁻¹ N superou os demais tratamentos, sem diferir da inoculação da estirpe de *Rhizobium* sp. 8121 (Tabela 6).

Para o índice de clorofila *b* no estágio vegetativo, não se verificou diferença entre os tratamentos relacionados à inoculação de BPCP's no ano 2012/13. Porém, em 2013/14 a adubação com 160 kg ha⁻¹ N superou a inoculação com a estirpe HM053 em 33%, não diferindo dos demais tratamentos. No estágio reprodutivo, o índice de clorofila *b* foi superior para a adubação com 160 kg ha⁻¹ N em relação aos demais tratamentos no ano 2013/14, porém no ano 2012/13 foi 24% superior ao tratamento controle e à inoculação do isolado L26, sem diferir dos demais tratamentos (Tabela 6).

Para o índice de clorofila total no estágio vegetativo, não foi verificada diferença estatística entre os tratamentos relacionados à inoculação de BPCP's para ambos os anos de cultivo. No estágio reprodutivo, por sua vez, observou-se que para o tratamento 160 kg ha⁻¹ N, o índice de clorofila foi 7% superior ao controle, não diferindo, contudo, dos demais tratamentos em 2012/13. Em 2013/14, o tratamento 160 kg ha⁻¹ N superou todos os demais, exceto a inoculação com a estirpe de *Rhizobium* sp. 8121, da qual não diferiu estatisticamente.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para os índices de clorofila *a*, *b* e total, nos estágios vegetativo e reprodutivo, de plantas de milho, híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com estirpes de *A. brasilense* e dois anos de cultivo. Uniãoeste/lapar, Pato Branco – PR

F.V.	G.L.	Quadrados médios					
		Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>		Clorofila total	
		Vegetativo	Reprodutivo	Vegetativo	Reprodutivo	Vegetativo	Reprodutivo
Bloco	3	21,862	8,852	2,392	6,981	36,984	31,573
Inoculação	8	4,366	23,062	1,135	19,087	8,298	82,700
Erro A	24	4,021	3,335	1,024	1,272	7,289	7,760
Ano	1	98,467**	1138,440	301,638	1499,329	744,787	5266,116
I X A	8	3,884	11,288**	2,397*	8,926**	10,804*	39,872**
Erro B	27	2,292	3,167	0,877	1,782	4,496	8,942
Total	71						
CV (%) ¹ P		5,73	5,02	8,21	7,71	5,71	5,46
CV (%) S		4,33	4,89	7,60	9,13	4,48	5,86

*, **: Significativos a 5 e 1% pelo teste F, respectivamente; V: estágio vegetativo; R: estágio reprodutivo. ¹P: parcelas; S: subparcelas.

Tabela 6 - Índices foliares de clorofila a, b e total, nos estágios vegetativo (V) e reprodutivo (R), de plantas de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo, no caso das interações. Unioeste/Iapar, Pato Branco

TRATAMENTO	Clorofila a		Clorofila b				Clorofila total				
	V	R	V		R		V		R		
		2012/13	2013/14	2012/13	2013/14	2012/13	2013/14	2012/13	2013/14	2012/13	2013/14
Controle	35	38 aA	30 cB	14 aA	10 abB	17 bA	8 cB	50 aA	44 aB	59 bA	37 cB
30 kg ha ⁻¹ N	34	41 aA	32 bcB	15 aA	10 abB	20 abA	9 bcB	50 aA	42 aB	62 abA	41 bcB
160 kg ha ⁻¹ N	36	42 aA	38 aB	14 aA	12 aB	21 aA	15 aB	52 aA	47 aB	63 aA	54 aB
Ab-V5*	35	40 aA	32 bcB	14 aA	11 abB	19 abA	10 bcB	49 aA	45 aB	59 abA	41 bcB
HM053	35	41 aA	30 cB	14 aA	9 bB	20 abA	8 cB	52 aA	42 aB	61 abA	38 cB
L26	35	39 aA	33 bcB	15 aA	10 abB	17 bA	10 bcB	51 aA	46 aB	56 abA	43 bcB
L27	34	41 aA	32 bcB	14 aA	10 abB	20 abA	10 bcB	50 aA	43 aB	60 abA	42 bcB
4331	34	40 aA	30 cB	15 aA	10 abB	20 abA	9 cB	51 aA	42 aB	61 abA	39 cB
8121	36	41 aA	35 abB	14 aA	11 abB	19 abA	12 bB	50 aA	47 aA	60 abA	47 abB
Média	35	40	32	14	10	19	10,0	50,5	44,1	59,6	42,5
CV (%)	5,73	4,89		7,60		9,13		4,48		5,86	

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

Azospirillum brasilense estirpe Ab-V5, *A. brasilense* estirpe HM053, isolados L26, L27, *Enhydrobacter* sp. estirpe 4331 e *Rhizobium* sp. estirpe 8121.

*Todos os tratamentos com inoculação receberam 30 kg ha⁻¹ de N.

O teor de clorofila total consiste na base universal para expressar a taxa fotossintética (CIGANDA; GITLSON; SCHEPERS, 2009), sendo influenciado diretamente pelo fornecimento de N à planta, o qual exerce efeito na fotossíntese total, devido à influência na área foliar, pois a produção de fotoassimilados depende da dimensão do aparelho fotossintético, traduzida pelo índice de área foliar (IAF), e da sua eficiência, traduzida pela taxa de assimilação líquida (TAL) (RODRIGUES e COUTINHO, 2000). Em plantas de milho bem nutridas em N, a zona de alongação (em parte aérea e raiz) tem uma atividade superior de sacarose sintase e invertase neutra, e as folhas na sua expansão máxima possuem níveis mais elevados de PEP-case e RUBISCO, o que aumenta e prolonga a capacidade fotossintética e de translocação, aumentando a disponibilidade de assimilados (PIMENTEL, 1998).

Os índices médios obtidos para clorofila *a*, *b* e total no estágio reprodutivo em 2013/14 com a adubação de 160 kg ha⁻¹ N (Tabela 6) refletem a importância do N na constituição do aparelho fotossintético das plantas e a possibilidade de monitoramento do seu teor em tecidos vegetais pelo conteúdo de clorofila e outros parâmetros fotossintéticos. Segundo Fageria, Baligar e Clark (2006), a taxa fotossintética no milho aumenta linearmente com o conteúdo de N nas folhas, pois de 50 a 70% do N total nas folhas está diretamente associado com cloroplastos no milho, o que se confirma pela forte correlação observada entre o teor de N foliar e os índices de clorofila *a* (0,885), *b* (0,879) e total (0,888) neste estudo (Tabela 14).

Com relação aos anos de cultivo, para as variáveis em que houve interação, os índices de clorofila *a*, *b* e total foram superiores no ano 2012/13 em relação à 2013/14 para todos os tratamentos relacionados à inoculação, exceto para o índice de clorofila total no estágio vegetativo com a inoculação da estirpe de *Rhizobium* sp. 8121, para o qual não houve diferença estatística entre anos de cultivo. O índice de clorofila *a* no estágio vegetativo também foi superior no ano 2012/13 em relação à 2013/14, reflexo do melhor desenvolvimento das plantas naquele ano, o que promoveu menor variação na resposta aos diferentes tratamentos relacionados à inoculação (Tabela 7).

Os resultados semelhantes entre a inoculação das estirpes associadas a 30 kg ha⁻¹ N e a adubação com 160 kg ha⁻¹ N para a clorofila total em 2012/13, demonstram a capacidade das bactérias associativas testadas em promover benefícios relacionados aos parâmetros fotossintéticos das plantas. Bashan et al. (2006) relatam que a inoculação com *A. brasilense* em trigo promoveu incremento em pigmentos fotossintéticos fotoprotetivos auxiliares, como violaxantina, zeaxantina, atheroxantina, luteína, neoxantina e beta-caroteno, que geralmente

são produzidos pela planta em maior quantidade sob condições de estresse, prolongando a atividade fotossintética dos tecidos vegetais.

Tabela 7 - Índices foliares de clorofila a, b e total, nos estágios vegetativo e reprodutivo, de plantas de milho híbrido (30F53) em função de anos de cultivo. Uniãoeste/Iapar, Pato Branco – PR

ANO	Clorofila a		Clorofila b		Clorofila total	
	Vegetativa	Reprodutiva	Vegetativa	Reprodutiva	Vegetativa	Reprodutiva
2012/2013	36 a	40	14	19	51	60
2013/2014	34 b	32	10	10	44	42
Média	35	36	12	15	47	51
CV (%)	4,33	4,89	7,60	9,13	4,50	5,86

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

Jordão et al. (2010) avaliaram os efeitos de doses de N e inoculação das sementes com *A. brasilense* sob diferentes manejos da cultura do milho e observaram efeito positivo na inoculação, a qual proporcionou índice SPAD de 50, superior ao tratamento sem inoculação (47). Sampaio et al. (2012) avaliaram o desenvolvimento vegetativo de dois genótipos de milho inoculados com *A. brasilense* em diferentes tipos de solo e verificaram, aos 40 dias após a germinação, que as plantas inoculadas cultivadas no Vertissolo apresentaram índice relativo de clorofila superior ao tratamento controle, porém inferior a adubação com 100 kg ha⁻¹ N. Basi (2013), por sua vez, verificou que os teores de clorofila a, b e total no estágio do florescimento do milho não foram influenciados pela inoculação com *A. brasilense*. Cabe salientar, que o ICF leva em conta a contribuição dos dois tipos de clorofila, por isso, quando comparado a valores de laboratório, os valores do clorofiLOG são até 30% mais sensíveis que os índices do SPAD (FALKER, 2014).

Quadros et al. (2014), avaliando as características agrônômicas e a produtividade de híbridos de milho inoculados com uma mistura de três espécies de *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. oryzae*), verificaram que houve diferença significativa para o teor relativo de clorofila das folhas, sendo obtidos valores médios das leituras SPAD entre os estádios V5 e R3, de 32 no tratamento controle e 34 no tratamento inoculado. Os autores também observaram uma correlação positiva recíproca entre inoculação, teor relativo de clorofila nas folhas e teor de N da parte aérea das plantas de milho.

Segundo Argenta (2001), as leituras no clorofilômetro de 52,1 e 58,0, respectivamente, para os estádios de seis a sete folhas e espigamento, correspondem ao nível

adequado de N nas plantas de milho. Segundo esses parâmetros e considerando-se os índices médios de clorofila total obtidos nos dois anos de cultivo, apenas no ano 2012/13 no estágio reprodutivo, correspondente ao espigamento, foi observado índice de clorofila superior ao nível adequado, o que representa suprimento adequado de N às plantas. Argenta et al. (2003), avaliando o teor de clorofila na folha como método indicador do nível de N na planta de milho em quatro estádios de desenvolvimento, também observaram nos estádios de seis a sete folhas e espigamento, que os valores de leitura SPAD obtidos no clorofilômetro estiveram abaixo dos considerados adequados por Argenta (2001).

De acordo com experimentos científicos conduzidos com mais de 50 híbridos em diversas regiões do Brasil testando-se doses fixas e variáveis de N na cultura do milho, as médias anuais obtidas para o índice de clorofila total no estágio vegetativo (51 e 44) são consideradas baixas (abaixo de 60) para o estágio fenológico em questão (V8). Neste caso, a faixa de produtividade esperada é baixa (abaixo de 9.000 kg ha⁻¹) (FALKER, 2009). De fato, para todos os tratamentos, a produtividade não ultrapassou esse valor, conforme verificado adiante (Tabela 10).

4.3 TEORES DE MACRO E MICRONUTRIENTES NAS FOLHAS

A análise de variância revelou efeito significativo pelo teste F para os teores de P, Ca, Mg e Mn em função da inoculação com BPCP's; para os teores de P, K, Ca, Mg, B e Mn em função de anos de cultivo; e a interação entre os fatores inoculação e anos de cultivo para os teores de N, Cu e Zn (Tabela 8).

Para o teor foliar de P, observou-se que a adubação com 160 kg ha⁻¹ N foi 21% superior à adubação com 30 kg ha⁻¹ N, porém não diferiu dos demais tratamentos. Todos os teores foliares médios de P obtidos em função da inoculação estão dentro da faixa de suficiência considerada adequada por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), que é de 2,5 a 3,5 g kg⁻¹ (Tabela 9). Conrad et al. (2013), avaliando os teores de P e K na parte área do milho em resposta a doses de inoculante comercial à base de *A. brasilense*, verificaram ajuste do teor foliar de P ao modelo linear crescente até a maior dose testada (300 mL do inoculante/25 kg de semente). Dartora (2012), em estudo com a combinação de estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* no desenvolvimento do milho, observou média superior do tratamento inoculado com *H. seropedicae* em relação ao controle, sem diferir da inoculação com *A. brasilense* de forma isolada ou combinada com *H. seropedicae*.

Tabela 8 - Resumo da análise de variância para as variáveis: teores foliares de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, B e Mn, e teores de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, B e Mn em grãos de plantas de milho, híbrido 30F53, em função da inoculação das sementes com estirpes de *A. brasilense* e dois anos de cultivo. Uniãoeste/Iapar, Pato Branco – PR

F.V.	G.L.	Quadrados médios								
		N	P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	B	Mn
Bloco	3	7,036	0,240	8,508	0,206	1,776	2,382	16,721	4,238	264,834
Inoculação	8	30,232	0,170**	2,677	0,235**	0,142*	7,066	5,580	1,656	35,518**
Erro A	24	4,389	0,045	1,817	0,066	0,055	0,500	3,496	0,772	7,953
Ano	1	1054,782	153,038**	2281,726**	2,637**	1,748**	603,202	935,425	84,002**	348,876**
I X A	8	25,279**	0,031	1,559	0,041	0,042	3,062**	11,159*	1,377	9,993
Erro B	27	3,400	0,043	1,264	0,119	0,082	0,474	4,848	1,396	22,110
Total	71									
CV (%) ¹ P		10,29	6,98	7,32	9,76	10,68	9,31	24,81	17,60	10,92
CV (%) S		9,06	6,82	6,10	13,15	13,10	9,06	29,21	23,67	18,20
F.V.	G.L.	Quadrados médios								
		N	P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	B	Mn
Bloco	3	0,808	0,157	0,586	0,0007	0,022	0,384	1,821	0,701	0,237
Inoculação	8	2,273	0,195	0,162	0,0014	0,014	0,283	15,159	0,141	0,236
Erro A	24	1,228	0,105	0,096	0,0006	0,014	0,193	5,030	0,136	0,334
Ano	1	0,581	14,454	2,908**	0,0347	1,499	45,236**	1275,798	10,788	29,159**
I X A	8	0,778	0,160**	0,222	0,0023**	0,018*	0,258	11,408**	0,347*	0,366
Erro B	27	1,003	0,047	0,104	0,0005	0,007	0,141	3,480	0,129	0,171
Total	71									
CV (%) P		10,78	12,55	10,72	21,54	12,55	28,74	13,19	17,30	14,54
CV (%) S		9,74	8,41	11,20	20,32	8,63	24,57	10,97	16,85	10,41

*, **: Significativos a 5 e 1% pelo teste F. ¹P: parcelas; S: subparcelas.

Tabela 9 - Teores foliares de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, B e Mn de plantas de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com estirpes de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo, no caso das interações. Uniãoeste/Iapar, Pato Branco – PR

Tratamento	N		P	K	Ca	Mg	Cu		Zn		B	Mn
	2012/13	2013/14					2012/13	2013/14	2012/13	2013/14		
	-----g kg ⁻¹ -----						-----mg kg ⁻¹ -----					
Controle	24 aA	14 bB	3,0 ab	19	2,4	2,0	9,6 bA	4,0 bB	10,7 aA	3,4 bB	4,8	23 b
30 kg ha ⁻¹ N	23 aA	16 bB	2,8 b	18	2,5	2,0	9,6 bA	4,3 bB	9,8 aA	2,7 bB	4,6	24 ab
160 kg ha ⁻¹ N	25 aA	26 aA	3,4 a	19	3,0	2,3	11,5 aA	8,5 aB	10,1 aA	8,8 aA	6,1	30 a
Ab-V5*	24 aA	16 bB	3,0 ab	18	2,7	2,2	10,8 abA	4,5 bB	12,2 aA	3,1 bB	4,6	26 ab
HM053	25 aA	15 bB	3,0 ab	19	2,5	2,1	10,8 abA	4,0 bB	12,1 aA	3,0 bB	4,9	26 ab
L26	23 aA	16 bB	3,0 ab	18	2,6	2,3	10,1 abA	4,3 bB	10,9 aA	4,0 abB	4,8	25 ab
L27	24 aA	15 bB	3,1 ab	18	2,8	2,4	11,0 abA	4,1 bB	11,6 aA	3,0 bB	4,9	26 ab
4331	25 aA	14 bB	3,1 ab	18	2,6	2,2	10,8 abA	4,0 bB	11,9 aA	3,5 abB	4,9	27 ab
8121	24 aA	17 bB	3,1 ab	19	2,6	2,2	10,1 abA	4,6 bB	11,0 aA	3,8 abB	5,3	26 ab
Média	24	16	3,1	18	2,6	2,2	10,5	4,7	11,1	3,9	5,0	26
CV (%)	9,06		6,98	7,32	9,76	10,68	9,06		29,21		17,60	10,92

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

Azospirillum brasilense estirpe Ab-V5, *A. brasilense* estirpe HM053, isolados L26, L27, *Enhydrobacter* sp. estirpe 4331 e *Rhizobium* sp. estirpe 8121.

*Todos os tratamentos com inoculação receberam 30 kg ha⁻¹ de N.

O P se destaca no metabolismo energético da planta, atuando na transferência de energia necessária para a fotossíntese e outros processos metabólicos. Em sua forma inorgânica, o Pi é substrato ou produto final em muitas reações enzimáticas importantes, incluindo a fotossíntese e o metabolismo de carboidratos, processos fundamentais para a assimilação e utilização de N (ARAÚJO e MACHADO, 2006). O P promove o crescimento inicial e o desenvolvimento da raiz e seu suprimento na fase inicial da planta, principalmente para o milho, mostra-se relevante para a obtenção de produtividades elevadas (FAVARIN; TESOTTO; RAGASSI, 2008; FANCELLI, 2010). Sua deficiência, no entanto, pode comprometer o desenvolvimento da planta como um todo, além de afetar negativamente a FBN, pois tanto a redução do N atmosférico quanto a assimilação de NH_4^+ são processos consumidores de energia (ARAÚJO e MACHADO, 2006).

No entanto, a maior parte do P adicionado como fertilizante é adsorvida aos colóides do solo, tornando-se com o tempo indisponível às plantas, em função da formação de compostos de baixa solubilidade (ARAÚJO e MACHADO, 2006), sendo o P orgânico do solo a principal fonte de P mineralizável do solo, representado principalmente pelo fosfato de inositol. Os microrganismos do solo auxiliam tanto na solubilização de fosfato, quanto na mineralização de formas orgânicas de P nos solos, produzindo enzimas do tipo fosfatases e fitases, que atacam, respectivamente, ésteres fosfatados e fosfato de inositol, liberando PO_4^{3-} na solução (SIQUEIRA et al., 1994; ARAÚJO e MACHADO, 2006). É possível que exista uma contribuição das bactérias promotoras do crescimento neste processo de disponibilização de P às plantas, pois Rodriguez et al. (2004) avaliaram a formação de ácido glucônico *in vitro* e solubilização de fosfato a partir de fontes de P pouco solúveis por duas estirpes de *A. brasilense* e uma estirpe de *A. lipoferum* e verificaram que ambas foram capazes de produzir ácido glucônico, com redução no pH do meio e liberação de fosfato solúvel.

Neste estudo, no entanto, não foram observados sintomas de deficiência de P nas plantas e, mesmo o tratamento controle, proporcionou teor de P foliar adequado, o que pode estar relacionado ao alto teor de P no solo ($10,3 \text{ mg dm}^{-3}$) e, também ao elevado teor de matéria orgânica, que representa importante fonte de P mineralizável do solo.

Para os teores foliares de Ca e Mg, apesar da significância pelo teste F, o teste de médias não permitiu diferenciar os tratamentos, sendo obtidos teores médios para estes nutrientes de 2,6 e 2,2 g kg^{-1} , respectivamente (Tabela 9). As médias obtidas estão de acordo com a faixa considerada ideal para a cultura do milho citada por Büll (1993), é de 2,3 a 4,0 g kg^{-1} para o Ca e de 1,5 a 4,0 g kg^{-1} para o Mg.

A maior parte do Ca no tecido vegetal está localizada nas paredes celulares

(apoplasma), interligando cadeias pécnicas da lamela média, sendo também essencial para a integridade da membrana plasmática, especificamente para a seletividade do transporte de íons. As baixas concentrações de Ca livre no citossol são atribuídas a uma baixa permeabilidade geral das membranas para este elemento e a ação de transportadores de membrana que removem Ca do citossol, expelindo-o ativamente para o apoplasto (VITTI ; LIMA; CICARONE, 2006; EPSTEIN e BLOOM, 2006). Além disso, o Ca tem papel na conversão de sinais estressantes advindos do ambiente, tanto abióticos quanto bióticos, os quais causam aumento na concentração de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma (EPSTEIN e BLOOM, 2006).

O Mg, por sua vez, compõe as clorofilas *a* e *b* e ativa mais enzimas que qualquer outro nutriente mineral, sendo capaz de inibir a fixação de CO_2 , mesmo na presença de clorofila suficiente, devido a sua exigência no processo de regeneração e atividade da enzima RUBPcase. O Mg também contribui na absorção de P e afeta a síntese de proteínas e o teor de N na planta (VITTI ; LIMA; CICARONE, 2006; DIAS, 2012).

Para o teor foliar de K foi obtido valor médio de 18 g kg^{-1} em função da inoculação (Tabela 9), o qual se encontra dentro da faixa considerada adequada para o milho por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), de $17,5$ a $22,5 \text{ g kg}^{-1}$. Dartora (2012) também não verificou efeito da inoculação de rizobactérias para o teor foliar de K, obtendo valor médio de $52,4 \text{ g kg}^{-1}$ em função da inoculação com *A. brasilense* e *H. seropediceae*. Conrad et al. (2013) verificaram ajuste do teor de K foliar ao modelo linear decrescente em função das doses de inoculante, ou seja, os teores de K foliar reduziram com o aumento das doses do inoculante.

O K apresenta altas concentrações no citossol e no vacúolo como íon livre, consistindo no maior agente osmótico catiônico celular, com participação no transporte através da membrana, neutralização de ânions e manutenção do potencial osmótico. Estimula a abertura dos estômatos pela manhã, com o aparecimento de luz e conseqüente influxo de íons K^+ , acompanhado por ânions orgânicos e inorgânicos, principalmente malato e cloro (EPSTEIN e BLOOM, 2006). O K é essencial para o crescimento, desenvolvimento e maturação dos grãos e frutos dos vegetais (MEURER, 2006), e teor elevado na planta pode ser associado ao aumento da produção de grãos, devido à participação do K no transporte de sacarose e fotoassimilados no sentido da fonte para o dreno (MARSCHNER, 1995).

O teor médio foliar de B observado em função da inoculação foi de $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$, abaixo da faixa de suficiência de 15 a 20 mg kg^{-1} definida por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997) para a cultura do milho (Tabela 9). Silvestrin (2011) avaliou diferentes tecidos da planta de milho como ferramenta de diagnose nutricional para o B e sua dinâmica no solo e

verificou que, entre os tecidos avaliados, o B tende a se concentrar no ápice da folha e na inflorescência feminina do milho, sendo a folha da espiga a mais estável para a diagnose nutricional, com nível crítico inferior a 9 mg kg^{-1} de B. Segundo o autor, na literatura observa-se amplitude entre os menores valores sugeridos como adequados para o milho, variando entre 5 e 15 mg kg^{-1} .

O B tem importante função na translocação de açúcares e no metabolismo de carboidratos, no florescimento, no crescimento do tubo polínico, nos processos de frutificação, no metabolismo de N e na atividade de hormônios (DECHEN e NACHTIGALL, 2006). Com relação à estrutura da parede celular, supõe-se que o B interligue duas moléculas de um polissacarídeo chamado ramnagalacturonano II (RGII), fornecendo força física à parede celular (EPSTEIN e BLOOM, 2006). Em relação a doenças, o B possui papel fungistático, pois participa da síntese de lignina que dificulta a entrada do patógeno na célula (MALAVOLTA, 2006).

O B é um nutriente imóvel nas plantas, que se movimenta com o fluxo transpiratório pelo xilema, por isso, os sintomas de deficiência tendem a aparecer em pontos de crescimento, onde há menor fluxo transpiratório (DECHEN e NACHTIGALL, 2006). Segundo Soares (2003), os sintomas de deficiência de B no milho são a interrupção do crescimento das partes terminais e secagem de folhas novas. Fancelli e Dourado Neto (2000) destacam ainda que plantas de milho deficientes em B apresentam espigas pequenas, falhas na granação, folhas avermelhadas no final do ciclo e extremidades das espigas com aspecto de cortiça. Destaca-se, entretanto, que no presente estudo não foram verificados sintomas visuais de deficiência de B.

Com relação ao teor foliar de Mn, a adubação com 160 kg ha^{-1} N superou o tratamento controle (30%), mas não diferiu dos demais tratamentos (Tabela 9). Todos os teores foliares de Mn ficaram abaixo do teor adequado para o milho (50 a 150 mg kg^{-1}) segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Segundo Favarin, Tezotto e Ragassi (2008), as quantidades de micronutrientes requeridas pelas plantas de milho são muito pequenas, entretanto, a deficiência ou excesso podem desorganizar os processos metabólicos, tais como crescimento, fotossíntese e respiração.

Embora os problemas de toxidez de Mn nos solos brasileiros sejam mais comuns que os de deficiência (LEITE et al., 2003), a tendência da aplicação superficial de calcário, como ocorre em plantio direto, tem provocado a deficiência de Mn sobretudo nas culturas de soja e milho (FAVARIN; TEZOTTO; RAGASSI, 2008). O Mn faz parte do fotossistema II, onde tem sucessivas oxidações até alcançar o potencial de oxidação da água (S4) (EPSTEIN e BLOOM, 2006) e desempenha papel importante no desenvolvimento da resistência da planta

a doenças fúngicas em função dos efeitos de lignificação, inibição de aminopeptidases envolvidas no crescimento fúngico e inibição direta, por efeito da toxidez (MALAVOLTA, 2006). Sua carência, além de reduzir o potencial produtivo do milho, em função de sua efetiva participação no fotossistema II da fotossíntese (fotólise da água), também contribui para a maior incidência de pragas e doenças em função da redução dos mecanismos de defesa da planta (FANCELLI, 2010). Houve doenças?

A partir dos resultados obtidos para os teores foliares de P e Mn, é possível observar novamente que a inoculação das sementes de milho com BPCP's associada à adubação nitrogenada de 30 kg ha⁻¹ N alcançou resultados próximos aos obtidos com a adubação com 160 kg ha⁻¹ de N, evidenciando o potencial destas bactérias associativas em promover o crescimento e absorção de nutrientes pelo milho. Cassán et al. (2008) destacam que a inoculação de BPCP's do gênero *Azospirillum* promove alterações na morfologia radicular da planta em resposta à produção de fito-hormônios e conseqüente estímulo à absorção de água e nutrientes minerais.

Quanto ao teor foliar de N, para o qual houve interação significativa entre os fatores avaliados, no ano 2012/13 não foi observada diferença entre os tratamentos relacionados à inoculação enquanto que, no ano 2013/14, a adubação com 160 kg ha⁻¹ N superou todos os demais tratamentos, em função da maior disponibilidade de N às plantas submetidas a esse tratamento. Com relação aos anos de cultivo, para todos os tratamentos com inoculação os resultados foram superiores no ano 2012/13 em relação à 2013/14, exceto para a adubação com 160 kg ha⁻¹ N (Tabela 9), para a qual não houve diferença entre os anos.

No entanto, todos os valores médios de N obtidos em função dos fatores em estudo ficaram abaixo da faixa de suficiência descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997) para a cultura do milho (27,5 a 32,5 g kg⁻¹ N), o que já foi previsto anteriormente segundo os parâmetros de Argenta (2001) com base nos teores de clorofila total determinados no estágio reprodutivo do milho. Os teores foliares de N abaixo da faixa adequada podem ser explicados pelo fato de que é possível ocorrer uma correlação negativa entre a concentração do nutriente no tecido da planta e o crescimento, ou seja, a concentração do nutriente no tecido diminui à medida que o crescimento aumenta. Tal fenômeno é chamado efeito Stesbjerg e consiste na diluição pelo crescimento, pois um suprimento maior do nutriente resultará em um aumento proporcionalmente maior em crescimento, então o conteúdo do nutriente na planta, com base em unidade de matéria vegetal, diminui (EPSTEIN e BLOOM, 2006).

O N é o nutriente mais essencial na determinação do potencial produtivo de culturas em sistemas agrícolas e quantitativamente o mais importante requerido para o crescimento da

planta, sendo necessários no caso do milho, 21 kg de N para produzir uma tonelada de grãos (FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2006; DIAS, 2012). Quando quantidades adequadas do nutriente estão disponíveis, o N promove a expansão do sistema radicular influenciando positivamente na absorção de água e nutrientes e afetando diretamente a taxa de crescimento das plantas (RODRIGUES e COUTINHO, 2000). O teor de N apresentou forte correlação com a produtividade (0,813) e com os teores de clorofilas *a*, *b* e total, além de correlação moderada com a área foliar (0,654) (Tabela 14). Segundo Fageria, Baligar e Clark, (2006), o suprimento de N pode afetar o crescimento vegetal e produtividade alterando área foliar e capacidade fotossintética, pois existe forte relação entre concentração de N foliar e taxa fotossintética foliar em função da composição de enzimas fotossintéticas (FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2006).

Em 2012/13 todos os tratamentos referentes à inoculação apresentaram teor foliar de N estatisticamente semelhante (Tabela 9), inclusive o tratamento controle, podendo-se inferir que houve bom suprimento deste nutriente às plantas em decorrência da decomposição da palhada das plantas de cobertura (nabo, ervilhaca, aveia preta e ervilha forrageira) cultivadas de forma consorciada antes do plantio do milho. A utilização de espécies leguminosas em cobertura de solo no inverno aumenta a disponibilidade de N no sistema e sua absorção pela planta, pode proporcionar incremento na produtividade de grãos de milho cultivado em sucessão (BORTOLINI; SILVA; ARGENTA, 2000).

Tabela 10 - Teores foliares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), zinco (Zn), boro (B) e manganês (Mn) de plantas de milho híbrido (30F53) em função de anos de cultivo. Unioeste/Iapar, Pato Branco – PR

ANO	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	B	Mn
	-----g kg ⁻¹ -----					-----mg kg ⁻¹ -----			
2012/2013	24	4,5 a	24 a	2,4 b	2,0 b	10,5	11,1	3,9 b	28 a
2013/2014	17	1,6 b	13 b	2,8 a	2,3 a	4,7	3,9	6,1 a	24 b
Média	20	3,1	18	2,6	2,2	7,6	7,5	5,0	26
CV (%)	9,06	6,82	6,10	13,15	13,10	9,06	29,21	23,67	18,20

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

Basso e Ceretta (2000), avaliando diferentes manejos de N para o milho cultivado em sucessão a plantas de cobertura no sistema plantio direto em três anos de cultivo, observaram maior absorção de N pelo milho quando cultivado após aveia preta + ervilhaca. Segundo Bortolini, Silva e Argenta (2000), a consorciação de espécies leguminosas e gramíneas permite obter cobertura de solo mais próxima da ideal e maior ciclagem de nutrientes,

trazendo benefícios à produtividade de grãos do milho. Os autores também verificaram que a introdução de ervilhaca em consórcio com aveia diminuiu a necessidade de adubação nitrogenada para o cultivo do milho em sucessão.

Solos com manejo adequado dos restos culturais (com maior teor de MO) apresentam efeitos residuais de N mais elevados (SIQUEIRA et al., 1994). A disponibilização de outros nutrientes também é favorecida pela taxa de cobertura do solo, pois a oxidação bioquímica e microbiológica dos resíduos vegetais, resultando na produção de ânions orgânicos, compete com os íons fosfato pelos sítios de ligação na superfície dos sesquióxidos de Fe e Al, diminuindo a fixação de P e, conseqüentemente, disponibilizando-os para as culturas subsequentes (FANCELLI, 2010).

Em 2013/14, a resposta à adubação com 160 kg ha^{-1} N foi mais evidente em relação ao teor de N nas folhas. Isso pode estar relacionado ao cultivo do milho sobre a palhada de aveia, a qual apresenta elevada relação C/N e conseqüentemente, tende a imobilizar o N temporariamente, coincidindo com a fase inicial de desenvolvimento do milho, disponibilizando-o posteriormente através da mineralização por ocasião do florescimento do milho (MALAVOLTA, 2006). Sá (1996) avaliando os efeitos da adubação nitrogenada na semeadura e em cobertura em experimentos com milho cultivado em Latossolo Vermelho argiloso sob plantio direto, verificaram que as plantas sem N na semeadura apresentaram amarelecimento temporário devido à imobilização do elemento em função da elevada relação C/N da palhada da aveia cultivada anteriormente.

Outros estudos verificaram resposta diferenciada da inoculação sobre o teor foliar de N em milho. Lana et al. (2012) verificaram que a associação entre inoculação e adubação nitrogenada, na semeadura ou em cobertura, provocou redução dos teores foliares de N nas plantas de milho. Hahn (2013) verificou, após 60 dias da semeadura, que entre os híbridos de milho avaliados, o híbrido 30F53 (avaliado neste estudo) apresentou as maiores respostas à inoculação combinada de três isolados de *Azospirillum* (UFRGS Lg1-R, UFRGS EI-S e UFRGS M-S) e à inoculação com o rizóbio UFRGS Vp16 em comparação ao tratamento controle, com incrementos no teor de N na parte aérea assim como na produção de massa seca de parte aérea. Segundo o autor, tais resultados comprovaram a alta capacidade dos isolados de *Azospirillum* e do rizóbio em promover o crescimento de plantas de milho, em função da produção de fito-hormônios, aumento na disponibilidade e absorção de macro e micronutrientes, entre outros mecanismos.

Para o teor foliar de Cu, a adubação com 160 kg ha^{-1} N superou o tratamento controle e a adubação com 30 kg ha^{-1} N no ano 2012/13, sem diferir dos demais tratamentos enquanto

que, no ano 2013/14, a adubação com 160 kg ha⁻¹ N superou todos os demais tratamentos (Tabela 9). Todos os tratamentos referentes à inoculação apresentaram resultado superior no ano 2012/13 em relação à 2013/14. De acordo com Malavolta, Vitti e oliveira, (1997), os valores normais de ocorrência de Cu variam de 6 a 20 mg kg⁻¹, portanto, em 2012/13 todos os tratamentos proporcionaram teores foliares de Cu adequados, com média anual de 10,5 mg kg⁻¹. Porém em 2013/14, apenas a adubação com 160 kg ha⁻¹ N proporcionou teor foliar de Cu adequado, com média anual de 4,7 mg kg⁻¹.

Fancelli (2010) relata que em áreas sob plantio direto por mais de cinco anos, apresentando elevado teor de MO e/ou elevado teor de Zn no solo, o cuidado com a falta de Cu deve ser redobrado, e que sua carência tem contribuído para o aumento da predisposição do milho a cercosporiose e complexo da mancha branca. A maior parte do Cu (70%) em células foliares está presente nos cloroplastos como proteínas complexas representadas pela plastocianina, doador imediato de elétrons para o fotossistema I, e a dismutase do peróxido (EPSTEIN e BLOOM, 2006; MALAVOLTA, 2006). O Cu também compõe as metaloenzimas e atua como receptor intermediário de elétrons (DIAS, 2012).

Para o teor foliar de Zn, os tratamentos com inoculação não diferiram em 2012/13, mas em 2013/14 a adubação com 160 kg ha⁻¹ N não diferiu da inoculação com L26, 4331 e 8121, superando os demais tratamentos (Tabela 9). Para todos os tratamentos com inoculação, os resultados foram superiores no ano 2012/13 em relação à 2013/14, exceto para a adubação com 160 kg ha⁻¹ N, para a qual não foi verificada diferença em função dos anos de cultivo. De acordo com Malavolta et al. (1997), os valores normais de ocorrência de Zn variam de 15 a 50 mg kg⁻¹, sendo que ambos os anos de cultivo apresentaram média geral abaixo dos valores considerados normais (11,1 mg kg⁻¹ em 2012/13 e 3,9 mg kg⁻¹ em 2013/14).

O Zn é o micronutriente mais exigido pelo milho, sendo exportadas 85 g de Zn para cada tonelada de grão produzida (FANCELLI, 2010). Atua como co-fator enzimático e é constituinte estrutural de enzimas desidrogenases, como álcool, lactato, malato e glutamato desidrogenase, superóxido dismutase e anidrase carbônica (DECHEN e NACHTIGALL, 2006). O Zn controla a produção de importantes reguladores de crescimento que afetam o crescimento e desenvolvimento vegetal, constituindo ativador enzimático de processos como a produção de triptofano, aminoácido precursor do ácido indol-acético (FAVARIN; TEZOTTO; RAGASSI, 2008), por isso uma das consequências da deficiência de Zn na planta de milho é o encurtamento dos internódios, o que não foi verificado no presente estudo.

Com relação ao fator anos de cultivo, os teores foliares de P e K em 2012/13 foram cerca de três e duas vezes superiores, respectivamente, em relação à 2013/14, enquanto o teor

de B foi 36% inferior em 2012/13 comparado à 2013/14. Os teores de Ca e Mg foram 17 e 15% superiores, respectivamente, em 2012/13 em relação a 2013/14, enquanto o teor de Mn foi 17% superior em 2013/14 em relação à 2012/13 (Tabela 10).

No ano 2012/13, em geral, foi possível observar maior teor de nutrientes na parte aérea das plantas, pois as condições de clima e manejo foram favoráveis, estimulando o desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea das plantas. Além disso, a palhada das plantas de cobertura de inverno cultivadas anteriormente favoreceram o desenvolvimento das plantas conforme já relatado. Em 2013/14, no entanto, as rajadas de vento prejudicaram o desenvolvimento das plantas, afetando também a absorção de nutrientes do solo. O sistema radicular constitui o dreno principal da planta, sendo seu crescimento decisivamente influenciado pelo suprimento de carboidratos sintetizados e acumulados na parte aérea, dessa forma, qualquer anormalidade que interfira na área foliar inicial, no metabolismo da planta e no ambiente radicular pode reduzir irreversivelmente o potencial produtivo do milho (FANCELLI, 2010).

4.4 TEORES DE MACRO E MICRONUTRIENTES NOS GRÃOS

A análise de variância revelou efeito significativo pelo teste F para os teores de K, Cu e Mn em função de anos de cultivo e a interação entre os fatores inoculação de BPCP's e anos de cultivo para os teores de P, Ca, Mg, Zn e B (Tabela 8).

Considerando-se os nutrientes para os quais houve interação, verificou-se para os teores de P, Ca, Mg e Zn nos grãos que não houve diferença entre os tratamentos relacionados à inoculação no ano 2012/13 enquanto que, para o B, o tratamento controle superou a inoculação com o isolado L26, sem diferir dos demais tratamentos (Tabela 11). Quanto ao ano 2013/14, entre as interações com efeito significativo, apenas o teor de B nos grãos não diferiu quanto aos tratamentos relacionados à inoculação. Em 2013/14, o teor de P nos grãos foi superior com a inoculação de *A. brasilense*, estirpe HM053 e *Rhizobium* sp., estirpe 8121 em relação à adubação com 160 kg ha⁻¹ e à inoculação de *Enhydrobacter* sp., estirpe 4331, sem diferir dos demais tratamentos. O teor de Ca nos grãos foi superior com a inoculação com HM053 sem diferir da inoculação com os isolados L26 e L27. Para o teor de Mg nos grãos, a inoculação com a estirpe HM053 superou a inoculação com a estirpe 4331, não diferindo dos demais tratamentos, e para o teor de Zn nos grãos, a inoculação com HM053 superou a adubação com 160 kg ha⁻¹ N e a inoculação com o isolado L27 e a estirpe 4331, sem diferir dos demais tratamentos.

A absorção de P é contínua até próximo da maturidade fisiológica, constatando-se acentuada translocação de P das partes vegetativas da planta para os grãos em fase de enchimento (FANCELLI, 2010), sendo quase todo o P translocado para as sementes (80 a 90%) (COELHO e FRANÇA, 1995). O baixo teor de P nos grãos, por sua vez, implica em menor teor de fitina, que está associada a sintomas de deficiência nutricional em seres humanos e animais (ARAÚJO e MACHADO, 2006).

Com relação aos anos de cultivo, no caso das interações, 2013/14 superou 2012/13 para todos os tratamentos relacionados à inoculação para os teores de Zn, Mg e P nos grãos. Para o teor de B nos grãos, 2013/14 superou 2012/13 para todos os tratamentos, exceto para o controle, adubação com 30 kg ha⁻¹ N e inoculação do isolado L27. Para o teor de Ca, 2013/14 superou 2012/13 para todos os tratamentos, exceto para adubação com 30 kg ha⁻¹ N e inoculação com a estirpe de *A. brasilense* Ab-V5 e estirpe de *Rhizobium* sp. 8121, que não diferiram estatisticamente para anos de cultivo (Tabela 11).

Tabela 11 - Teores de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, B e Mn em grãos de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com estirpes de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo, no caso das interações. Uniãoeste/Iapar, Pato Branco – PR

TRATAMENTO	N	P		K	Ca		Mg		Cu	Zn		B		Mn
		2012/13	2013/14		2012/13	2013/14	2012/13	2013/14		2012/13	2013/14	2012/13	2013/14	
		-----g kg ⁻¹ -----						-----mg kg ⁻¹ -----						
Controle	10	2,3 aB	2,9 abA	3,1	0,09 aB	0,13 bA	0,8 aB	1,0 abA	1,5	14 aB	22 abA	2,3 aA	2,3 aA	4,0
30 kg ha ⁻¹ N	10	2,1 aB	3,1 abA	2,9	0,09 aA	0,12 bA	0,8 aB	1,1 abA	2,0	12 aB	21 abA	2,0 abA	2,4 aA	4,0
160 kg ha ⁻¹ N	12	2,1 aB	2,7 bA	2,7	0,09 aB	0,12 bA	0,8 aB	1,0 abA	1,6	12 aB	16 cA	1,9 abB	2,7 aA	4,1
Ab-V5*	10	1,9 aB	3,1 abA	3,0	0,09 aA	0,11 bA	0,7 aB	1,1 abA	1,5	12 aB	22 abA	1,8 abB	2,6 aA	3,9
HM053	10	2,3 aB	3,4 aA	3,0	0,08 aB	0,20 aA	0,9 aB	1,2 aA	1,6	13 aB	25 aA	1,6 abB	2,7 aA	4,4
L26	10	2,1 aB	3,0 abA	2,8	0,09 aB	0,15 abA	0,8 aB	1,1 abA	1,4	13 aB	22 abA	1,2 bB	2,5 aA	3,9
L27	10	2,4 aB	3,0 abA	2,8	0,08 aB	0,16 abA	0,9 aB	1,0 abA	1,35	14 aB	21 bcA	1,7 abA	2,2 aA	3,8
4331	10	2,0 aB	2,8 bA	2,6	0,08 aB	0,12 bA	0,8 aB	1,0 bA	1,3	12 aB	19 bcA	1,7 abB	2,5 aA	3,9
8121	10	2,0 aB	3,4 aA	3,0	0,10 aA	0,102 bA	0,7 aB	1,2 abA	1,6	12 aB	23 abA	1,5 abB	2,7 aA	3,9
Média	10	2,1	3,0	2,9	0,09	0,13	0,8	1,1	1,5	13	21	1,8	2,5	4,0
CV (%)	10,78	8,41		10,72	20,32		8,63		28,74	10,97		16,85		14,54

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

Azospirillum brasilense estirpe Ab-V5, *A. brasilense* estirpe HM053, isolados L26, L27, *Enhydrobacter* sp. estirpe 4331 e *Rhizobium* sp. estirpe 8121.

*Todos os tratamentos com inoculação receberam 30 kg ha⁻¹ de N.

Dartora (2012) verificou que o teor de N nos grãos foi influenciado pela inoculação observando-se média superior para a inoculação combinada das estirpes de *A. brasilense* e *H. seropediceae* em relação à inoculação isolada de *A. brasilense*. Para os teores de P e K nos grãos, o autor relata que não foi verificado efeito da inoculação, com valores médios de 2,0 e 15 g kg⁻¹ para P e de K, respectivamente.

Tabela 12 - Teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), zinco (Zn), boro (B) e manganês (Mn) em grãos de milho híbrido (30F53) em função de anos de cultivo. Uniãoeste/Iapar, Pato Branco – PR

ANO	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	B	Mn
	-----g kg ⁻¹ -----				-----mg kg ⁻¹ -----				
2012/2013	10,37	2,14	3,08 a	0,09	0,79	2,32 a	12,8	1,75	3,34 b
2013/2014	10,19	3,04	2,68 b	0,13	1,08	0,73 b	21,2	2,52	4,61 a
Média	10,28	2,59	2,88	0,22	0,94	1,52	17,0	2,14	3,98
CV (%)	9,74	8,41	11,20	20,32	8,63	24,57	10,97	16,85	10,41

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

Durante o enchimento de grãos, o N é mobilizado inicialmente das folhas e colmos, de modo que os fotossintatos produzidos durante essa fase são canalizados primariamente para as sementes em enchimento, sendo o suprimento via raízes limitado. Nessa fase, é importante a manutenção do metabolismo das folhas para garantir adequado enchimento de grãos, pois estas contribuem com a maior parte dos substratos nitrogenados para o enchimento desses órgãos (SOUZA e FERNANDES, 2006). Gava et al. (2010) observaram que a distribuição do N acumulado nas diferentes partes da parte aérea do milho, foi semelhante para todas as doses de N-fertilizante testadas, sendo alocado em média 70% do N total nos grãos e 30% no restante da parte aérea. Resultado semelhante foi obtido por Duete et al. (2008) e Gava et al. (2006), evidenciando que o maior dreno de N na planta localiza-se nos grãos.

Para o teor de K, foi observada média superior (15%) para o ano 2012/13 em relação 2013/14 (Tabela 12). Observa-se que o teor de Cu nos grãos foi três vezes superior em 2012/13 enquanto o teor de Mn foi 38% superior em 2013/14 (Tabela 12). Segundo Fancelli (2010), muitas vantagens do fornecimento de micronutrientes não são observadas na forma de simples aumentos lineares de produtividade, mas na qualidade do produto colhido, no vigor das plantas e na tolerância as doenças e pragas.

4.5 COMPONENTES DA PRODUÇÃO

A análise de variância revelou efeito significativo pelo teste F para diâmetro da espiga em função da inoculação; altura de inserção da espiga, comprimento e diâmetro da espiga e número de grãos por fileira em função de anos de cultivo; e interação entre os fatores inoculação e anos de cultivo, para massa da espiga e produtividade (Tabela 13).

Para o diâmetro da espiga, a adubação com $160 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$ foi superior em 7% à inoculação com o isolado L27, sem diferir dos demais tratamentos (Tabela 14). Dartora (2012) também verificou efeito significativo da inoculação para o diâmetro da espiga, sendo obtidas médias superiores com a inoculação de *H. seropedicae* de forma isolada ou associada à inoculação de *A. brasilense* em relação ao tratamento controle. Mello (2012), por sua vez, avaliando a contribuição da inoculação de *A. brasilense* e doses de N na cultura do milho, relatou que não houve efeito da inoculação com *A. brasilense* sobre o diâmetro da espiga.

Para a altura de inserção da espiga foi observado valor médio de 110,5 cm em função da inoculação das BPCP's (Tabela 14). Outros autores também relatam que a inoculação com *A. brasilense* não influenciou na altura de inserção da espiga de plantas de milho (MARINI, 2012; LANA et al., 2012; BASI, 2013). Entretanto, Muller (2013), avaliando a eficiência da inoculação de produto comercial a base de *A. brasilense*, aplicado no sulco de semeadura e no tratamento de sementes, associada a níveis de adubação nitrogenada e bioestimulante vegetal no milho, verificou que a inoculação, em ambas as formas de aplicação, incrementou a altura de inserção da espiga superando o tratamento controle.

O comprimento da espiga médio obtido em função da inoculação foi de 16,3 cm (Tabela 14). Mello (2012) e Marini (2012) também não verificaram efeito da inoculação sobre o comprimento da espiga. Porém, Dartora (2012) verificou que a inoculação combinada das estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* proporcionou incremento de 5% no comprimento da espiga em relação ao tratamento controle. Soares (2003), avaliando as interações de B e Zn com o N e sua influência no desempenho produtivo do milho, verificou aumento no comprimento da espiga em função de doses crescentes de N, assim como um elevado coeficiente de correlação desta variável com a produtividade de grãos, devido à influência direta no número de grãos por fileira. O comprimento da espiga apresentou forte correlação com a produtividade (0,796) e também com outros componentes da produção, como diâmetro da espiga (0,898), número de grãos por fileira (0,931) e massa da espiga (0,951), para os quais também houve correlação parcial (Tabelas 14 e 15).

Tabela 13 - Altura de inserção da espiga (AI), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras de grãos por espiga (NF), número grãos por fileira (NG), massa da espiga (ME) e produtividade de grãos (PROD) de plantas de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com estirpes de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo, no caso das interações. Uniãoeste/Iapar, Pato Branco – PR

TRATAMENTO	AI	CE	DE	NF	NG	ME		PROD	
	-----cm-----		mm			-----g-----		----kg ha ⁻¹ ----	
Controle	109,2	16,2	49,3 ab	16	31	222 aA	192 abA	5.852 cA	2.556 bcB
30 kg ha ⁻¹ N	115,2	15,9	49,4 ab	16	31	261 aA	176 abB	6.102 bcA	2.840 abcB
160 kg ha ⁻¹ N	113,1	17,3	51,6 a	16	33	261 aA	247 aA	7.199 abcA	4.536 aB
Ab-V5*	110,1	16,4	49,1 ab	16	32	224 aA	207 abA	6.538 abcA	3.229 abcB
HM053	112,3	15,8	49,0 ab	16	30	258 aA	144 bB	7.871 aA	2.364 cB
L26	107,2	16,8	50,0 ab	16	32	254 aA	211 abA	7.718 abA	3.779 abcB
L27	105,7	15,5	48,1 b	16	30	251 aA	144 bB	6.509 abcA	2.556 bcB
4331	111,1	16,8	49,3 ab	16	33	262 aA	205 abB	7.673 abA	3.118 abcB
8121	110,4	16,5	50,1 ab	16	31	237 a A	227 abA	6.403 abcA	4.267 abB
Média	110,5	16,3	49,5	16	31	248	195	6.874	3.249
CV (%)	6,12	7,19	2,94	4,22	9,43	16,61		14,64	

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

Azospirillum brasilense estirpe Ab-V5, *A. brasilense* estirpe HM053, isolados L26, L27, *Enhydrobacter* sp. estirpe 4331 e *Rhizobium* sp. estirpe 8121.

*Todos os tratamentos com inoculação receberam 30 kg ha⁻¹ de N.

Quanto ao número de fileiras de grãos por espiga e número de grãos por fileira as médias obtidas em função da inoculação, foram de 16 e 31, respectivamente (Tabela 13). Para a massa da espiga, observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos relacionados à inoculação das sementes com BPCP's no ano 2012/13. No ano 2013/14, por sua vez, a adubação com 160 kg ha⁻¹ N proporcionou massa da espiga média de 247 g, superando a inoculação com a estirpe HM053 e o isolado L27 (em 72%), sem diferir dos demais tratamentos (Tabela 13). Quanto aos anos de cultivo, verificou-se massa da espiga superior no ano 2012/13 em relação à 2013/14 para os tratamentos com adubação de 30 kg ha⁻¹ N e com a inoculação das estirpes HM053 e 4331 e do isolado L27. Para os demais tratamentos não houve diferença entre os anos de cultivo. Com relação à média anual, em 2012/13 foi obtida massa da espiga de 248 g, enquanto em 2013/14 foi obtida massa de 195 g, ou seja, houve uma redução de 53 g na massa média da espiga de um ano para outro, o que influencia diretamente na produtividade, devido a forte correlação entre essas variáveis (Tabela 14). Dartora (2012) relatou que a inoculação de *H. seropediceae* associada com *A. brasilense* proporcionou incremento de 9% na massa da espiga em relação ao controle. Marini (2012) e Mello (2012), por sua vez, não verificaram efeito da inoculação com *A. brasilense* sobre a massa da espiga.

Para a produtividade de grãos, no ano 2012/13 a inoculação da estirpe de *A. brasilense* HM053 proporcionou 7.871 kg ha⁻¹, superando o tratamento controle e a adubação com 30 kg ha⁻¹ N, sem diferir, no entanto, dos demais tratamentos, inclusive da adubação com 160 kg ha⁻¹ N. No ano 2013/14, a adubação com 160 kg ha⁻¹ N proporcionou produtividade média de 4.536 kg ha⁻¹, superando o tratamento controle e a inoculação das sementes com a estirpe HM053 e com o isolado L27 (Tabela 13). Neste mesmo ano, a estirpe de *Rhizobium* sp. 8121 se destacou com média de produtividade de 4.267 kg ha⁻¹, o que representou um incremento de 1.427 kg ha⁻¹ na produtividade em relação ao uso isolado da adubação nitrogenada de base (30 kg ha⁻¹ N), demonstrando o potencial da estirpe nestas condições de cultivo. Quanto aos anos de cultivo, o ano 2012/13 apresentou resultado superior a 2013/14 para todos os tratamentos referentes à inoculação, com média geral de 6.874 kg ha⁻¹, refletindo uma redução de 3.625 kg ha⁻¹ em relação ao ano seguinte em que foi obtida produtividade média de 3.249 kg ha⁻¹.

A produtividade apresentou forte correlação com dez das catorze variáveis pesquisadas, sendo as mais altas correlações obtidas com a área foliar (0,812), clorofila a (0,845), b (0,882) e total (0,896) e teor de N foliar (0,813). Porém, apenas com a área foliar houve também correlação parcial (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14 - Coeficientes de correlação de Pearson entre produtividade (PROD), altura de planta (ALT), diâmetro basal do colmo (DCO), massa seca da parte aérea (MSPA), área foliar (AF), teor de clorofila a (CLA), teor de clorofila b (CLB), teor de clorofila total (CLT), altura de inserção de espiga (AI), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras de grãos por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), massa da espiga (ME) e teor de nitrogênio foliar (N) de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo. Unioeste/Iapar, Pato Branco – PR

	PROD	ALT	DCO	MSPA	AF	CLA	CLB	CLT	AI	CE	DE	NF	GF	ME	N
PROD	1	0,032	0,722**	0,258*	0,812**	0,845**	0,882**	0,869**	0,413**	0,796**	0,728**	0,355**	0,767**	0,746**	0,813**
ALT		1	0,064	0,459**	0,227	-0,114	-0,154	-0,136	0,154	-0,014	0,046	0,108	0,004	0,015	-0,102
DCO			1	0,372**	0,821**	0,684**	0,708**	0,701**	-0,191	0,538**	0,540**	0,242*	0,587**	0,507**	0,643**
MSPA				1	0,480**	0,247*	0,246*	0,248*	-0,177	0,122	0,157	0,081	0,098	0,172	0,124
AF					1	0,692**	0,723**	0,713**	0,351**	0,614**	0,522**	0,208	0,626**	0,551**	0,654**
CLA						1	0,972**	0,993**	0,376**	0,611**	0,650**	0,368**	0,568**	0,584**	0,885**
CLB							1	0,994**	0,416**	0,652**	0,651**	0,294*	0,635**	0,611**	0,879**
CLT								1,000	0,400**	0,636**	0,655**	0,332**	0,607**	0,602**	0,888**
AI									1	-0,248*	-0,148	-0,007	-0,210	-0,155	-0,272*
CE										1	0,898**	0,370**	0,931**	0,951**	0,616**
DE											1	0,495**	0,814**	0,899**	0,631**
NF												1	0,362**	0,379**	0,244*
GF													1	0,885**	0,592**
ME														1	0,578**
N															1

* Significativo pelo teste t em nível de 5% de probabilidade de erro, n = 72 observações.

Tabela 15 - Coeficientes de correlação parcial entre produtividade (PROD), altura de planta (ALT), diâmetro basal do colmo (DCO), massa seca da parte aérea (MSPA), área foliar (AF), teor de clorofila a (CLA), teor de clorofila b (CLB), teor de clorofila total (CLT), altura de inserção de espiga (AI), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras de grãos por espiga (NF), número de grãos por fileira (GF), massa da espiga (ME) e teor de nitrogênio foliar (N) de milho híbrido (30F53) em função da inoculação das sementes com diferentes estirpes de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e anos de cultivo. Unioeste/Iapar, Pato Branco – PR

	PROD	ALT	DCO	MSPA	AF	CLA	CLB	CLT	AI	CE	DE	NF	GF	ME	N
PROD	1	-0,032	0,722	0,258	0,812*	0,845	0,882	0,869	-0,413	0,796	0,728	0,355	0,767	0,746	0,813
ALT		1	0,064	0,459*	0,227**	-0,114	-0,154	-0,136	0,154	-0,014	0,046	0,108	0,004	0,015	-0,102
DCO			1	0,372	0,821**	0,684	0,708	0,701	-0,191	0,538*	0,534*	0,242	0,587*	0,507	0,643
MSPA				1	0,480*	0,247	0,246	0,248	-0,177	0,122	0,157	0,081	0,098	0,172	0,124
AF					1	0,692	0,723	0,713	-0,351	0,614	0,522	0,208	0,626	0,551	0,654
CLA						1	0,972**	0,993**	-0,376	0,611	0,650	0,368	0,568*	0,584	0,885
CLB							1	0,994**	-0,416	0,652	0,651	0,294	0,635	0,611	0,879
CLT								1	-0,400	0,636	0,655	0,332	0,607*	0,602	0,888
AI									1	-0,248	-0,148	-0,007	-0,210	-0,155	-0,272
CE										1	0,898**	0,370	0,931**	0,951**	0,616
DE											1	0,495	0,814	0,899	0,631
NF												1	0,362	0,379	0,244*
GF													1	0,885	0,592
ME														1	0,578
N															1

* Significativo pelo teste t em nível de 5% de probabilidade de erro, n = 72 observações.

A redução expressiva na produtividade da cultura do milho de um ano para outro reflete a resposta das plantas ao estresse abiótico (rajadas de vento) no início do desenvolvimento. O estado de estresse impõe a manifestação de diversos mecanismos no metabolismo vegetal conforme o grau de severidade do distúrbio. Desta forma, ocorrem mudanças nas atividades enzimáticas, aumentando a disponibilidade de peroxidases, catalases, glutadionas e redutases, o acúmulo de antioxidantes (ácido ascórbico e tocoferol), de substâncias osmoticamente ativas (prolina, glicina-betaína e polióis) e de metabolismo secundário, como os polifenóis e antocianinas (FANCELLI, 2010).

Outras manifestações relacionadas às condições de estresse podem ser representadas pelo aumento da respiração, redução da taxa fotossintética e do acúmulo de matéria seca, distúrbios de crescimento e senescência prematura de tecidos e órgãos vegetais. Dessa forma, o estresse impõe à planta um gasto energético extra, representado pelo custo metabólico despendido da biossíntese de compostos secundários e no desencadeamento das estratégias de adaptação, o qual deveria ser direcionado à produção de biomassa e à manifestação do potencial produtivo (FANCELLI, 2010). No ano 2013/14, no início do estágio reprodutivo da cultura, já era possível observar aspectos de senescência nas plantas de milho no sentido da base para o ápice, o que certamente comprometeu a atividade fotossintética dos tecidos vegetais e, conseqüentemente, reduziu o acúmulo e transferência de fotoassimilados para os grãos, reduzindo a produtividade.

Marini (2012) relatou que, mesmo não havendo diferença significativa para a produtividade com a inoculação de *A. brasilense*, foi observada produtividade média de 7.967 kg ha⁻¹ para o tratamento inoculado, o que representou 259 kg ha⁻¹ em comparação ao tratamento controle. Muller (2013) verificou que a inoculação, tanto nas sementes quanto no sulco de semeadura, superou o tratamento controle quanto à produtividade de grãos, proporcionando incrementos de 432 e 702 kg ha⁻¹, respectivamente.

Os resultados semelhantes entre a inoculação das sementes com as bactérias associativas testadas, associadas à adubação com 30 kg ha⁻¹ N e adubação com 160 kg ha⁻¹ N, em especial, quando foi inoculada a estirpe de *A. brasilense* HM053 em 2012/13 e a estirpe de *Rhizobium* sp. 8121 em 2013/14, refletem o efeito de promoção do crescimento vegetal propiciado por estas bactérias. Estes efeitos podem envolver mecanismos diversos como a produção de fito-hormônios, o controle biológico de fitopatógenos, a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfatos e atuação de enzimas (BASHAN e LEVANONY, 1990; PIDELLO; MENENDEZ; LENSÍ, 1993). Além disso, a inoculação destas BPCP's associadas a menores doses de fertilizantes nitrogenados tem mostrado maior eficiência para o

sistema planta-bactéria quando comparado com o uso isolado da bactéria. Para Bartchechen et al. (2010), a inoculação de produto comercial a base de *A. brasilense* apresentou resultado superior ao tratamento controle com incremento na produtividade do milho de 461 kg ha⁻¹, porém quando foi associada à adubação nitrogenada em cobertura não promoveu incremento de produtividade. Bárbaro et al. (2008) relatam que a aplicação de elevadas doses de N, associada à inoculação pode diminuir a eficiência da inoculação, pois a planta responde ao estímulo da absorção do nutriente, limitando o processo biológico.

Segundo Hartmann (1988), a eficiência da FBN do *Azospirillum* spp. é rapidamente reduzida ou até mesmo inibida na presença de maiores concentrações de compostos nitrogenados no solo, principalmente amônio, o qual provoca a inibição rápida da atividade nitrogenase nas bactérias. Este processo de controle e regulação da atividade do complexo nitrogenase por fatores ambientais moduladores torna-se necessário em função da elevada demanda energética envolvida no processo de redução do nitrogênio atmosférico (N₂) pelos organismos diazotróficos, cerca de 28 mols de ATP por mol de amônio produzido (BALDANI et al., 2009).

Quanto ao fator anos de cultivo, o comprimento de espiga, o diâmetro da espiga e o número de grãos por fileiras de grãos foram 14, 6 e 17% superiores, respectivamente, no ano 2012/13 em relação à 2013/14, porém para altura de inserção da espiga, o ano de 2013/14 foi 7% superior a 2012/13 (Tabela 16).

Tabela 16 - Altura de inserção da espiga (AI), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras de grãos por espiga (NF), número grãos por fileira (NG), massa da espiga (ME) e produtividade de grãos (PROD) de plantas de milho híbrido (30F53) em função de anos de cultivo. Unioeste/Iapar, Pato Branco – PR

ANO	AI	CE	DE	NF	NG	ME	PROD
	-----cm-----		mm			g	kg ha ⁻¹
2012/2013	106,7 b	17,4 a	50,9 a	16	34 a	248	6.874
2013/2014	114,3 a	15,2 b	48,2 b	16	29 b	195	3.249
Média	110,5	16,3	49,5	16	32	221	5.062
CV (%)	5,74	7,98	3,97	4,22	10,63	16,61	11,35

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

Em 2012/13, em geral, as diferenças entre os tratamentos relacionados à inoculação das BPCP's foram menos evidentes e a inoculação da estirpe HM053 mostrou-se bastante promissora, pois proporcionou a mais elevada média de produtividade (7.871 kg ha⁻¹),

associada a apenas 30 kg ha⁻¹ N na semeadura, enquanto a adubação com 160 kg ha⁻¹ N apresentou produtividade média de 7.199 kg ha⁻¹, ou seja, 672 kg ha⁻¹ a menos (Tabela 13). Em 2013/14, em que condições abióticas adversas prejudicaram o desenvolvimento inicial da cultura, foi observada maior variabilidade entre os resultados referentes à inoculação, como já relatado para outras variáveis. A estirpe HM053 e o isolado L27 se destacaram de forma negativa, enquanto a estirpe 8121 proporcionou resultados positivos em relação à produtividade.

A variabilidade das respostas obtidas a partir de experimentos de inoculação em campo pode ser atribuída a uma série de fatores (SIQUEIRA et al., 1999), como a combinação inapropriada das espécies vegetais e estirpes bacterianas ou fatores limitantes externos que afetam a expressão do efeito. Tal imprevisibilidade dos resultados a campo tem limitado o uso comercial dos inoculantes, por isso os estudos relacionados à seleção de estirpes apropriadas e à correção dos fatores edáficos limitantes à associação, não apenas para a variedade da espécie vegetal pesquisada, mas também para condições climáticas e edáficas específicas é importante (SIQUEIRA et al., 1994).

Os resultados deste estudo demonstram que, sob diferentes condições bióticas e abióticas, embora sobre a mesma área de cultivo, as bactérias associativas com potencial de promoção de crescimento vegetal testadas se comportaram de forma diferenciada. Neste sentido, mais ensaios relacionados ao comportamento e seleção de estirpes em condições edafoclimáticas distintas devem ser realizados para consolidar os resultados promissores que algumas bactérias apresentaram neste estudo e a possibilidade de aliar estirpes eficientes no mesmo inoculante, o que constitui alternativa viável visando potencializar os benefícios da inoculação em milho. Estudos complementares que contemplem fatores relacionados à colonização bacteriana, como a sobrevivência das bactérias após semeadura, a colonização das raízes e a população bacteriana na planta e no solo podem auxiliar no sentido de elucidar melhor os efeitos refletidos no desenvolvimento e produtividade das plantas inoculadas.

5 CONCLUSÕES

Existe influência das condições edafoclimáticas incidentes em cada ano de cultivo no desempenho das estirpes de bactérias promotoras de crescimento vegetal avaliadas. A estirpe de *A. brasilense* HM053 apresenta elevado potencial de promoção de crescimento sob condições favoráveis ao desenvolvimento da cultura do milho, enquanto a estirpe de *Rhizobium* sp. 8121 mostra-se promissora mesmo quando o metabolismo vegetal for afetado por estresse de natureza abiótica, ambas proporcionando produtividade similar à adubação com 160 kg ha⁻¹ N.

A adubação na semeadura e em cobertura com N (160 kg ha⁻¹), em comparação à inoculação das sementes de milho com BPCP associada à adubação nitrogenada na semeadura (30 kg ha⁻¹), promove maior desempenho produtivo do milho em condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento e maior incremento no teor foliar de N e de clorofila.

Os teores foliares de macro e micronutrientes das plantas de milho não são afetados pela inoculação das sementes com BPCP's. Porém, os teores de P, Ca, Mg e Zn nos grãos são influenciados de forma positiva pela inoculação da estirpe de *A. brasilense* HM053.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROSUSTENTÁVEL. **Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)**. Disponível em: <<http://www.agrosustentavel.com.br/downloads/fbn.pdf>>. Acesso em: 5 fev. 2014.
- ALBUQUERQUE, A.W.; SANTOS, J. R.; FILHO, G. M.; REIS, L.S. Plantas de cobertura e adubação nitrogenada na produção de milho em sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v.17, n.7, p. 721-726, 2013.
- ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho**. 2007. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- ARAÚJO, S. C. Realidade e perspectivas para o uso de *Azospirillum* na cultura do milho. **Informações Agronômicas**, p. 1-3, jun. 2008.
- ARAÚJO, A. P.; MACHADO, C. T. de T. **Fósforo**. In: EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Nutrição mineral de plantas: Princípios e perspectivas. Londrina, PR, Editora Planta, 2006. cap. 10, p. 253-280.
- ARAÚJO, F. F. de; FOLONI, J. S. S.; WUTZKE, M.; MELEGARI, A. da S.; RACK, E. Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. **Semina**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1043-1054, maio/jun. 2013.
- ARGENTA, G.; SILVA, P. R.F.; BORTOLINI, C. G.; FORSTHOFER, E. L.; MANJABOSCO, E. A.; NETO, V. V. Resposta de híbridos simples de milho à redução do espaçamento entre linhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, DF, v. 36, n.1, p. 71-78, 2001.
- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. .F.; FOSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L.; SUHRE, E.; TEICHMANN, L. L. Adubação nitrogenada em milho pelo monitoramento do nível de nitrogênio na planta por meio do clorofilômetro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. p.109-119, 2003.

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

AZIZ, A., MARTIN-TANGUY, J.; LARHER, F. Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. **Plant Growth Regulation**. v. 21, p. 153–163, 1997.

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

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M. A. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 90, p. 35-46, 1986.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F. L.; HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; NOGUEIRA, E. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDOTTO, L. E. B.; SOARES, L. H. B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V. L. D.; CARVALHO, T. L. G.; ALVES, B. J. R.; JAMES, E. K.; JANTALIA, C. P.; FERREIRA, P. C. G.; VIDAL, M. S.; BODDEY, R. M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família *Poaceae* (Antiga *Gramineae*). In: RIBEIRO, M.R.; NASCIMENTO, C. W.; RIBEIRO FILHO, M. R. & CANTALICE, J. R. B. (Eds.) **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira Ciência do Solo, 2009. p. 203-271.

BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; H. M., DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, p. 627-639, 1997.

BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1265-1276, 1999.

BÁRBARO, I. M.; BRANCALIÃO, S. R.; TICELLI, M. É possível a fixação biológica de nitrogênio no milho? **Pesquisa e Tecnologia**. São Paulo, SP, v. 5, n. 1, p. 1-8, jan/jun. 2008.

BARBOSA, J. Z.; CONSALTER, R.; VARGAS MOTTA, A. C. Fixação biológica de nitrogênio em *Poaceae*. **Evidência**, Joaçaba, SC, v. 12, n. 1, p. 7-18, 2012.

BARTCHECHEN, A.; FIORI, C. C. L.; WATANABE, S. H.; GUARIDO, R. C. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L). **Campo Digital**, Campo Mourão, PR, v.5, n.1, p. 56-59, dez., 2010.

BASHAN, Y. Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux in intact wheat roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 419-425, 1990.

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

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729-770, 1998.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment 2010. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.

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

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 591-698, 1990.

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

BASHAN, Y.; MITIKU, G. Estimation of minimal numbers of *Azospirillum brasilense* using time-limited liquid enrichment combined with enzyme-linked immunosorbent assay. **Soil Biology e Biochemistry**. v. 23, n. 2, p. 135-138, 1991.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H.; WHITMOYER, R. E. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. **Journal of General Microbiology**. v. 137, p. 187-196. 1991.

BASHAN, Y.; ALCARAZ-MELENDEZ, L.; TOLEDO, G. Responses of soybean and cowpea root membranes to inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Symbiosis**, v. 13, p. 217-228, 1992.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*–plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521–577, 2004.

BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J. J.; LEYVA, L. A.; HERNANDEZ, J.-P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, p. 279–285, 2006.

BASI, S. **Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho**. 2013. 63 p. (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

BASSO, C. J.; CERETTA, C. A. Manejo do nitrogênio no milho em sucessão a plantas de cobertura de solo, sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 905-915, 2000.

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

BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, v. 108, p. 53-65, 1988.

BODDEY, R. M.; GILLER, K. E.; CADISCH, G.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Contribution of biological nitrogen fixation to tropical agriculture: actual and potential. **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**. v. 31, p. 599-604, 1998.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 1-7, 2001.

BORÉM, Aluísio (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 2005. 969 p.

BORTOLINI, C. G.; SILVA, P. R. F.; ARGENTA, G. Sistemas consorciados de aveia preta e ervilhaca comum como cobertura de solo e seus efeitos na cultura do milho em sucessão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, p. 897-903, 2000.

BOTTINI, R.; CASSAN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 65, p. 497–503, 2004.

BRACCINI, A. L., DAN, L. G. M., PICCININ, G. G., ALBRECHT, L. P., BARBOSA, M. C. & ORTIZ, A. H. T. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 58-64, 2012.

BROCH D. L.; RANNO, S. K. Fertilidade do Solo, Adubação e Nutrição da Cultura do Milho. **Tecnologia e Produção: Soja e Milho 2011/2012**. cap. 12. p. 240-252, 2012.

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

BURR, T. J.; CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-20, 1985.

CAMPOS, B. C. de; THEISEN, S.; GNATTA, V. Inoculante “Graminante” na cultura de milho. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 713-715, 2000.

CAMPOS, D. V. B. de; RESENDE, A. S.; ALVEZ, B. J.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sob inundação. **Agronomia**, v. 37, n.2, p. 41-46, 2003.

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

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. dos S. (Eds.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. p. 79-96.

CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V.P. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F. D.; SALOMONE, I. G. de. (Eds.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.

CASSÁN F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2009a.

CASSAN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, V.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**. v. 45, p. 12–19, 2009b.

CHEIKH, N.; JONES, R. J. 1994. Disruption of maize kernel growth and development by heat stress. Role of cytokinin/ abscisic acid balance. **Plant Physiology**, v. 106, p. 45-51.

- CIGANDA, V.; GITELSON, A.; SCHEPERS, J. Non-destructive determination of maize leaf and canopy chlorophyll content. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 157-167, mar. 2009.
- COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. Nutrição e Adubação. **Arquivo do Agrônomo**. Piracicaba, SP, v. 2, p.1-25, 1995.
- CONRAD, V. A.; SERRA, A. P.; MARCHETTI, M. E.; MORAIS, H. S. Interferência de diferentes doses de inoculante sobre a altura e teor de fósforo e potássio no milho no estágio V4. In: ENEPE, Encontro de Ensino Pesquisa e Extensão, 2013, Dourados. **Anais...** Dourados: 2013. p. 1-12.
- COHEN, A. C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, v. 54, p. 97–103, 2008.
- CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 15 jan. 2015.
- CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; CONCEIÇÃO, P. S. da. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 39, n. 6, Set. 2009.
- COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 21, p. 1–18. 1995.
- COSTACURTA, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. **Molecular and General Genetics**. v. 243, p. 463–472, 1994.
- CRUZ, J. C.; FILHO, I. A. P.; ALVARENGA, R. C.; NETO, M.M. G.; VIANA, J. H. M.; OLIVEIRA, M. F. de; SANTANA, D. P. **Manejo da cultura do Milho**, Circular Técnica 87, Sete Lagoas, MG, dez. 2006.
- CRUZ, S. C. S.; PEREIRA, F. R. DA S.; SANTOS, J. R.; ALBUQUERQUE, A. W. DE; PEREIRA, R. G. Adubação nitrogenada para o milho cultivado em sistema plantio direto, no Estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, p. 62-68, 2008.

DARTORA, J. **Desempenho agrônômico do milho em resposta à inoculação combinada com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* associação à adubação nitrogenada**. 2012. 62 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2012.

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

DAS, A. C.; SAHA, D. Influence of diazotrophic inoculations on nitrogen nutrition of rice. **Australian Journal of Soil Research**. v. 41, n. 8, p. 1543-1554, 2003.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Micronutrientes. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. cap. 13, p. 327-354.

DIAS, J. S. Nutrientes, do que as plantas precisam? **Universal Fertilizantes S.A.** Canoas, RS, p. 1-10, 2012.

DE-BASHAN, L. E.; HOLGUIN, G.; GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propositos agricolas y ambientales. In: FERRERA-CERRATO, R.; ALARCON, A. (Eds.). **Microbiologia agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biologico, planta-microorganismo**. México: Editorial Trillas, 2007. cap. 8, p. 170-224.

DEL GALLO, M.; HAEGI, A. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **Symbiosis**, v. 9, p. 155-161. 1990.

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

DIDONET, A. D.; MAGALHÃES, A. C. The role of auxin-like compounds in plant growth promoting rhizobacteria: the wheat-*Azospirillum* association. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 179-183, 1993.

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

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 173-179.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biologia*, v. 1, p. 261- 272, 1958.

DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Alternatives for nitrogen nutrition of crops in tropical agriculture. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 42, p. 339-346, 1995.

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

DUARTE, A. P.; SAWASAKI, E.; PATERNIANI, M. E. A., G., Z.; GALLO, P., B. **Milho: Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. IAC: Campinas. (Boletim, IAC, 200, 2014).

DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C.; TRIVELIN, P. L. O. & AMBROSANO, E. J. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (15N) pelo milho em Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 161- 171, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. 204 p.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Livro: Nutrição mineral de plantas: Princípios e perspectivas. **Editores Planta**, Londrina, PR, 2006.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; CLARK, R. B. Physiology of crop production. **Food Products Press**. 345 p. 2006.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA. Nota de Aplicação CFL1030: Parâmetros de ICF na cultura do milho, **Revista A**, n. 4, p. 1-3, set. 2009.

FALLIK, E.; OKON, Y.; EPSTEIN, E.; GOLDMAN, A.; FISCHER, M. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, p. 147–153, 1989.

FALKER 2014. **Medidor eletrônico de teor de clorofila** – ClorofiLog. Disponível em: <file:///C:/Users/Jana/Downloads/CAT_CFL1030_COMP_0706%20(2).pdf>. Acesso em: 12 nov. 2014

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

FANCELLI, A. L. **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes na cultura do milho**. International Plant Nutrition Institute, p.1-16, set. 2010.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Ecofisiologia e fenologia. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, p. 21-54, 2000.

FAVARIN, J. L.; TEZOTTO, T.; RAGASSI, C. F. Uso racional de micronutrientes na cultura de milho. **Informações Agronômicas**, p.6-8, jun, 2008.

FEIDEN, A. **Conceitos e Princípios para o Manejo Ecológico do Solo**. Seropédica: Embrapa *Agrobiologia*, 2001. 21 p. (Embrapa *Agrobiologia*. Documentos, 140).

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. M.; RODRIGUES, L. S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1509-1517. 2001.

FERREIRA, M. C. B.; FERNANDES, M. S.; DÖBEREINER, J. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4, p. 47–53, 1987.

FERREIRA, A. de O.; SÁ, J. C. de M.; BRIEDIS, C.; FIGUEIREDO, A. G. de. Desempenho de genótipos de milho cultivados com diferentes quantidades de palha de aveia-preta e doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 2, p.173-179, fev. 2009.

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

FREITAS, S. dos S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. p.1-20. In: SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. dos S. (Eds.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.

FURBANK, R. T.; TAYLOR, W. C. Regulation of photosynthesis in C3 and C4 plants: a molecular approach. **The Plant Cell**, v. 7, p. 797-807, 1995.

GAMARNIK, A.; FRYDMAN, R. Cadaverine an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds. **Plant Physiology**, v. 97, p. 778–785, 1991.

GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; HEINRICHS, R.; SILVA, M. A. Balanço do nitrogênio da uréia (15N) no sistema solo-planta na implantação da semeadura direta na cultura do milho. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 65, n. 3, p. 477-486, 2006.

GAVA, G. J. de C. ; OLIVEIRA, M. W. de; SILVA, M. de A.; JERÔNIMO, E. M.; CRUZ, J. C. S.; TRIVELIN, P. C. O. Produção de fitomassa e acúmulo de nitrogênio em milho cultivado com diferentes doses de 15N-uréia. **Semina**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 851-862, out./dez. 2010.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D. M. **Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria**. Imperial College Press, London, UK. 1999.

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

HAHN, L. **Promoção de crescimento de plantas gramíneas e leguminosas inoculadas com rizóbios e bactérias associativas**. 2013. 171 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 343-357, 2004.

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

HUERGO, L. F MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; SALOMONE, I. G. de. (Eds.) *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 17-35.

HUNGRIA, Mariangela. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, v.325, 36 p., 2011.

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

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

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

JAMES, E. K; GVANESHWAR, P ; MATHAN, N ; BARRAGUIO, W. L; REDDY, P. M; JANNETTA, P. M. P; OLIVARES, F. L; LADHA, J. K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropodicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 9, p. 894-906, 2002.

JIMÉNEZ-SALGADO, T; FUENTES-RAMÍREZ, L. E; TAPIA-HERNÁNDEZ, A; MASCARÚA-ESPARZA, M. A; MARTÍNEZ-ROMERO, E; CABALLERO-MELLADO. J. *Coffea arabica* L.: a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of the

nitrogenfixing-acetobacteria. **Applied of Environmental of Microbiology**, v. 63, p. 3676-3683, 1997.

JORDÃO, L. T.; LIMA, F. F.; LIMA, R. S.; MORETTI, P. A.E.; PEREIRA, H. V.; MUNIZ, A. S.; OLIVEIRA, M. C. N. Teor Relativo de Clorofila em Folhas de Milho Inoculado com *Azospirillum brasilense* sob Diferentes Doses de Nitrogênio e Manejo com Braquiária. In: FertBio, 2010, Guarapari. **Anais...** Guarapari: 2010. p. 1-5.

KARPATI, E; KISS, P; AFSHARIAN, M; MARINI, F; BUGLIONI, S; FENDRIK, L; DEL GALLO, M. Molecular studies of the interaction of *Azospirillum lipoferum* with wheat germ agglutinin. **NATO ASI Ser. Ser.** v.37, p.213-221, 1995.

KASAMO, K; SAKAKIBARA, Y. The plasma membrane H⁺-ATPase from higher plants: functional reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids. **Plant Science**, v.111, p.117-131, 1995.

KENNEDY, I.R; PEREG-GERK, L.L; WOOD, C; DEAKER, R; GILCHRST, K; KATUPITIYA, S. Biological nitrogen fixation in nonlegumes field crops: facilitating the evolution of in effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, v.194, p.65-79, 1997.

KLOEPPER, J. W; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. **International Conference Plant Pahogenic Bacteira**, Angus, v.2. p.879-882, 1978.

LANA, M. DO C; DARTORA, J; MARINI, D; HANN, J. E. H. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v.59, p.399-405, 2012.

LANGE, A., MOREIRA, F.M.A. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.535-543, 2002.

LEITE, U.T; AQUINO, B. F. de; ROCHA, R. N. C; SILVA, J. da. Níveis críticos foliares de boro, cobre, manganês e zinco em milho. **Bioscience Journal**. Uberlândia, MG, v. 19, n. 2, p. 115-125, mai/ago. 2003.

LIU, K.; FU, H.; BEI, Q.; LUAN, S. Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. **Plant Physiol.** v. 124, p. 1315–1325, 2000.

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

LOPEZ-DE-VICTORIA, G; LOVELL, C. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. **Applied and Environmental Microbiology** v.40, p.705-711, 1993.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da Produção de Milho**. Circular Técnica Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, p. 3-10, 2006.

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

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

MALHOTRA, M; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.73–80, 2009.

MARCHAL, K; VANDERLEYDEN, J. The “oxygen paradox” of dinitrogen-fixing bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.363–373, 2000.

MARIN, V. A; BALDANI, V. L. D; TEIXEIRA, K. R. dos S; BALDANI, J. I. **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/598661/1/doc091.pdf>> Acesso em 20 set. 2013.

MARINI, D. **Resposta de híbridos de milho à associação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada**. 2012. 60 p. (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2012.

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

MASUDA, Y. Auxin-induced cell elongation and cell wall changes. **Botanical Magazine**. Tokyo, v.103, p.345-370, 1990.

MEHNAZ, S; WESELOWSKI, B; LAZAROVITS, G; *Azospirillum zea* diazotrophic bacteria isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2805-2809, 2007.

MEHNAZ, S; KOWALIK, T; REYNOLDS, B; LAZAROVITS. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 1848-1856, 2010.

MELLO, N. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho e trigo**. p.98. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2012.

MEURER, E. J. Potássio. In: EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Nutrição mineral de plantas: Princípios e perspectivas. Londrina, PR, **Editora Planta**, cap. 11, p. 281-298, 2006.

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

MOHR, H. & SCHOPFER, P. Plant Physiology. **Editora Springer**, p.629, 1995.

MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. **Editora UFPA**, Lavras, Brasil, v.2, p.729, 2006.

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

MÜLLER, T. M. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* associada a níveis crescentes de adubação nitrogenada e o uso de bioestimulante vegetal na cultura do milho**. p.98. 2013.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, 2013.

NERONI, R. F; CARDOSO, E. J. B. N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**, v.64, p.303-304, 2007.

NIEMI, K; HAGGMAN, H; SARJALA, T. Effects of exogenous diamines on the interaction between ectomycorrhizal fungi and adventitious root formation in Scots pine in vitro. **Tree Physiology**, v.22, p.373–381, 2001.

OLIVARES, F.L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana de açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. Seropédica, 1997. 344p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

OLIVEIRA A. L. M; URQUIAGA, S; DÖBEREINER, J; BALDANI, J. I. The effect inoculating endophytic N₂ fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.

OKON, Y; LABANDERA-GONZALEZ, C. Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field incubation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, 1994.

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

PATTEN, C. L; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Vancouver, v. 42, n. 3, p. 207-220, mar. 1996.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JÚNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. de M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

PEISKER, M; HENDERSON, S. A. Carbon: terrestrial plants. **Plant, Cell Environment**, v. 15, p. 987-1004, 1992.

PEIXOTO, C. de M. O milho: **O Rei dos cereais**: da sua descoberta há 8.000 anos até as plantas transgênicas. Disponível em: <<http://www.seednews.inf.br/portugues/seed62/milho62.shtml>>. Acesso em 3 de fevereiro 2014.

PENOT, T; BERGES, N; OUINGUENE, C; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays*) in France, using biochemical tests and plasmid profiles. **Canadian Journal Microbiology**, v.39, p.798-803, 1992.

PERES, A. R. **Co-inoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* em feijoeiro cultivado sob duas lâminas de irrigação: produção e qualidade fisiológica de sementes**. 2014. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2014.

PERRIG, D; BOIERO, M. L; MASCIARELLI, O. A; PENNA, C; RUIZ, O. A; CASSAN, F. D; LUNA, M. V. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 1143-1150, 2007.

PICCININ, G. G., BRACCINI, A. L., DAN, L. G. M., SCAPIM, C. A., RICCI, T. T. & BAZO, G. L. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 393-397, 2013.

PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Seropédica: EDUR, p.150, 1998.

PIDELLO, A; MENENDEZ, L; LENSI, R. *Azospirillum* affects Eh and potential denitrification in a soil. **Plant and Soil**, v. 157, p. 31-34, 1993.

POTAFOS, INSTITUTO DA POTASSA & FOSFATO. **Manual internacional de fertilidade do solo**. Piracicaba, 177.p, 1998.

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

QUADROS, P. D; ROESCH, L. F. W; SILVA, P. R. F; VIEIRA, V. M; ROEHR, D. D; CAMARGO, F. A. O. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209-218, 2014.

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

RAMOS, A. S; SANTOS, T. M. C. dos; SANTANA, T. M. de; GUEDES, É. L. F; MONTALDO, Y. C. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Verde**, Mossoró, RN, v. 5, n. 4, p. 113-117, out./dez. 2010.

RANGEL-LUCIO, J. A; RODRÍGUEZ-MENDOZA, M. de las N; FERRERA-CERRATO, R; CASTELLANOS-RAMOS, J. Z; RAMÍREZ-GAMA, R. M; ALVARADO-BÁRCENAS, E. Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz. **Agronomía Mesoamericana**, v. 22, n. 2, p. 269-279, 2011.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. Editora Guanabara Koogan, 728p, 1996.

REIS, V. M. Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. **Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia**, v. 232, 22 p., 2007.

REIS, V. M; TEIXEIRA, A. K. R. dos S. Fixação biológica de nitrogênio – Estado da arte. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de. *Processos biológicos no sistema solo-planta*. Brasília, DF: **Embrapa Agrobiologia**, 2005.

RIBAUDO, C. M.; KRUMPHOLZ, E. M.; CASSAN, F. D.; BOTTINI, R.; CANTORE, L.; CURA, A. *Azospirillum* sp. Promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 175-185, 2006.

RICHARDS, D. E; KING, K. E; AIT-ALI, T; HARBERD, N. P. How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 67–88, 2001.

RODRIGUES, M. A; COUTINHO, J. F. Eficiência de utilização do azoto pelas plantas. **Edição: Instituto Politécnico de Bragança** · Bragança · Portugal, 2000.

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

RODRIGUEZ, H; GONZALEZ, T; GOIRE, I; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552–555, 2004.

ROSENBLUETH, M; MARTÍNEZ-ROMERO, E. bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

RYAN, K. G; FRANKS, A; RYAN, D. J; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Lett**, v. 278 p. 1-9, 2008.

SÁ, J. C. M. **Manejo do nitrogênio na cultura do milho no sistema plantio direto**. Passo Fundo, Aldeia Norte, 24.p, 1996.

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

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

SAMPAIO, A. A; SILVA, A. F; AGUIAR, C. A. C; GAVA, C. A. T; NOGUEIRA, M. A; HUNGRIA, M; MARTINS, L. M. V; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Desenvolvimento vegetativo de genótipos superprecoces de milho inoculados com *Azospirillum brasilense* em solos do semiárido. In: Fertbio, 2012, Maceió. **Anais...** Maceió: 2012. p. 1-3.

SANTOS, J. Q. **Fertilização - Fundamentos da Utilização dos Adubos e Correctivos**. Publicações Europa-América, Mem Martins, 442 p. 1991.

SANTOS, M. M; GALVÃO, J. C. C; SILVA, I. R; MIRANDA, G. V; FINGER, F. L. Épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em plantio direto, e alocação do

nitrogênio (^{15}N) na planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1185-1194, 2010.

SCHULTZ, N; MORAIS, R.F. de; SILVA, J. A. da; BAPTISTA R. B; R. P. OLIVEIRA; LEITE, J. M; PEREIRA, W; JÚNIOR, J. de B. C; ALVES, B. J. R; BALDANI, J. I; BODDEY, R. M; URQUIAGA, S; REIS, V. M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.47, n.2, p.261-268, 2012.

SEVILLA, M; BURRIS, R. H; GUNAPALA, N; KENNEDY, N. C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif- mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 358-366, 2001.

SILVA, F. C. (Ed, técnico). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed - Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, 627 p. 2009.

SINCLAIR, T. R; HORIE, T. Crop physiology & metabolism. Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: A Review. **Crop Science**, v. 29, p. 90-98, 1989.

SILVESTREIN, F. **Dinâmica de boro no solo e planta e sua influência na cultura do milho em dois latossolos de textura média**. p.39. 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia Química e Biologia do Solo e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2011.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M.; GRISI, B.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. **Microrganismos e Processos Biológicos do Solo: Perspectiva Ambiental**. Embrapa. Brasília, DF, p.1-142, 1994.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J. G. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas** – (Eds.).Viçosa: SBCS. Lavras: UFLA/DCS, 1999. 818p.

SOARES, M.A. **Influência de nitrogênio, zinco e boro e de suas respectivas interações no desempenho da cultura de milho (*Zea mays* L)**. 2003. p. 112. (Mestrado em Agronomia Fitotecnia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2003.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, p. 205-240, 2004.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: Princípios e perspectivas**. Londrina, PR, Editora Planta, 2006. cap. 9, p. 215-252.

SPAEPEN, S; VANDERLEYDEN, J; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism–plant signaling. **Fems Microbiology Reviews**, v.31, p. 425–448, 2007.

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.

STRZELCZYK, E; KAMPERT, M; LI, C. Y. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v. 149, p. 55–60, 1994.

SUKIMAN, H. I.; NEW, P. Relationship between root colonization and initial adsorption of *Azospirillum* to plant roots. **Microbial Ecology**, v. 20, p. 65-74, 1990.

SUMAN, A; SHRIVASTAVA, A. K; GAUR, A; SINGH, P; SINGH, J; YADAV, R.L. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. **Plant Growth Regulation**, v.54, p.1-11, 2008.

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

THULER, D. S; FLOH, E. I. S; HANDRO, W; BARBOSA, H. R. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp in chemically defined media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 174–178, 2003.

TIEN, T. M; GASKINS, M. H; HUBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1016–102, 1979.

URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. **Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produtividade dos sistemas agrícolas na América Latina.** Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap7ID-1aDona7p8o.pdf>> Acesso em 23 novembro 2013.

USDA, **Unites States Department of Agriculture.** Disponível em: <http://www.usda.gov/oce/forum/>. Acesso em: 15 jan. 2015.

VARGAS, V. P. **Manejo da adubação nitrogenada na recuperação de estresses em milho.** Dissertação Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC Mestre em Ciência do Solo LAGES-SC 2010.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v. 255, p. 571-586, 2003.

VITTI, G. C.; LIMA, E.; CICARONE, F. Cálcio, magnésio e enxofre. In: EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: Princípios e perspectivas.** Londrina, PR, Editora Planta, 2006. cap. 12, p. 299-325.

WEBER, O. B; BALDANI, V. L. D; TEIXEIRA, K. R. S; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v. 210, p. 103-113, 1999.

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

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

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

YAMADA, T. Manejo do nitrogênio na cultura do milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. (Coord.). **Tecnologia da produção de milho**. Piracicaba: ESALQ, 1997. p. 121-130.

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

YAMADA, T; STIPP e ABDALLA, S. R. Estratégias de manejo para alta produtividade do milho. **Informações Agronômicas**. n. 113 mar. 2006.

ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, v. 21, p. 569-576, 2001.

ZAPPELINI, L. O; GUIRAU, E. P; **Inoculação expandida**. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/site/revistas/cultura/GC_2012_Agosto.pdf> Acesso em: 11 jul. 2014.