

TÂMARA PRADO DE MORAIS

**ADUBAÇÃO NITROGENADA E INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasiliense* EM
HÍBRIDOS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Césio Humberto de Brito

Co-orientador

Prof. Dr. Adão de Siqueira Ferreira

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

TÂMARA PRADO DE MORAIS

**ADUBAÇÃO NITROGENADA E INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasiliense* EM
HÍBRIDOS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 27 de Fevereiro de 2012.

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

UFU

Prof. Dr. Carlos Juliano Brant Albuquerque

EPAMIG

Profa. Dra. Angélica Araújo Queiroz

IFTM

Prof. Dr. Césio Humberto de Brito
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M827a Morais, Tâmara Prado de, 1986-
2012 Adubação nitrogenada e inoculação com azospirillum brasileiro em híbridos de milho / Tâmara Prado de Morais. -- 2012.
82 f. : il.

Orientador: Césio Humberto de Brito.
Co-orientador: Adão de Siqueira Ferreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Teses. 2. Milho - Adubação - Teses. I. Brito, Césio Humberto de. II. Ferreira, Adão de Siqueira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

À comunidade científica,
Ofereço.

Aos meus pais,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, bênçãos e todas as oportunidades concedidas;

À Universidade Federal de Uberlândia pela infraestrutura disponibilizada;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao corpo docente do Instituto de Ciências Agrárias pelos ensinamentos, paciência e disposição em responder as minhas dúvidas nas salas de aula ou nos corredores;

Aos professores Dr. Césio Humberto de Brito e Dr. Adão de Siqueira Ferreira pela confiança e apoio ao decorrer do meu mestrado e pelas sugestões que, certamente, contribuíram para lapidar este trabalho e enriquecer meu conhecimento;

À Profa. Dra. Denise Garcia de Santana pelas aulas de estatística e por estar sempre à disposição para discussões, conselhos ou mesmo eventuais conversas informais;

À empresa Syngenta Seeds pela implantação e condução do projeto de campo;

Aos alunos do curso de graduação em Agronomia da UFU pela colaboração nas análises;

Aos técnicos e estagiários dos laboratórios de Pedologia e de Análises de Solos pela ajuda e ensinamentos;

Aos colegas da pós-graduação pelos momentos de humor e profundas reflexões científicas;

A todos os amigos pelo divertido convívio e consideração;

Aos meus pais que, acreditando na nobreza do conhecimento, sempre me incentivaram a estudar. Agradeço pela base e cuidados para a minha formação, por todo seu afeto e incondicional confiança. Às minhas irmãs pela amizade e constante apoio. Ao meu sobrinho, Owen, que mesmo não entendendo o que acontece ao seu redor alegra nossas vidas;

Meu sincero agradecimento ao meu esposo pelo companheirismo, ajuda e pelos momentos de alegrias;

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a conclusão desta importante etapa em minha vida.

Muito Obrigada!

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O Elemento Nitrogênio	3
2.2 Aspectos Gerais da Cultura do Milho	6
2.3 Gênero <i>Azospirillum</i>	8
2.4 Associação <i>Azospirillum</i> -Plantas	10
2.5 Potencial de Inoculação com <i>Azospirillum</i> em Milho.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Descrição dos Ensaios.....	16
3.1.1 Ensaio de campo	16
3.1.2 Ensaio de casa de vegetação	19
3.1.3 Ensaio residual	21
3.2 Inoculação das Sementes.....	21
3.3 Variáveis Analisadas	22
3.3.1 Ensaio de campo	22
3.3.1.1 Produtividade de grãos de milho	22
3.3.2 Ensaio de casa de vegetação	22
3.3.2.1 Altura, diâmetro do colmo e teor de clorofila das plantas de milho.....	22
3.3.2.2 Massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e volume de raízes.....	23
3.3.2.3 Teores de nitrogênio e de fósforo e atividade enzimática.....	23
3.3.4 Análise Estatística	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Ensaio de Campo.....	25
4.1.1 Efeito da inoculação com <i>Azospirillum</i> sobre o rendimento de grãos de milho.....	25
4.1.2 Efeito da adubação nitrogenada sobre a produtividade do milho	28
4.2 Ensaio de Casa de Vegetação	32
4.2.1 Desenvolvimento das plantas de milho.....	32

4.2.2 Características relacionadas ao rendimento	37
4.2.3 Atividade enzimática.....	39
4.2.4 Relação massa seca de parte aérea/massa seca de raiz	41
4.3 Ensaio Residual.....	43
5. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resultado da análise do solo – Iraí de Minas-MG.....	17
TABELA 2. Propriedades químicas e físicas do solo – Uberlândia-MG.....	20
TABELA 3. Resumo das análises de variância dos dados de produtividade obtidos nos ensaios de alta e baixa tecnologia conduzidos a campo em Iraí de Minas.....	27
TABELA 4. Desempenho produtivo de híbridos de milho, cultivados com baixa tecnologia, em função da adubação nitrogenada.....	29
TABELA 5. Resumo da análise conjunta dos dados de produtividade obtidos nos ensaios de alta e baixa tecnologia conduzidos a campo em Iraí de Minas.....	31
TABELA 6. Medidas de altura, diâmetro de colmo, acúmulo de massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e volume de raízes de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função de doses de nitrogênio.....	32
TABELA 7. Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função de doses de nitrogênio.....	38
TABELA 8. Atividades das enzimas urease ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$) e fosfatase ($\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$) em solo cultivado com milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função de doses de nitrogênio.....	39
TABELA 9. Relação massa seca de parte aérea/massa seca de raiz de plantas de milho em função de doses de nitrogênio e da inoculação com <i>Azospirillum</i>	41
TABELA 10. Medidas de altura, diâmetro de colmo, acúmulo de massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e volume de raízes de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de doses de nitrogênio.....	43
TABELA 11. Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de doses de nitrogênio.....	44
TABELA 12. Atividades das enzimas urease ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$) e fosfatase ($\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$) em solo cultivado com milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de nitrogênio e de <i>Azospirillum</i>	45

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. O ciclo do nitrogênio.....	3
FIGURA 2. Esquema da associação planta- <i>Azospirillum</i> na promoção do crescimento vegetal.....	13
FIGURA 3. Valores de precipitação pluviométrica, temperaturas mínima e máxima, durante o período de 17 de novembro de 2009 a 19 de maio de 2010, no município de Iraí de Minas, MG.....	17
FIGURA 4. Esquema da área experimental dos ensaios de campo.....	18
FIGURA 5. Desempenho produtivo de híbridos de milho, cultivados com baixa tecnologia, em função da inoculação com <i>Azospirillum brasiliense</i>	25
FIGURA 6. Desempenho produtivo de híbridos de milho, cultivados com alta tecnologia, em função da inoculação com <i>Azospirillum brasiliense</i>	26
FIGURA 7. Desempenho produtivo de híbridos de milho, cultivados com alta tecnologia, em função da adubação nitrogenada.....	28
FIGURA 8. Produtividade do milho em função da aplicação de fungicida e da adubação nitrogenada.....	30
FIGURA 9. Temperaturas máximas e mínimas durante o período de 02 de abril a 12 de maio de 2011 na casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias da UFU em Uberlândia - MG.....	35

RESUMO

MORAIS, TÂMARA PRADO. **Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasiliense* em híbridos de milho.** 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

O milho é um dos principais cereais cultivados no mundo, porém apresenta desafios quanto ao correto manejo da adubação. Sua alta exigência por nitrogênio tem sido a principal responsável pelas excessivas doses de fertilizantes nitrogenados sintéticos aplicados na cultura. Como consequência, há aumento no custo de produção da lavoura e impactos negativos ao meio ambiente. Dessa forma, é necessário estudar métodos alternativos que promovam o crescimento das plantas e garantam a produtividade, buscando-se aliar eficiência, viabilidade econômica e segurança ambiental. Bactérias diazotróficas podem fixar nitrogênio atmosférico e produzir substâncias promotoras do crescimento, podendo reduzir a utilização de fertilizantes nitrogenados na cultura do milho. Para testar essa hipótese, este trabalho teve como objetivo avaliar a inoculação com *Azospirillum brasiliense* em combinação com adubação nitrogenada em híbridos de milho, nas condições do cerrado brasileiro. A pesquisa foi composta por três ensaios, todos em delineamento experimental de blocos ao acaso. O primeiro foi realizado a campo, no município de Iraí de Minas, durante a safra 2009/2010. Foram avaliados quatro híbridos de milho inoculados ou não com a bactéria do gênero *Azospirillum* e submetidos a diferentes doses de adubação nitrogenada (50, 100, 150, 200, 250 e 300 kg de N ha⁻¹). O segundo ensaio, realizado em casa de vegetação, no município de Uberlândia, foi conduzido em esquema fatorial 3 x 3, sendo o primeiro fator correspondente a doses de nitrogênio (0, 100 e 200 kg ha⁻¹) e o segundo, à dose do inoculante líquido à base de *Azospirillum* (0, 100 e 200 mL ha⁻¹). Ao final desse experimento, outro ensaio em casa de vegetação foi realizado para verificar o possível efeito residual da inoculação e da adubação nitrogenada. Em campo, concluiu-se que a inoculação de milho com *Azospirillum brasiliense* é uma tecnologia promissora capaz de incrementar significativamente a produtividade da cultura, em sistemas de alto e baixo investimento. As avaliações em casa de vegetação permitiram concluir que a adição de nitrogênio, de maneira geral, promoveu maior desenvolvimento das plantas de milho, incrementou os teores de clorofila e de nutrientes e aumentou a atividade das enzimas relacionadas à disponibilização de amônia e fósforo inorgânico na rizosfera. Além disso, apresentou efeito residual no desenvolvimento das plantas na semeadura subsequente.

Palavras-chave: *Zea mays* L., doses de nitrogênio, *Azospirillum brasiliense*, rendimento de grãos, atividade enzimática.

¹ Comitê Orientador: Césio Humberto de Brito – UFU (Orientador) e Adão de Siqueira Ferreira – UFU.

ABSTRACT

MORAIS, TÂMARA PRADO. **Nitrogen application and *Azospirillum brasiliense* inoculation on maize hybrids.** 2012. 71f. Uberlândia: UFU, 2012. 71f. Dissertation (Masters Program Agronomy/Crop Science) – Federal University of Uberlândia, Uberlândia.²

Maize is one of the world's most important cultivated cereals; however, it presents great challenges for correct fertilization management. Its high nitrogen demand has been the major cause of excessive applications of synthetic nitrogen fertilizers in the crop. As a result, both environmental and economical problems have increased. Therefore, alternative methods that promote plant growth and ensure productivity need to be better studied to associate efficiency, economic viability and environment safety. Diazotrophic bacteria are able to fix atmospheric nitrogen and synthesize plant growth promoting substances, which may reduce the need for nitrogen fertilizers. To test this hypothesis, this work evaluated inoculation with *Azospirillum brasiliense* combined with nitrogen fertilization on maize plants under Brazilian Cerrado conditions. The research consisted of three trials, in a randomized block design. The first experiment was done in the field at Iraí de Minas, during the crop season of 2009/2010. Four maize hybrids inoculated or not with the *Azospirillum* bacteria and subjected to different nitrogen rates (50, 100, 150, 200, 250 and 300 kg of N ha⁻¹) were evaluated. The second trial, under greenhouse conditions at Uberlândia, was set up as a 3 x 3 factorial. The first factor corresponded to nitrogen rates (0, 100 and 200 kg ha⁻¹) and the second factor to *Azospirillum* inoculant (0, 100 and 200 mL ha⁻¹). At the end of this experiment, another greenhouse trial was done to determine the possible residual effect of inoculation and nitrogen fertilization. According to the field study, it was concluded that maize inoculation with *Azospirillum brasiliense* is a promising technology capable of significantly enhancing crop yield, in both high and low investment systems. In general, greenhouse evaluations showed that nitrogen application promoted growth, increased chlorophyll and nutrient contents, and intensified the activity of rhizosphere enzymes related to ammonium and inorganic phosphorus availability in maize plants. Also, nitrogen fertilization had residual effect on plant development in the test evaluating the residual effect of the fertilizer.

Keywords: *Zea mays* L., nitrogen rates, *Azospirillum brasiliense*, grain yield, enzymatic activity.

² Supervising Committee: Césio Humberto de Brito – UFU (Major Professor) and Adão de Siqueira Ferreira – UFU.

1 INTRODUÇÃO

No cenário mundial, o milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de destacada importância em virtude de sua diversidade de utilização, extensão da área cultivada (aproximadamente 162 milhões de hectares³) e reflexos sócio-econômicos. Por suas características fisiológicas, apresenta alto potencial produtivo, podendo alcançar até 30 t ha⁻¹ de grãos⁴. No entanto, seu rendimento médio é muito baixo (em torno de 5,4 t ha⁻¹ de grãos⁵), demonstrando que os diferentes sistemas de produção de milho devem ser aprimorados para obter aumento na produtividade e na rentabilidade que esta cultura pode proporcionar.

Apesar das inovações tecnológicas que se incorporam a cada ano ao setor agrícola, o manejo inadequado da adubação ainda se configura em um dos principais entraves ao crescimento e produção desta gramínea. O milho é bastante exigente em fertilidade, com destaque ao nitrogênio (N), sendo que a deficiência desse macronutriente pode reduzir o rendimento de grãos entre 10 e 22% (SUBEDI; MA, 2009).

O N está presente em diversas formas na biosfera. A atmosfera contém cerca de 80% de nitrogênio molecular (N₂), entretanto, seu aproveitamento só é possível mediante processos industriais ou fixação biológica por alguns organismos procariotos (PREININGER; GYURJÁN, 2001). A crescente demanda dos sistemas agrícolas por fertilizantes nitrogenados, aliada ao seu elevado custo e potencial de contaminação do meio ambiente, tem direcionado a pesquisa quanto ao processo natural.

Neste sentido, diversos estudos têm sido realizados no Brasil e no mundo com microrganismos capazes de fixar o N atmosférico, denominados diazotróficos, em associação com gramíneas. Esses estudos foram intensificados na década de 70 pela Dra. Johanna Döbereiner e colaboradores (DÖBEREINER; DAY, 1976). A expectativa era que, com a adoção desta tecnologia, haveria redução no uso de adubos nitrogenados nas lavouras e incremento nas produtividades, devido ao fornecimento do N fixado às

³ Informação obtida do site de estatísticas da FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), incluindo dados oficiais, semi-oficiais ou estimados. FAOSTAT. Acesso em: 5 mar. 2012.

⁴ BRITO, C.H. Notas de aula. Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

⁵ Dado do Centro de Inteligência do Milho (Embrapa Milho e Sorgo) e da FAOSTAT, considerando a produção e área cultivada nos 10 principais países produtores de milho. Acesso em: 5 mar. 2012.

culturas. Essas pesquisas foram realizadas principalmente com as bactérias do gênero *Azospirillum*.

Mesmo após décadas de estudos, a adoção dessa tecnologia nos sistemas agrícolas ainda é incipiente. O principal entrave à introdução do *Azospirillum* na cultura do milho é a imprevisibilidade e inconsistência dos resultados de pesquisa, os quais podem variar de acordo com o genótipo, condições edafoclimáticas e metodologia de condução do ensaio.

Considerando que, até o momento, as pesquisas que levaram à identificação de estirpes de *Azospirillum* no Brasil foram conduzidas apenas na região sul (HUNGRIA, 2011), é de suma importância a realização de ensaios de inoculação em solos de cerrado. Assim, para avaliar o potencial das bactérias diazotróficas na cultura do milho, foram conduzidos trabalhos em campo e casa de vegetação com os seguintes objetivos: 1) verificar a viabilidade da inoculação de sementes de milho com bactérias do gênero *Azospirillum* nas condições do cerrado brasileiro; 2) adequar doses de fertilizantes nitrogenados na cultura, considerando o emprego dessa tecnologia; e 3) verificar respostas morfológicas e bioquímicas de plantas de milho inoculadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Elemento Nitrogênio

O nitrogênio (N) é considerado elemento essencial para as plantas, pois está presente na composição das mais importantes biomoléculas, tais como ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas (HARPER, 1994; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). É um dos elementos minerais requerido em maior quantidade. Em muitos sistemas de cultivo, sua disponibilidade é quase sempre um fator limitante, interferindo no pleno desenvolvimento e produção das plantas.

Na biosfera, os processos metabólicos de diferentes espécies atuam interdependentemente para recuperar e reutilizar este elemento através de um vasto ciclo do nitrogênio (NELSON; COX, 2009), o qual é governado principalmente pela atividade microbiana. De acordo com a Figura 1, o N pode ser incorporado ao solo através de compostos orgânicos (restos vegetais e animais) e/ou inorgânicos (fertilizantes nitrogenados sintéticos), fixação biológica (simbiótica ou não) e fixação por descargas elétricas. No solo, o N pode ser mineralizado, imobilizado ou perdido por volatilização, denitrificação, lavagem (ou erosão), lixiviação e/ou ser extraído pelas culturas.

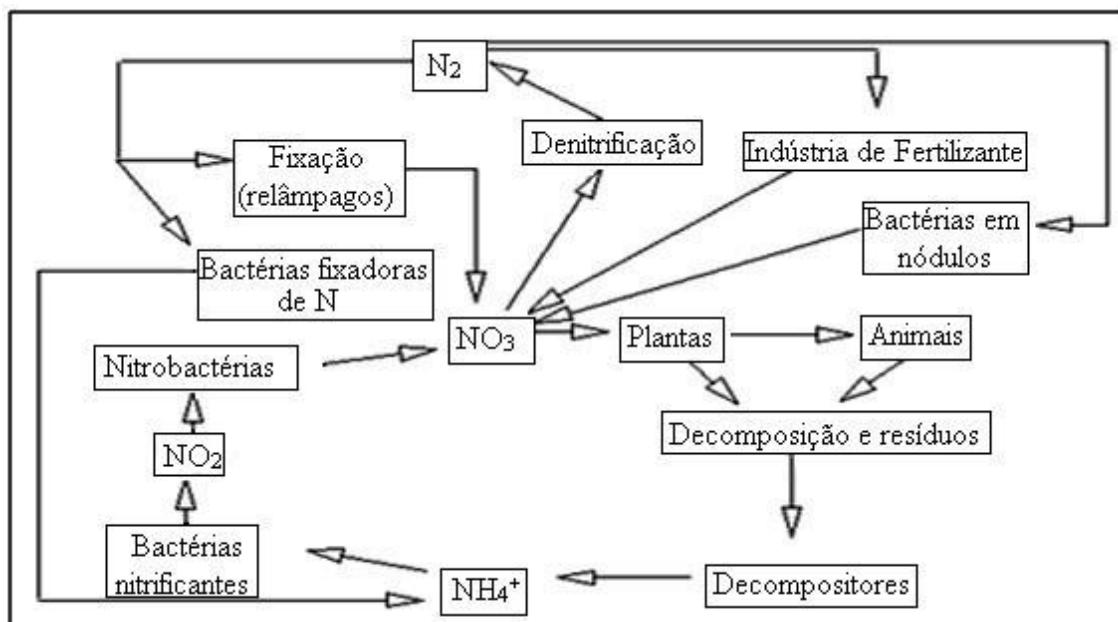
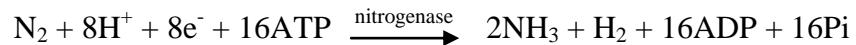


FIGURA 1. O ciclo do nitrogênio (Adaptado de McShaffrey, 2006).

A mais importante fonte de N é a atmosfera (HUERGO, 2006). O nitrogênio molecular, ou dinitrogênio (N_2), constitui 4/5 da atmosfera terrestre. Porém, é metabolicamente indisponível a mais de 99% dos organismos vivos (GALLOWAY et al., 2003) em virtude da estabilidade da tripla ligação $N \equiv N$ (MADIGAM et al., 2004).

A reação de redução de N atmosférico a amônia – fixação de N – requer uma energia de ativação extremamente alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados. Na indústria, por exemplo, o processo de fixação de N desenvolvido por Haber-Bosch para síntese de amônia emprega temperaturas entre 300 e 500°C e pressões acima de 300 atm, sendo utilizados catalisadores à base de ferro (KIM; REES, 1994). Esse processo consome muita energia e encarece o preço do fertilizante nitrogenado (BUCHANAN et al., 2000).

Na natureza, alguns organismos procariotos são capazes de assimilar o N atmosférico e convertê-lo à forma assimilável (NH_3). Esse processo, chamado fixação biológica de nitrogênio (FBN), é realizado através do complexo enzimático nitrogenase, conforme reação que se segue (POSTGATE, 1982; EADY, 1986):



Estima-se que a FBN seja responsável por cerca de 65% do total de N fixado na Terra (NEWTON, 2002; AZEVEDO, 2010), o que o faz ser considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese, juntamente com a decomposição orgânica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Um grande número de plantas cultivadas mantém em suas raízes uma população ativa de microrganismos diazotróficos (fixadores de N atmosférico), sendo que, ao longo do processo evolutivo, muitas dessas associações sofreram especializações, resultando em relações muito estreitas entre a planta e a bactéria (MARCHIORO, 2005).

Tendo em vista os custos econômicos e ambientais decorrentes do uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos e o fato de que o Brasil importa atualmente 73% do N utilizado na agricultura (HUNGRIA, 2011), muitas pesquisas têm sido direcionadas quanto ao estudo do processo natural de fixação biológica do nitrogênio (CANTARELLA; DUARTE, 2004; CONCEIÇÃO et al., 2009).

Em termos agrícolas, a maior contribuição da FBN, e a que mais se destaca no Brasil, ocorre pela simbiose rizóbio-soja (ARAÚJO, 2008). Estudos apontam que a

eficiência desta associação permite dispensar totalmente (HUNGRIA et al., 2001) ou reduzir a adubação nitrogenada sem causar perda de produtividade (ALVES et al., 2003).

Devido ao grande benefício gerado por esta prática, muitos estudos têm buscado bactérias que realizam a fixação de N em gramíneas (DE-POLLI et al., 1977; APP et al., 1986; BODDEY; VICTORIA, 1986; MIRANDA et al., 1990; BODDEY et al., 1995; SOLIMAN et al., 1995; JAMES, 2000; KENNEDY; ISLAM, 2001; RONCATO-MACCARI et al., 2003), pois, se a FBN pudesse estar associada a espécies não-leguminosas, poderia aumentar o potencial de fornecimento deste nutriente às plantas. Além disso, promoveria a conservação dos recursos não-renováveis, a preservação do meio ambiente e reduziria o ônus econômico da compra de fertilizantes nitrogenados pelos agricultores.

O potencial da FBN em contribuir com N para o crescimento de algumas espécies de gramíneas já foi demonstrado para algumas forrageiras, como a grama-batatais (*Paspalum notatum batatais* Flüegge), o capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq), o capim braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), a braquiarinha (*Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick) (DE-POLLI et al., 1977; BODDEY; VICTORIA, 1986; MIRANDA et al., 1990) e também para o arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) (APP et al., 1986; BODDEY et al., 1995), para a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (JAMES, 2000), para a cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) (SOLIMAN et al., 1995; KENNEDY; ISLAM, 2001) e do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) (RONCATO-MACCARI et al., 2003). É muito provável, porém, que a FBN detectada nessas plantas seja o resultado da atividade não de uma, mas de várias espécies de microrganismos diazotróficos associados a elas.

Considerando a importância e a urgência do desenvolvimento de produtos que venham a substituir ou diminuir a utilização de energias não-renováveis, a inoculação com bactérias diazotróficas pode ser uma alternativa biotecnológica na busca pela sustentabilidade dos sistemas agrícolas, visto que pode promover incrementos na produção das lavouras com menor dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos (BODDEY et al., 1997), uma vez que estes microrganismos podem atuar na disponibilidade de N para a planta (BALDANI et al., 2002).

Neste sentido, o milho pode ser considerado uma cultura promissora, com grande potencial a ser explorado em termos de viabilidade da inoculação, pois pode ser

colonizado simultaneamente por grande diversidade de bactérias diazotróficas (ROESCH et al., 2007).

2.2 Aspectos Gerais da Cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta de origem americana, cujos primeiros registros de cultivo foram encontrados no México há mais de 7.300 anos (GARCIA et al., 2006). É uma gramínea anual, de metabolismo C4, alógama e allotetraplóide, com $2n = 4x = 20$ cromossomos (GAUT et al., 2000).

Quanto às características morfológicas, apresenta três sistemas radiculares. O primeiro é provisório, proveniente da germinação da semente, o qual é substituído pelo sistema radicular definitivo. Este, pode atingir até 3 m de comprimento, no entanto, a maior parte das raízes fasciculadas encontra-se nos primeiros 30 cm do solo. Posteriormente, desenvolvem-se os esporões que auxiliam na sustentação da planta, absorção de água e de nutrientes. O caule do milho é do tipo colmo, constituído por nós e entrenós, no qual estão inseridas, alternadamente, as folhas paralelinérveas. É uma planta monóica, apresentando uma inflorescência masculina (pendão) e uma feminina (espiga), cuja semente é um tipo de fruto classificado como cariopse (MAGALHÃES et al., 1994).

O milho é considerado uma planta plástica, ou seja, com capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais, sendo cultivado entre os extremos norte e sul do globo terrestre, desde baixas a altitudes superiores a 2.500 m (TEIXEIRA et al., 2002). No entanto, parte dessa adaptabilidade pode ser atribuída às pesquisas com melhoramento genético que permitiram o desenvolvimento de cultivares altamente produtivos indicados às mais distintas condições edafoclimáticas das diversas regiões produtoras.

Mundialmente, o milho é o terceiro cereal mais cultivado, depois do arroz e do trigo (AWIKA, 2011). Sua versatilidade permite que seja utilizado na alimentação humana, no arraçoamento animal e até mesmo na indústria de alta tecnologia como matéria-prima para produção de cosméticos, bebidas, explosivos e biocombustível.

O Brasil ocupa o ranking dos principais países produtores deste cereal, juntamente com os Estados Unidos e a China. Apesar disto, a produção brasileira, que está em torno de 57 milhões de toneladas, é muito aquém da chinesa e mais ainda da americana, que registram uma produção aproximada de 177 e 316 milhões de toneladas,

respectivamente (USDA, 2011). Isso ocorre uma vez que, no Brasil, os níveis de produtividade média de milho são muito baixos. O cultivo por pequenos e médios agricultores (PEDRINHO, 2009), o baixo investimento no milho de 2^a safra, as condições climáticas desfavoráveis em algumas regiões produtoras, a utilização de variedades ou híbridos não adaptados a determinadas condições edafoclimáticas, o uso de sementes não certificadas, o manejo inadequado da população de plantas (espaçamento), a ausência de pureza genética e o manejo incorreto de fertilizantes e defensivos são alguns fatores que contribuem para a baixa produtividade média brasileira.

No cenário nacional, os maiores estados produtores de milho são Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás, que correspondem a 56% da produção brasileira. No estado de Minas Gerais esta cultura ocupa posição de destaque tanto em área cultivada como em produção. Estima-se que para a safra 2011/2012 (incluindo a safrinha) sejam produzidas 6,8 milhões de toneladas de milho em 1,3 milhão de hectares mineiros (CONAB, 2011).

Ressalta-se, portanto, que o milho é uma cultura de destacada importância para a economia mundial e nacional, ocupando uma área agrícola significativa. Nessas condições, tende a ser uma lavoura tecnificada, cujo sistema de produção baseie-se na mecanização e na elevada utilização de insumos fertilizantes e de defensivos agrícolas.

Quanto à fertilidade dos solos, o milho possui alto requerimento por N, exigindo 20 kg ha⁻¹ deste nutriente para cada tonelada de grão produzido (COELHO et al., 2010). A deficiência deste elemento em plantas de milho é caracterizada pelo amarelecimento das folhas do baixeiro, inicialmente em forma de “V”, seguida de clorose generalizada e abscisão foliar. Em alguns casos, podem ser observadas deformações na ponta da espiga. Assim, a limitação de N pode comprometer o crescimento das plantas e reduzir significativamente a produção de grãos de milho (MALAVOLTA et al., 1997; MARTINS et al., 2008).

A seleção de materiais próprios para ambientes pobres em N tem sido buscada por diversos pesquisadores (MURULI; PAULSEN, 1981; DENBINSKI et al., 1991; MAGALHÃES; MACHADO, 1992; LAFITTE; EDMEADES, 1994a, b; BÄNZIGER; LAFITTE, 1997). Porém, a obtenção de genótipos de milho eficientes na utilização do N é bastante complexa, pois o metabolismo desse macronutriente é influenciado por diversos fatores ambientais (MACHADO et al., 1992).

Visto isto, e considerando que a maioria dos solos das regiões tropicais apresenta deficiência de N, adubações nitrogenadas se fazem necessárias para suprir a demanda pela cultura garantindo ótimas produções (BORTOLINI et al., 2001; OHLAND et al., 2005; SOUZA, 2006). Entretanto, de maneira geral, as espécies cultivadas são capazes de aproveitar somente cerca de 50% do fertilizante nitrogenado aplicado, enquanto o restante é perdido no sistema solo-planta por lixiviação, volatilização, denitrificação e outros fatores; causando perdas econômicas anuais em torno de U\$ 3 bilhões de dólares e impactos negativos ao meio ambiente (SAIKIA; JAIN, 2007).

Sabe-se que existem interações entre o N e bactérias diazotróficas na assimilação e utilização desse nutriente (REIS JÚNIOR et al., 2008a). Neste sentido, seu uso associado à cultura do milho representa um grande potencial para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos e, consequentemente, a poluição ambiental e os custos de produção da lavoura.

2.3 Gênero *Azospirillum*

Dentre os microrganismos fixadores de N encontrados em associações com gramíneas, as espécies do gênero *Azospirillum* constituem um dos grupos mais estudados, com diversas pesquisas sobre sua ecologia, fisiologia e genética (BALDANI et al., 1997; BASHAN; HOLGUIN, 1997), sendo estes aspectos recentemente revisados por Hartmann e Baldani (2006).

Esses microrganismos pertencem à subclasse α das proteobactérias, a qual comporta um grande número de bactérias simbióticas e associativas a plantas, tais como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Gluconacetobacter* (HARTMANN; BALDANI, 2006). O gênero *Azospirillum* engloba várias espécies. As primeiras a serem descritas foram *A. lipoferum* e *A. brasiliense*, na década de 70 (TARRAND et al., 1978). Nos anos seguintes, foram descobertas as espécies *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. largimobile* (SLY; STACKEBRANDT, 1999), *A. doebereinerae* (ECKERT et al., 2001), *A. oryzae* (XIE; YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007a), *A. zae* (MEHNAZ et al., 2007b), *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008) e *A. formosense* (LIN et al., 2011).

Em sua maioria, são bactérias gram-negativas de vida livre, em forma de bastonete e usualmente uniflageladas, apresentando um movimento vibróide

característico (QUADROS, 2009). Apresentam metabolismo de carbono e N bastante versátil, o que lhes confere competitividade durante o processo de colonização. As fontes de carbono preferenciais são ácidos orgânicos como malato, piruvato e succinato, havendo também uma aparente preferência de frutose sobre glucose (QUADROS, 2009). Quanto às fontes de N, as principais são amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular (TRENTINI, 2010).

O *Azospirillum* sp. apresenta ampla distribuição nos solos tropicais e subtropicais. Porém, pouco se sabe sobre sua sobrevivência nesses solos na ausência da planta hospedeira. Apesar disto, tem sido demonstrado que as bactérias desse gênero apresentam vários mecanismos de proteção (formação de cistos, produção de melanina, de poli-β-hidroxibutirato), os quais podem facilitar sua sobrevivência em condições desfavoráveis (DEL GALLO; FENDIRIK, 1994).

Essas bactérias podem associar-se a várias espécies vegetais de diferentes maneiras. A priori, acreditava-se que habitavam somente a rizosfera, devido à frequência que são encontradas colonizando a superfície das raízes (BASHAN; LEVANONY, 1990; ASSMUS et al., 1995; DÖBEREINER et al., 1995; BASHAN; HOLGUIN, 1997; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). No entanto, há relatos de que também podem ser endofíticas facultativas (DÖBEREINER; PEDROSA, 1987; SCHLÖTER et al., 1994; HUERGO et al., 2008), sendo capazes de colonizar internamente os tecidos de raízes e da parte aérea das plantas sem causar sintomas de doença (TERVER; HOLLIS, 2002).

Quando associadas ao sistema radicular, essas bactérias podem, eventualmente, promover incrementos na produtividade de cereais e de gramíneas forrageiras (OKON, 1985). Apesar de todas as estirpes isoladas serem diazotróficas, as linhagens endofíticas são consideradas mais eficazes no fornecimento do N fixado às plantas (KIRCHHOF et al., 1997; HECHT-BUCHHOLZ, 1998; JAMES, 2000; HAUWAERTS et al., 2002; RAMOS et al., 2002; FISCHER et al., 2003).

O modo de ação das espécies de *Azospirillum* ainda não foi completamente elucidado. Entretanto, suas propriedades fisiológicas são bem conhecidas (HARTMANN; ZIMMER, 1994). Além da capacidade de fixar N atmosférico, quando em associação com gramíneas (STEEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; ELMERICH; NEWTON, 2007), podem atuar na solubilização de fosfato inorgânico (VERMA et al., 2001). Ensaios conduzidos *in vitro* evidenciaram também sua capacidade de sintetizar etileno (STRZELCZYK et al., 1994), auxinas, giberelinas,

citocininas (RADEMACHER, 1994; PATTEN; GLICK, 1996) e de estimular o desenvolvimento do sistema radicular (LAMBRECHT et al., 2000).

Indiretamente, as bactérias do gênero *Azospirillum* podem agir no crescimento vegetal protegendo a planta hospedeira contra microrganismos patogênicos, através da produção de chitinases, glucanases (WHIPPS, 2001), sideróforos (LODEWYCKX et al., 2002) e da indução de resistência sistêmica (JETIYANON; KLOEPER, 2002). Entretanto, é importante destacar que as associações dessas bactérias com a planta hospedeira dependem do genótipo vegetal (INIGUEZ et al., 2004) e de condições específicas do solo (OLIVEIRA et al., 2006).

Assim, estudos sobre o potencial uso dessas bactérias em promover o crescimento de plantas de milho, aumentar o rendimento de grãos e aportar N via fixação biológica, devem ser conduzidos permitindo uma melhor adequação das doses de fertilizantes nitrogenados na cultura e, sem dúvida, uma melhor eficiência no uso desta tecnologia, traduzida por redução de custos e ambiente preservado.

2.4 Associação *Azospirillum*-Plantas

Bactérias do gênero *Azospirillum* têm sido utilizadas como inoculante em diversas culturas, como cereais, algodão (*Gossypium hirsutum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), banana (*Musa* spp.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), café (*Coffea* sp.) e forrageiras do gênero *Brachiaria* (REIS et al., 2000), influenciando positivamente o crescimento vegetal, o rendimento de safras e o conteúdo de N das plantas.

Em uma revisão recente de trabalhos sobre as respostas fisiológicas induzidas por *Azospirillum*, Barassi et al. (2008) relatam a melhoria em parâmetros fotossintéticos das folhas, incluindo o teor de clorofila e condutância estomática, melhoria no potencial hídrico, incremento na produção de biomassa e maior altura de plantas.

Vários experimentos com cereais têm demonstrado evidentes benefícios dessa inoculação (OKON, 1982; REYNERS; VLASSAK, 1982; BALDANI et al., 1987; BELIMOV et al., 1995, BODDEY; DÖBEREINER, 1995). Considerando o trigo (*Triticum aestivum* L.), a cevada (*Hordeum vulgare* L.) e a aveia (*Avena sativa* L.), a inoculação com *Azospirillum* sp. pode aumentar significativamente a produtividade, variando entre as culturas (DIDONET, 1998; DALLA SANTA et al., 2004).

Ensaios de inoculação já foram conduzidos em diversos países (DOBBELAERE et al., 2001), resultando, na maioria dos casos, na recomendação do uso de inoculantes à base de *Azospirillum* na agricultura (BURDMAN et al., 2000; LUCY et al., 2004; KENNEDY et al., 2004). Em gramíneas, estudos relatam que a adoção desta tecnologia pode proporcionar redução de 50% no uso de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA et al., 2010).

A promoção do crescimento de plantas inoculadas com essa bactéria já foi obtida em condições de campo e em experimentos em casa de vegetação, alterando significativamente várias características do vegetal. Como exemplos, a inoculação pode incrementar a matéria seca e o acúmulo de N total na planta, aumentar a produção e o peso de grãos e acelerar a taxa de germinação de sementes (NUR et al., 1980; BODDEY; DÖBEREINER, 1988; SUMNER, 1990; FAGES, 1994; FALLIK; OKON, 1996; PANDEY et al., 1998).

Em ensaio conduzido em casa de vegetação, linhagens de *Azospirillum* foram capazes de promover maior crescimento de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) (FAGES; ARSAC, 1991). Da mesma forma, a inoculação de sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) com *A. brasiliense* resultou em efeitos positivos no desenvolvimento de raízes e parte aérea, quando comparado às plantas não inoculadas (DEL GALLO; FABBRI, 1990). Incrementos no teor de matéria seca, área foliar e rendimento de grãos também foram observados em plantas de *Sorghum bicolor* L. Moench cultivadas em hidroponia. Neste caso, os autores constataram que, em estádios mais avançados de desenvolvimento, a senescência foliar foi retardada nas plantas inoculadas com *A. brasiliense* favorecendo, assim, o acúmulo de matéria seca e o enchimento de grãos (SARIG et al., 1990).

Ensaios também foram conduzidos para verificar o efeito da co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum*. A dupla inoculação com *Azospirillum* sp. e estirpes de rizóbio apresentou efeito sinérgico na nodulação, crescimento das plantas, rendimento e fixação de N₂ nas culturas do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) (RAVERKER; KONDE, 1988; BURDMAN et al., 1997).

Aparentemente, o *Azospirillum* libera substâncias na rizosfera que atuam como sinalização de genes indutores da formação de nódulos, garantindo uma melhor simbiose (BURDMAN et al., 1996). Além disso, essa bactéria promove maior formação de raízes laterais e pêlos radiculares (BURDMAN et al., 1998) o que, provavelmente, melhora a infecção pelos rizóbios e, assim, a formação de nódulos. A existência de um

efeito sinérgico ou aditivo do *Azospirillum* em combinação com outros diazotróficos também tem sido sugerida em experimentos com cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002).

De maneira geral, aproximadamente 70% dos experimentos conduzidos a campo com inoculação de *Azospirillum* sp., em várias culturas e em diferentes condições edafoclimáticas, mostraram aumentos de produtividade, podendo chegar a 30% (OKON; LABANDERA-GONZÁLEZ, 1994; OKON; ITZIGSOHN, 1995; OKON; VANDERLEYDEN, 1997). Essa contribuição das bactérias é maior quando as plantas recebem doses variáveis de fertilizante nitrogenado (DOBBELAERE et al., 2003).

Didonet et al. (1996) já reportavam maior eficiência na associação bactéria-planta em virtude da adição de fertilizante nitrogenado, quando comparado ao uso isolado da bactéria. Esses autores observaram que a produção de grãos de trigo inoculado com a estirpe JA04 de *A. brasiliense*, e complementado com 15 kg de N ha⁻¹, não diferiu estatisticamente do tratamento que recebeu a adubação equivalente a 45 kg de N ha⁻¹, feita em cobertura.

Os efeitos estimulatórios do *Azospirillum* têm sido atribuídos a vários processos, como a fixação biológica do nitrogênio e a produção de hormônios de crescimento vegetal. No entanto, a contribuição da FBN vem sendo questionada, uma vez que a transferência do N fixado para a planta ocorre muito lentamente, apenas uma pequena parte torna-se disponível para o vegetal (DOMMELEN et al., 1998) e as bactérias não secretam altas quantidades de amônia durante o crescimento diazotrófico (STEENHOUT; VANDERLEYDEN, 2000). Assim, a capacidade das bactérias em produzir substâncias promotoras do crescimento (UMALI-GARCIA et al., 1980; CASSÁN et al., 2001), promover aumento da taxa de absorção de minerais pelas raízes (LIN et al., 1983; FALLIK et al., 1988b; PEOPLES et al., 1995; DOBBELAERE et al., 1999; LAMBRECHT et al., 2000) e suprimir doenças pela competição com microrganismos fitopatogênicos (BERG, 2009) têm sido levados em consideração.

Neste escopo, Lambrecht et al. (2000) reportam que plantas inoculadas com *Azospirillum* apresentam maior crescimento devido à biossíntese e secreção bacteriana de auxina (principalmente, ácido indol-acético - AIA). A presença deste hormônio na rizosfera promoveria maior desenvolvimento do sistema radicular e, consequentemente, maior absorção de água e nutrientes pelas plantas (Figura 2). Esta alteração na morfologia das raízes decorrente do AIA secretado por *Azospirillum* já foi comprovada em outros estudos (DOBBELAERE et al., 1999; SPAEPEN et al., 2008).

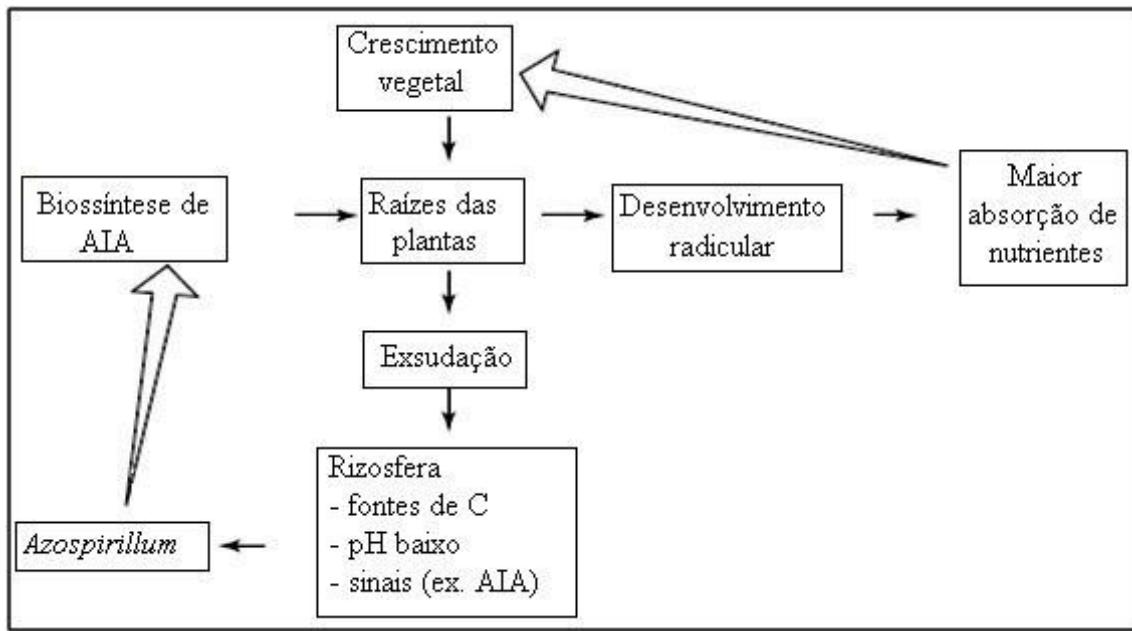


FIGURA 2. Esquema da associação planta-*Azospirillum* na promoção do crescimento vegetal. Setas largas indicam estímulo (Adaptado de Lambrecht et al., 2000).

Conforme mencionado, bactérias do gênero *Azospirillum* também podem, indiretamente, promover o crescimento das plantas em consequência de seus efeitos antagônicos a fitopatógenos. Em experimento conduzido por Bashan e Bashan (2002), plantas de tomateiro foram co-inoculadas com o agente causal da pinta-bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) e com *A. brasiliense* e pulverizadas com ácido málico. Como resultado, os autores observaram decréscimo na população de *Pseudomonas*, no progresso da doença e melhor crescimento das plantas de tomate.

2.5 Potencial de Inoculação com *Azospirillum* em Milho

A associação positiva entre essas bactérias diazotróficas e o milho tem sido demonstrada por vários autores, sendo que a inoculação com *Azospirillum* resultou, na maioria dos casos, em aumento de produção e/ou de matéria seca e acúmulo de N nas plantas inoculadas (OKON; LABANDERA-GONZÁLEZ, 1994; SALAMONE; DÖBEREINER, 1996; OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

Segundo Muñoz-Garcia et al. (1991), a inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasiliense* cepa UAP 77 provoca aumento na matéria seca de raízes da ordem de 54 a 86%, e de 23 a 64% no peso seco da parte aérea. Este resultado, no entanto, diverge do encontrado por Chela et al. (1993), que evidenciaram que somente a

inoculação bacteriana não apresenta efeito sobre a matéria fresca e seca de plantas de milho. Sua combinação, porém, com nitrogênio incrementa estas variáveis (CHELA et al., 1993). Stancheva et al. (1992) também relatam que o aumento da taxa de acúmulo de matéria seca em plantas de milho inoculadas com *A. brasiliense* ocorre, principalmente, na presença de elevadas doses de N, o que parece estar relacionado com o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação deste nutriente.

A inoculação de plantas de milho com *A. lipoferum*, em condições de casa de vegetação, resultou em significativa promoção do crescimento vegetal, expressa em maiores pesos de raiz e de parte aérea, independente do substrato utilizado (areia ou solo) (MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006). Segundo os autores, mesmo constatada neste experimento a capacidade desta bactéria em fixar nitrogênio, o crescimento vegetal foi atribuído, principalmente, à sua significativa produção de AIA. No entanto, ao contrário do que é postulado na literatura, não foi verificada solubilização de fosfato por *A. lipoferum* tampouco por *A. brasiliense* (MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006).

Com relação a trabalhos de inoculação do milho com estirpes de *Azospirillum amazonense*, podem-se citar os estudos realizados por Lee et al. (1989) e Silva (2005), que são considerados referências quanto ao efeito positivo dessa inoculação em plantas de milho. Reis Júnior et al. (2008b) também corroboram estes resultados. Os autores, trabalhando com esta mesma bactéria, verificaram maior produção de matéria seca e acúmulo de N nas raízes de milho, quando comparado às plantas não inoculadas.

Quanto ao rendimento das lavouras, diversos autores reportam que a inoculação de sementes de milho com *Azospirillum* aumenta significativamente a produtividade (SALAMONE; DÖBEREINER, 1996; OKON; VANDERLEYDEN, 1997). Em experimento conduzido a campo na Argentina, estirpes de *Azospirillum* praticamente dobraram o número de grãos por espiga e aumentaram em 59% o peso dos grãos (FULCHIERI; FRIONI, 1994). Confirmando este efeito positivo das bactérias, Cavallet et al. (2000) registraram incremento médio de 17% na produtividade de grãos de milho em função da inoculação. Em estudo mais recente, Hungria et al. (2010) relatam que o *Azospirillum* proporciona aumento no rendimento de 24 a 30% em relação ao milho não inoculado, alcançando produtividades médias de 3,41 a 3,57 t ha⁻¹.

Embora estudos em casa de vegetação geralmente apresentem respostas positivas da inoculação bacteriana sobre o crescimento das plantas, muitos experimentos a campo ainda reportam resultados inconsistentes (BASHAN, 1998), sendo os fatores que interferem nas respostas das culturas ainda desconhecidos (OKON;

LABANDERA-GONZÁLEZ, 1994; BASHAN; HOLGUIN, 1997). Neste sentido, Sumner (1990) e Campos et al. (1999) relatam resultados negativos na produção de grãos de cereais inoculados com estirpes de *Azospirillum*. Na cultura do milho, Bartchechen et al. (2010) verificaram que, embora a inoculação das sementes com *A. brasiliense* tenha proporcionado um incremento em produtividade em relação à testemunha, configurou resultados inferiores à aplicação de doses de N em cobertura.

Assim, em virtude da diversidade de resultados da inoculação de plantas de milho com *Azospirillum*, mais estudos devem ser conduzidos em localidades diferentes sob várias condições de clima e tipos de solos, para verificar a possibilidade desta tecnologia em se firmar como uma alternativa agronomicamente viável para os agricultores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi constituída por ensaios conduzidos em campo e casa de vegetação. No ensaio de campo, diferentes híbridos de milho foram inoculados com *Azospirillum brasilense* via sementes. Nessa primeira etapa, objetivou-se verificar a afinidade das bactérias por genótipos recomendados para as condições do cerrado brasileiro, sob sistemas de produção de alta e baixa tecnologia. Para tanto, considerou-se o efeito da inoculação e da adubação nitrogenada no rendimento de grãos dos híbridos de milho e a possibilidade de redução do fornecimento de nitrogênio à cultura decorrente da adoção dessa prática. Na segunda etapa, selecionou-se um híbrido do ensaio de campo para avaliação de características morfológicas e bioquímicas relacionadas ao desenvolvimento das plantas de milho em resposta a doses do inoculante e de N. Nesse caso, o ensaio foi conduzido em casa de vegetação. Em seguida, procedeu-se ao estudo do possível efeito residual da inoculação via sementes e da adubação nitrogenada, mediante nova semeadura do híbrido nas mesmas condições do ensaio anterior.

3.1 Descrição dos Ensaios

3.1.1 Ensaio de campo

O ensaio de campo foi instalado e conduzido no município de Iraí de Minas ($18^{\circ}59'02''$ S e $47^{\circ}27'39''$ W), região do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, durante o ano agrícola 2009/2010. O clima da região é considerado tropical de altitude, Cwa de acordo com a classificação de Köppen, cuja temperatura média do ar é de $22,8^{\circ}\text{C}$ e a precipitação pluviométrica em torno de 1.539 mm ao ano, concentrando as chuvas no período de setembro a maio.

As temperaturas médias máximas e mínimas e a precipitação ocorrida durante o desenvolvimento do trabalho estão representadas na Figura 3. Observou-se a ocorrência de chuvas bem distribuídas, com menores precipitações ao final do ciclo da cultura, e temperaturas adequadas, favorecendo os estádios críticos de desenvolvimento do milho, conforme indicado por Fancelli (2003).

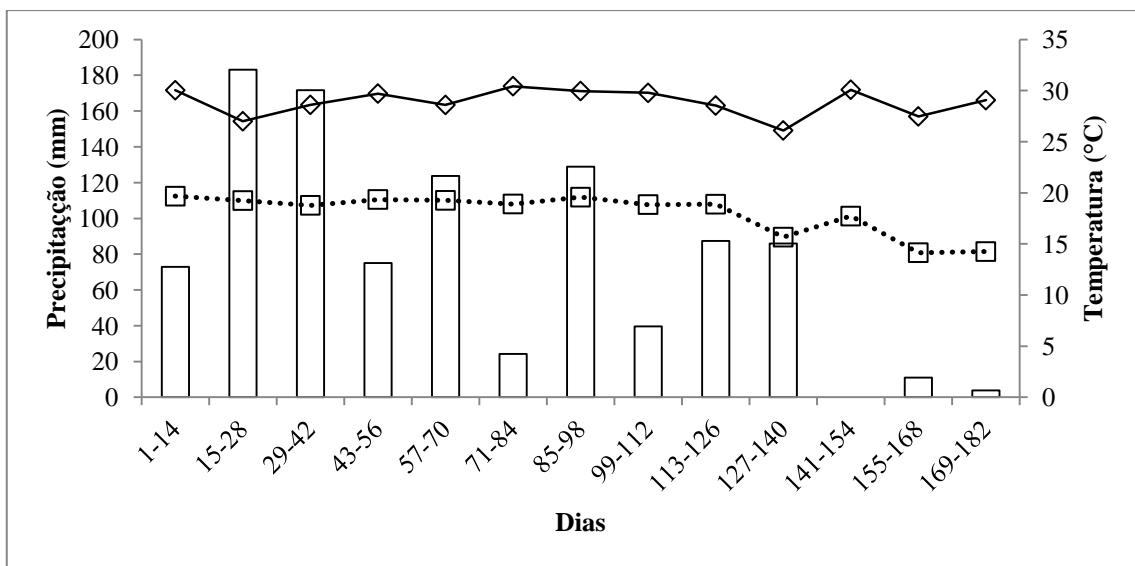


FIGURA 3. Valores de precipitação pluviométrica, temperaturas mínima e máxima, durante o período de 17 de novembro de 2009 a 19 de maio de 2010, no município de Iraí de Minas, MG. Fonte: Laboratório de Climatologia da Universidade Federal de Uberlândia, MG.

O solo da área experimental apresenta relevo plano e é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo (EMBRAPA, 2006), originalmente sob vegetação de cerrado. Antes da instalação do experimento, foi realizada a amostragem do solo, na camada de 0-20 cm de profundidade, a qual indicou as características químicas e físicas apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Resultado da análise do solo – Iraí de Minas-MG, 2009.

Propriedades	Amostra (0-20 cm)
pH (H ₂ O)	5,5
P meh ⁻¹ (mg dm ⁻³)	15,12
K ⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,37
Ca ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	2,4
Mg ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,65
Al ³⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,0
H + Al (cmol _c dm ⁻³)	3,6
M.O. (dag kg ⁻¹)	3,4
SB (cmol _c dm ⁻³)	3,42
t (cmol _c dm ⁻³)	3,42
T (cmol _c dm ⁻³)	7,0
V (%)	48
m (%)	0
Argila (g kg ⁻¹)	411

Na pesquisa, foram realizados dois ensaios independentes, considerados de alta e baixa tecnologia (com e sem aplicação de fungicida, respectivamente). Para cada ensaio, o delineamento estatístico experimental foi em blocos ao acaso (DBC), com 6 repetições, em esquema fatorial $4 \times 2 \times 6$, avaliando-se quatro híbridos de milho inoculados ou não com a bactéria do gênero *Azospirillum* e submetidos a diferentes doses de adubação nitrogenada (50, 100, 150, 200, 250 e 300 kg de N ha^{-1}).

Cada parcela foi constituída de 6 linhas de cultivo de 5,2 m de comprimento, espaçadas de 0,6 m entre si, perfazendo uma área de 18,72 m^2 por parcela e uma área experimental de 5.391,4 m^2 . Como parcela útil, foram consideradas apenas as 4 linhas centrais. Os híbridos utilizados no experimento foram codificados (1, 2, 3 e 4), sendo todos materiais comerciais de milho de alto potencial produtivo.

Cabe salientar que os dois ensaios (de alta e baixa tecnologia) foram instalados em área contínua, de mesmo histórico. O croqui da área experimental é esquematizado na Figura 4.

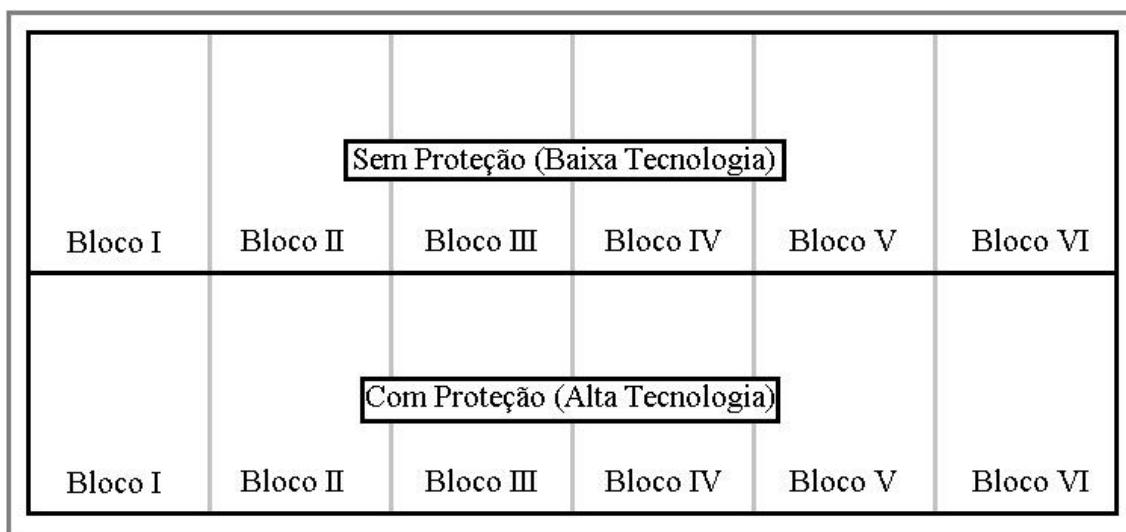


FIGURA 4. Esquema da área experimental dos ensaios de campo.

Cerca de 30 dias antes da semeadura foi realizada a dessecação da área experimental com 3 L ha^{-1} de glyphosate + 0,25 L ha^{-1} de 2,4-D. A semeadura foi realizada no dia 17 de novembro de 2009, logo após a inoculação das sementes com *Azospirillum*, em sistema de plantio direto, com uma densidade de aproximadamente 70.000 plantas ha^{-1} . Utilizou-se uma semeadora a vácuo adaptada para ensaios. A adubação correspondeu à aplicação de 650 kg ha^{-1} do formulado 08-20-20 + 0,5% de Zn, no momento da semeadura, e de 78 kg ha^{-1} de K₂O em cobertura, quando as plantas

de milho estavam no estádio V_6 , juntamente com doses variadas de uréia de acordo com os tratamentos.

Todos os tratos culturais necessários ao pleno desenvolvimento das plantas foram realizados objetivando alta produtividade. Para o controle de plantas infestantes em pré-emergência, foi realizada aplicação de 4 L ha^{-1} de atrazina + s-metolachlor. Concomitantemente, aplicou-se 1 L ha^{-1} de clorpirifós para controle de insetos-praga. O volume de calda utilizado foi de 300 L ha^{-1} . Em pós-emergência, quando o milho estava no estádio de desenvolvimento V_5 , aplicou-se 3 L ha^{-1} de atrazina + $0,75 \text{ L ha}^{-1}$ de nicosulfuron para o controle de plantas infestantes, e, para o controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), $0,1 \text{ L ha}^{-1}$ de espinosade + $0,3 \text{ L ha}^{-1}$ de lufenuron, em um volume de calda de 200 L ha^{-1} . Cabe salientar que todas as pulverizações foram realizadas no período da manhã, normalmente entre as 9 e 10 horas, sempre em condições ambientais adequadas, objetivando uma ótima tecnologia de aplicação.

O ensaio considerado de alta tecnologia constou, ainda, de pulverizações com fungicida nos estádios V_8 , V_T e R_3 , segundo escala de Ritchie e Hanway (1992), com produto à base de triazol + estrobilurina na dose de 300 mL ha^{-1} . Para tanto, foi utilizado um pulverizador costal motorizado, modelo F-768⁶, com capacidade do tanque de 25 L, em uma pressão de trabalho de 20 lbs pol^{-2} e vazão de 150 L ha^{-1} . O pulverizador foi equipado com uma barra transversal em “T” com 6 bicos de aplicação e tubulações com $\frac{1}{4}$ de polegada de espessura. Foram utilizadas pontas de pulverização tipo leque plano, Teejet 11002.

3.1.2 Ensaio de casa de vegetação

Este experimento foi realizado em vasos plásticos, na casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias da UFU em Uberlândia – MG, durante o mês de abril de 2011. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 3×3 , com 5 repetições em parcelas formadas por dois vasos (com capacidade de 2 L cada um), com uma planta de milho por vaso. O primeiro fator correspondeu a doses de N (0, 100 e 200 kg ha^{-1}) e o segundo, à dose do inoculante líquido à base de *Azospirillum* aplicado via sementes (0, 100 e 200 mL ha^{-1}).

⁶ Fabricado pela empresa chinesa KAWASHIMA.

O solo para preenchimento dos vasos foi coletado na Fazenda Experimental do Glória, de propriedade da Universidade Federal de Uberlândia, em área previamente cultivada com soja. Para análise do solo, amostras simples foram retiradas da camada de 0-20 cm e homogeneizadas, formando a amostra composta enviada para o Laboratório de Análises de Solos (ICIAG – UFU). O resultado da análise do solo, caracterizado como Latossolo Vermelho Distrófico (EMBRAPA, 2006) de textura muito argilosa, é apresentado na Tabela 2.

TABELA 2. Propriedades químicas e físicas do solo – Uberlândia-MG, 2011.

Propriedades	Amostra (0-20 cm)
pH (H ₂ O)	5,9
P meh ⁻¹ (mg dm ⁻³)	4,1
K ⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,24
Ca ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	2,2
Mg ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	1,2
Al ³⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,0
H + Al (cmol _c dm ⁻³)	2,7
M.O. (dag kg ⁻¹)	3,0
SB (cmol _c dm ⁻³)	3,64
t (cmol _c dm ⁻³)	3,64
T (cmol _c dm ⁻³)	6,34
V (%)	57
m (%)	0
Areia grossa (g kg ⁻¹)	152
Areia fina (g kg ⁻¹)	101
Silte (g kg ⁻¹)	62
Argila (g kg ⁻¹)	685

Vasos plásticos com 2 L de capacidade e com drenos foram previamente desinfestados com solução contendo 40% de álcool + 10% de formol + 20% de hipoclorito de sódio e colocados para secar ao ar. O solo coletado foi destorrado, seco ao ar, peneirado e acondicionado nos vasos.

Conforme mencionado anteriormente, o híbrido de milho utilizado neste experimento foi selecionado do ensaio de campo. Para tanto, considerou-se aquele mais responsável nos dois sistemas de produção (de alta e baixa tecnologia). Nesse sentido, foi empregado o Híbrido 2, o qual é, também, o mais cultivado na região.

A adubação de base consistiu da aplicação das fontes superfosfato triplo (37% de P₂O₅), cloreto de potássio (58% de K₂O) e sulfato de amônio (20% de N) (nos tratamentos com fertilizante nitrogenado), fornecendo doses equivalentes a 120 kg ha⁻¹ de P₂O₅, 50 kg ha⁻¹ de K₂O e 50 kg ha⁻¹ de N. Os adubos foram distribuídos no solo a 5 cm da superfície. A inoculação do híbrido de milho com *Azospirillum* foi realizada convencionalmente (via sementes), sendo a semeadura efetuada com 3 sementes por vaso a 3 cm de profundidade. O desbaste foi realizado 10 dias após a semeadura, mantendo-se uma planta por vaso. Para o controle de infestantes, foram realizadas, sempre que necessário, catações manuais. A adubação de cobertura foi realizada quando as plantas estavam no estádio de desenvolvimento V₄, segundo escala de Ritchie e Hanway (1992), com cloreto de potássio (58% de K₂O) e nitrato de amônio (32% de N) em doses equivalentes a 150 kg ha⁻¹ de K₂O e, de acordo com o tratamento, 50 e 150 kg ha⁻¹ de N.

3.1.3 Ensaio residual

Após avaliações do primeiro ensaio em casa de vegetação, o solo de cada vaso foi homogeneizado e peneirado, procedendo-se à nova semeadura do mesmo híbrido, porém sem inoculação das sementes e tampouco com aplicação de fertilizantes.

Todos os procedimentos de condução e avaliação foram realizados da mesma maneira que no experimento anterior. No entanto, reitera-se que os tratamentos consistiram apenas do residual daqueles apresentados.

3.2 Inoculação das Sementes

As sementes de milho foram inoculadas com o produto comercial MASTERFIX®L Gramíneas, em tambor rotativo, no ensaio de campo, e com auxílio de sacos plásticos, no experimento em casa de vegetação. A mistura foi cuidadosamente realizada para garantir que a distribuição do inoculante líquido nas sementes fosse uniforme. Este inoculante contém estirpes da bactéria *Azospirillum brasiliense* em concentração mínima de 2x10⁸ células viáveis mL⁻¹.

Para cada híbrido, foi aplicada a dose recomendada pelo fabricante, equivalente a 100 mL do inoculante comercial ha⁻¹. Para o ensaio em casa de vegetação, as doses do inoculante foram equivalentes a 100 mL ha⁻¹ e 200 mL ha⁻¹ (o dobro da dose

recomendada), sendo que, após homogeneização, as sementes inoculadas foram mantidas por cerca de 4 horas em local protegido do sol, até o momento da semeadura.

3.3 Variáveis Analisadas

No campo, por ocasião da colheita, a variável analisada foi a produtividade de grãos dos híbridos de milho. Já nos ensaios em casa de vegetação, para avaliação do desenvolvimento dessa gramínea, foram analisadas as seguintes características: altura da planta (cm), diâmetro de caule (mm), teor relativo de clorofila (ICF), volume de raiz (mL), massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular (g), teor de nitrogênio e de fósforo da parte aérea e das raízes (g kg^{-1}) e atividade das enzimas urease ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e fosfatase ($\mu\text{g PNP} \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Essas características foram analisadas 40 dias após a semeadura.

3.3.1 Ensaio de campo

3.3.1.1 Produtividade de grãos de milho

Quando a cultura atingiu o ponto de colheita (grãos com 23% de umidade), as espigas de cada parcela experimental foram colhidas e processadas mecanicamente empregando uma colhedora John Deere 1450. O peso e a umidade foram determinados por um sistema de balança e por um determinador de umidade, ambos instalados na colhedora. Os dados foram extrapolados para área de um hectare e corrigidos para 13% de umidade, encontrando assim valores de produtividade em t ha^{-1} .

3.3.2 Ensaio de casa de vegetação

3.3.2.1 Altura, diâmetro do colmo e teor de clorofila das plantas de milho

A altura das plantas de milho foi determinada com auxílio de uma trena e compreendeu a distância entre a região do colo e a inserção da última folha completamente desenvolvida. Na região do colo, determinou-se também o diâmetro do caule com um paquímetro digital, considerando-se o maior diâmetro do colmo.

O teor relativo de clorofila na folha foi determinado utilizando-se um clorofilômetro eletrônico, marca clorofiLOG modelo CFL 1030, o qual foi operado conforme as instruções do fabricante (FALKER, 2008). Neste aparelho, as unidades de mensuração, denominadas Índice de Clorofila Falker (ICF), são estimadas pela leitura diferencial da quantidade de luz transmitida pela folha em três regiões de comprimento

de onda (635, 660 e 880 nm). As leituras foram realizadas no terço superior da última folha completamente expandida de cada planta (duas leituras por planta).

3.3.2.2 Massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e volume de raízes

As massas da matéria fresca da parte área e raiz foram obtidas após lavagem do sistema radicular em água corrente e posterior separação das partes (área e radicular) com um corte na altura do colo, sendo pesadas, separadamente, em uma balança com sensibilidade de 0,01g.

Para determinação do volume de raízes das plantas de milho, as mesmas foram submersas em proveta contendo água. O volume foi determinado pela diferença entre os volumes inicial e final do recipiente.

Posteriormente, as raízes e a parte aérea foram lavadas em água corrente, seguida da imersão em solução de água + detergente neutro e novo enxágue com água corrente. Após, foram submersas em solução de HCl 1:1 e enxaguadas com água deionizada. Este procedimento visou à remoção de quaisquer impurezas e/ou resíduos do material vegetal. As amostras, então, foram acondicionadas separadamente em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 65-70°C até peso constante, para determinação da massa seca.

3.3.2.3 Teores de nitrogênio e de fósforo e atividade enzimática

Para quantificação de N e de P, as amostras secas passaram, respectivamente, por processos de digestão sulfúrica, destilação e titulação (N-Kjeldahl), e por espectrofotometria com amarelo-de-vanadato, de acordo com as metodologias descritas no Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes (EMBRAPA, 2009).

As atividades das enzimas urease e fosfatase, no solo, foram determinadas por absorbância, utilizando-se os procedimentos de Guan (1986) e de Tabatabai e Bremner (1969), respectivamente (Anexos A e B).

3.4 Análise Estatística

As características avaliadas, nos ensaios de campo e casa de vegetação, foram submetidas ao teste *F* da análise de variância, seguida pelo teste de Tukey, para comparações entre médias, e por regressão polinomial para estudo das doses de

nitrogênio. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2003), sendo utilizado $\alpha = 0,05$ como valor de significância.

Ressalta-se que todas as pressuposições requeridas para a análise de variância foram verificadas. A normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro e Wilk (1965) e a homogeneidade das variâncias por Levene (1960), utilizando o *software* SPSS versão 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Nesse sentido, para fins de análise, alguns dados tiveram de ser transformados, quando não atendiam às pressuposições. Porém, o resultado do teste de médias sempre foi expresso em valores sem transformação.

A saber, as transformações utilizadas foram: \sqrt{x} para atividade da enzima fosfatase e para teor de clorofila, no primeiro ensaio em casa de vegetação e no ensaio residual, respectivamente; $\sqrt{x + 0,5}$ para as variáveis altura de planta, massa fresca de parte aérea e massa fresca de raiz, no ensaio residual; e $\sqrt{x + 1}$ para massa seca de parte aérea e teor de fósforo nas plantas de milho no ensaio residual.

Cabe salientar, ainda, que os experimentos (em campo e casa de vegetação) foram analisados individualmente, exceto quanto ao efeito da proteção foliar na produtividade dos híbridos de milho no campo. Nesse caso, procedeu-se à análise conjunta dos dados, comparando as médias dos ensaios de alta e baixa tecnologia pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de Campo

4.1.1 Efeito da inoculação com *Azospirillum* sobre o rendimento de grãos de milho

Para os dois ensaios, de baixa e alta tecnologia, observou-se que a inoculação dos híbridos com *Azospirillum* promoveu aumento médio no rendimento de grãos de 4 a 7% o que corresponde a, aproximadamente, 7 a 12 sacas de 60 kg ha⁻¹. Assim, independentemente do híbrido e da tecnologia de produção, essa prática garante o retorno do investimento ao configurar maiores produtividades na cultura do milho (Figuras 5 e 6).

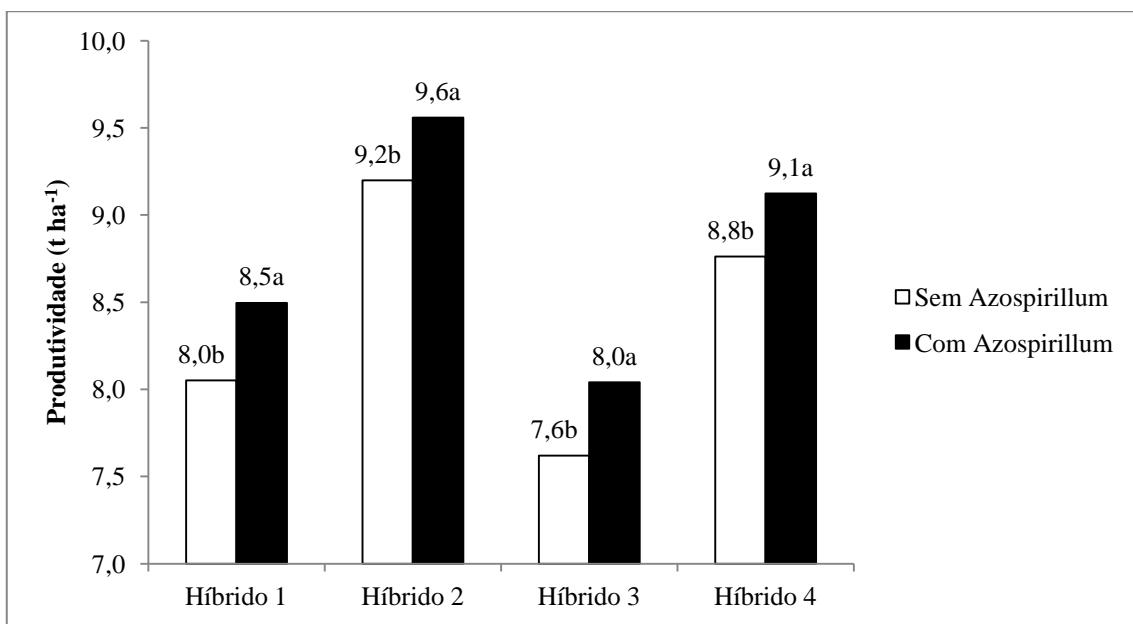


FIGURA 5. Desempenho produtivo de híbridos de milho, cultivados com baixa tecnologia, em função da inoculação com *Azospirillum brasiliense*. Uberlândia – MG, 2011¹.

¹médias com letras distintas, para cada híbrido, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

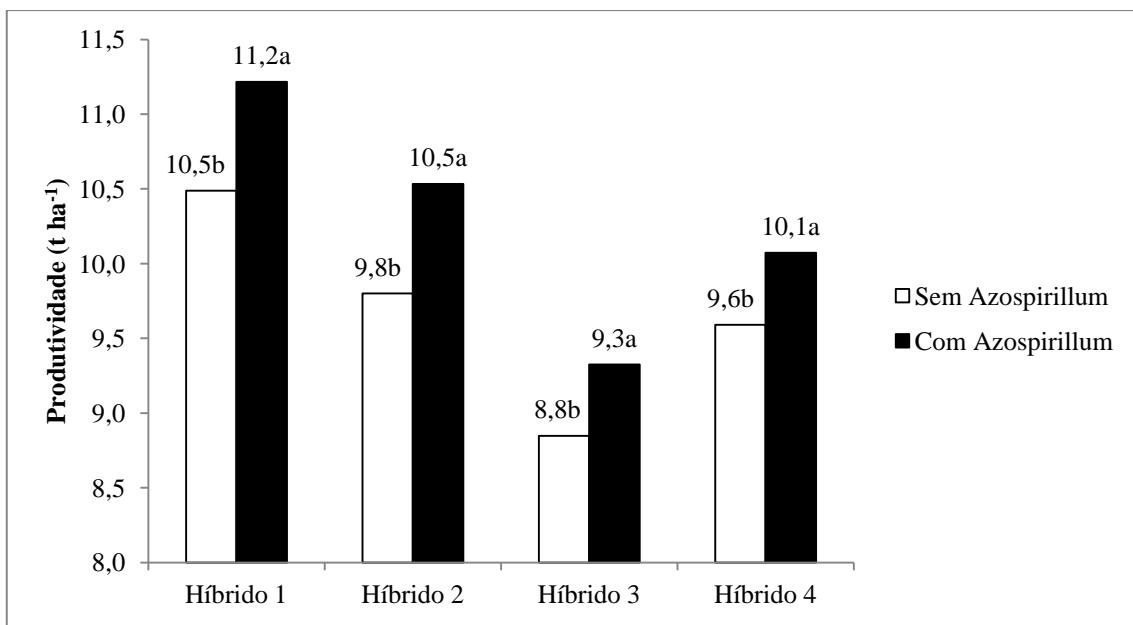


FIGURA 6. Desempenho produtivo de híbridos de milho, cultivados com alta tecnologia, em função da inoculação com *Azospirillum brasiliense*. Uberlândia – MG, 2011¹.

¹médias com letras distintas, para cada híbrido, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

De acordo com os resultados apresentados, observa-se que todos os híbridos testados responderam positivamente à inoculação, sugerindo, portanto, afinidade entre as estirpes bacterianas presentes no inoculante e os genótipos de milho. Estudos dessa natureza são importantes uma vez que inúmeros trabalhos têm demonstrado que existe certa afinidade entre estirpes de *Azospirillum* e cultivares (WANI et al., 1985) ou entre a bactéria e espécies de plantas (PENOT et al., 1992). Nesse sentido, o genótipo teve efeito na resposta da planta à inoculação, como reportado na cultura do trigo (CABALLERO-MELLADO et al., 1992), cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 1992) e também para o milho (ARSAC et al., 1990; SALAMONE; DÖBEREINER, 1996; SALAMONE et al., 1996).

Pode-se inferir que a adoção da inoculação possibilita incrementar a produtividade média em lavouras de milho cultivadas nas condições do cerrado, uma vez que houve afinidade do *Azospirillum* pelos híbridos recomendados para a região. Assim, mesmo pequenos e médios produtores (em sistemas de baixa tecnologia) podem garantir maiores rendimentos, o que poderá contribuir para aumentar a produtividade média nacional.

Salamone e Döbereiner (1996) e Okon e Vanderleyden (1997) também encontraram aumentos de produtividade com a inoculação de *Azospirillum* sp. nas mais diversas condições de cultivo. No sul do Brasil, variedades de milho apresentaram incrementos de até 30% na produção, dependendo da estirpe bacteriana, atingindo produtividade média de 3,57 t ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 2010).

Em ambos os ensaios, o aumento da produção está relacionado aos efeitos estimulatórios da inoculação com *Azospirillum*, os quais podem ser decorrentes não apenas da FBN na rizosfera, mas, também, da maior eficiência na absorção de água e nutrientes pelas plantas, devido ao maior crescimento do sistema radicular estimulado pela produção de fitormônios (BODDEY et al., 1986; KUCEY, 1988; DÖBEREINER, 1992; FALLIK; OKON, 1996; BASHAN; HOLGUIN, 1997; REIS et al., 2000).

Apesar do comprovado efeito das bactérias do gênero *Azospirillum* no rendimento de grãos de milho, o qual é postulado na literatura, nesse experimento não foi verificada interação significativa entre as doses de N e o uso do inoculante (Tabela 3).

TABELA 3. Resumo das análises de variância dos dados de produtividade obtidos nos ensaios de alta e baixa tecnologia conduzidos a campo em Iraí de Minas. Uberlândia – MG, 2011.

FV	GL	Quadrado Médio	
		Produtividade	
		Alta Tecnologia	Baixa Tecnologia
Híbrido	3	38756546,1402*	34132186,9671*
Dose de N	5	2083899,1684*	728966,0897*
Inoculação	1	26363940,7753*	11344132,3842*
Híbrido x Dose de N	15	113466,0483 ^{ns}	194254,2874 ^{ns}
Híbrido x Inoculação	3	375584,9833 ^{ns}	31997,0146 ^{ns}
Dose de N x Inoculação	5	157649,6636 ^{ns}	202088,6443 ^{ns}
Híbrido x Dose de N x Inoculação	15	81620,4439 ^{ns}	52294,4368 ^{ns}
Bloco	5	2173984,4119	852605,5815
Resíduo	235	184895,6882	158913,4752
CV (%)		4,31	4,63
W ¹		0,998	0,993
F ¹		1,939	1,290

* e ^{ns}: significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste F a 0,05 de significância;

¹W; F: estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente; valores em negrito indicam normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

Dessa maneira, mesmo se uma parte da exigência do milho por N fosse suprida pela associação com essas bactérias diazotróficas, não se recomendaria a redução da aplicação de fertilizantes nitrogenados na cultura. Esse resultado, no entanto, diverge do encontrado por Hungria (2011), que observou redução substancial na adubação nitrogenada em ensaio com a cultura do milho inoculada com *Azospirillum*. Aplicando-se uma dose correspondente a cerca de 50% daquela considerada recomendada para a cultura (100 kg ha⁻¹ de N), a pesquisadora obteve produtividade de 7,8 t ha⁻¹ de grãos de milho (HUNGRIA, 2011). Entretanto, cabe salientar que esse resultado foi obtido somente com a estirpe Ab-V5 (+ 54 kg ha⁻¹ de N) em um único ano agrícola.

4.1.2 Efeito da adubação nitrogenada sobre a produtividade do milho

De maneira geral, observou-se que o fertilizante nitrogenado resultou em maiores médias de rendimento de grãos de milho, semelhante aos resultados encontrados por Filho et al. (2005), que verificaram acréscimo da produtividade com o aumento das doses de N.

No ensaio de alta tecnologia, a partir de 50 kg ha⁻¹ de N há aumento na produtividade da cultura do milho, esperada como máxima de 10,14 t ha⁻¹ na aplicação de 260 kg ha⁻¹ de N. A partir desta dose, a resposta dos híbridos de milho à adubação nitrogenada tende a cair (Figura 7).

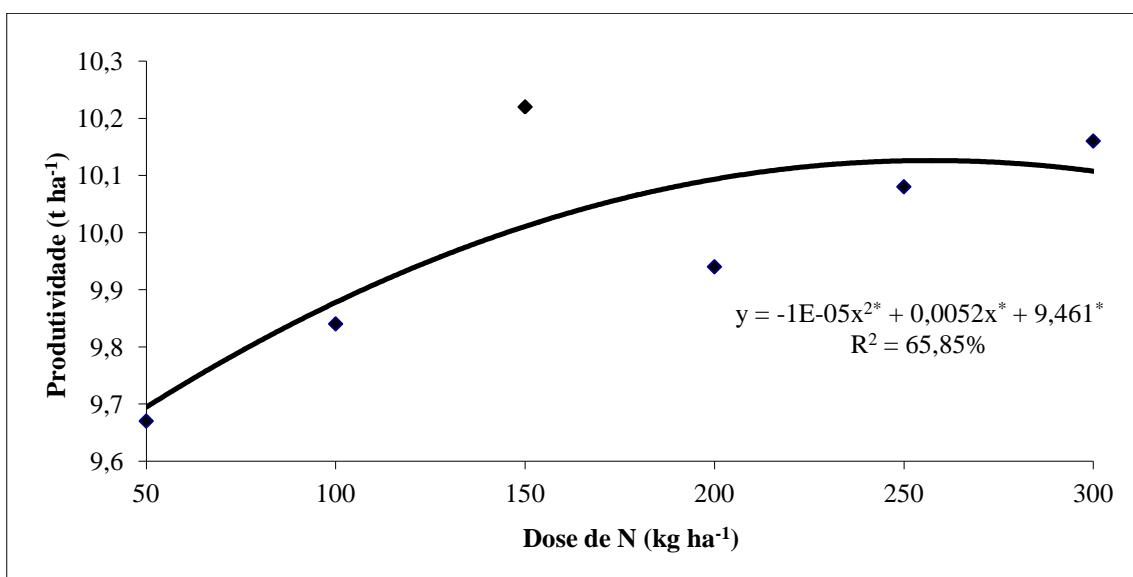


FIGURA 7. Desempenho produtivo de híbridos de milho, cultivados com alta tecnologia, em função da adubação nitrogenada. Uberlândia – MG, 2011.

Este comportamento quadrático da produtividade do milho ao aumento das doses de N aplicadas também foi reportado por Fernandes et al. (1998), Duarte (2003), Silva et al. (2005) e Cardoso et al. (2008). Isso pode ser explicado devido à volatilização da amônia, resultante da aplicação de uréia ao solo. A hidrólise desse fertilizante eleva o pH ao redor dos grânulos e converte todo o seu conteúdo de N em NH_4^+ , que reage com a OH^- formando H_2O e NH_3^+ volátil (ERNANI, 2008), causando toxidez às plantas. Assim, a aplicação de elevadas doses de N na forma de uréia pode prejudicar o crescimento de plantas de milho e, consequentemente, reduzir a produção.

Considerando o ensaio de baixa tecnologia, observa-se, na Tabela 4, que a menor dose de N aplicada (50 kg ha^{-1}) configurou menor produtividade ($8,39 \text{ t ha}^{-1}$), confirmando o alto requerimento do milho por N para maiores produções (BORTOLINI et al., 2001; OHLAND et al., 2005; SOUZA, 2006). Entretanto, nota-se que não houve diferença estatística na produtividade da cultura em resposta às demais doses aplicadas, mesmo quando esta triplicou (de 100 para 300 kg ha^{-1} de N). Um fator que pode ter contribuído para este comportamento é a ausência de proteção foliar, uma vez que, neste ensaio, não foram realizadas pulverizações com fungicida e, portanto, a capacidade fotossintética dos híbridos pode ter sido comprometida, assim como as produções. Visto isto, infere-se que o rendimento de grãos de milho está relacionado não só à disponibilidade de N no solo e à sua absorção pela planta, mas à eficiência de canalização deste macronutriente para o grão e sua transformação em compostos de reserva (MACHADO et al., 1998), ou seja, de nada adianta investir em nutrição vegetal se não é adotado um correto manejo fitossanitário. Essa afirmação é consistente com estudos sobre o efeito do uso de fungicidas no incremento da produtividade de plantas (KÖEHLE et al., 2003; CRUZ, 2009; MORAIS; BRITO, 2011).

TABELA 4. Desempenho produtivo de híbridos de milho, cultivados com baixa tecnologia, em função da adubação nitrogenada. Uberlândia – MG, 2011.

Doses de nitrogênio (kg ha^{-1})	Produtividade (t ha^{-1}) ¹
50	8,39 b
100	8,64 a
150	8,72 a
200	8,53 ab
250	8,67 a
300	8,68 a

¹médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Ressalta-se, neste caso em que a adubação nitrogenada foi significativa, que o teste de Tukey foi aplicado em detrimento à regressão polinomial uma vez que o modelo não se ajustou ($R_L^2 = 34,35\%$).

A importância da proteção foliar sobre o aproveitamento do fertilizante nitrogenado aplicado é evidenciada na Figura 8. Nota-se que, quando foram realizadas as aplicações de fungicida (ensaio de alta tecnologia), os híbridos foram capazes de utilizar melhor a adubação nitrogenada. Assim, independente da dose de N fornecida, a assimilação desse nutriente pelas plantas de milho foi otimizada devido à proteção foliar (controle de doenças) e às alterações fisiológicas promovidas pelo emprego do fungicida (KAISER; BRENDEL-BEHNISCH, 1995; GROSSMANN; RETZLAFF, 1997; GROSSMANN et al., 1999; BRYSON et al., 2000; RAVA, 2002; FAGAN et al., 2010). Este resultado corrobora o encontrado por Ruske et al. (2003) ao estudarem os efeitos de um fungicida à base de estrobilurina na assimilação de N em cultivares de trigo.

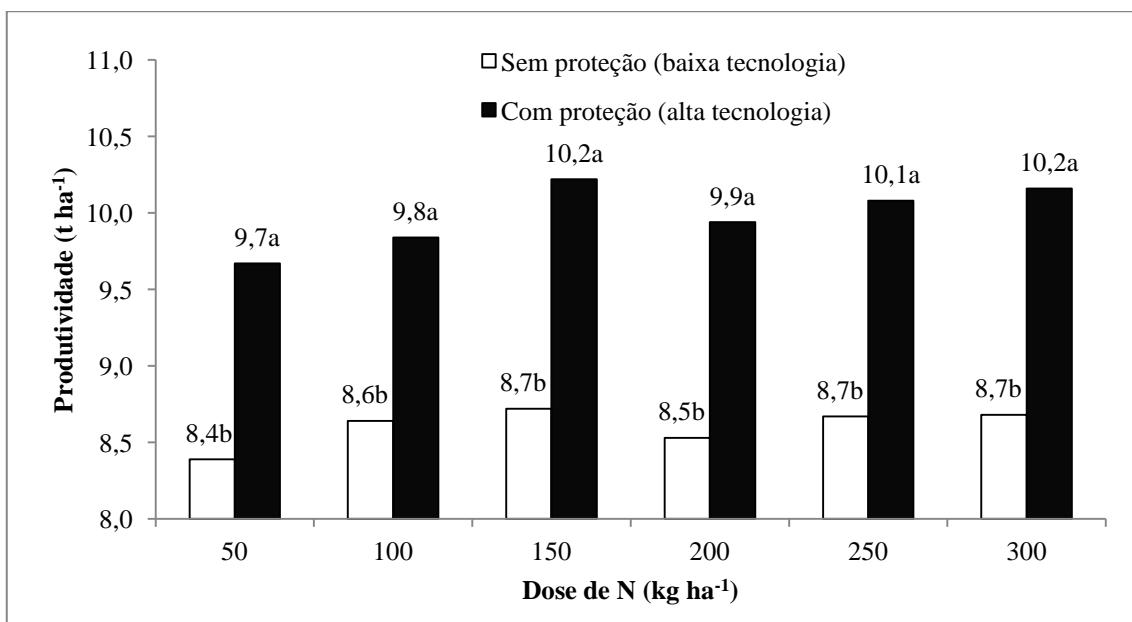


FIGURA 8. Produtividade do milho em função da aplicação de fungicida e da adubação nitrogenada. Uberlândia – MG, 2011¹.

¹médias com letras distintas, para cada dose de nitrogênio, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Apesar do teste *F* da análise conjunta não ter detectado diferença significativa na produtividade do milho em função da aplicação de fungicida e da adubação nitrogenada

(Tabela 5), observa-se, analisando cada dose de N empregada (50, 100, 150, 200, 250 e 300 kg ha⁻¹), que o uso do fungicida pode garantir o retorno do investimento, pois permite aumento médio na produtividade do milho de 14 a 17%, correspondente a, aproximadamente, 1,2 a 1,5 t ha⁻¹ de grãos. Assim, a proteção foliar e os efeitos fisiológicos causados pelo fungicida influenciaram positivamente na eficiência no uso da adubação nitrogenada pelas plantas de milho, afetando o rendimento dos híbridos avaliados. Dessa forma, esse melhor aproveitamento do N pelo milho pode reduzir os custos de produção da lavoura, evitar a degradação dos recursos ambientais e aumentar a produtividade da cultura.

TABELA 5. Resumo da análise conjunta dos dados de produtividade obtidos nos ensaios de alta e baixa tecnologia conduzidos a campo em Iraí de Minas. Uberlândia – MG, 2011.

FV	GL	Produtividade
Híbrido	3	48365385,9384*
Dose de N	5	2495142,7714*
Inoculação	1	36147851,4951*
Proteção	1	273671648,5789*
Híbrido x Dose de N	15	201803,1783 ^{ns}
Híbrido x Inoculação	3	216316,9558 ^{ns}
Híbrido x Proteção	3	24523347,1690*
Dose de N x Inoculação	5	258140,0550 ^{ns}
Dose de N x Proteção	5	317722,4867 ^{ns}
Inoculação x Proteção	1	1560221,6645*
Híbrido x Dose de N x Inoculação	15	91945,9234 ^{ns}
Híbrido x Dose de N x Proteção	15	105917,1574 ^{ns}
Híbrido x Inoculação x Proteção	3	191265,0421 ^{ns}
Dose de N x Inoculação x Proteção	5	101598,2529 ^{ns}
Híbrido x Dose de N x Inoculação x Proteção	15	41968,9573 ^{ns}
Bloco	5	1528514,8013
Resíduo	475	185864,2723
CV (%)		4,64
W ¹		0,994
F ¹		1,676

* e ^{ns}: significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste *F* a 0,05 de significância;

¹W; F: estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente; valores em negrito indicam normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

4.2 Ensaio de Casa de Vegetação

4.2.1 Desenvolvimento das plantas de milho

O desenvolvimento das plantas de milho, em casa de vegetação, foi atribuído apenas à adição de fertilizante nitrogenado ao solo, independentemente da inoculação do híbrido com *Azospirillum*, ao contrário do observado nos ensaios a campo. A dose equivalente a 100 kg ha⁻¹ de N promoveu maior crescimento de parte aérea configurando, portanto, maiores médias de altura (30,01 cm), diâmetro do colmo (14,76 mm) e massa fresca e seca (78,80 g e 7,46 g, respectivamente) (Tabela 6). Por outro lado, na ausência desse nutriente, o sistema radicular apresentou expressivo crescimento. Isso ocorre uma vez que, em ambientes com limitação de N, as raízes tendem a se desenvolver para explorar um maior volume de solo, na tentativa de suprir a deficiência (AGREN; INGESTAD, 1987; PEREZ-LEROUX; LONG, 1994; BONIFAS et al., 2005; BONIFAS; LINDQUIST, 2006).

TABELA 6. Medidas de altura, diâmetro de colmo, acúmulo de massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e volume de raízes de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função de doses de nitrogênio. Uberlândia – MG, 2011.

Dose de nitrogênio (kg ha ⁻¹) ¹	Altura de planta (cm)	Diâmetro do colmo (mm)	MFPA (g)	MFR (g)	MSPA (g)	MSR (g)	Volume de raiz (mL)
0	27,73b	12,84b	50,59c	58,71a	5,93b	2,22a	44,17a
100	30,01a	14,76a	78,80a	53,50ab	7,46a	1,49b	36,38b
200	27,75b	13,10b	62,14b	48,91b	6,37b	1,08c	30,80c

¹médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

A maior dose de N aplicada (equivalente a 200 kg ha⁻¹) apresentou comportamento semelhante à ausência de adubação nitrogenada, exceto quanto ao crescimento radicular (Tabela 6). É possível que a quantidade do fertilizante nos vasos tenha provocado um efeito salino no solo, o que prejudicou o desenvolvimento das plantas de milho quanto às variáveis consideradas. Assim, a dose de 200 kg ha⁻¹ de N provavelmente elevou a concentração eletrolítica da solução do solo nas proximidades das regiões fertilizadas. Segundo Taiz e Zeiger (2006), a alta concentração de sais próxima às sementes ou raízes pode inibir a absorção de água pelas plantas, devido ao

aumento da pressão osmótica que reduz o potencial osmótico e, consequentemente, o potencial hídrico.

Apesar de outros trabalhos citarem benefícios da inoculação com *Azospirillum* no desenvolvimento das plantas (SALAMONE; DÖBEREINER, 1996; MACHADO et al., 1998), o efeito desta prática não foi observado neste estudo, nem mesmo quanto ao desenvolvimento do sistema radicular, cujo crescimento é relatado na literatura em decorrência da produção de fitormônios por essas bactérias (SALAMONE; DÖBEREINER, 1996; OKON; VANDERLEYDEN, 1997). Segundo esses autores, a inoculação modifica a morfologia do sistema radicular das plantas, aumentando não apenas o número de radicelas, mas, também, o diâmetro das raízes laterais e adventícias.

No entanto, neste ensaio, o acúmulo de massas de matéria fresca e seca do sistema radicular e seu volume não foram afetados pelas doses do inoculante. Nesse sentido, as médias variaram de 52,25 a 54,80 g e de 1,57 a 1,62 g de massa fresca e seca do sistema radicular, respectivamente, e de 36,27 a 37,78 mL para o volume das raízes. Na verdade, a inconsistência em trabalhos de inoculação com *Azospirillum* é bastante conhecida e variações no ambiente, solo ou substrato, nas plantas e nos componentes da microflora são consideradas como responsáveis por esta variação entre diferentes experimentos (DOBBELAERE et al., 2001).

Ausência de respostas à inoculação de sementes de milho com *Azospirillum* também são encontradas na literatura. Verona et al. (2010) relatam que não houve diferença significativa para as variáveis altura, massa seca de parte aérea e massa seca de raiz de plantas de milho inoculadas, na presença ou não de fitorreguladores. Da mesma maneira, a aplicação de diferentes doses de inoculante à base dessa bactéria em sementes de milho não promoveu incrementos na massa fresca do sistema radicular e tampouco no acúmulo de massa seca da parte aérea (ROBERTO et al., 2010). Esses resultados confirmam as pesquisas de Campos et al. (1999; 2000) que, trabalhando com a inoculação de *Azospirillum* durante todo o ciclo das culturas do trigo, aveia e do milho, também não encontraram respostas agronômicas favoráveis à associação em nenhum dos parâmetros analisados.

O sucesso dos resultados encontrados na literatura da associação planta-*Azospirillum* está relacionado, na maioria das vezes, a fatores da própria bactéria, como a escolha da estirpe, o número ideal de células por semente e sua viabilidade (OKON; LABANDERA-GONZÁLEZ, 1994).

O híbrido selecionado para este experimento, conforme mencionado, foi obtido do ensaio de campo, no qual foi verificada afinidade das estirpes de *A. brasiliense* presentes no inoculante na associação com os híbridos de milho. Dessa forma, infere-se que a estirpe bacteriana e o genótipo escolhidos foram aptos a associarem-se eficientemente. Porém, com relação ao número ideal de células por semente, Fallik et al. (1988a) e Arsac et al. (1990) propõem que a concentração do *Azospirillum* no inoculante é mais importante que sua dose: níveis acima do ótimo apresentam efeito inibitório no crescimento das plantas inoculadas, enquanto concentrações baixas simplesmente não têm efeito algum no estádio vegetativo.

O produto comercial utilizado neste experimento contém estirpes da bactéria *A. brasiliense*, em concentração mínima de 2×10^8 células viáveis mL^{-1} (conforme preconizado pela Legislação Brasileira). Porém, tem sido reportado que a concentração bacteriana ótima que promove o crescimento de plantas de milho é de 1×10^7 unidades formadoras de colônia semente $^{-1}$ (FALLIK et al., 1988a; FAGES, 1994). Considerando as doses utilizadas neste experimento, 100 e 200 mL ha^{-1} , tem-se concentrações bacterianas teóricas de, aproximadamente, 3×10^5 e 6×10^5 unidades formadoras de colônia semente $^{-1}$, respectivamente. Tais concentrações poderiam, portanto, estar relacionadas à ausência de resposta das plantas de milho à inoculação durante o desenvolvimento inicial (estádio vegetativo). Entretanto, para atingir a concentração ideal de *Azospirillum*, relatada na literatura, seria necessária a aplicação de altos volumes do inoculante líquido, o que poderia comprometer a qualidade das sementes. Para solucionar essa desvantagem, uma opção seria aumentar o número de células bacterianas viáveis por mL^{-1} do inoculante (PUENTE et al., 2009).

Quanto à viabilidade, sabe-se que essas bactérias são sensíveis ao calor, não tolerando longos períodos de temperaturas superiores a 35°C (HUNGRIA, 2011). De acordo com os valores térmicos diários apresentados na Figura 9, a viabilidade do inoculante pode ter sido comprometida devido às elevadas temperaturas registradas na casa de vegetação durante a realização do experimento. Essa justificativa é consistente com o reportado por Venkateswarlu (2007), que afirma que altas temperaturas podem afetar a sobrevivência desses microrganismos no solo.

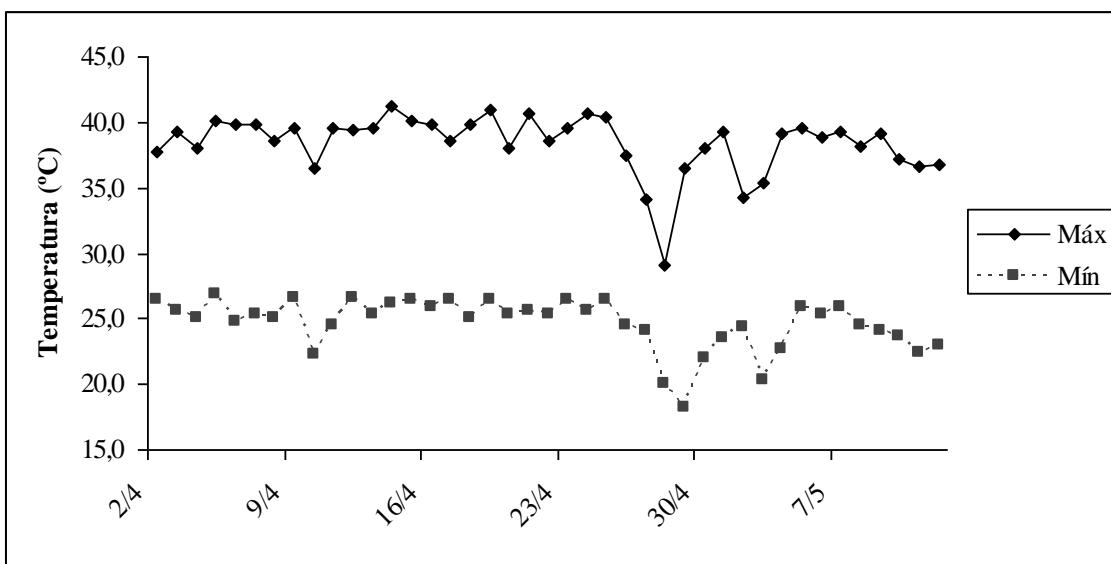


FIGURA 9. Temperaturas máximas e mínimas durante o período de 02 de abril a 12 de maio de 2011 na casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias da UFU em Uberlândia – MG.

Além de fatores associados às bactérias, as respostas à inoculação podem variar também devido às condições de condução dos ensaios, à técnica de inoculação, características físicas e químicas do solo e interações da bactéria com as comunidades de microrganismos nativos do solo (BASHAN et al., 1995a; CHOTTE et al., 2002). Todos esses fatores podem afetar o tamanho da população de *Azospirillum* e, assim, influenciar indiretamente a fixação biológica e a produção de reguladores de crescimento pelas bactérias e, consequentemente, os parâmetros de crescimento das plantas (GADAGI et al., 2004).

Diante do exposto, a colonização de plantas de milho por bactérias diazotróficas pode ser afetada por muitos fatores bióticos e abióticos, sendo que a simples inoculação com estas bactérias não é capaz de garantir a promoção do crescimento vegetal. Dentre os fatores, pode-se destacar, ainda, a presença de N no ambiente. Sabe-se que a atividade e/ou síntese da enzima nitrogenase é inibida na presença de formas combinadas de N, como nitrato e amônia (VANDE BROEK et al., 1992; ZHANG et al., 1997; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Portanto, é provável que as bactérias do gênero *Azospirillum* não tenham um adequado rendimento em solos onde haja altos níveis de fertilizantes (DOBBELAERE et al., 2003).

Neste escopo, Kolb e Martin (1988) relataram que a adição de N mineral em vasos, contendo diversas gramíneas e plantas herbáceas, diminui a atividade da enzima nitrogenase e o número de bactérias diazotróficas presentes. Os autores sugerem que o

decréscimo na proporção de diazotróficos no solo ocorre em virtude de uma supressão competitiva dos microrganismos heterotróficos na presença de formas combinadas de N. Resultado semelhante foi observado por Kirchhof et al. (1997), ao trabalharem com *Herbaspirillum* em gramíneas do gênero *Miscanthus*. Na cultura da cana-de-açúcar, altas doses de adubo nitrogenado causaram efeito negativo sobre a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; MUTHUKUMARASAMY et al., 1999). De maneira geral, os autores consideraram que o fertilizante altera o estado fisiológico da planta, influenciando em sua associação com os microrganismos. Além da diminuição da população de bactérias diazotróficas, recentemente verificou-se que a diversidade destas bactérias também pode ser comprometida pela adição de adubos nitrogenados ao solo (BERGAMASCHI, 2006).

O efeito negativo de elevadas doses de fertilizantes nitrogenados sobre populações de bactérias diazotróficas associadas à cultura do milho também já foi relatado (REIS JÚNIOR et al., 2008b). Hungria (2011), em trabalho com plantas de milho inoculadas, salienta que nos tratamentos que receberam 100% de N fertilizante, o efeito da inoculação com *Azospirillum* foi, em geral, anulado.

Sabe-se que uma soja bem inoculada e fixando N₂ pode deixar cerca de 30 kg ha⁻¹ de N para a cultura seguinte (HUNGRIA et al., 2007). Portanto, considerando o histórico da área na qual o solo deste experimento foi coletado, e os resultados de pesquisa mencionados anteriormente, pode ter ocorrido uma contribuição residual da soja, aumentando a disponibilidade de N no solo e sua absorção pelo milho, o que pode, neste caso, ter afetado a associação das bactérias com as plantas.

Assim, o nível de fertilidade do solo empregado, possivelmente correlacionou-se a uma insignificante ou deletéria resposta do milho à inoculação com *Azospirillum*. Essa justificativa também é consistente com o verificado por Oliveira et al. (2006), que observaram redução na produtividade de cana-de-açúcar devido à inoculação com bactéria diazotrófica em solo de alta fertilidade. Entretanto, sugerem-se que mais estudos sejam conduzidos para determinar o quanto as condições do solo podem afetar a interação entre gramíneas e bactérias diazotróficas.

4.2.2 Características relacionadas ao rendimento

Devido à grande exigência por N, o milho é uma cultura altamente responsiva a esse fertilizante, apresentando incrementos em várias características que podem influenciar na produção final, como o teor de clorofila, acúmulo de N e de fósforo nas plantas (Tabela 7).

Quanto ao teor relativo de clorofila, expresso em ICF (Índice de Clorofila Falker), nota-se, na Tabela 7, que a adição do fertilizante nitrogenado incrementa esta variável, independentemente da dose de N. Resultado semelhante foi obtido por Martins et al. (2008), que verificaram que o teor de clorofila em genótipos de milho foi sensível à disponibilidade de N no ambiente. A previsibilidade desses resultados justifica-se pelo fundamental papel do N no metabolismo das plantas, participando, diretamente, na biossíntese de proteínas e clorofilas.

Seguindo esse mesmo padrão de comportamento, o acúmulo de nutrientes nas plantas de milho também foi maior devido à adubação nitrogenada. No caso do nitrogênio, seu teor praticamente dobrou em relação ao controle, variando de 28,34 a 58,17 g de N kg⁻¹ de matéria seca (Tabela 7). Isso ocorre uma vez que o teor de N nas plantas é muito influenciado pela adubação nitrogenada (KILLORN; ZOURARAKIS, 1992), refletindo a disponibilidade desse nutriente no solo.

O fósforo também é um importante elemento requerido pelas plantas. Participe de vários processos no metabolismo vegetal, como divisão celular, fotossíntese, oxidações biológicas, transferência de energia e assimilação de nutrientes pelas plantas (GAUR, 2002). Conforme observado na Tabela 7, o teor de fósforo nas plantas de milho aumentou em função do fornecimento de N via adubação. Esse resultado sugere que a maior ou menor disponibilidade de N pode exercer efeito na assimilação de P. Interações sinergísticas entre esses nutrientes já foram identificadas na cultura do milho (MACHADO et al., 2004), sendo que, para Büll (1993), é marcante a influência do N na maior absorção de P pelo milho. À semelhança dos dados apresentados nesse experimento, Reis Júnior et al. (2008b) também verificaram que aumentos na dose de N resultaram em maior acúmulo de N e P nas plantas de milho.

TABELA 7. Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função de doses de nitrogênio. Uberlândia – MG, 2011.

Dose de nitrogênio (kg ha ⁻¹) ¹	Clorofila ²	N ³	P ³
0	34,72b	28,34b	5,04b
100	61,55a	55,52a	7,96a
200	61,78a	58,17a	7,65a

¹médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²médias expressas em ICF (Índice de Clorofila Falker);

³médias expressas em g do nutriente kg⁻¹ de tecido seco (parte aérea + raízes).

O estímulo que as bactérias exercem sobre as plantas e seu potencial para atuar tanto como fixadoras como produtoras de fitormônios são influenciados por diversas variáveis, tais como o tipo de solo, nutrição, temperatura e comunidades microbianas presentes no solo. Diante disto, nas condições deste ensaio, os teores de clorofila, nitrogênio e fósforo nas plantas de milho não foram influenciados pela inoculação das sementes com *Azospirillum* não configurando, portanto, respostas nas características analisadas.

Os teores de clorofila, nitrogênio e fósforo variaram, respectivamente, de 50,58 a 54,25 ICF, 46,32 a 47,96 g de N kg⁻¹ de tecido seco e 6,69 a 7,11 g de P kg⁻¹ de tecido seco. Resultado contrastante, no entanto, foi obtido por Bashan et al. (2006) ao trabalharem com a inoculação desta bactéria em plantas de trigo. Esses autores relatam incremento em vários pigmentos fotossintéticos nas plantas inoculadas, tais como os teores relativos de clorofila a e b. Experimentos conduzidos a campo, também com a cultura do trigo, evidenciaram aumento na absorção de N e P em virtude da associação das plantas com bactérias promotoras do crescimento (GALAL et al., 2000; PANWAR; SINGH, 2000), possivelmente devido ao maior desenvolvimento radicular. A inoculação com *A. brasiliense*, em condições de casa de vegetação, também promoveu substancial aumento na assimilação de nitrogênio em plantas e grãos de trigo (ISLAM et al., 2002).

Conforme discutido anteriormente, as plantas de milho não apresentaram significativo crescimento quanto às doses do inoculante aplicadas. Dessa forma, não foram capazes de acumular maiores teores de nutrientes. Por outro lado, a adubação nitrogenada configurou incrementos no crescimento vegetativo e na assimilação de nitrogênio e de fósforo. Esses resultados condizem com o apresentado por Mendonça et

al. (2006) que, trabalhando com a inoculação de milho com uma mistura de bactérias diazotróficas, encontraram que o acúmulo de N na cultura foi decorrente da variabilidade genotípica das plantas em extrair N do solo e não devido à contribuição microbiana. Hungria et al. (2010) tampouco verificaram diferenças no conteúdo de nutrientes nas folhas de plantas de milho inoculadas com espécies de *Azospirillum*.

Diante do exposto, Pedrinho (2009) relata que, possivelmente, as contribuições decorrentes de interações do milho com microrganismos são pouco notadas por esta se tratar de uma planta com uma competente estratégia fisiológica (metabolismo C4).

4.2.3 Atividade enzimática

Semelhantemente aos resultados observados para as demais características avaliadas, as atividades das enzimas, no solo cultivado com milho, foram influenciadas apenas pela adição de fertilizante nitrogenado. Em comparação ao controle, a maior dose de N aplicada (200 kg ha^{-1}) configurou aumentos nas atividades da urease e da fosfatase ácida de 67 e 9%, respectivamente (Tabela 8).

TABELA 8. Atividades das enzimas urease ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$) e fosfatase ($\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$) em solo cultivado com milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função de doses de nitrogênio. Uberlândia – MG, 2011.

Dose de nitrogênio (kg ha^{-1}) ¹	Urease	Fosfatase ²
0	56,72 b	275,15 ab
100	45,52 b	267,47 b
200	94,84 a	301,24 a

¹médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²dados transformados segundo \sqrt{x} .

A partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que a maior dose de N estimulou o crescimento microbiano na rizosfera, refletido pelo aumento das atividades das enzimas. Assim, houve uma maior ciclagem de nutrientes pelos microrganismos, aumentando a disponibilidade de NH_3 e fósforo inorgânico (BADALUCCO; NANNIPIERI, 2007). Compant et al. (2010) demonstraram que a disponibilidade de nutrientes afeta significativamente a composição e liberação de exsudatos pelas raízes das plantas, com efeitos diretos sobre a microbiota do solo. Neste contexto, além da comunidade microbiana, estudos relatam que a atividade dos microrganismos também

pode ser modificada pela fertilização (KANCHIKERIMATH; SINGH, 2001; CHU et al., 2007; HE et al., 2007).

Baligar et al. (1991) e Cookson e Lepiece (1996) reportaram que a atividade da urease está relacionada ao teor de N no solo, o que corrobora os resultados apresentados neste experimento. Na maior dose de N aplicada (200 kg ha^{-1}), alguns autores já obtiveram aumento de 94% na atividade dessa enzima, em comparação ao solo cultivado com *Eucalyptus dunnii* Maiden que não recebeu fertilização (WANG et al., 2008). Kakhki et al. (2008) também observaram aumento na atividade da urease após adubação nitrogenada, seguida de sua sensível diminuição com o decorrer do tempo.

Com relação à atividade da enzima fosfatase ácida, seu aumento pode ser atribuído não apenas ao maior crescimento microbiano na rizosfera, mas também à maior taxa de produção dessa enzima pela microbiota (GRAHAM; HAYNES, 2005). Isso se deve a uma possível acidificação do solo pelo emprego do fertilizante nitrogenado (em virtude da nitrificação do sulfato de amônio e do nitrato de amônio aplicados) que pode ter favorecido a atividade da fosfatase ácida. Assim, de maneira geral, diversos estudos demonstram que a fertilização do solo com nitrogênio aumenta as atividades da urease e da fosfatase ácida (SAIYA-CORK et al., 2002; GRAHAM; HAYNES, 2005; ALLISON et al., 2006), com incrementos variando, em média, de 7 a 56% (SAIYA-CORK et al., 2002).

Embora a inoculação das sementes de milho com as bactérias do gênero *Azospirillum* não tenha apresentado efeitos sobre as enzimas do solo, Perotti e Pidello (1999) constataram a influência dessas bactérias sobre a enzima urease em Latossolo Roxo esterilizado e não-estéril. Segundo esses autores, com o decorrer do tempo, há um aumento na atividade da urease no solo esterilizado e inoculado, enquanto o oposto é observado no solo não-estéril. Essa diferença foi atribuída à possível competição das bactérias com microrganismos nativos e à presença de amônia no solo, que afetaram o desempenho bacteriano (PEROTTI; PIDELLO, 1999). Além de verificar resposta positiva à urease, Patil (2005) também reporta a capacidade de isolados de *Azospirillum* em solubilizar fosfato, através da atividade *in vitro* da enzima fosfatase. Essa habilidade de algumas bactérias do gênero *Azospirillum* já havia sido demonstrada por Seshadri et al. (2000) ao trabalharem com estirpes de *A. halopraeferens*.

4.2.4 Relação massa seca de parte aérea/massa seca de raiz

Considerando a relação de desenvolvimento entre a parte aérea e o sistema radicular das plantas de milho, observou-se interação significativa entre as doses de N e as doses de inoculante aplicadas. De acordo com os dados apresentados na Tabela 9, nota-se que o aumento na adubação nitrogenada configura maior crescimento de parte aérea, com destaque para a dose de 200 kg ha⁻¹ de N, principalmente quando associada à maior dose de *Azospirillum* (equivalente a 200 mL ha⁻¹). Nessa condição, as plantas de milho são capazes de desenvolver 7,01 g de parte aérea por unidade de raiz formada, refletindo uma maior eficiência na utilização dos recursos disponíveis para seu crescimento. Relação inversa, no entanto, ocorre na ausência de N, independentemente da inoculação das plantas.

TABELA 9. Relação massa seca de parte aérea/massa seca de raiz de plantas de milho em função de doses de nitrogênio e da inoculação com *Azospirillum*. Uberlândia – MG, 2011.

Dose de nitrogênio (kg ha ⁻¹) ¹	Dose de <i>Azospirillum</i> (mL ha ⁻¹)		
	0	100	200
0	2,65A b	2,93A b	2,65A c
100	5,25A a	5,11A a	5,23A b
200	5,87B a	5,48B a	7,01A a

¹médias seguidas por letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Os resultados apresentados sugerem que, em condições limitadas de suprimento de N, as plantas fracionam uma maior proporção de seu crescimento para formação de sistema radicular, conforme reportado por vários autores (AGREN; INGESTAD, 1987; EGHBALL et al., 1993; PEREZ-LEROUX; LONG, 1994; BONIFAS et al., 2005). O investimento em raízes, entretanto, ocorre em detrimento à formação de parte aérea (BONIFAS; LINDQUIST, 2006). No caso do milho, o comprometimento da área foliar não é desejável, pois pode resultar em baixas produtividades.

O efeito da dose do inoculante (200 mL ha⁻¹ associado à dose de 200 kg ha⁻¹ de N) sugere que, em solos com alta disponibilidade de N, o *Azospirillum* pode melhorar a assimilação de nutrientes pelas plantas de milho, direcionando-os para formação de parte aérea, embora, nesse experimento, não tenham sido constatados maiores teores de N e de P nas plantas inoculadas. Essa justificativa é consistente com o reportado por

Stancheva et al. (1992) que afirmam que o aumento da taxa de acúmulo de matéria seca em plantas de milho inoculadas com *A. brasiliense* ocorre, principalmente, na presença de elevadas doses de N, o que parece estar relacionado com o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação desse nutriente. Possivelmente, a maior taxa de absorção está relacionada a modificações na morfologia do sistema radicular, as quais podem estar relacionadas à produção de fitormônios pela bactéria, conforme abordado em outros estudos (DOBBELAERE et al., 2001; BASHAN et al., 2004; ROESCH et al., 2007).

Apesar de todo o embasamento científico utilizado na discussão dos fatores que podem ter interferido nas respostas das plantas à inoculação, é interessante ressaltar que as diferenças apresentadas nesse estudo, principalmente entre os ensaios conduzidos a campo e em casa de vegetação, podem estar relacionadas ao estádio de desenvolvimento das plantas avaliadas. Postula-se na literatura que, em plantas de milho crescidas no campo, a infecção dos tecidos das raízes e colmos por essas bactérias ocorre apenas no período reprodutivo das plantas (MAGALHÃES et al., 1979), período em que também se observam as maiores taxas de atividade da nitrogenase (enzima responsável pela redução de N₂ a NH₃). Observações semelhantes já foram relatadas para o trigo (KAVIMANDAN et al., 1978) e para o arroz (WATANABE; BARRAQUIO, 1979). Cabe ressaltar, que a infecção do interior das raízes de gramíneas não é característica generalizada das estirpes de *A. brasiliense* e parece restrita à linhagem Sp245 (BALDANI et al., 1987; HARTMANN et al., 1995). Dentro da planta, as bactérias ficam livres da competição com os demais habitantes da rizosfera e as trocas de nutrientes entre estas e a planta hospedeira se tornam muito mais efetivas. Corroborando estes estudos, Andreote (2007) sugere que as plantas, durante o estádio vegetativo de desenvolvimento, liberam exsudatos radiculares ricos em proteínas e carboidratos, que podem alterar a quantidade desta bactéria no solo. Com o tempo, o estádio reprodutivo é atingido, o que permite a recomposição destas bactérias na rizosfera e a colonização/infecção dos tecidos vegetais, uma vez que as raízes das plantas apresentam menor atividade suprimindo os microrganismos heterotróficos. Visto isto, podem-se justificar os efeitos benéficos observados no ensaio de campo quanto à produtividade da cultura e a insignificante ou não expressiva contribuição do *Azospirillum* no ensaio em casa de vegetação.

4.3 Ensaio Residual

O desenvolvimento das plantas de milho, após nova semeadura, foi atribuído apenas ao residual do fertilizante nitrogenado no solo, demonstrando que não houve nenhuma contribuição residual do inoculante utilizado. Na verdade, já se esperava esse resultado uma vez que, de maneira geral, a inoculação com *Azospirillum* não interferiu no desenvolvimento das plantas de milho no ensaio anterior, conforme discutido.

Nos tratamentos com a prévia aplicação das doses de 100 e 200 kg ha⁻¹ de N, houve incremento em todos os caracteres vegetativos analisados, enquanto que, na ausência do fertilizante, notou-se menor desenvolvimento vegetativo das plantas (Tabela 10). Este comportamento demonstra a importância do N para as culturas, uma vez que é um macronutriente essencial. Além de ser constituinte dos aminoácidos livres e protéicos, o N está presente em outros compostos importantes, como as bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas) e os ácidos nucléicos (DNA e RNA), fundamentais à divisão celular e, portanto, à formação e ao crescimento do sistema radicular e da parte aérea das plantas (CONN; STUMPF, 1980; MENGEL; KIRKBY, 2001).

TABELA 10. Medidas de altura, diâmetro de colmo, acúmulo de massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e volume de raízes de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de doses de nitrogênio. Uberlândia – MG, 2011.

Dose de nitrogênio (kg ha ⁻¹) ¹	Altura de planta ² (cm)	Diâmetro do colmo (mm)	MFPA ² (g)	MFR ² (g)	MSPA ³ (g)	MSR (g)	Volume de raiz (mL)
0	10,83b	5,92b	5,24b	11,14b	0,57b	0,40c	8,45b
100	22,77a	10,20a	25,16a	14,87a	2,52a	0,75a	14,28a
200	20,69a	9,84a	23,72a	13,38ab	2,52a	0,60b	12,46a

¹médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²dados transformados segundo $\sqrt{x + 0,5}$;

³dados transformados segundo $\sqrt{x + 1}$.

Esta cultura, que demanda grande quantidade de N, apresenta alta resposta à adubação nitrogenada, o que sugere que a interação de microrganismos diazotróficos com as plantas de milho não seja um sistema natural muito eficiente de aporte de N. Os resultados de pesquisa já apresentados mostraram que a resposta à inoculação é bastante

variável e parece ser dependente de vários fatores, incluindo a temperatura, o estádio de desenvolvimento das plantas e a microbiota do solo.

Com relação às variáveis teor de clorofila e conteúdo de nitrogênio das plantas de milho, observa-se comportamento semelhante ao descrito no ensaio anterior. Maiores médias foram obtidas com o residual da adubação nitrogenada, até 60,56 ICF e 57,62 g de N kg⁻¹ de matéria seca (Tabela 11). Por outro lado, não houve diferença significativa quanto às doses de inoculante aplicadas. Nesse caso, o teor de clorofila variou de 42,42 a 46,85 ICF e o teor de nitrogênio de 41,17 a 41,65 g kg⁻¹. O teor de fósforo não foi influenciado pelo residual dos tratamentos.

TABELA 11. Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de doses de nitrogênio. Uberlândia – MG, 2011.

Dose de nitrogênio (kg ha ⁻¹) ¹	Clorofila ^{2,3}	N ⁴	P ^{4,5}
0	22,04c	21,15c	6,66a
100	53,09b	45,30b	5,61a
200	60,56a	57,62a	6,01a

¹médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²médias expressas em ICF (Índice de Clorofila Falker);

³dados transformados segundo \sqrt{x} ;

⁴médias expressas em g do nutriente kg⁻¹ de tecido seco (parte aérea + raízes);

⁵dados transformados segundo $\sqrt{x + 1}$.

Por fim, a Tabela 12 evidencia que as atividades das enzimas urease e fosfatase, no solo, não foram influenciadas pelos resíduos da adubação nitrogenada e tampouco da inoculação. Este resultado sugere que houve um declínio na população de microrganismos associados à rizosfera e, portanto, na atividade dessas enzimas, possivelmente devido à utilização dos nutrientes pelas plantas de milho.

TABELA 12. Atividades das enzimas urease ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$ solo seco h^{-1}) e fosfatase ($\mu\text{g PNP g}^{-1}$ solo seco h^{-1}) em solo cultivado com milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de nitrogênio e de *Azospirillum*. Uberlândia – MG, 2011.

Dose de nitrogênio (kg ha⁻¹)¹	Dose de <i>Azospirillum</i> (mL ha⁻¹)			Médias
	0	100	200	
Urease				
0	65,32	66,21	67,70	66,41 a
100	60,43	56,89	63,70	60,34 a
200	46,43	68,58	58,12	57,71 a
Médias	57,39 A	63,89 A	63,17 A	
Fosfatase				
0	268,11	258,01	250,58	258,90 a
100	269,54	289,31	277,21	278,69 a
200	276,75	264,53	299,40	280,22 a
Médias	271,47 A	270,62 A	275,73 A	

¹médias seguidas por letras iguais, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

A priori, esse ensaio foi conduzido objetivando verificar o possível efeito residual das bactérias do gênero *Azospirillum* sobre plantas de milho, partindo do pressuposto de que são capazes de desenvolver mecanismos de sobrevivência quando submetidas a condições adversas, mesmo na ausência da planta hospedeira. A sobrevivência dessas bactérias depende, em grande parte, das condições do solo, principalmente quanto à sua composição química e granulométrica (BASHAN et al., 1995b) e à presença de microrganismos heterotróficos (PEROTTI; PIDELLO, 1999). Neste escopo, Bashan et al. (1995b) concluem que a *A. brasiliense* sobrevive pouco na maioria dos solos por períodos prolongados, sendo que a remoção da planta hospedeira afeta direta e rapidamente o nível da população.

No entanto, neste experimento é difícil definir se a viabilidade do *Azospirillum* foi comprometida desde o primeiro ensaio ou se estas bactérias de fato não possuem efeito residual para a próxima cultura. Assim, novos estudos devem ser realizados, preferencialmente considerando todo o ciclo do milho, para determinar a necessidade de re-inoculação e a possível contribuição residual dessas bactérias no crescimento e produtividade do próximo cultivo ou, até mesmo, da próxima safra.

5 CONCLUSÕES

A inoculação de plantas de milho com *Azospirillum brasiliense* é uma tecnologia promissora capaz de incrementar significativamente a produtividade da cultura, em sistemas de alto e baixo investimento. A adoção desta prática não substitui o uso de fertilizantes nitrogenados e tampouco permite sua redução de dose.

A adição de fertilizantes nitrogenados promove maior desenvolvimento das plantas de milho, incrementa os teores de clorofila e de nutrientes e aumenta a atividade das enzimas relacionadas à disponibilização de amônia e fósforo inorgânico na rizosfera. Além disso, apresenta efeito residual no desenvolvimento das plantas na semeadura subsequente.

REFERÊNCIAS

- AGREN, G.I.; INGESTAD, T. Root:shoot ratio as a balance between nitrogen productivity and photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.10, p.579-586, 1987.
- ALLISON, S.D.; NIELSEN, C.; HUGHES, R.F. Elevated enzyme activities in soils under the invasive nitrogen-fixing tree *Falcataria moluccana*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.38, p.1537-1544, 2006.
- ALVES, B.R.J.; DODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, v.252, p.1-9, 2003.
- ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 184f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.
- APP, A.A. et al. The effect of cultivated and wild rice varieties on the nitrogen balance of flooded soil. **Soil Science**, Baltimore, v.141, p.448-452, 1986.
- ARAÚJO, S.C. Realidade e perspectivas para o uso de *Azospirillum* na cultura do milho. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.122, p.4-6, 2008.
- ARSAC, J.F. et al. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. **Agronomie**, Paris, v.10, p.640-654, 1990.
- ASSMUS, B. et al. *In situ* localization of *Azospirillum brasiliense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1013-1019, 1995.
- AWIKA, J.M. Major cereal grains production and use around the world. In: AWIKA, J.M.; PIIRONEN, V.; BEAN, S. (eds.) **Advances in cereal science**: implications to food processing and health promotion. Washington: ACS Symposium Series; American Chemical Society, 2011. v.1089. p.1-13.
- AZEVEDO, P.T.M. **Minhocas, fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em mudas de Araucaria angustifolia**. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.
- BADALUCCO, L.; NANNIPIERI, P. Nutrient transformations in the rhizosphere. In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. (eds.) **The rhizosphere**: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Boca Raton/London/New York: CRC Press, 2007. 2. ed. p.111-133.
- BALDANI, J.I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.29, p.911-922, 1997.
- BALDANI, J.I. et al. **Biotecnologia**: avanços na agricultura e na agroindústria.

Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433p.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of fieldgrown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.4, n.1, p.37-40, 1987.

BALIGAR, V.C.; STALEY, T.E.; WRIGHT, R.J. Enzyme activities in Appalachian soils: Urease. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.22, n.3, p.315-322, 1991.

BÄNZIGER, M.; LAFITTE, H.R. Efficiency of secondary traits for improving maize for low-nitrogen target environments. **Crop Science**, Madison, v.37, p.1110-1117, 1997.

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

BARTCHECHEN, A. et al. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L.). **Campo Digit@l**, Campo Mourão, v.5, n.1, p.56-59, 2010.

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

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by using the plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.6, p.2637-2643, 2002.

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

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

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

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.36, p.591-603, 1990.

BASHAN, Y. et al. Soil parameters which affect the survival of *Azospirillum brasiliense*. In: FENDRIK, I. et al. (eds.) *Azospirillum and related microorganisms*. Germany: Springer Verlag, 1995a. p.441-450.

BASHAN, Y. et al. Survival of *Azospirillum brasiliense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.5, p.1938-1945, 1995b.

BELIMOV, A.A. et al. Relationship between survival rates of associative nitrogen-fixers on roots and yield response of plants to inoculation. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.17, n.3, p.187-196, 1995.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.84, n.1, p.11-18, 2009.

BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

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

BODDEY, R.M. et al. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.29, p.787-799, 1997.

BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, The Hague, v.42, n.1, p.241-250, 1995.

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

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

BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N-labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, The Hague, v.90, p.265-292, 1986.

BONIFAS, K.D.; LINDQUIST, J.L. Predicting biomass partitioning to root versus shoot in corn and velvetleaf. **Weed Science**, Champaign, v.54, p.133-137, 2006.

BONIFAS, K.D. et al. The effects of nitrogen supply on root:shoot ratio in corn and velvetleaf. **Weed Science**, Champaign, v.53, p.670-675, 2005.

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

BRYSON, R.J.; LEANDRO, L.; JONES, D.R. The physiological effects of kresoxim-methyl on wheat leaf greenness and the implication for crop yield. In: **PROCEEDINGS**

OF THE RIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE - PESTS AND DISEASES, 2000, Farnham. **Proceedings...** Farnham: British Crop Protection Council, 2000. p.739-747.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2000. 1367p.

BÜLL, L.T. Nutrição mineral do milho. In: BÜLL, L.T.; CANTARELLA, H. (eds.) **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafós, 1993. p.63-145.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. In: SUBBA RAO, N.S.; DOMMERGUES, Y.R. (eds.) **Microbial interaction in agriculture and forestry**. Enfield: Science Publishers, 2000. v.3. p.229-250.

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasiliense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.29, p.923-929, 1997.

BURDMAN, S. et al. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. (eds.) **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.609-612.

BURDMAN, S. et al. Promotion of nod-gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillum brasiliense* Cd. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.3030-3033, 1996.

CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M.A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasiliense* under temperate climate. **Symbiosis**, Philadelphia, v.13, p.243-253, 1992.

CAMPOS, B.C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante "Graminante" nas culturas de trigo e aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.401-407, 1999.

CAMPOS, B.C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante "Graminante" na cultura de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.4, p.713-715, 2000.

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

CARDOSO, M.J. et al. Performance produtiva do milho em relação a doses de nitrogênio e a população de plantas no sistema semeadura direta nos cerrados do município de Baixa Grande do Ribeiro, PI. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008. Brasília. **Anais...** Brasília: ParlaMundi, 2008.

CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice

dwarf mutants. **Plant Physiology**, Washington, v.125, n.4, p.2053-2058, 2001.

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

CHELA, G.S. et al. Effect of bacterial cultures and nitrogen fertility on the yield and quality of maize fodder (*Zea mays* L.). **Annals of Biology**, India, v.9, p.83-86, 1993.

CHOTTE, J. et al. Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.34, p.1083-1092, 2002.

CHU, H. et al. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.39, n.11, p.2971-2976, 2007.

COELHO, A.M. et al. Nutrição e adubação do milho. In: CRUZ, J.C. (eds.) **Sistema de Produção**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010. Versão eletrônica. (Documentos EMBRAPA-CNPMS). Disponível em:
<http://www.cnpmes.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/feraduba.htm>. Acesso em: 21 out. 2011.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.42, p.669-678, 2010.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. Terceiro levantamento, Brasília: Conab, 2011. 39p.

CONCEIÇÃO, P.M. et al. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1880-1883, 2009.

CONN, E.E; STUMPF, P.K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1980. 525p.

COOKSON, P.; LEPICE, G.L. Urease enzyme activity of soils of the Batinah region of Sultanate of Oman. **Journal of Arid Environments**, London, v.32, n.3, p.225-238, 1996.

CRUZ, F.A.B. **Produtividade e componentes de produção do milho safrinha no cerrado em função de nitrogênio, cobre, manganês e fungicida**. 2009. 124f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, 2009.

DALLA SANTA, O.R. et al. *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n.6, p.843-850, 2004.

DEL GALLO, M.; FABBRI, P. Inoculation of *Azospirillum brasiliense* Cd on chickpea

- (*Cicer arietinum*). **Symbiosis**, Philadelphia, v.9, p.283-287, 1990.
- DEL GALLO, M.; FENDIRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: OKON, Y. (eds.) **Azospirillum Plant associations**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.57-75.
- DENBINSKI, E.; RAFALSKI, A.; WISNIEWSKA, I. Effect of long-term selection for high and low protein content on the metabolism of aminoacids and carbohydrate in maize kernel. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v.29, p.549-557, 1991.
- DE-POLLI, H. et al. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.9, p.119-123, 1977.
- DIDONET, A.D. **Resultados de pesquisa sobre inoculação de trigo, de cevada e de milho com bactérias do gênero Azospirillum**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1998. 10p. (EMBRAPA-CNPT. Pesquisa em Andamento, 4).
- DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasiliense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, p.645-651, 1996.
- DOBBELAERE, S. et al. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.28, p.871-879, 2001.
- DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasiliense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, The Hague, v.212, n.2, p.153-162, 1999.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **CRC Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v.22, n.2, p.107-149, 2003.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E.J.B.N. (eds.) **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992. p.173-180.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/Itaguará: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.T. (eds.) **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State University, 1976. v.2. p.518-538.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Science Tech. Madison: Springer, 1987. 155p. (Brock/Springer series in contemporary bioscience).
- DOMMELEN, V.A. et al. (Methyl) ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasiliense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180,

p.2652-2659, 1998.

DUARTE, A.P. **Resposta de cultivares de milho ao nitrogênio no sistema plantio direto e sua influência na qualidade dos grãos.** 2003. 174f. Tese (Doutorado em Agronomia (Solos e Nutrição de Plantas)) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

EADY, R.R. Enzymology in free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W.J.; PUHLER, S. (eds.) **Nitrogen Fixation: molecular biology.** Oxford: Clarendon Press, 1986. v.4. p.1-49.

ECKERT, B. et al. *Azospirillum doebereinerae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, p.17-26, 2001.

EGHBALL, B. et al. Fractal analysis for morphological description of corn roots under nitrogen stress. **Agronomy Journal**, Madison, v.85, p.287-289, 1993.

ELMERICH, C.; NEWTON, W.E. **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations.** Netherlands: Springer, 2007. 321p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos.** Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes.** 2. ed. rev. ampl. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627p.

ERNANI, P.R. **Química do solo e disponibilidade de nutrientes.** Lages: Graphel, 2008. 230p.

FAGAN, E.B. et al. Efeito da aplicação de piraclostrobina na taxa fotossintética, respiração, atividade da enzima nitrato redutase e produtividade de grãos de soja. **Bragantia**, Campinas, v.69, n.4, p.771-777, 2010.

FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: OKON, Y. (eds.) **Azospirillum Plant Associations.** Boca Raton: CRC Press, 1994. p.88-105.

FAGES, J.; ARSAC, J.F. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v.137, p.87-90, 1991.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA Ltda. **Manual do medidor eletrônico de teor de clorofila (ClorofiLOG / CFL 1030).** Porto Alegre: Falker Automação Agrícola, 2008. 33p.

FALLIK, E.; OKON, Y.; FISCHER, M. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.20, p.45-49, 1988a.

FALLIK, E. et al. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum*

brasiliense inoculated maize roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.21, p.147-153, 1988b.

FALLIK, E.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.12, p.511-515, 1996.

FANCELLI, A.L. **Fisiologia, nutrição e adubação do milho para alto rendimento.** Piracicaba: ESALQ/USP, 2003. 9p.

FERNANDES, L.A. et al. Preparo do solo e adubação nitrogenada na produtividade do milho em latossolo sob vegetação de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.22, p.247-254, 1998.

FERREIRA, D.F. Programa Sisvar.exe. **Sistema de Análises de Variância**. Versão 5.3. 2003.

FILHO, J.P.R.A. et al. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p.467-473, 2005.

FISCHER, S.E.; MIGUEL, M.J.; MORI, G.B. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasiliense* Cd under saline stress. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.219, p.53-62, 2003.

FUENTES-RAMÍREZ, L.E. et al. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, The Hague, v.154, n.2, p.145-150, 1993.

FULCHIERI, M.; FRIONI, L. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.26, p.921-923, 1994.

GADAGI, R.S. et al. The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.100, p.323-332, 2004.

GALAL, Y.G.M. et al. Non-isotopic method for the quantification of biological nitrogen fixation and wheat production under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.32, p.47-51, 2000.

GALLOWAY, J.N. et al. The nitrogen cascade. **Bioscience**, Washington, v.53, n.4, p.341-356, 2003.

GARCIA, J.C.; MATTOSO, M.J.; DUARTE, J.O. Importância do milho em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.233, p.7-12, 2006.

GAUR, A.C. Microbial mineral phosphate solubilization: an over view. In: **NATIONAL SYMPOSIUM ON MINERAL PHOSPHATE SOLUBILIZATION**, 1., 2002. Dharwad. **Proceedings...** Dharwad: University of Agricultural Sciences, p.1-3.

2002.

GAUT, B.S. et al. Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.97, n.13, p.7008-7015, 2000.

GRAHAM, M.H.; HAYNES, R.J. Organic matter accumulation and fertilizer-induced acidification interact to affect soil microbial and enzyme activity on a long-term sugarcane management experiment. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.41, p.249-256, 2005.

GROSSMANN, K.; KWIATKOWSKI, J.; CASPAR, G. Regulation of phytohormone levels, leaf senescence and transpiration by the strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.154, p.805-808, 1999.

GROSSMANN, K.; RETZLAFF, G. Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Pesticide Science**, Oxford, v.50, n.1, p.11-20, 1997.

GUAN, S.Y. **Soil enzyme and its methodology**. Beijing: China Agricultural Press, 1986. p.274-340.

HARPER, J.E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K.J.; BENNETT, J.M.; SINCLAIR, T.R. (eds.) **Physiology and determination of crop yield**. Madison: American Society of Agronomy: Crop Science Society of America: Soil Science Society of America, 1994. p.285-302.

HARTMANN, A. et al. Use of molecular probes to study *Azospirillum*-plant interactions. In: **INTERNATIONAL WORKSHOP ON ASSOCIATIVE INTERACTIONS OF NITROGEN-FIXING BACTERIA WITH PLANTS**, 1995. Saratov. **Proceedings...** Saratov: Ignatov V., p.59-63, 1995.

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

HARTMANN, A; BALDANI, J.I. The genus *Azospirillum*. In: DWORKIN, M. et al. (eds.) **The Prokaryotes**. New York: Springer, 2006. p.115-140.

HAUWAERTS, D. et al. A major chemotaxis gene cluster in *Azospirillum brasiliense* and relationships between chemotaxis operons in alfa-proteobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.208, p.61-67, 2002.

HE, J.Z. et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.9, n.9, p.2364-2374, 2007.

HECHT-BUCHHOLZ, C. The apoplast-habitat of endophytic dinitrogen-fixation bacteria and their significance for the nitrogen nutrition of nonleguminous plants. **Zeitschrift fuer Pflanzenernährung und Bodenkunde**, Germany, v.161, p.509-520, 1998.

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

HUERGO, LF. **Regulação do metabolismo de nitrogênio em *Azospirillum brasiliense***. 2006. 187f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasiliense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2011. 36p. (Documentos EMBRAPA-SOJA, ISSN 1516-781X, n.325).

HUNGRIA, M. et al. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.33, p.387-394, 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2007. 80p. (Documentos EMBRAPA-SOJA, ISSN 1516-781X, n.283).

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

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.17, n.10, p.1078-1085, 2004.

ISLAM, N.; RAO, C.V.S.; KENNEDY, I.R. Facilitating a N₂-fixing symbiosis between diazotrophs and wheat. In: KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A. (eds.) **Biofertilisers in action**. Canberra: Rural Industries Research and Development Corporation, 2002. p.84-93.

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

JETIYANON, K.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. **Biological Control**, Orlando, v.24, p.285-291, 2002.

KAISER, W.M.; BRENDLE-BEHNISCH, E. Acid-base-modulation of nitrate reductase in leaf tissues. **Planta**, Berlin, v.196, n.1, p.1-6, 1995.

KAKHKI, F.V.; HAGHNIA, G.; LAKZIAN, A. Effect of enriched sewage sludge on soil urease activity. **Soil and Environment**, Pakistan, v.27, n.2, p.143-147, 2008.

KANCHIKERIMATH, M.; SINGH, D. Soil organic matter and biological properties after 26 years of maize-wheat-cowpea cropping as affected by manure and fertilization in a Cambisol in semiarid region of India. **Agriculture, Ecosystems and Environment**,

Amsterdam, v.86, n.2, p.155-162, 2001.

KAVIMANDAN, S.K; SUBBA-RAO, N.S.; MOHRIR, A.V. Isolation of *Spirillum lipoferum* from the stems of wheat and nitrogen fixation in enrichment cultures. **Current Science**, Bangalore, v.47, p.96-98, 1978.

KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSKÉS, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better explored? **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.36, p.1229-1244, 2004.

KENNEDY, I.R.; ISLAM, N. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.41, n.3, p.447-457, 2001.

KHAMMAS, K.M. et al. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, Paris, v.140, n.9, p.679-693, 1989.

KILLORN, R.; ZOURARAKIS, D. Nitrogen fertilizer management effects on corn grain yield and nitrogen uptake. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v.5, p.142-148, 1992.

KIM, J.; REES, D.C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, Washington, v.33, n.2, p.389-398, 1994.

KIRCHHOF, G. et al. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, The Hague, v.194, p.45-55, 1997.

KÖEHLE, H. et al. **Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants**. AgroConcept GmbH: Bonn, 2003. p.61-74.

KOLB, M.; MARTIN, P. Influence of nitrogen on the number of N₂-fixing and total bacteria in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.20, n.2, p.221-225, 1988.

KUCEY, R.M.N. Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.34, p.735-739, 1988.

LAFITTE, H.R.; EDMEADES, G.O. Improvement for tolerance to low soil nitrogen in tropical maize. I Selection criteria. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.39, p.1-4, 1994a.

LAFITTE, H.R.; EDMEADES, G.O. Improvement for tolerance to low soil nitrogen in tropical maize. II Grain yield, biomass production, and N accumulation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.39, p.15-25, 1994b.

LAMBRECHT, M. et al. Indole 3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.8, n.7, p.298-300,

2000.

LEE, K.B.; PARK, T.G.; SONG, S.D. Effects of *Azospirillum amazonense* Y1 on the growth of corn. **Korean Journal of Botany**, Seoul, v.32, n.3, p.137-144, 1989.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I. et al. (eds.) **Contributions to probability and statistics: essays in honor of Harold Hotelling**. California: Stanford University Press, 1960. p.278-292.

LIN, S.Y. et al. *Azospirillum formosense* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Publicado online em 8 jul. 2011. doi: 10.1099/ij.s.0.030585-0.

LIN, W.; OKON, Y.; HARDY, R.W. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.45, n.6, p.1775-1779, 1983.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **CRC Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v.21, n.6, p.583-606, 2002.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B.R. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.86, p.1-25, 2004.

MACHADO, A.T. et al. Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em diferentes genótipos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.4, n.1, p.45-47, 1992.

MACHADO, A.T. et al. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.6, p.961-970, 1998.

MACHADO, C.T.T. et al. Acumulação de nitrogênio, fósforo e zinco e índices de eficiência de utilização e translocação de nutrientes em milho submetido a dois níveis de adubação nitrogenada. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 26.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 10.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 7.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO: AVALIAÇÃO DAS CONQUISTAS: BASE PARA ESTRATÉGIAS FUTURAS, 5., 2004. Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBCS/UDESC. 2004, CD-ROM.

MADIGAM, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 584p.

MAGALHÃES, F.M. et al. A new acidtolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.55, p.417-430, 1983.

MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D.; DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.39, p.587-596, 1979.

MAGALHÃES, J.R.; MACHADO, A.T. Biochemical parameters selecting maize for nitrogen assimilation efficiency under stress conditions. In: SIMPÓSIO

INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM PERSPECTIVA, 1992. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: EMBRAPA-CNPMS, p.346-367. 1992.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; PAIVA, E. **Fisiologia da planta de milho.** Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1994. 27p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 20).

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

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol-acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio.** 2005. 74f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARTINS, A.O. et al. Nitrogen-use efficiency of maize genotypes in contrasting environments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.8, p.291-298, 2008.

McSHAFFREY, D. **Environmental Biology:** ecosystems. The nitrogen cycle, 2006. Disponível em: <<http://www.marietta.edu/~biol/102/ecosystem.html>>. Acesso em: 26 set. 2011.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, New York, v.51, n.3, p.326-335, 2006.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.57, p.620-624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.57, p.2805-2809, 2007b.

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

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849p.

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

MORAIS, T.P.; BRITO, C.H. Eficiência no uso do nitrogênio pela cultura do milho em resposta à aplicação de fungicidas. In: SIMPÓSIO CIENTÍFICO DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS E AGRÁRIAS, 3., 2011. Uberlândia. **Anais...** Universidade

Federal de Uberlândia, Uberlândia, p.89-93. 2011

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. (eds.) **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA, 2006. p.449-542.

MUÑOZ-GARCIA, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; VALDÉS, M. Promoción del crecimiento del maíz por cepas productoras de siderófagos de *Azospirillum* y *Pseudomonas fluorescens*. In: CONGRESO NACIONAL DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO, 3.; ENCUENTRO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN DE NITRÓGENO, 1., 1991. Cuernavaca. **Anais...** Cuernavaca, México, p.61. 1991.

MURULI, B.I.; PAULSEN, G.M. Improvement of nitrogen use efficiency and its relationship to other traits in maize. **Maydica**, Bergamo, v.26, p.63-73, 1981.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from indian sugar cane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.29, n.2, p.157-164, 1999.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5. ed. W.H. Freeman, 2009. 1100p.

NEWTON, W.E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F.O. et al. (eds.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Springer, 2002. p.3-8.

NUR, I.; OKON, Y.; HENIS, Y. An increase in nitrogen content of *Setaria italica* and *Zea mays* inoculated with *Azospirillum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.26, p.482-485, 1980.

OHLAND, R.A.A. et al. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, p.538-544, 2005.

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

OKON, Y. *Azospirillum*: physiological properties, mode of association with roots and its application for the benefit of cereal and forage grass crops. **Israel Journal of Botany**, Jerusalem, v.31, p.214-220, 1982.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. **Biotechnology Advances**, New York, v.13, p.415-424, 1995.

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

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate

plants. **ASM News**, Ann Arbor, v.63, p.364-370, 1997.

OLIVEIRA, A.L.M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v.284, p.23-32, 2006.

OLIVEIRA, A.L.M. et al. Biological nitrogen fixation (BNF) in micropropagated sugarcane plants inoculated with different endophytic diazotrophic bacteria. In: PEDROSA, F.O. et al. (eds.) **Nitrogen Fixation**: from molecules to crop productivity. Dordrecht: Springer, 2002. p.425.

PANDEY, A.; SHARMA, E.; PALNI, L.M.S. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim himalaya. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.30, p.379-384, 1998.

PANWAR, J.D.S.; SINGH, O. Response of *Azospirillum* and *Bacillus* on growth and yield of wheat under field conditions. **Indian Journal of Plant Physiology**, New Delhi, v.5, p.108-110, 2000.

PATIL, V.P. **Mineral phosphate solubilization and molecular diversity of Azospirillum**. 2005. 66f. Dissertação (Mestrado em Agricultura) – University of Agricultural Sciences, Dharwad, 2005.

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

PEDRINHO, E.A.N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (Zea mays L.)**. 2009. 74f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

PENG, G. et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, p.1263-1271, 2006.

PENOT, I. et al. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays L.*) in France using biochemical tests and plasmid profiles. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.798-803, 1992.

PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F.; LADHA, J.K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. **Plant and Soil**, The Hague, v.174, p.3-28, 1995.

PEREZ-LEROUX, H.A.J.; LONG, S.D. Growth analysis of contrasting cultivars of *Zea mays L.* at different rates of nitrogen supply. **Annals of Botany**, London, v.73, p.507-513, 1994.

PEROTTI, E.B.; PIDELLO, A. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on urease activity in soil and gamma-sterilized soil. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v.31, n.1, p.36-41, 1999.

POSTGATE, J.R. **The Fundamentals of Nitrogen Fixation**. Cambridge: Cambridge

University Press, 1982. p.375-385.

PREININGER, E.; GYURJÁN, I. Trials to create artificial nitrogen-fixing symbioses and associations using *in vitro* methods: an outlook. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, Columbia, v.37, n.2, p.139-148, 2001.

PUENTE, M.L.; GARCÍA, J.E.; ALEJANDRO, P. Effect of the bacterial concentration of *Azospirillum brasiliense* in the inoculum and its plant growth regulator compounds on crop yield of corn (*Zea mays* L.) in the field. ***Journal of Agricultural Science***, Cambridge, v.5, n.5, p.604-608, 2009.

QUADROS, P.D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RADEMACHER, W. Gibberellin formation in microorganisms. ***Plant Growth Regulation***, Dordrecht, v.15, n.3, p.303-314, 1994.

RAMOS, H.J.O. et al. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the gfp and gusA genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. ***Journal of Biotechnology***, Amsterdam, v.97, p.243-252, 2002.

RAVA, C.A. Eficiência de fungicidas no controle da antracnose e mancha angular do feijoeiro comum. ***Summa Phytopathologica***, Jaguariuna, v.28, n.1, p.65-69, 2002.

RAVERKER, K.P.; KONDE, B.K. Effect of *Rhizobium* and *Azospirillum lipoferum* inoculation on nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. ***Plant and Soil***, The Hague, v.106, p.249-252, 1988.

REINHOLD, B. et al. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov, a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). ***International Journal of Systematic Bacteriology***, Reading, v.37, p.43-51, 1987.

REIS JÚNIOR, F.B. et al. **Isolamento, caracterização e seleção de estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* associadas a diferentes variedades de milho cultivadas no Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA-CERRADOS, 2008a. 36p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento EMBRAPA-CERRADOS, ISSN 1676-918X, n.206).

REIS JÚNIOR, F.B. et al. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. ***Revista Brasileira de Ciência do Solo***, Viçosa, v.32, n.3, p.1139-1146, 2008b.

REIS, V.M. et al. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. ***CRC Critical Review in Plant Science***, Boca Raton, v.19, p.227-247, 2000.

REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Use of *Azospirillum brasiliense* as a biofertilizer in intensive wheat cropping. ***Plant and Soil***, The Hague, v.66, p.217-233, 1982.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J. **How a corn plant develops**. Ames: Iowa State University Extension Department, 1992. 26p. (Special Report, 48).

ROBERTO, V.M.O.; SILVA, C.D.; LOBATO, P.N. Resposta da cultura do milho à aplicação de diferentes doses de inoculante (*Azospirillum brasiliense*) via semente. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010. Goiânia. **Anais...** Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. p.2429-2434. 2010, CD-ROM.

ROESCH, L.F.W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.23, n.10, p.1377-1383, 2007.

RONCATO-MACCARI, L.D.B. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.45, n.1, p.39-47, 2003.

RUSKE, R.E.; GOODING, M.J.; JONES, S.A. The effects of triazole and strobilurin fungicide programmes on nitrogen uptake, partitioning, remobilization and grain N accumulation in winter wheat cultivars. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.140, n.4, p.395-407, 2003.

SAIKIA, S.P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma? **Current Science**, Bangalore, v.92, n.3, p.317-322, 2007.

SAIYA-CORK, K.R.; SINSABAUGH, R.L.; ZAK, D.R. The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.34, p.1309-1315, 2002.

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

SALAMONE, I.E.G. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype association as evaluated by ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.23, p.249-256, 1996.

SARIG, S.; OKON, Y.; BLUM, A. Promotion of leaf area development and yield in *Sorghum bicolor* inoculated with *Azospirillum brasiliense*. **Symbiosis**, Philadelphia, v.9, p.235-245, 1990.

SCHLOTER, M. et al. Immunological studies of the wheat-root colonization by the *Azospirillum brasiliense* strains Sp7 and Sp245 using strain specific monoclonal antibodies. In: HEGAZI, N.; FAYEZ, M.; MONIB, M. (eds.) **Nitrogen fixation with nonlegumes**. Cairo: The American University in Cairo Press, 1994. p.290-295.

SESHADRI, S. et al. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferens*. **Current Science**, Bangalore, v.79, p.565-567, 2000.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, London, v.52, n.3, p.591-599, 1965.

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

SILVA, M.F. **Avaliação da colonização por *Azospirillum* spp. na cultura do milho**

(*Zea Mays L.*) utilizando a técnica do ELISA. 2005. 72f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

SLY, L.I.; STACKEBRANDT, E. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.49, p.541-544, 1999.

SOLIMAN, S. et al. Nitrogen fixation by wheat plants as affected by nitrogen fertilizer levels and non-symbiotic bacteria. **Egyptian Journal of Soil Science**, Cairo, v.35, p.401-413, 1995.

SOUZA, J.A. Manejo da fertilidade de solo para a cultura do milho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.233, p.26-37, 2006.

SPAEPEN, S. et al. Effects of *Azospirillum brasiliense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, The Hague, v.312, n.1, p.15-23, 2008.

STANCHEVA, I. et al. Effects of inoculation with *Azospirillum brasiliense* on photosynthetic enzyme activities and grain yield in maize. **Agronomie**, Paris, v.12, n.4, p.319-324, 1992.

STEENHOUT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, n.4, p.487-506, 2000.

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

SUBEDI, K.D.; MA, B.L. Assessment of some major yield-limiting factors on maize production in a humid temperate environment. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.110, n.1, p.21-26, 2009.

SUMNER, M.E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Sciences**, New York, v.12, p.54-123, 1990.

TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.1, p.301-307, 1969.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City: Cummings, 2006. 4. ed. 608p.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.24, n.8, p.967-980, 1978.

TEIXEIRA, F.F. et al. Diversidade no germoplasma de milho coletado na região nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.1, n.3, p.59-67, 2002.

TERVER, I.W.; HOLLIS, J.P. Bacteria in the storage organs of healthy tissue. **Phytopathology Journal**, New York, v.38, p.960-967, 2002.

TRENTINI, D.B. **Identificação dos alvos celulares das proteínas de transdução de sinal PII do diazotrófico de vida livre *Azospirillum amazonense***. 2010. 122f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

UMALI-GARCIA, M. et al. Association of *Azospirillum* with grass roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.39, n.1, p.219-226, 1980.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.56, p.105-114, 1992.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World corn production, consumption, and stocks**. 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=World+Corn+Production%2c+Consumption%2c+and+Stocks+++++&hidReportRetrievalID=459&hidReportRetrievalTemplateID=7>>. Acesso em: 13 dez. 2011.

VANDE BROEK, A. et al. Transcription of the *Azospirillum brasiliense* nifH gene is positively regulated by NifA and NtrA and is negatively controlled by the cellular nitrogen status. **Molecular and General Genetics**, New York, v.232, n.2, p.279-283, 1992.

VENKATESWARLU, B. Nitrogen fixation in arid and semi-arid agriculture: opportunities and constraints. In: ABROL, Y.P.; RAGHURAM, N.; SACHDEV, M.S. (eds.) **Agricultural nitrogen use and its environmental implications**. New Delhi: I.K. International Publishing House, 2007. p.415-436.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth-promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.91, p.127-141, 2001.

VERONA, D.A. et al. Tratamento de sementes de milho com Zeavit®, Stimulate® e inoculação com *Azospirillum* sp. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010. Goiânia. **Anais...** Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. p.3731-3737. 2010, CD-ROM.

WANG, Q.K.; WANG, S.L.; LIU, Y.X. Responses to N and P fertilization in a young *Eucalyptus dunnii* plantation: microbial properties, enzyme activities and dissolved organic matter. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.40, p.484-490, 2008.

WANI, S.P.; CHANDRAPALAIH, S.; DART, P.J. Responses of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen-fixing bacteria. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v.21, p.175-182, 1985.

WATANABE, I.; BARRAQUIO, W.L. Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living N₂-fixing organisms from rice roots. **Nature**, London, v.277,

p.565-566, 1979.

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

XIE, C.H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.55, p.1435-1438, 2005.

YOUNG, C.C. et al. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.58, p.959-963, 2008.

ZHANG, Y. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.152, n.2, p.195-204, 1997.

ANEXOS

ANEXO A: PROTOCOLO DA UREASE.....	68
ANEXO B: PROTOCOLO DA FOSFATASE.....	69
ANEXO C: TABELAS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA.....	70

ANEXO A: PROTOCOLO DA UREASE

Procedimentos:

1. 5 g de solo;
2. 5 mL de Solução Tampão Citrato pH 6,7;
3. 5 mL de Solução de Uréia 10%;
4. Incubar a 37°C por 3 horas em banho-maria;
5. Completar para 50 mL com água destilada;
6. Transferir 1 mL para tubos eppendorfer;
7. Centrifugar por 5' a 10000 rpm;
8. Em outros tubos eppendorfer adicionar 500 µL do Reagente 1 + 500 µL do Reagente 2;
9. Pipetar 100 µL da amostra centrifugada;
10. Levar para banho-maria por 10' a 37°C;
11. Ler em espectrofotômetro a 600 nm.

Soluções:

- Solução Tampão Citrato pH 6,7: pesar 1,443 g de ácido cítrico e 98,995 g de citrato de sódio diidratado, diluir em balão volumétrico de 1000 mL.
- Solução de Uréia 10%: pesar 10 g de uréia para cada 100 mL de água.
- Solução de NH₄Cl: pesar 0,1 g de NH₄Cl para 1 L de água destilada.

Curva Padrão:

Ponto	Tampão Citrato (µL)	NH ₄ Cl (µL)	Reagente 1 (µL)	Reagente 2 (µL)
1	100	0	500	500
2	90	10	500	500
3	80	20	500	500
4	60	40	500	500
5	40	60	500	500
6	0	100	500	500

1. Levar para banho-maria por 5' a 37°C.

ANEXO B: PROTOCOLO DA FOSFATASE

Procedimentos:

1. Pesar 1 g de solo;
2. 4 mL de Tampão Modificado Universal pH 4,0;
3. 0,5 mL de fosfatase substrate (PNP);
4. Incubar a em banho-maria a 37°C por 1 hora;
5. Adicionar 1 mL de CaCl₂;
6. Adicionar 4 mL de NaOH;
7. Transferir uma alíquota de 1 mL para tubos eppendorfer;
8. Centrifugar por 5' a 10000 rpm;
9. Ler em espectrofotômetro a 405 nm.

Soluções:

- Solução Tampão Modificado Universal pH 4,0: pesar 5,763 g de ácido cítrico, 4,080 g de KH₂PO₄ e 1,854 g de ácido bórico. Completar o volume para 1 L com água destilada.
- Solução de PNP (fosfatase substrate): pesar 0,0339 g de PNP; adicionar 6 mL de TMU.
- Solução de CaCl₂ 0,5M: pesar 36,75 g de CaCl₂ 2H₂O e completar o volume para 1 L.
- Solução de NaOH 0,5M: pesar 20 g de NaOH e completar o volume para 1 L.
- Solução p-nitrophenol: pesar 0,8 g de p-nitrophenol e completar para 10 mL de água. Desta, retirar 200 µL e completar o volume para 10 mL com TMU. Deste último tubo, retirar 1 mL e completar novamente para 10 mL com TMU, e desta solução pipetar os pontos da curva.

Curva Padrão:

Ponto	p-nitrophenol (µL)	TMU (µL)	NaOH (µL)	CaCl ₂ (µL)
1	0	525	460	115
2	5	520	460	115
3	15	510	460	115
4	25	500	460	115
5	50	475	460	115
6	75	450	460	115

ANEXO C: TABELAS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA (CASA DE VEGETAÇÃO)

TABELA 1. Resumo das análises de variância dos dados de altura de planta - Alt., diâmetro de colmo - Ø, acúmulo de massa fresca da parte aérea - MFPA, massa fresca de raiz - MFR, massa seca da parte aérea - MSPA, massa seca do sistema radicular - MSR, volume de raízes - Vol., teor de clorofila - Clo., teor de nitrogênio - N, teor de fósforo - P, relação massa seca de parte aérea/massa seca de raiz - Rel., atividade da enzima urease - U e atividade da enzima fosfatase - F, obtidos no primeiro ensaio em casa de vegetação. Uberlândia – MG, 2011.

FV	GL	Quadrado Médio												
		Alt.	Ø	MFPA	MFR	MSPA	MSR	Vol.	Clo.	N	P	Rel.	U	F ²
N	2	25,65*	16,26*	3017,57*	360,73*	9,23*	4,96*	676,05*	3630,82*	4088,47*	38,55*	45,70*	401,10*	4,03*
Azós.	2	0,32 ^{ns}	0,32 ^{ns}	20,94 ^{ns}	25,84 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,01 ^{ns}	9,00 ^{ns}	53,59 ^{ns}	11,93 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,89 ^{ns}	18,82 ^{ns}	0,27 ^{ns}
N x Azos.	4	0,79 ^{ns}	0,38 ^{ns}	32,71 ^{ns}	70,53 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,10 ^{ns}	50,38 ^{ns}	7,87 ^{ns}	20,36 ^{ns}	0,37 ^{ns}	1,22*	5,28 ^{ns}	0,67 ^{ns}
Bloco	4	25,29	0,14	146,76	1536,76	0,19	0,69	360,88	64,44	25,00	1,72	6,07	2,74	2,63
Resíduo	32	1,24	0,58	24,94	69,50	0,45	0,05	26,40	16,97	52,71	0,52	0,42	16,06	0,74
CV (%)		3,92	5,61	7,82	15,52	10,17	14,03	13,84	7,82	15,34	10,43	13,81	30,50	5,16
W ¹		0,976	0,973	0,972	0,951	0,946	0,980	0,954	0,973	0,907	0,971	0,988	0,989	0,952
F ¹		0,752	1,478	0,321	0,540	1,576	1,722	0,475	1,324	2,478	0,570	1,720	1,966	1,288

* e ^{ns}: significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste F a 0,05 de significância;

¹W; F: estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente; valores em negrito indicam normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente;

²dados transformados segundo \sqrt{x} .

TABELA 2. Resumo das análises de variância dos dados de altura de planta - Alt., diâmetro de colmo - Ø, acúmulo de massa fresca da parte aérea - MFPA, massa fresca de raiz - MFR, massa seca da parte aérea - MSPA, massa seca do sistema radicular - MSR, volume de raízes - Vol., teor de clorofila - Clo., teor de nitrogênio - N, teor de fósforo - P, atividade da enzima urease - U e atividade da enzima fosfatase - F, obtidos no ensaio residual em casa de vegetação. Uberlândia – MG, 2011.

FV	GL	Quadrado Médio											
		Alt. ²	Ø	MFPA ²	MFR ²	MSPA ³	MSR	Vol.	Clo. ⁴	N	P ³	U	F
N	2	9,05*	84,54*	33,99*	1,06*	1,95*	0,45*	133,78*	41,02*	5161,65*	0,12 ^{ns}	11,94 ^{ns}	2121,70 ^{ns}
Azos.	2	0,08 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	6,45 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,97 ^{ns}	0,01 ^{ns}	7,62 ^{ns}	112,44 ^{ns}
N x Azos.	4	0,11 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	5,12 ^{ns}	0,11 ^{ns}	22,76 ^{ns}	0,04 ^{ns}	9,77 ^{ns}	1168,35 ^{ns}
Bloco	4	0,71	0,59	0,54	1,78	0,05	0,10	48,64	0,35	224,65	0,15	16,61	9357,25
Resíduo	32	0,15	0,72	0,26	0,15	0,02	0,02	9,35	0,21	29,70	0,06	7,00	815,47
CV (%)		9,19	9,78	12,41	10,52	8,00	21,12	26,07	6,91	13,18	9,28	21,51	10,48
W ¹		0,963	0,959	0,940	0,962	0,937	0,959	0,963	0,868	0,974	0,955	0,972	0,979
F ¹		1,604	4,162	1,140	0,793	2,920	1,048	2,101	2,567	0,779	2,509	7,474	1,095

* e ^{ns}: significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste F a 0,05 de significância;

¹W; F: estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente; valores em negrito indicam normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente;

²dados transformados segundo $\sqrt{x + 0,5}$;

³dados transformados segundo $\sqrt{x + 1}$;

⁴dados transformados segundo \sqrt{x} .