

ADÍLIO DE SÁ JÚNIOR

COMPORTAMENTO AGRONÔMICO DO MILHO EM RESPOSTA AO MODO DE
APLICAÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

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. Carlos Machado dos Santos

Coorientador

Prof. Dr. Césio Humberto de Brito

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

ADÍLIO DE SÁ JÚNIOR

COMPORTAMENTO AGRONÔMICO DO MILHO EM RESPOSTA AO MODO DE
APLICAÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

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 23 de novembro de 2012.

Profa. Dra. Denise Garcia de Santana

UFU

Dra. Isis Barreto Dantas

UFLA

Prof. Dr. Simério Carlos Silva Cruz

UEG

Prof. Dr. Carlos Machado dos Santos

ICIAG–UFU

(Orientador)

Prof. Dr. Césio Humberto de Brito

ICIAG–UFU

(Coorientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

DEDICO

Aos meus pais, Adílio de Sá e Maria José Salgado de Sá (*in memoriam*), cujo amor incondicional, cuja dedicação e cujo desprendimento foram um incentivo essencial aos meus estudos. A vocês, pela luta diária de uma vida.

A minha esposa, Rosemari Maciel de Sá, e aos meus filhos: Evandro Luiz Maciel de Sá e Rafael Maciel de Sá, pela paciência, pela tolerância e pelo amor incontestável nos momentos alegres e apreensivos.

Existem seres que são pessoas, transmitem conhecimento; outros são almas, transmitem saber; outros são espíritos, transmitem amor. Aqueles que são os três, são luz: transmitem vida.

Obrigado senhor, pela vida iluminada.

Adílio de Sá Júnior.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Senhor, meu pastor e meu guia. Pelos amigos e pela família que me deu. Por sempre me iluminar, proteger e derramar bênçãos em meu caminho.

Aos meus pais, Adílio de Sá e Maria Jose Salgado de Sá, pela dedicação e pelo amor da minha vida.

À minha esposa, Rosemari, pelo amor e pela paciência nas horas difíceis.

Aos meus filhos, Evandro Luiz Maciel de Sá e Rafael Maciel de Sá, pela ajuda nas realizações alcançadas.

A todos os meus irmãos, pelo companheirismo e pela felicidade proporcionados.

A Káren Cristine, pelas aulas ministradas.

Ao professor Carlos Machado dos Santos, pela amizade, pelos ensinamentos de vida, pela dedicação e pelo apoio.

Ao professor Césio Humberto Brito e Adão, pelas orientações oferecidas com muita precisão.

Aos demais professores da pós-graduação em Agronomia, pelos ensinamentos.

Aos técnicos do laboratório de solos: Marinho Monteiro, Manoel, Eduardo e Marco Aurélio e à secretária Andréa, pela ajuda, pela experiência e pelo apoio inestimáveis.

A Sara Moraes Mendes Almeida, pelo apoio, pelo companheirismo e pela amizade.

Aos responsáveis técnico dos laboratórios e fazendas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pela disposição em suprir as necessidades deste trabalho.

Aos colegas Franciele Olivo, Dayene Cássia de Paula Soares, Vanderlei, João Paulo, Lidiane, Tâmara e Reinaldo, pela amizade e ajuda na condução dos meus experimentos.

Às professoras e amigas Glaucia e Flavia Nery, pelo companheirismo, pelo profissionalismo e pela orientação.

A todos os alunos da graduação: Wender, Erico, Diego e Juliana, pelo carinho e pela dedicação comigo e com a pesquisa.

Aos funcionários da fazenda do Gloria, pela prontidão no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas de trabalho da UFU, que me acompanharam durante meu crescimento profissional.

Aos colegas do curso, pela amizade e por contribuírem para meu crescimento intelectual e profissional.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição intelectual dada ao trabalho.

Aos amigos da coordenação da pós-graduação, Eduardo e Cida, pelo profissionalismo.

A todos os técnicos administrativos, pela amizade de uma vida.

Aos amigos que na vida me ensinam o valor do carinho.

A empresa Stoller, por acreditar na ciência e no potencial desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), da UFU, pela oportunidade do meu aprimoramento intelectual.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Botânica e aspectos da espécie <i>Zea mays</i>	3
2.2 Papel do nitrogênio na cultura do milho.....	3
2.3 Nitrogênio no solo.....	4
2.4 Fixação biológica do nitrogênio (FBN).....	4
2.5 O gênero <i>Azospirillum</i>	5
2.6 Respostas do milho à associação com bactérias do gênero <i>Azospirillum</i>	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Delineamento experimental e tratamentos.....	9
3.2 Instalação e condução.....	11
3.3 Avaliações dos componentes morfológicos.....	12
3.3.1 Estandes inicial e final.....	12
3.3.2 Altura da planta.....	12
3.3.3 Folhas verdes.....	14
3.3.4 Teor de nitrogênio, fósforo e potássio na folha.....	14
3.3.5 Disponibilidade de nitrogênio, fósforo e potássio no solo.....	14
3.3.6 Avaliações nas espigas e grãos.....	14
3.3.7 Análise estatística.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5 CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Detalhe do miniabrigo climatológico instalado no centro da extremidade frontal do experimento para monitoramento da temperatura, umidade relativa e precipitação — Uberlândia, MG, 2012 (houve sobreposição de grafismo e texto para indicação visual de pontos).....	9
FIGURA 2 – Vista geral do bloco e de detalhes da parcela e área útil do experimento — Uberlândia, MG, 2012 (houve sobreposição de grafismo e texto para indicação visual de pontos).....	10
FIGURA 3 – A) modo de aplicação no sulco de semeadura; B) base da planta em estádio V ₃ ; C) base da planta em área total; D) estádio V ₆ do equipamento utilizado — Uberlândia, MG, 2012 (houve sobreposição de grafismo e texto para indicação visual de pontos).....	10
FIGURA 4 – Distribuição de espigas sobre piso do armazém durante a secagem até o equilíbrio higroscópico (Uberlândia, MG, 2012).....	12
FIGURA 5 – Distribuição de espigas sobre piso do armazém durante a secagem até o equilíbrio higroscópico (Uberlândia, MG, 2012).....	12
FIGURA 6 – Amostragem de folhas e solo (A e B) para determinar teores de N, P e K — Uberlândia, MG, 2012 (houve sobreposição de grafismo e texto para indicação visual de pontos).....	14
FIGURA 7 – Detalhes das avaliações: A e B) comprimento e diâmetro da espiga; C) debulha manual; D) diâmetro do sabugo — Uberlândia, MG, 2012 (houve sobreposição de grafismo e texto para indicação dos procedimentos).....	15
FIGURA 8 – Dados de precipitação, temperaturas mínima e máxima, umidade relativa e precipitação coletados na área experimental onde foi conduzido o experimento, avaliando-se sementes de milho inoculadas por diferentes modos e doses de <i>Azospirillum brasilense</i> — Uberlândia, MG, 2012.....	18
FIGURA 9 – Concentração de potássio na folha em função da dose de inoculante usada quando aplicado via pulverização no sulco de semeadura e na área total — Uberlândia, MG, 2012.....	22
FIGURA 10 – Número de grãos por espiga em função da dose de inoculante utilizada quando aplicado via pulverização na base da planta e na área total — Uberlândia, MG, 2012.....	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características químicas e físicas do solo da área experimental amostrado nas profundidades 0–20 e 20–40 centímetros, na fazenda do Glória — Uberlândia, MG, 2012.....	13
TABELA 2 – Resumo da análise de variância destes dados: componentes morfológicos (altura da planta), folhas verdes, diâmetro do sabugo, matéria seca da palha, componentes da produção (estandes inicial e final), diâmetro, número de fileiras e de grãos, comprimento de espigas, peso de mil grãos, comprimento e produtividade de milho submetido a modos e doses de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> — Uberlândia, MG, 2012.....	19
TABELA 3 – Resumo da análise de variância dos dados referentes aos teores nas folhas e à disponibilidade, no solo, de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) nas amostras de folhas e solos coletadas no ensaio com milho submetido a modos e doses de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> — Uberlândia, MG, 2012.....	20
TABELA 4 – Médias dos dados da concentração de potássio nas folhas e do número de grãos de milho por espiga referentes à interação entre o modo de aplicação e a doses de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> — Uberlândia, MG, 2012.....	21
TABELA 5 – Médias dos dados dos componentes morfológicos (altura da planta), folhas verdes, diâmetro do sabugo, matéria seca da palha, componentes da produção (estandes inicial e final), diâmetro, número de fileiras e de grãos, comprimento de espigas, peso de mil grãos, comprimento e produtividade do milho em função da inoculação ou não das sementes de milho com <i>Azospirillum brasilense</i> na dosagem de 100 mL ha ⁻¹ do produto comercial — Uberlândia, MG, 2012.....	24
TABELA 6 – Dados dos teores nas folhas e da disponibilidade no solo de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K); amostra coletadas na profundidade de 0–20 cm nas amostras de folhas e solo do ensaio com milho submetido a modos e doses de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> — Uberlândia, MG, 2012.....	26
TABELA 7 – Testes de homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos e aditividade dos blocos referentes às análises dos dados de altura de plantas; folhas verdes, diâmetro de sabugo e matéria seca da palha obtidos no experimento com sementes de milho híbrido submetidas a diferentes modos e doses de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> — Uberlândia, MG, 2012.....	26

TABELA 8 –	Testes de homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos e aditividade dos blocos referentes às análises dos dados de estandes inicial e final, diâmetro de espiga, número de fileiras por espiga, número de grãos por espiga, comprimentos da espiga, peso de mil grãos, comprimento de grãos e produtividade obtidos no experimento utilizando sementes de milho híbrido inoculadas por diferentes modos e doses de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> — Uberlândia, MG, 2012.....	27
TABELA 9 –	Resumo dos testes de homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos e aditividade dos blocos referentes às análises dos dados de teores nas folhas e a disponibilidade no solo de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) nas amostras coletadas no ensaio com milho submetidas a modos e doses de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> — Uberlândia, MG, 2012.....	28

RESUMO

SÁ JÚNIOR, ADÍLIO. **Comportamento agrônômico do milho em resposta ao modo de aplicação e concentrações de *Azospirillum brasilense***. 2012. 51f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) — Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

Usar bactérias do gênero *Azospirillum* para fixar nitrogênio pode ser uma forma alternativa de obter esse elemento e, assim, reduzir custos de produção do milho. Este trabalho objetivou avaliar alterações nos componentes morfológicos da produção e produtividade do milho em resposta a modos de aplicação e concentração de *Azospirillum brasilense*. Conduzido na fazenda experimental do Gloria, da Universidade Federal de Uberlândia, em Uberlândia, MG, o experimento seguiu delineamento experimental em blocos casualizados com seis repetições. Os tratamentos foram distribuídos no esquema fatorial (3 x 4 + 2): o primeiro fator incluiu modos de aplicação via pulverização no sulco de semeadura, na base da planta e em área total; o segundo incluiu doses do inoculante (100, 200, 300 e 400 mL ha⁻¹). Os tratamentos adicionais foram sem inoculação e com inoculação via tratamento de sementes na dose 100 mL ha⁻¹. A implantação da cultura e os tratos culturais referentes ao manejo de plantas infestantes, pragas e doenças adotaram o modelo de exploração com alta tecnologia. A avaliação focou nos componentes morfológicos (altura da planta, folhas verdes, diâmetro do sabugo, matéria seca da palha) e da produção (estande inicial e final, diâmetro, número de fileiras e grãos, comprimento de espigas, peso de mil grãos, comprimento e produtividade). Concluiu-se que a inoculação com *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, propicia incremento na produtividade do milho e a inoculação via pulverização e o aumento na dosagem não altera a produtividade do milho.

Palavras-chave: *Zea mays*, produtividade, inoculação, simbiose.

¹ Comitê orientador: prof. dr. Carlos Machado dos Santos — UFU (orientador); prof. dr. Césio Humberto Brito — UFU (coorientador)

ABSTRACT

SÁ JÚNIOR, ADÍLIO. **Behavior of maize in response to application methods and concentrations of *Azospirillum brasilense***. 2012. 51 f. Dissertation (MSc in Agronomy/Crop Science) — Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia.²

The use of *Azospirillum* genus bacteria to fix nitrogen can be useful to obtain such chemical element and, thus, reduce costs of maize cultivation. This study aimed to evaluate changes of morphological components in the production and productivity of maize as a response to application methods and concentration of *Azospirillum brasilense*. The experiment was carried out at Gloria experimental farm, linked to Universidade Federal de Uberlândia, state of Minas Gerais. Randomized blocks with six replications were used as experimental design. Treatments were arranged in a factorial scheme (3×4+2). The first factor consisted of two ways of spray application, one in the furrow at the base of the plant, the other at the whole plant area. The second factor consisted of different doses of inoculating (100, 200, 300 and 400 mL ha⁻¹). Additional treatments included seed treatment by *Azospirillum brasilense* inoculation at 100 mL ha⁻¹ and not inoculated seeds. The development of crop and agricultural practices relating to the management of weeds, pests and diseases were performed by the use of high technology. Evaluation focused on morphological components (plant height, green leaves, cob diameter, dry straw, length, diameter) and production components (initial and final stands, number of rows and of grains per spike, spike length and thousand grain weight and yield). It was concluded that inoculation with *Azospirillum brasilense* via seed treatment increases maize yield and that inoculum application via spraying and the increasing in dosage do not alter the yield of maize.

Keywords: *Zea mays*, productivity, inoculation symbiosis.

² Advising committee: Carlos Machado dos Santos, advisor — UFU; Césio Humberto Brito, co-advisor, UFU.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS/ONU, 2011), em 31 de outubro de 2012 a população mundial chegou a sete bilhões de habitantes, distribuídos geograficamente e socialmente aleatoriamente pelos continentes. Alimentar com segurança uma população tal requer aumentar e melhorar a qualidade da produção mediante recursos tecnológicos de baixo custo e fácil acessibilidade. Tal aumento e melhoria se aplicariam, por exemplo, à cultura do milho: grão importante da dieta humana desde tempos imemoriais e cujo maior produtor mundial são os Estados Unidos seu maior — com produtividades médias são de 10; 6 e 4 t ha⁻¹, respectivamente (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE/USDA, 2011) —, seguido da China e do Brasil.

No Brasil, o milho é o cereal mais importante do agronegócio: além de ser usado em rotação de culturas para produzir grãos, serve de alimento humano e animal. Em 2010, seu o cultivo chegou a 15 milhões de hectares, com produtividade média de 4.000 kg ha⁻¹. Na produção nacional, Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás representam 56% do montante produzido (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO/CONAB, 2011).

A produtividade na cultura do milho, segundo Killorn e Zourarakis (1992), relaciona-se com o potencial genético da semente, as condições edafoclimáticas e a disponibilidade de nutrientes. Obter o máximo de produtividade do híbrido requer grandes quantidades de fertilizantes, dos quais o nitrogênio é o mais exigido. Conforme Amado, Milniczuk e Aita (2002), a quantidade de nitrogênio aplicado, assim como o manejo incorreto, são os responsáveis principais pela baixa produtividade na cultura. Nesse caso, o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Azospirillum* pode ser fonte alternativa para obter nitrogênio e diminuir custos de produção (DÖBEREINER, 1992). Combinar fontes de nitrogênio em forma de adubos minerais com fontes fixadas pelo *Azospirillum* como alternativa viável de manejo se justifica porque tal combinação reúne efeitos imediatos e de longo prazo (SCIVITTARO et al., 2000; AMADO; MILNICZUK; AITA, 2002; MURAOKA et al., 2002; ARAÚJO et al., 2005).

Estudos que avaliem essa alternativa se justificam porque poderiam não só propiciar aproveitamento melhor ou mesmo reduzir o nitrogênio mineral, mas também incrementar significativamente a produtividade da cultura do milho. É para essa

possibilidade que convergiu a pesquisa aqui descrita, cujo objetivo foi avaliar alterações nos componentes morfológicos da produção e produtividade do milho em resposta a modos de aplicação e concentração de *Azospirillum brasilense*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Botânica e aspectos da espécie *Zea mays*

Pertencente à família Poaceae, a espécie *Zea mays* é monóica e tem uma flor masculina (pendão) e uma feminina (espiga) que, após a fecundação, vão originar o grão classificado como fruto-semente (cariopse). Em fase de plântula, tem raízes seminais que desaparecem para dar lugar às raízes fasciculadas e, depois, às adventícias. Tem caule do tipo colmo com nós e entrenós e folhas paralelinérveas alternadas. No estágio fenológico V₃, quando o ponto de crescimento encontra-se abaixo do solo, é definido o número de folhas, espigas e grãos que a planta produzirá; no estágio V₆, quando o ponto de crescimento se encontra acima do solo, é definido o número de fileiras das espigas. Essa fase demanda mais nutrientes (MAGALHÃES et al., 2002).

Além do nitrogênio, o mais importante (MAGALHÃES et al., 2002), a cultura exige potássio e fósforo, que aumentam os custos de produção (BAIRD, 2002). Tais nutrientes são importantes para o metabolismo das plantas; constituem moléculas de proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, clorofila e outras. O nitrogênio é um dos responsáveis pelo aumento da produtividade e de proteínas nos grãos; em sua ausência, o potencial máximo de produção não é expresso, o que afeta a quantidade e qualidade do produto final (SABATA; MASON, 1992; LANDRY; DELHAYE, 1993; ZHANG; MACKENZIE; SMITH, 1994; WILLIAMS; MILLER, 2001; HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007; REVISTA RURAL, 2009).

2.2 Papel do nitrogênio na cultura do milho

Dos nutrientes que a cultura do milho exige, o nitrogênio é fundamental porque se relaciona diretamente com a produtividade; presente na germinação da semente, na maturação do fruto e na senescência da planta, é absorvido por raízes e folhas na forma de N-NO₃ predominantemente (YAMADA; ABDALLA; VITTI, 2007). Sua forma química mais usada é a ureia, tida como insumo energético não renovável por ser derivada do petróleo (REVISTA RURAL, 2009). O nitrogênio molecular convertido em amônia é essencial ao metabolismo da planta, pois compõe a estrutura dos seres vivos na forma de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas coenzimas, ácidos nucleicos, citocromos, clorofila, hormônios e outras moléculas. O nitrogênio fixado afeta a

quantidade e qualidade dos grãos produzidos (SABATA; MASON, 1992; LANDRY; DELHAYE, 1993; ZHANG; MACKENZIE; SMITH, 1994).

2.3 Nitrogênio no solo

Aplicado como adubo mineral, o nitrogênio tem custo elevado porque requer grandes quantidades, sobretudo o por causa de perdas resultantes de práticas de manejo inadequadas e lixiviação no solo (CANTARELLA, 2007); e embora o nitrogênio seja abundante — representa 78% dos gases atmosféricos (N_2) —, a força da tripla ligação entre seu dois átomos dificulta sua absorção por plantas e animais. Contudo, como os gases atmosféricos se espalham pelas camadas porosas do solo, sob a ação das enzimas dinitrogenases, o nitrogênio tem sua tripla ligação rompida; isto é, o gás N_2 se transforma em amônia (NH_4^+); e assim pode ser absorvido pelas bactérias fixadoras biológicas de nitrogênio (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007).

Segundo Taiz e Zeiger (2004), o nitrogênio é fixado no solo por três processos naturais — o biológico, a descarga elétrica, a decomposição de matéria orgânica — e um processo artificial — a adubação sintética. Os relâmpagos respondem por quase 8% do nitrogênio fixado pelas plantas; as reações fotoquímicas, por cerca de 2%; e a fixação biológica de nitrogênio por bactérias ou algas azuis responde por aproximadamente 90% — daí a importância dos estudos envolvendo bactérias fixadoras de nitrogênio.

2.4 Fixação biológica do nitrogênio (FBN)

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é uma técnica para minimizar custos de aplicação de nitrogênio bastante estudada nos últimos anos. O Brasil é tido como pioneiro nas pesquisas com FBN, sobretudo o grupo de Joana Döbereiner, que identificou bactérias diazotróficas endofíticas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholouderia* (WEBER, 1998; WEBER et al., 1999; WEBER et al., 2001) e recorre a bactérias denominadas diazotróficas. Existem ainda bactérias promotoras de crescimento vegetal que estimulam as plantas através da FBN e da produção de hormônios (auxinas e giberilinas), que, atuando no crescimento da parte radicular, favorecem a absorção de água e nutrientes (PEOPLES; HERRIDGE; LADHA, 1995; FALLIK et al., 1988; DOBBELAERE et al., 1999; LAMBRECHT et al., 2000; SEVILLA et al., 2001; DOBBELAERE et al., 2002; BASHAN; HOLGUIN;

BASHAN, 2004); também podem agir como solubilizador de fosfato ou acelerador do processo de mineralização (PERSELLO-CARTINEAUX; NUSSAUME; ROBAGLIA, 2003). As bactérias fixadoras de nitrogênio são classificadas como associativas endofíticas ou simbióticas; as do gênero *Azospirillum* são consideradas associativas quando livres na região da rizosfera ou endofíticas facultativas quando nos tecidos da planta. Em ambos os casos, excretam parte do nitrogênio fixado e, assim, suprem parte da necessidade desse elemento pela planta (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007).

A FBN que ocorre no complexo da nitrogenase se vincula à disponibilidade de NH_4^+ e luz (POPE et al., 1985), à concentração de oxigênio (DIXON; KAHN, 2004), à especificidade da planta hospedeira e à estirpe da bactéria usada (BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 1983). A FBN ocorre pela reação catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase que tem duas proteínas: a dinitrogenase redutase ou proteína Fe e a nitrogenase ou proteína Fe-Mo. A função da primeira é transportar elétrons até a dinitrogenase, que é capaz de reduzir grande número de substratos que apresentem ligações triplas (POSTGATE, 1982).

Roncatto-Maccari et al. (2003) relatam que não existe lugar específico para ocorrer a FBN em plantas de gramíneas. De acordo com Vargas et al. (2003), a cana-de-açúcar e outras monocotiledôneas podem ter desenvolvido mecanismos moleculares para reconhecer e estabelecer uma interação com bactérias diazotróficas endofíticas.

Segundo Reis e Olivares (2006), as bactérias colonizam as plantas usando várias vias de penetração: via estomática, hidatódios, nectários, tricomas, injúrias ou feridas e a emergência de raízes laterais. Esta última é proveniente do periciclo da raiz parental, que ao emergir deixa cavidades por onde penetra a bactéria.

2.5 O gênero *Azospirillum*

Das bactérias fixadoras de nitrogênio, as do gênero *Azospirillum* são muito estudadas em pesquisas na área de fisiologia, ecologia e genética (BALDANI et al., 1997; BASHAN; HOLGOIN, 1997). Têm comportamento simbiótico e associativo com diversas espécies de plantas e similaridade com bactérias como *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (HARTMANN; BALDANI, 2006). Classificadas na subdivisão α -Proteobacteria, podem sobreviver nos solos na forma de cistos. Têm forma de bastonetes e são classificadas como de vida livre e uniflageladas (TARRANT; KRIEG; DÖBEREINER, 1978). Por fim, assimilam o carbono de ácidos orgânicos

como malato, piruvato e succinato (QUADROS, 2009); nesse caso, o nitrogênio provém da amônia, do nitrato, do nitrito e de aminoácidos (TRENTINI, 2010).

Segundo Döbereiner e Day (1975), a bactéria *Spirillum lipoferum* era o microrganismo principal fixador de nitrogênio em gramíneas. Mas, com base nas características fisiológica, bioquímica e por homologia de DNA, foi criado o gênero *Azospirillum*, com duas espécies: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978). Depois disso, foram identificadas *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. holopraeferes* (REINHOLD et al., 1987), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. largimobile* (SLY; STACKEBRANDT, 1999), *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001), *A. oryzaea* (XIE; YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. canadense* (MEHANAZ et al., 2007a), *A. zea* (MEHANAZ et al., 2007b), *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008) e *A. formosense* (LIN et al., 2011).

Fixadora de nitrogênio (diazotróficas), a *Azospirillum brasiliense* é encontrada, sobretudo, na rizosfera das poaceas e considerada altamente móvel. Quando em vida livre, as bactérias diazotróficas microaeróbicas desse gênero fixam o nitrogênio atmosférico (BODDEY; DOBERREINER, 1995); associadas com a rizosfera das gramíneas, podem contribuir com a adubação nitrogenada. A produção de amônia pelas bactérias e por outras substâncias atuantes no crescimento das raízes e radículas aumenta a capacidade de absorção da planta e, logo, a capacidade de produção da cultura. Assim, usar substâncias que aumentem a eficácia desse nutriente se torna prática indispensável a empreendimentos agrícolas de alta tecnologia.

Em diversos experimentos, estirpes de bactérias do gênero *Azospirillum* mostraram grande potencial na promoção do crescimento de plantas em diferentes tipos de solos e condições climáticas. Observou-se a produção de fitormônios influenciados pelas bactérias responsáveis pelo crescimento de plantas, produzindo, principalmente, ácido 3-indolacético, citoquininas e giberilinas (CROZIER et al., 1988; BOTTINI et al., 1989; CACCIARI et al., 1989; OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

Em revisão bibliográfica sobre respostas fisiológicas do *Azospirillum* em plantas, Barassi et al. (2008) constataram indicação de melhoria na clorofila e condutância estomática, maior teor de prolina nas raízes e parte aérea, aumento do potencial hídrico, incremento de água no apoplasto, aumento da elasticidade da parede celular, maior altura de planta e maior biomassa. A EMBRAPA Soja, em conjunto com a Universidade Federal do Paraná, conseguiu isolar estirpes para o milho (AbV5 e

AbV6); após ensaios conduzidos por cinco anos, verificaram ganho médio na produtividade de 25% (TEIXEIRA, 1997).

O mercado mundial oferece inoculantes comerciais contendo *Azospirillum brasilense*. Mas os maiores esforços governamentais no uso de inoculante para gramíneas foram feitos pelo México, onde o produto comercializado é denominado “fertilizante para milho” e onde, em 1993, o produto foi usado em 5 mil ha (PAREDES-CARDONA et al., 1988; CABALLERO-MELLADO; CARCANO-MONTIEL; MASCARUA-ESPARZA, 1992). Um produto denominado Graminante TM, à base de pó de carbonato de cálcio e contendo uma mistura de estirpes de bactéria do gênero *Azospirillum*, foi lançado na Argentina (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

Didonet (1988) relatou aumento de produtividade atribuído às bactérias do gênero *Azospirillum* em culturas como trigo (*Triticumaestivum* L.), cevada (*Hordeumvulgare* L.) e aveia (*Avena sativa* L.); enquanto Reis (2000) apontou aumento em espécies como algodão (*Gossypum hirsutum* L.), tomate (*Lycopersicumesculentus* L.), banana (*Musa* spp.) e braquiárias (*Brachiaria* spp.).

2.6 Respostas do milho à associação com bactérias do gênero *Azospirillum*

Trabalhando com sementes de milho inoculadas com *Azospirillum*, Muñoz-Garcia, Caballero-Mellado e Valdés (1991) verificaram aumento de matéria seca de raiz e da parte aérea; enquanto Salomone e Döbereiner (1996), avaliando a resposta de vários genótipos de milho à inoculação de quatro estirpes de *Azospirillum* Spp. isoladas na Argentina e três isoladas de raízes de sorgo e milho no Brasil, constataram aumento no peso de grãos. A melhora dessas variáveis se relaciona com causas fisiológicas, talvez por causa da absorção maior de nitrogênio. Didonet, Rodrigues e Kenner (1996) verificaram que existem várias evidências de que sementes de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* sejam responsáveis pelo aumento e acúmulo de matéria seca, o que pode ter relação com o aumento das atividades das enzimas fotossintéticas de assimilação de nitrogênio.

Okon e Vanderleyden (1997), após trabalharem com inoculação de *Azospirillum* em culturas e condições diversas de clima e solo, concluíram que o gênero *Azospirillum* spp aumentou os rendimentos; salientam ainda que seu uso pode auxiliar na fixação biológica de nitrogênio e interferir no aumento da superfície de absorção das raízes. A inoculação modifica a morfologia do sistema radicular — aumenta o número de radicelas — e o diâmetro das raízes laterais e adventícias.

Cavallet et al. (2000) usaram sementes de milho com produto comercial (Graminante) à base de inoculante da bactéria *Azospirillum* spp e verificaram aumento na produtividade média de 17%, assim como no comprimento médio das espigas, sem interferência na altura e no número de fileiras por espigas.

Em 273 experimentos na Argentina com a inoculação de *Azospirillum* em sementes de trigo, houve aumento médio de 256 kg ha⁻¹ em 76% dos ensaios. Resultados similares ocorreram com o milho: 85% dos casos responderam positivamente à inoculação com incremento da produtividade media de 472 kg ha⁻¹ (DÍAZ-ZORITA; FERNANDEZ CANIGIA, 2008). Reis Júnior et al. (2008), trabalhando com milho e a bactéria *Azospirillum amazonense*, constataram produção maior de matéria seca e acúmulo de nitrogênio nas raízes.

Hungria (2011) conduziu, em Londrina e Ponta grossa (PR), oito ensaios com milho com as estirpes AbV5 e AbV6 da *Azospirillum brasiliense* via tratamento de sementes. Mostraram-se promissoras porque se obteve aumento médio na produtividade de 26%. Jordão (2011), testando sementes de milho com e sem *Azospirillum brasiliense*, verificou incremento na produtividade.

Moraes et al. (2012), em ensaio de campo, trabalharam com quatro híbridos de milho com e sem *Azospirillum brasiliense* em sistemas de alta e baixa tecnologia. Verificaram que o uso da inoculação é uma tecnologia promissora, podendo incrementar a produtividade, independentemente do sistema usado. Em ensaio em casa de vegetação, trabalharam com quatro doses de nitrogênio e quatro do inoculante; constataram incremento dos teores de clorofila e nutrientes e aumento das atividades de uréase e fosfatase na rizosfera quando utilizados 200 kg ha⁻¹ de nitrogênio e 200 mL ha⁻¹ de *Azospirillum*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental do Gloria, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), município de Uberlândia, MG. A área experimental está localizada a 18°95'92" de latitude sul e 48°20'15" de longitude oeste, com altitude de 880 metros. Um miniabrigo climatológico, contendo pluviômetro, higrômetro e termômetro de máxima e mínima, instalado na área onde ocorria o experimento, monitorou a temperatura, a umidade relativa e a precipitação (FIG. 1).

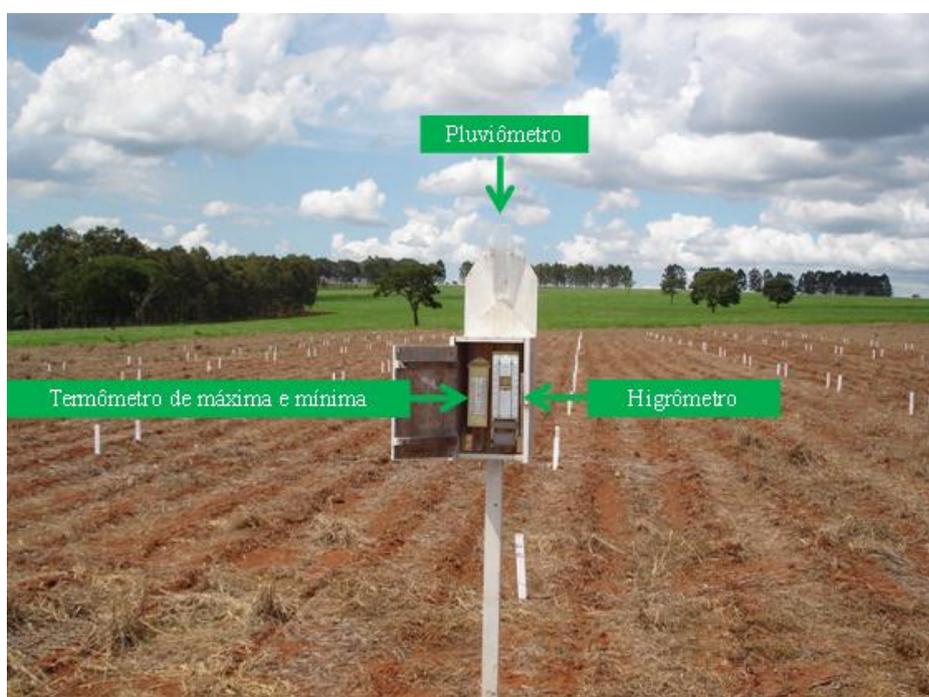


FIGURA 1 – Detalhe do miniabrigo climatológico instalado no centro da extremidade frontal do experimento para monitoramento da temperatura, umidade relativa e precipitação — Uberlândia, MG, 2012 (houve sobreposição de grafismo e texto para indicação visual de pontos)

Fonte: nosso acervo

3.1 Delineamento experimental e tratamentos

O ensaio foi montado no delineamento de blocos casualizados com seis repetições. As parcelas foram constituídas por seis fileiras de 5 metros, espaçadas de 0,8 m. Como área útil, foram consideradas as quatro fileiras centrais, desprezando-se 0,5 m de cada extremidade, conforme ilustrado na Figura 2.



FIGURA 2 – Vista geral do bloco e de detalhes da parcela e área útil do experimento — Uberlândia, MG, 2012 (houve sobreposição de grafismo e texto para indicação visual de pontos)

Fonte: nosso acervo

Os tratamentos foram dispostos no esquema fatorial $3 \times 4 + 2$. Os fatores foram: 1º fator: modo de aplicação via pulverização com *Azospirillum brasilenses* (FIG. 3): 3A – sulco de semeadura (sobre as sementes); 3B – base da planta em estágio V_3 ; 3C – área total com a planta em estágio V_6 .

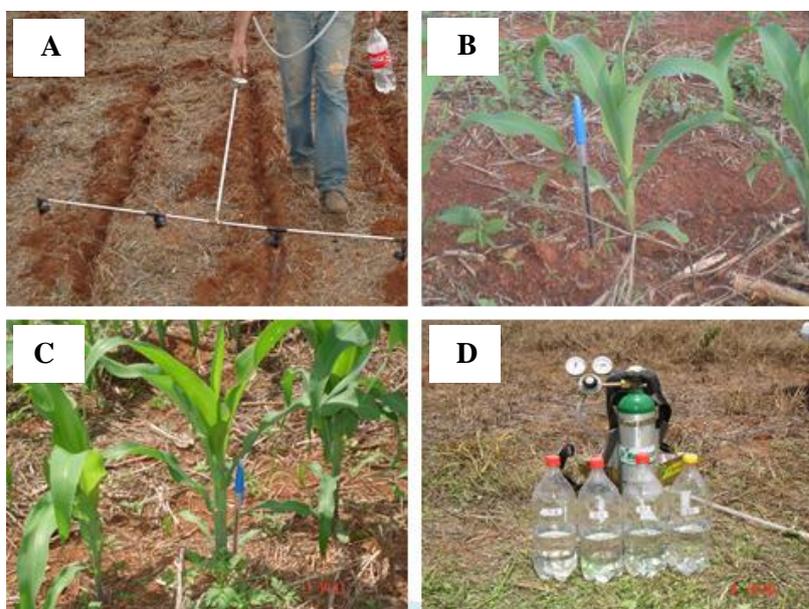


FIGURA 3 – A) modo de aplicação no sulco de semeadura; B) base da planta em estágio V_3 ; C) base da planta em área total no estágio V_6 ; D) detalhe do equipamento utilizado — Uberlândia, MG, 2012 (houve sobreposição de grafismo e texto para indicação visual de pontos)

Fonte: nosso acervo

As aplicações foram feitas com pulverizador³ de CO₂ de pontas micron leque (110.15), conforme ilustrado na Figura 3D. O volume de calda aplicado foi de 100L ha⁻¹.

2º fator: doses do inoculante: 1) 100 mL ha⁻¹, 2) 200 mL ha⁻¹, 3) 300 mL ha⁻¹, 1. 400 mL ha⁻¹. Tratamentos adicionais: 1) sem inoculação, 2) inoculação conforme tratamento convencional de sementes (100 mL ha⁻¹).

3.2 Instalação e condução

O experimento foi conduzido no sistema plantio direto, em área cultivada antes com soja. Inicialmente, fez-se a dessecação da cobertura vegetal da área experimental aplicando Glyphosate® na dosagem de 5 L ha⁻¹. Após 15 dias foram coletadas amostras de solo nas profundidades de 0–20 e 20–40 centímetros para avaliação das características químicas e físicas, cujos resultados estão na Tabela 1. A adubação foi feita com semeadora de plantio direto, que distribuiu 500 kg ha⁻¹ da formulação 8-28-16, a profundidade de 5 centímetros. Na semeadura manual, na primeira quinzena de novembro de 2010, usou-se uma régua gabarito confeccionada em madeira para distribuir as sementes, de modo a distribuir 70 mil sementes por ha⁻¹ do híbrido DKB 390 VTPRO.

Houve duas adubações de cobertura: 1ª) no estádio V₃, com aplicação de 140 kg e 100 kg ha⁻¹ de N e K₂O, respectivamente (as fontes foram sulfato de amônia e cloreto de potássio); 2ª) no estádio V₄, com aplicação de 70 kg ha⁻¹ de N (a fonte foi nitrato de amônio).

O controle das plantas infestantes ocorreu no estádio V₇, com aplicação de Soberam (2 L ha⁻¹), Atrazina (2 L ha⁻¹) e Aureo (1 L ha⁻¹). O controle de fitopatógenos foi feito em três aplicações, com intervalos de 30 dias: a primeira em V₈, usando-se Opera® e Assist® nas doses de 0,75 L e 0,5 L ha⁻¹, respectivamente. Na segunda e na terceira, foi usado Priori extra, Nimbus, CoMo, Fitogard e Mancozeb, com distribuição de 150; 400 e 600 mL ha⁻¹; 2 L ha⁻¹ e 2 kg ha⁻¹, respectivamente.

Na maturação fisiológica (surgimento da camada negra), foram colhidas cinco espigas sequenciais a partir da 10ª planta de cada fileira das duas centrais da área útil. Após a despalha, palha e espigas foram postas para secar sobre piso de armazém convencional⁴ até atingir o equilíbrio higroscópico (FIG. 4). A colheita das outras espigas da área útil da parcela ocorreu no estádio R₆, quando estavam no ponto de colheita; também foram postas para secar até atingir o equilíbrio higroscópico (FIG. 5).

³ Equipamento para pesquisa código HB.PS.003, comercializado pela empresa Herbicat. A bactéria foi usada na forma do produto comercial Masterfix® L gramíneas Stoller® do lote B 07094, estirpe AbV5 e AbV6, com concentração mínima de 2 . 10⁸ células viáveis mL⁻¹.

⁴ Triagro Ltda.



FIGURA 4 – Distribuição de espigas sobre piso do armazém durante a secagem até o equilíbrio higroscópico (Uberlândia, MG, 2012)

Fonte: nosso acervo



FIGURA 5 – Distribuição de espigas sobre piso do armazém durante a secagem até o equilíbrio higroscópico (Uberlândia, MG, 2012)

Fonte: nosso acervo

3.3 Avaliações dos componentes morfológicos

3.3.1 Estandes inicial e final

Essas avaliações contaram todas as plantas da área útil nos estádios V_1 e R_6 , respectivamente. O resultado foi expresso em população de plantas por hectare.

3.3.2 Altura da planta

A altura das plantas foi avaliada no estádio R_6 , medindo-se a altura em centímetros, do solo até a inserção do pendão, em todas as plantas da área útil.

TABELA 1 – Características químicas e físicas do solo da área experimental amostrado nas profundidades 0–20 e 20–40 centímetros, na fazenda do Glória — Uberlândia, MG, 2012^{1/}

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS 0–20 CM ^{2/}										
pH	P	K	Al	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V	MO
1:2,	mg dm ⁻³				Cmol _c dm ⁻³				%	dag kg ⁻¹
5,5	3,9	0,14	0,00	1,6	0,8	3,60	2,49	41	41	2,8
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS 20–40 CM										
5,3	2,4	0,12	0,2	1,3	0,7	3,8	2,12	36	36	2,8
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS										
Profundidade (cm)		% Argila	% Silte	% Areia fina		% Areia	Textura			
0–20		68,5	6,3	10,1		15,2	Argiloso			
20–40		68,6	10,3	10,3		14,4	Argiloso			

^{1/} Análises químicas e físicas realizadas pelo laboratório de análises de solos e manejo do solo do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, MG

^{2/} (P, K - HCl 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹) (Ca, Mg, Al -KCl 1 mol L⁻¹) e (H+ Al Solução tampão SMP a pH 7,5).

3.3.3 Folhas verdes

A avaliação da folhas verdes ocorreu no estágio R₆ mediante avaliação visual em que se atribuíram notas variando de 0% (plantas completamente secas) a 100% (plantas completamente verdes) na área útil da parcela.

3.3.4 Teor de nitrogênio, fósforo e potássio na folha

No estágio VT, foram coletadas ao acaso, nas duas linhas laterais da parcela, desprezando-se 0,5 m em cada extremidade, 12 folhas +4, conforme ilustra a Figura 6A. Destas, retirou-se o terço basal sem a nervura central, segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). O protocolo usado para determinar N, P e K na folha (vide APÊNDICE A) foi feito no laboratório de análises de solo da UFU.

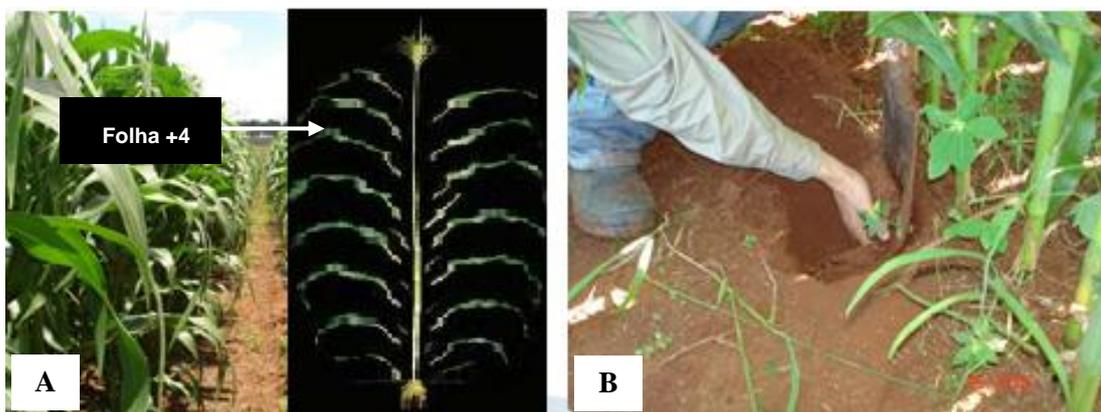


FIGURA 6 – Amostragem de folhas e solo (A e B) para determinar teores de N, P e K — Uberlândia, MG, 2012 (houve sobreposição de grafismo e texto para indicação visual de pontos)

Fonte: nosso acervo

3.3.5 Disponibilidade de nitrogênio, fósforo e potássio no solo

Quando as plantas de milho atingiram o estágio VT, foram coletadas quatro subamostras de solo na profundidade de 0–20 centímetros na região da rizosfera das plantas, nas entrelinhas da área útil da parcela. Após serem homogêneas e quarteadas, retirou-se a amostra de 1 kg, como mostra a Figura 6B. Igualmente, o protocolo empregado na determinação de N, P e K no solo (vide APÊNDICE B) foi realizado no laboratório de análises de solo da UFU.

3.3.6 Avaliações nas espigas e grãos

A avaliação de espiga e grão foi feita em dez espigas colhidas durante a maturação fisiológica (FIG. 4). O comprimento da espiga foi determinado com régua graduada em centímetros (FIG. 7A), enquanto a determinação de diâmetro se valeu de paquímetro digital graduado em milímetros — mediu-se o diâmetro na posição mediana da espiga (FIG. 7B). Após a medição de comprimento e diâmetro, houve a contagem do número de fileiras na espiga.

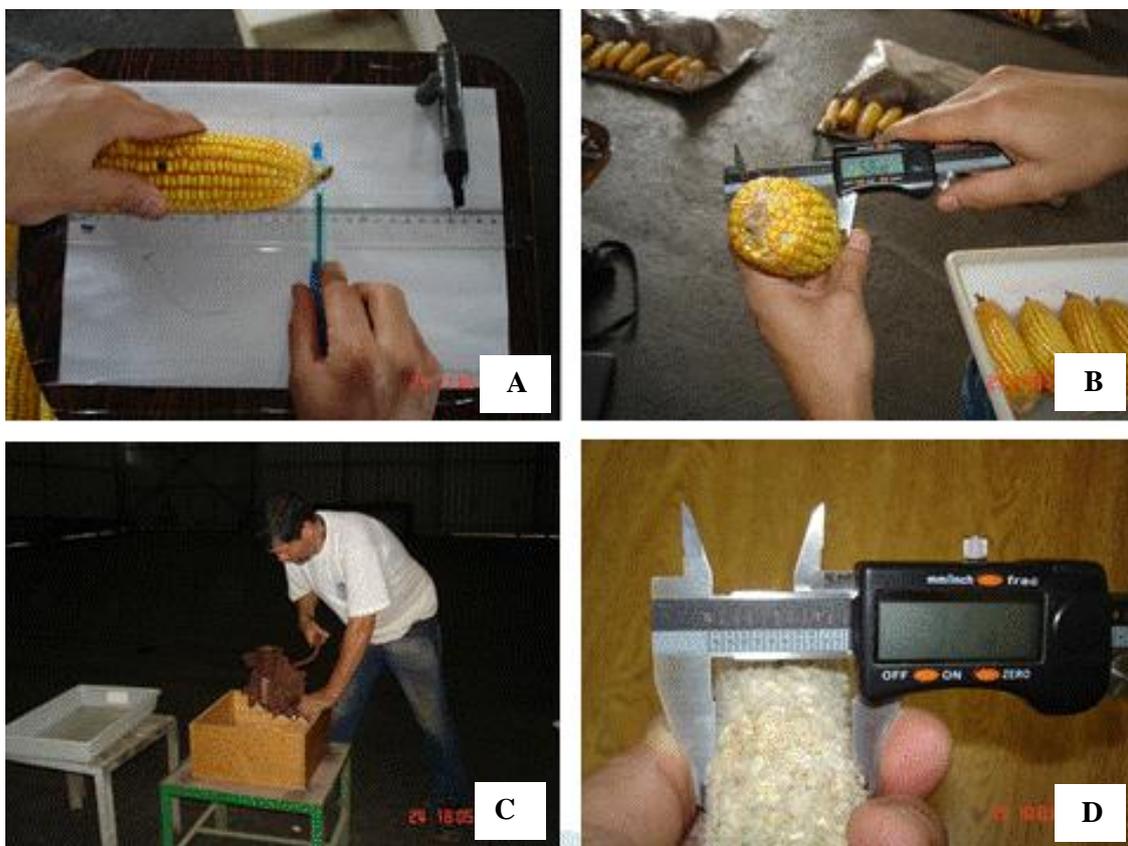


FIGURA 7 – Detalhes das avaliações: A e B) comprimento e diâmetro da espiga; C) debulha manual; D) diâmetro do sabugo — Uberlândia, MG, 2012 (houve sobreposição de grafismo e texto para indicação dos procedimentos)

Fonte: nosso acervo

Para determinar o diâmetro do sabugo, o número de grãos por espiga, o comprimento, o grau de umidade e o peso de mil grãos, as dez espigas colhidas na maturação fisiológica foram debulhadas manualmente (FIG. 7C). Para determinar o grau de umidade, usou-se o método expedito com medidor de umidade G 800 — conforme metodologia prescrita pelas Regras para Análises de Sementes/RAS

(BRASIL, 2009). O peso de grãos por espiga foi obtido após debulha das dez espigas amostradas na área útil da parcela mediante balança analítica com precisão de 1 mg, corrigindo-se o peso para o grau de umidade de 13%. O peso de mil grãos foi determinado no laboratório de análise de sementes da UFU, conforme prescrições das RAS (BRASIL, 2009), sendo corrigido para o grau de umidade de 13%. Enfim, o número de grãos por espiga e o comprimento dos grãos foram estimados indiretamente, utilizando-se os pesos dos grãos por espiga e de mil grãos e pela diferença entre o diâmetro da espiga e o diâmetro do sabugo, respectivamente.

Para determinar o peso da palha, foram usadas palhas das dez espigas amostradas em cada parcela, mediante balança analítica com precisão de 1 mg; os resultados foram expressos em gramas.

A produtividade foi obtida pela pesagem dos grãos colhidos na área útil da parcela em balança com precisão de 1 mg, ajustando-se o grau de umidade para 13% e extrapolando os resultados para kg ha^{-1} .

3.3.7 Análise estatística

As características morfológicas e de produção, bem como a produtividade, foram submetidas aos testes de homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos e de aditividade dos efeitos (blocos e tratamentos) pelo programa estatístico SPSS (16.0).

Quando todas as pressuposições foram atendidas, as análises foram realizadas com os dados originais. Quando, ao menos, uma das pressuposições não foi atendida, os dados foram transformados segundo raiz de X. Apenas nos casos em que a transformação corrigiu ou melhorou a eficiência das transformações as análises foram feitas com os dados transformados.

Os dados originais ou transformados foram submetidos à análise de variância pelos programas estatísticos Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2002) e Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2003). Nos casos em que a interação foi significativa e não significativa, as médias dos modos de aplicação foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e as concentrações de *Azospirillum*, por regressão polinomial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados de temperatura mínima e máxima, umidade relativa e precipitação coletados na área onde foi conduzido o experimento são apresentados na Figura 8. Observa-se que as médias de temperaturas, mínima e máxima, da umidade relativa do ar e o índice pluviométrico durante o experimento foram de 19,55 e 31,23 °C, 77,11% e 1.452 mm, respectivamente. Segundo Magalhães et al. (2002), a cultura do milho necessita de quase 800 mm de precipitação e oscilação térmica entre 20 e 30 °C para expressar seu potencial produtivo. Portanto, as condições climáticas no período de condução do experimento foram favoráveis.

A Tabela 2 apresenta o resumo da análise de variância dos dados relativos aos componentes morfológicos (altura da planta, folhas verdes, diâmetro do sabugo e matéria seca da palha) e da produção (estandes inicial e final, diâmetro e número de fileiras, de grãos e comprimento de espigas, peso de mil grãos e comprimento de grãos) e da produtividade do milho submetidos a modos e doses de aplicação de *Azospirillum brasilense*. Nota-se que houve efeito significativo da interação entre o modo de aplicação e as doses empregadas apenas para o número de grãos por espiga. Também se observa que a produtividade, o diâmetro de espiga e o comprimento e a produtividade de grãos diferiu significativamente da testemunha sem inoculação. Quando se compararam os adicionais com os modos e as dosagens (fatorial), verifica-se que houve efeito significativo pelo teste de F somente para o diâmetro da espiga e o comprimento dos grãos.

A Tabela 3 contém o resumo da análise de variância dos dados referentes aos teores nas folhas e a disponibilidade, no solo, de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) nas amostras de folhas e solos coletadas no ensaio com milho submetidos a modos e doses de aplicação de *Azospirillum brasilense*. Nota-se que somente o teor de potássio nas folhas, a interação entre o modo de aplicação e as doses empregadas, foi significativa pelo teste F a 5% de probabilidade; também se verifica que a interação entre tratamentos adicionais foi significativa a 5% de probabilidade pelo teste de F somente para a variável disponibilidade de nitrogênio no solo e que a interação entre os adicionais e fatorial foi significativa apenas para a disponibilidade de fósforo.

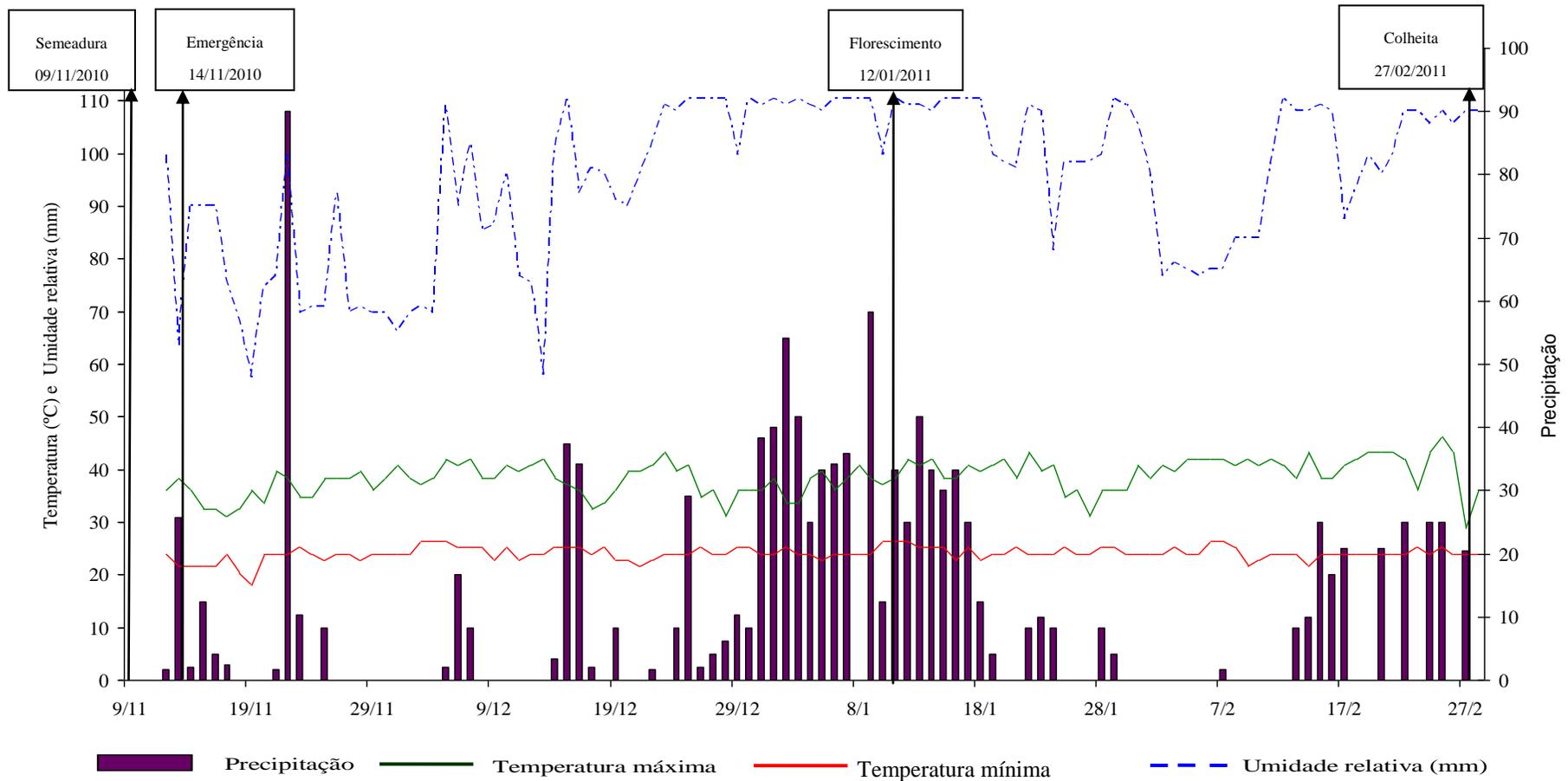


FIGURA 8 – Dados de precipitação, temperaturas mínima e máxima, umidade relativa e precipitação coletados na área experimental onde foi conduzido o experimento, avaliando-se sementes de milho inoculadas por diferentes modos e doses de *Azospirillum brasilense* — Uberlândia, MG, 2012

TABELA 2 – Resumo da análise de variância destes dados: componentes morfológicos (altura da planta), folhas verdes, diâmetro do sabugo, matéria seca da palha, componentes da produção (estandes inicial e final), diâmetro, número de fileiras e de grãos, comprimento de espigas, peso de mil grãos, comprimento e produtividade de milho submetido a modos e doses de aplicação de *Azospirillum brasilense* — Uberlândia, MG, 2012

Fontes de variação	Graus de liberdade	QUADRADOS MÉDIOS			
		Altura da planta	Folhas verdes	Diâmetro do sabugo	Matéria seca da palha
Blocos	5	0,11212	387,62	2,63	0,00126
Modo de aplicação (MA)	2	0,02984 ^{ns}	7,29 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,00016 ^{ns}
Doses (D)	3	0,05394 ^{ns}	93,52 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,00040 ^{ns}
Interação (MA) X (D)	6	0,04951 ^{ns}	132,75 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,00044 ^{ns}
Fatorial X (Adicional 1 + Adicional 2)	1	0,03732 ^{ns}	7,14 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,00018 ^{ns}
Adicional 1 x Adicional 2	1	0,02978 ^{ns}	33,33 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,00021 ^{ns}
Resíduo	65	0,04610	76,21	0,45	0,00033
Coeficientes de variação (%)		1,85	21,32	2,17	11,2974

	Estande		Espiga			Grãos		Produtividade		
	Inicial	Final	Diâmetro	Número de fileiras	Número de grãos	Comprimento	Peso de mil			
Blocos	1898556	6098400	0,08359	0,71	1564,33	228,90	1134,76	0,16040	389027,55	
Modo de aplicação (MA)	118149 ^{ns}	134006 ^{ns}	0,00798 ^{ns}	0,99 ^{ns}	3505,26 ^{ns}	61,10 ^{ns}	37,02 ^{ns}	0,01247 ^{ns}	581228,09 ^{ns}	
Doses (D)	253179 ^{ns}	3284144 ^{ns}	0,00325 ^{ns}	0,61 ^{ns}	102,28 ^{ns}	61,45 ^{ns}	160,30 ^{ns}	0,00633 ^{ns}	178312,29 ^{ns}	
Interação (MA) X (D)	1825325 ^{ns}	3691045 ^{ns}	0,00779 ^{ns}	0,60 ^{ns}	4488,73 [*]	35,32 ^{ns}	138,02 ^{ns}	0,01168 ^{ns}	186861,49 ^{ns}	
Fatorial X (Adicional 1 + Adicional 2)	8275807 ^{ns}	4244172 ^{ns}	0,35413 [*]	0,87 ^{ns}	3610,71 ^{ns}	48,91 ^{ns}	0,66 ^{ns}	0,70743 [*]	99224,76 ^{ns}	
Adicional 1 x Adicional 2	1446759 ^{ns}	813802 ^{ns}	0,62146 ^{**}	0,22 ^{ns}	1058,10 ^{ns}	0,30 ^{ns}	150,74 ^{ns}	0,98978 [*]	1484649,60 ^{**}	
Resíduo	1594074	7029891	0,07746	0,43	1906,96	58,59	324,51	0,14908	209703,74	
Coeficiente de variação (%)		1,88	4,05	2,36	3,86	3,85	9,20	8,40	5,26	3,96

**,*^{ns}: significativo a 1% e 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste de F

1 e 2: adicional sem e com *Azospirillum brasilense* na dosagem recomendada, respectivamente

TABELA 3 – Resumo da análise de variância dos dados referentes aos teores nas folhas e à disponibilidade, no solo, de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) nas amostras de folhas e solos coletadas no ensaio com milho submetido a modos e doses de aplicação de *Azospirillum brasilense* — Uberlândia, MG, 2012

Fontes de variação	Graus de liberdade	QUADRADOS MÉDIOS					
		Teor na folha			Disponibilidade no solo		
		N	P	K	N	P	K
Blocos	5	5,40	0,02040	13,02	10,56	1,64305	958,36
Modo de aplicação (MA)	2	7,85 ^{ns}	0,00334 ^{ns}	0,88 ^{ns}	2,43 ^{ns}	0,78181 ^{ns}	29,26 ^{ns}
Doses (D)	3	6,02 ^{ns}	0,00076 ^{ns}	0,49 ^{ns}	7,97 ^{ns}	1,62569 ^{ns}	149,98 ^{ns}
Interação (MA) X (D)	6	3,08 ^{ns}	0,00357 ^{ns}	0,97 *	7,60 ^{ns}	0,67125 ^{ns}	251,02 ^{ns}
Fatorial X (Adicional 1 + Adicional 2)	1	3,58 ^{ns}	0,00347 ^{ns}	1,61 ^{ns}	2,36 ^{ns}	7,31050 *	464,79 ^{ns}
Adicional 1 x Adicional 2	1	0,96 ^{ns}	0,00325 ^{ns}	1,33 ^{ns}	24,01*	2,70750 ^{ns}	520,08 ^{ns}
Resíduo	65	9,45	0,00675	0,42	5,58	1,60966	378,95
Coeficiente de variação (%)		8,95	4,52	3,75	58,48	31,86	24,44

* e ^{ns}: significativo a 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente, pelo teste de F
 1 e 2: adicional sem e com *Azospirillum brasilense* na dosagem recomendada, respectivamente

A Tabela 4 apresenta médias dos dados da concentração de potássio nas folhas e do número de grãos por espiga referentes à interação entre o modo e as doses de *Azospirillum brasilense*. Nota-se que, nas doses 100, 200 e 300 mL ha⁻¹, o modo de aplicação não interferiu no teor de potássio nas folhas nem no número de grãos por espiga. Entretanto, quando foram aplicados 400 mL ha⁻¹, o modo de aplicação na base da planta (estádio V₃) propiciou maior teor de potássio nas folhas e no número de grãos por espiga. No modo de aplicação em área total, o número de grãos por espigas foi menor, mas o teor de potássio na folha não diferiu da aplicação no sulco de semeadura, que, por sua vez, não diferiu da aplicação na base da planta. Tal fato ocorre em razão da variabilidade; noutros termos, em dadas situações comporta-se como (a) em outras como (b), porém a chance de (a) ser igual a (b) é muito remota.

TABELA 4 – Médias dos dados da concentração de potássio nas folhas e do número de grãos de milho por espiga referentes à interação entre o modo de aplicação e a doses de aplicação de *Azospirillum brasilense* — Uberlândia, MG, 2012¹

Modo de inoculação (pulverização)	Doses do produto comercial (mL ha ⁻¹)			
	100	200	300	400
	Potássio nas folhas (g/kg)			
No sulco (sobre as sementes)	17,42 a	16,83 a	16,92 a	17,42 ab
Na base da planta (estádio V3)	17,25 a	17,17 a	17,25 a	17,91a
Em área total (estádio V6)	16,58 a	17,83 a	17,58 a	16,83 b
	Número de grãos por espiga			
No sulco (sobre as sementes)	503,5 a	471,8 a	472,8 a	471,5 a
Na base da planta (estádio V3)	460,8 a	466,6 a	493,7 a	483,9 a
Em área total (estádio V6)	493,0 a	499,0 a	496,8 a	416,4 b

¹ Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A Figura 9 apresenta a concentração de potássio nas folhas em função da dose de inoculante usada quando aplicado via pulverização no sulco de semeadura e em área total. Verifica-se que, quando a inoculação foi via pulverização na base da planta, o teor de potássio na folha decresceu linearmente com o aumento da dose do inoculante. Entretanto, quando a inoculação foi via pulverização em área total, inicialmente houve

incremento no teor de potássio até a dose de 190 ml ha⁻¹, declinando depois com o aumento da dose do inoculante. Os resultados encontrados, embora apresentem diferenças significativas, podem ser atribuídos aos cálculos baseados nos teores de K, em que não se calcularam os teores de umidade, portanto não corresponderam aos valores reais; porém, encontram-se dentro da taxa de suficiência para esse elemento na cultura do milho, que é de 17,7 a 22,50 mg kg⁻¹, conforme prescrito na quinta aproximação (GUIMARÃES et al., 1999).

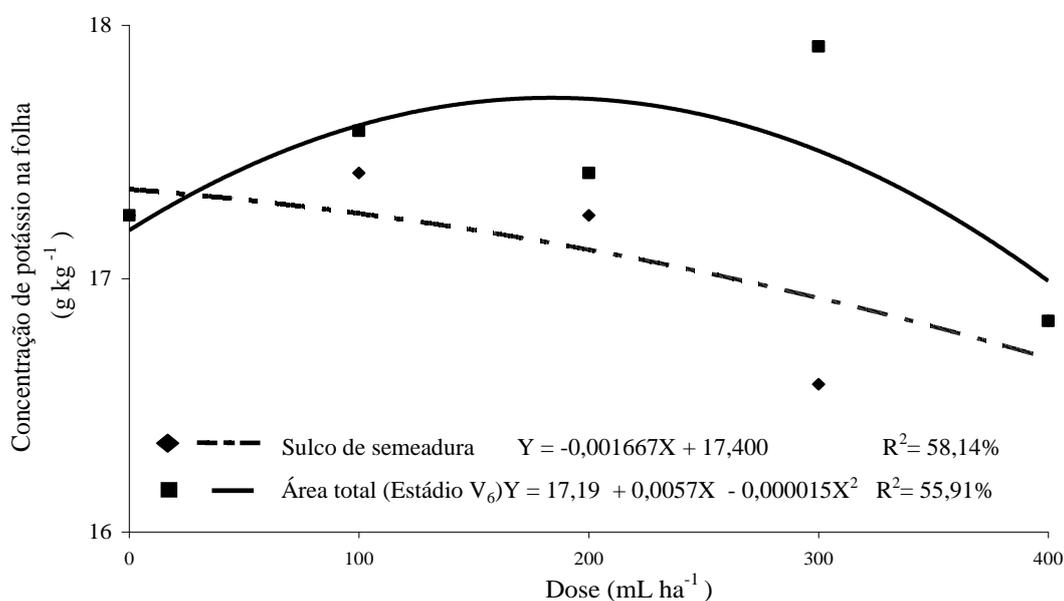


FIGURA 9 – Concentração de potássio na folha em função da dose de inoculante usada quando aplicado via pulverização no sulco de semeadura e na área total — Uberlândia, MG, 2012

A Figura 10 apresenta o número de grãos por espiga em função da dose de inoculante utilizada quando aplicado via pulverização na base da planta e em área total. Observa-se que, quando a inoculação foi via pulverização na base da planta, ao contrário do que ocorreu com o teor de potássio na folha, o número de grãos por espiga teve incremento linear com o aumento da dose do inoculante. Mas, quando a inoculação foi via pulverização em área total, de início houve incremento no número de grãos até a dose 165,63 ml ha⁻¹, declinando posteriormente com o aumento da dose do inoculante, como ocorrido com o teor de potássio.

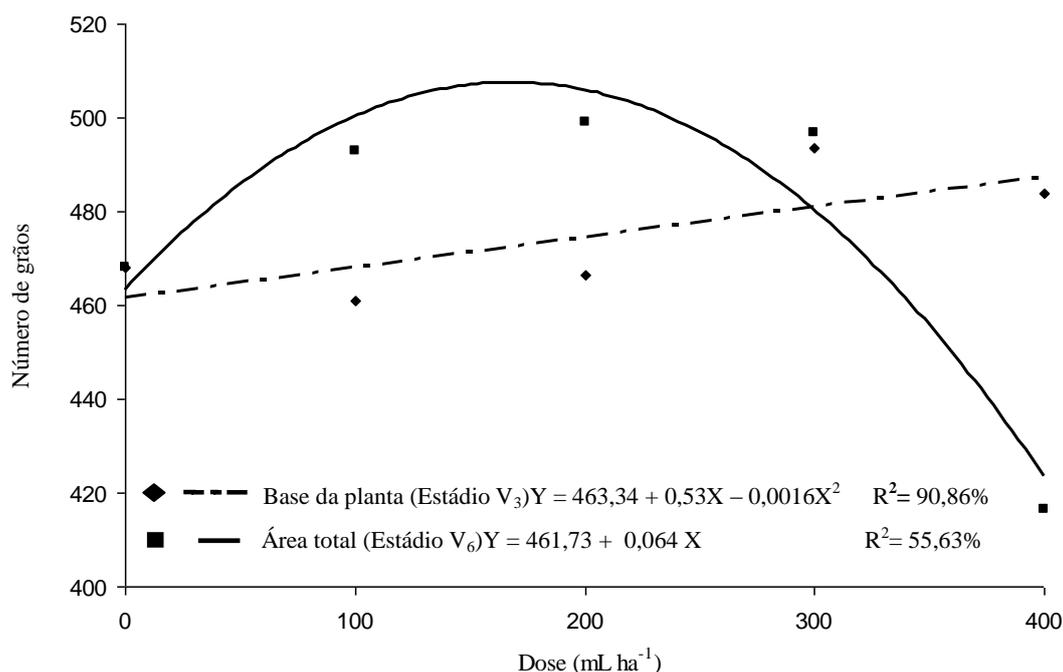


FIGURA 10 – Número de grãos por espiga em função da dose de inoculante utilizada quando aplicado via pulverização na base da planta e na área total — Uberlândia, MG, 2012

A Tabela 5 apresenta médias dos seguintes dados: componentes morfológicos, altura da planta, folhas verdes, diâmetro do sabugo, matéria seca da palha; componentes da produção, estandes inicial e final, diâmetro, número de fileiras e de grãos e comprimento de espigas; comprimento e peso de mil grãos e produtividade do milho em função da inoculação ou não das sementes com *Azospirillum brasilense* na dosagem de 100 mL ha⁻¹ do produto comercial. Os valores de incremento foram calculados considerando-se o acréscimo ou decréscimo tendo como referencia os tratamentos sem a inoculação.

Quanto à produtividade, houve incremento significativo de 6,31% em relação ao tratamento que não recebeu inoculação. Esse fato pode ser atribuído ao efeito combinado dos componentes de produção, uma vez que, de todos os fatores, apenas o diâmetro de espiga e comprimento de grãos apresentaram incrementos significativos.

Resultados referentes à produtividade provenientes da inoculação das estirpes AbV5 e AbV6 em sementes de milho são relatados por Hungria (2011), que encontrou incremento da ordem de 26%. Corroborando esses resultados, Cavallet et al. (2000), trabalhando com sementes de milho inoculadas com *Azospirillum* na forma do produto

TABELA 5 – Médias dos dados dos componentes morfológicos (altura da planta), folhas verdes, diâmetro do sabugo, matéria seca da palha, componentes da produção (estandes inicial e final), diâmetro, número de fileiras e de grãos, comprimento de espigas, peso de mil grãos, comprimento e produtividade do milho em função da inoculação ou não das sementes de milho com *Azospirillum brasilense* na dosagem de 100 mL ha⁻¹ do produto comercial¹ — Uberlândia, MG, 2012

VARIÁVEIS ²	INOCULAÇÃO					
	Sem			Com		
	Componentes morfológicos					Incremento ³ %
Altura de planta (cm)	135,13	A	137,51	A	1,76	
Folhas verdes (%)	43,33	A	43,00	A	-0,76	
Diâmetro sabugo (mm)	30,96	A	30,56	A	-1,29	
Matéria seca da palha (g)	0,17	A	0,16	A	-5,88	
						Estados
						Incremento ³ %
	Inicial (plantas ha ⁻¹)	66736,11	A	66041,67	A	-1,04
	Final (plantas ha ⁻¹)	66354,17	A	65833,33	A	-0,78
						Espigas
						Incremento ³ %
Fatores da produção	Diâmetro (mm)	51,13	B	58,67	A	14,75
	Número de fileiras	16,53	A	16,81	A	1,69
	Número de grãos	468,12	A	449,34	A	-4,01
	Comprimento (mm)	159,77	A	159,45	A	-0,20
						Grãos (g)
						Incremento ³ %
	Peso de mil (g)	338,77	A	345,88	A	2,10
	Comprimento (mm)	20,57	B	27,72	A	34,76
Produtividade (kg ha ⁻¹)		11141,96	B	11845,44	A	6,31

¹ Inoculante líquido Masterfix[®] L gramíneas

² Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

³ Em relação à ausência de inoculação

comercial “Graminante”, observaram significância na comparação dos tratamentos com e sem o inoculante, sendo relevante para as variáveis produtividade em 17% e comprimento médio das espigas em 6%.

Esses resultados corroboram dados de Moraes (2012), que, ao testar sementes de milho híbrido sobre sistema de produção de alta e baixa tecnologia inoculadas com *Azospirillum brasilense* e dosagens diferentes de nitrogênio, verificou incremento na produtividade de 7%. Reis Júnior et al. (2008), inoculando sementes de milho com *Azospirillum amazonense*, registraram fatores que podem aumentar a produtividade, como a

maior produção de matéria seca e acúmulo de N nas raízes. Nesse sentido, Salomone e Döbereiner (1996) verificaram maior produção de raízes e substâncias ligadas ao crescimento.

Confirmando o efeito do *Azospirillum*, Ramos et al. (2010), trabalhando com sementes de milho inoculadas com *Azospirillum liposferum*, avaliaram características filotécnicas e verificaram que as maiores médias foram obtidas para tratamentos inoculados com bactéria e que receberam adubação nitrogenada.

Várias pesquisas relatam resultados negativos. Dotto et al. (2010), trabalhando com dois híbridos de milho inoculados ou não com *Herbaspirillum seropedicae* e três doses de nitrogênio em cobertura, verificaram que a bactéria não influenciou na produtividade e que os híbridos testados apresentaram respostas diferenciadas à inoculação. Bartchechen et al. (2010), testando a produtividade do milho decorrente da inoculação ou não com *Azospirillum brasilense* e três doses em cobertura de nitrogênio, verificaram não haver significância entre os tratamentos.

Resultados discrepantes que envolvam milho inoculados com *Azospirillum*, podem ser atribuídos à especificidade de atração entre planta e bactéria (BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 1983), condições nutricionais do solo (RAMOS, 1992) e condições edafoclimáticas dos experimentos (KILLORN; ZOURARAKIS, 1992). Döbereiner (1978) constatou aumento no número de bactérias diazotróficas na endorizosfera, na fase da floração, influenciando no enchimento de grãos, justamente quando a demanda de nitrogênio e outros nutrientes da planta é maior.

Segundo Guerreiro (2008), as rizobactérias podem estimular a produção de hormônios vegetais como as auxinas, giberilinas e citocininas — esta última responde pela mobilização de nitrogênio e potássio das raízes para as folhas e, possivelmente, para os grãos.

A Tabela 6 apresenta médias dos dados referentes aos teores nas folhas e à disponibilidade no solo de N, P e K, amostra coletadas de 0–20 centímetros, do milho submetido a modos e doses de aplicação de *Azospirillum brasilense*. Segundo Novais et al. (2007), as quantidades ideais de N, P e K nas folha de milho são 30, 22 e 20 g kg⁻¹, respectivamente. Os resultados encontrados convergem para as recomendações. Sobre a interação desses nutrientes, verificaram uma interação não competitiva entre potássio e nitrogênio, absorvidos em grandes quantidades pelas plantas; a adição de um eleva a demanda pelo outro; e a falta pode elevar o decréscimo em acúmulo de reservas e produção. Sobre a interação do nitrogênio com o fósforo, verificaram que, quando se adiciona fertilizantes nitrogenados, aumenta a absorção do fósforo.

TABELA 6 – Dados dos teores nas folhas e da disponibilidade no solo de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K); amostra coletadas na profundidade de 0–20 cm nas amostras de folhas e solo do ensaio com milho submetido a modos e doses de aplicação de *Azospirillum brasilense* — Uberlândia, MG, 2012

Variáveis ²	INOCULAÇÃO					
	Sem			Com		
	Teores na folha			Incremento ³ %		
N (g kg ⁻¹)	34,57	A		35,13	A	1,62
P (g kg ⁻¹)	3,43	A		3,30	A	-3,80
K (g kg ⁻¹)	17,25	A		17,92	A	3,88
	Disponibilidade no solo			Incremento ³ %		
N (g kg ⁻¹)	3,03	B		5,87	A	93,73
P (C mol _c dm ⁻³)	2,00	A		2,95	A	47,50
K (g kg ⁻¹)	92,00	A		78,84	A	-14,30

¹ Inoculante líquido Masterfix[®] L gramíneas

² Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

³ Em relação à ausência de inoculação

Sobre as pressuposições para análise de variâncias, as tabelas 7, 8 e 9 mostram resumos dos testes de homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos e aditividade dos blocos. Nota-se que a transformação de dados foi necessária só para as variáveis altura de planta (TABELA 7), diâmetro da espiga e comprimento dos grãos (TABELA 8) e teor de fósforo nas folhas (TABELA 9).

TABELA 7 – Testes de homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos e aditividade dos blocos referentes às análises dos dados de altura de plantas; folhas verdes, diâmetro de sabugo e matéria seca da palha obtidos no experimento com sementes de milho híbrido submetidas a diferentes modos e doses de aplicação de *Azospirillum brasilense* — Uberlândia, MG, 2012

Variáveis	Testes	DADOS NÃO TRANSFORMADOS		DADOS TRANSFORMADOS		Análise dos dados
		Valor de F/K/F ¹	Significância ²	Valor de F/K/F ¹	Significância ²	
Altura de planta ⁴	Levene	1,449	0,760	1,372	0,195	T
	Ks ³	0,123	0,003	0,121	0,004	
	Tuckey	5,098	0,028	4,236	0,045	
Folhas verdes	Levene	1,730	0,073	—	—	NT
	Ks ³	0,037	0,200	—	—	
	Tuckey	0,041	0,840	—	—	
Diâmetro sabugo	Levene	1,317	0,224	—	—	NT
	Ks ³	0,060	0,200	—	—	
	Tuckey	6,348	0,015	—	—	
Matéria seca palha	Levene	1,344	0,210	—	—	NT
	Ks ³	0,086	0,181	—	—	
	Tuckey	1,545	0,220	—	—	

T; NT: dados transformados e não transformados, respectivamente

¹ Estatística dos testes: K – F; F' Kolmogorov-Smirnov, Levene e Tuckey, respectivamente

² Valores em negrito apresentam homogeneidade de variância, normalidade dos resíduos e aditividade para blocos pelos testes de Levene, Kolmogorov-Smirnov e Tuckey, respectivamente à probabilidade de 0,01%

³ Kolmogorov-Smirnov

⁴ Dados transformados em \sqrt{x}

TABELA 8 – Resumo dos testes de homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos e aditividade dos blocos referentes às análises dos dados de estandes inicial e final, diâmetro de espiga, número de fileiras por espiga, número de grãos por espiga, comprimentos da espiga, peso de mil grãos, comprimento de grãos e produtividade obtidos no experimento utilizando sementes de milho híbrido inoculadas por diferentes modos e doses de aplicação de *Azospirillum brasilense* — Uberlândia, MG, 2012

Variáveis	Testes	DADOS NÃO TRANSFORMADOS		DADOS TRANSFORMADOS		Análise dos dados
		Valor de F/K/F ¹	Significância ²	Valor de F/K/F ¹	Significância ²	
Estande inicial	Levene	0,652	0,801	—	—	NT
	Ks ³	0,101	0,035	—	—	
	Tuckey	0,731	0,396	—	—	
Estande final	Levene	0,916	0,541	—	—	NT
	Ks ³	0,047	0,200	—	—	
	Tuckey	1,322	0,256	—	—	
Diâmetro espiga ⁴	Levene	4,543	0,000	4,427	0,000	T
	Ks ³	0,267	0,000	0,245	0,000	
	Tuckey	186,26	0,000	133,433	0,000	
Número de fileiras por espiga	Levene	0,525	0,902	—	—	NT
	Ks ³	0,087	0,168	—	—	
	Tuckey	0,053	0,820	—	—	
Número de grãos por espiga	Levene	2,432	0,014	—	—	NT
	Ks ³	0,076	0,200	—	—	
	Tuckey	5,745	0,020	—	—	
Comprimento da espiga	Levene	1,231	0,277	—	—	NT
	Ks ³	0,077	0,200	—	—	
	Tuckey	0,352	0,556	—	—	
Peso de mil grãos	Levene	1,083	0,388	—	—	NT
	Ks ³	0,063	0,200	—	—	
	Tuckey	0,735	0,395	—	—	
Comprimento dos grãos ⁴	Levene	4,704	0,000	4,541	0,000	T
	Ks ³	0,307	0,000	0,273	0,000	
	Tuckey	148,84	0,000	70,914	0,000	
Produtividade	Levene	0,749	0,309	—	—	NT
	Ks ³	0,066	0,200	—	—	
	Tuckey	0,019	0,892	—	—	

T; NT: dados transformados e não transformados, respectivamente

¹ Estatística dos testes: K –F; F' Kolmogorov-Smirnov, Levene e Tuckey, respectivamente

² Valores em negrito apresentam homogeneidade das variância, normalidade dos resíduos e aditividade para blocos, pelos testes de Levene, Kolmogorov-Smirnov e Tuckey, respectivamente a probabilidade de 0,01%

³ Kolmogorov-Smirnov

⁴ Dados transformados em \sqrt{x}

TABELA 9 – Resumo dos testes de homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos e aditividade dos blocos referentes às análises dos dados de teores nas folhas e a disponibilidade no solo de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) nas amostras coletadas no ensaio com milho submetidas a modos e doses de aplicação de *Azospirillum brasilense* — Uberlândia, MG, 2012

Variáveis	Testes	DADOS NÃO TRANSFORMADOS		DADOS TRANSFORMADOS		Análise dos dados
		Valor de F/K/F ³ ¹	Significância ²	Valor de F/K/F ³ ¹	Significância ²	
N nas folhas	Levene	1,796	0,061	1,874	0,048	NT
	Ks ³	0,188	0,000	0,192	0,000	
	Tuckey	4,322	0,043	5,104	0,028	
P nas folhas	Levene	1,035	0,429	1,008	0,453	T
	Ks ³	0,132	0,001	0,125	0,002	
	Tuckey	4,186	0,046	3,977	0,051	
K nas folhas	Levene	0,782	0,676	—	—	NT
	Ks ³	0,088	0,158	—	—	
	Tuckey	4,262	0,044	—	—	
N no solo	Levene	1,351	0,206	—	—	NT
	Ks ³	0,071	0,200	—	—	
	Tuckey	2,980	0,090	—	—	
P no solo	Levene	1,578	0,113	—	—	NT
	Ks ³	0,091	0,085	—	—	
	Tuckey	1,588	0,213	—	—	
K no solo	Levene	1,417	0,174	—	—	NT
	Ks ³	0,075	0,200	—	—	
	Tuckey	0,317	0,576	—	—	

T; NT: dados transformados e não transformados, respectivamente

¹ Estatística dos testes: K –F; F³ Kolmogorov-Smirnov, Levene e Tuckey, respectivamente

² Valores em negrito apresentam homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos e aditividade para blocos, pelos testes de Levene, Kolmogorov-Smirnov e Tuckey, respectivamente a probabilidade de 0,01%

³ Kolmogorov-Smirnov

⁴ Dados transformados em \sqrt{x}

5 CONCLUSÕES

- A inoculação com *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes propicia incremento na produtividade do milho.
- A inoculação via pulverização e o aumento na dosagem não alteram a produtividade do milho.

REFERÊNCIAS

- AMADO, T.J.C.; MILNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.26, p.241–8, 2002.
- ARAÚJO, A.S.F.; TEIXEIRA, G.M.; CAMPOS, A.X.; SILVA, F.C.; AMBROSANO, E.J.; TRIVELIN, P.C.O. Utilização de nitrogênio pelo trigo cultivado em solo fertilizado com adubo verde (*Crotalaria juncea*) e/ou uréia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, p.284–9, 2005.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622p.
- BALDANI, J.J. et al. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.924–9, 1983.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.V.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.29, p.911–22, 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. (Ed.) *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.49–59.
- BARTCHECHEN, A.; FIORI, C.C.L.; WATANABE, S.H.; GUARIDO, R.G. 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.56–9, dez. 2010.
- BASHAN, Y.; HOLGOIN, G. *Azospirillum* — plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). **Canadian journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103–21, 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. 521–77, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análises de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.
- BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for future. **Fertilizer Research**. The Hague, Oxford, v.42, n.1, p.241–50, 1995.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R.P. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, Waterbury, v.90, p.45–7, 1989.

- BREMNER, J.M.; KEENEY, D.R. Determination and isotope ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: 3 — Exchangeable ammonium, nitrate and nitrite by extraction — distillation methods, Madison, **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, 30, p.577–82, 1966.
- CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M. A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 243–53, 1992.
- CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.115, p.151–3, 1989.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375–470.
- CAVALLET, L.E.; PESSOA A.C.S.; HELMICH J.J.; HELMICH P. R.; OST C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* Spp. **Revista Brasileira de Engenharia ambiental**, Campina Grande, v. 4 n.1, p.129–32, 2000.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO/CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira** — terceiro levantamento-milho — safra 2011/12. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_10_58_12_08.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2012.
- CROZIER, A. et al. Analysis of indole-3-acetic acid and related indóis in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Denver, v.54, p.2.833–7, 1988.
- DÍAZ-ZORITA, M.; FERNANDEZ CANIGIA, M.V. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* Ssp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. **Asociación Argentina de Microbiología**, Argentina, p.155–66, 2008.
- DIDONET, A.D. **Resultados de pesquisa sobre inoculação de trigo, cevada e de milho com bactérias do gênero *Azospirillum***. Passo Fundo: EMBRAPA/CNPT, 1988. 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 brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.16, n.9, p.645–51, 1996.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat. Rev. Microbiol**, London, v.2, p. 621–31. 2004.

- DOBBELAERE, S. et al. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 36, p. 284–97, 2002.
- DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasiliense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 212, p. 155–64, 1999.
- DÖBEREINER, J. Influence of environmental factors on the occurrence of *Spirillum lipoferum* in soils and roots. In: Environmental role of nitrogen-fixing blue green algae and as symbiotic bacteria. **Ecological Bulletin**, Copenhagen, v.26, p.343–52, 1978.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E.J.B.N. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992, p. 173–80.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J. (Ed.). **Nitrogen fixation**. Pullman: Washington State University, 1975. p.518–38.
- DOTTO, A.P.; LANNA, M.C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J.F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 3, p. 376–82, 2010.
- ECKERT, B. et al. *Azospirillum doebereineriae* Ssp. 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.
- FALLIK, E. et al. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* inoculated maize roots. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v.21, p. 147–53, 1988.
- FERREIRA, D.F. Programa Sisvar.exe. **Sistema de análises de variância**. Versão 5.3. 2003.
- GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ, V.H.A.; CARLOS, A.; GUIMARÃES, A.C.I.; GONTIJO, P.T. **Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais**. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais — 5ª Aproximação. Viçosa, MG, 1999. 359p
- GUERREIRO, R.T. **Seleção de *Bacillus spp* promotores de crescimento de milho**. 2008. 55f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) — Faculdade de agronomia da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2008.
- HARTMANN, A; BALDANI, J. I. The genus *Azospirillum*. In: DWORKIN, M. et al. (Ed.). **The Prokaryotes**. New York: Springer, 2006. p.115–40.

- HUNGRIA, M.; CAMPOS, 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. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p.
- JORDÃO, L.T. Fixação eficiente. **Cultivar grandes culturas**, Pelotas, n. 144, p 16–8, maio 2011.
- 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 *on-line* em 8 jul. 2011. doi 10.1099/ijms.0.030585-0.
- KHAMMAS, K.M. et al. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Reserch in Microbiology**, Paris, v. 140, n.9, p.679–93, 1989.
- KILLORN, R.; ZOURARAKIS, D. Nitrogen fertilizer management effects on corn grain yield and nitrogen uptake. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v.5, p.142–8, 1992.
- LAMBRECHT, M. et al. Indoles-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, London, V. 8, p.298–300, 2000.
- LANDRY, J.; DELHAYE, S. The Tryptophan contents of wheat, maize and barley grains as a function of nitrogen content. **Journal of Cereal Science**, London, v.18, p.259–66, 1993.
- MAGALHÃES, F.M. et al. A new acidtolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.55, p. 417–30, 1983.
- MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F. O.M.; PAIVA, E.; CARNEIRO, N.P. **Fisiologia do milho**. Sete lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. 23p (EMBRAPA-CNPMS. Circular técnica, 22).
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: princípios e aplicações. 2 ed. Piracicaba: Potafós, 1997. 319p.
- MEHANAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadenses* sp. nov., nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **Internatioanal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.57, p.620–24, 2007a.
- MEHANAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zaeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **Internatioanal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.57, p.2.805–9, 2007b.

- MORAES, T.P.; BRITO, C.H.; FERREIRA, A. S. **Adubação nitrogenada e inoculação co *Azospirillum brasilense* em híbridos de milho**. 2012. 82f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) — Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.
- MUÑOZ-GARCIA, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; VALDÉS, M. Promoción del crecimiento del maíz por cepas productoras de siderófos de *Azospirillum y pseudomonas* fluorescentes. In: CONGRESO NACIONAL DE LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO Y I ENCUESTRO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACION STR FIJACION DE NITROGENO, 3., 1991. Cuernavaca. **Anais...** Cuernavaca, México, f.61. 1991.
- MURAOKA, T. et al. Eficiencia de abonos verdes (crotalaria y mucuna) y urea, aplicados solos o juntamente, como fuentes de N para el cultivo de arroz. **Terra**, Chapingo, v.20, p.17–23, 2002.
- NOVAIS, R. F. et al. Interação do nitrogênio com outros nutrientes. **Fertilidade do Solo**, Viçosa, p. 439–833, 2007.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1.591–1601, 1994.
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species stimulate plants. **ASM News**, Ann Arbor, v. 63, p. 364–70, 1997.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS/ONU. Disponível em: <<http://www.onu.org.br/index.php?s=polu%C3%A7%C3%A3o+mundial&x=0&y=0>> Acesso em: 4 jan. 2012.
- PAREDES-CARDONA et al. Respuesta del maíz a la inoculación com *Azospirillum brasilense*. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, México, v. 30, p. 351–55, 1988.
- 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.1.263–71, 2006.
- PEOPLES, M. B; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: an efficient Source of Nitrogen for sustainable Agricultutal Produccion. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 3–28, 1995.
- PERSELLO-CARINEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 26, p. 189–99, 2003.
- POPE, M.R.; MURRELL, S.A.; LUDDEN, P.W. Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by denosine diphosphoribosylation of a specific arginine residue. **Proc. National Acad. Sci.**, USA, v.82, p. 3.173–7, 1985.

- POSTGATE, J.R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University press, 1982. p. 375–85.
- QUADROS, P.D. **Inoculação de *Azospirillum* Spp. em sementes de genótipos de milho cultivado no Rio Grande do Sul**. 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) — Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- RAMOS, L.R.M. **Efeito de períodos de convivência da comunidade infestante sobre o crescimento, nutrição mineral e produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L.)**. 1992. 100 f. Tese (Doutorado em Agronomia) — Faculdade de Agronomia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- RAMOS, A.S.; SANTOS, T.M.C.; SANTANA, T.M.; GUEDES, E.L.F.; MONTALDO, Y.C. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Verde**, Mossoró, v.5, n.4, p. 113–7, 2010.
- 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, 2008, p. 1.139–46. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo-Brasil.
- 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, V.M. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **CRC. Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v.19, p. 227–47, 2000.
- REIS V.M.; OLIVARES F. L. **Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias**. Seropédica: Embrapa — Agrobiologia. p. 34. 2006. (Embrapa agrobiologia-documento 216).
- REVISTA RURAL. **Inoculante raiz mais forte**, 2009. Disponível em: <http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2009/Artigos/rev140_inoculante.htm> Acesso em: 4 jan. 2012 .
- RONCATTO-MACCARI et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* express nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Oxford, v.45, p.39–47, 2003.
- SABATA, R.J.; MASON, S.C. Corn hybrid interactions with soil nitrogen level and water regime. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v.5, p.137–42, 1992.
- SALOMONE I.E.G.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p. 193–6, 1996.
- SCIVITTARO, W.B.; MURAOKA, T.; BOARETTO, A.E.; TRIVELIN, P.C.O. Utilização de nitrogênio de adubos verdes e mineral pelo milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, p.917–26, 2000.

SEVILLA, M.; BURRIS, R.H.; GUNAPLA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with acetobacter diazotrophicus wild-type and nif-mutant strains. **Plant Microbe Interact**, St. Paul, v.14, p.358–66, 2001.

SILVA, F. A.; S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p.71–8, 2002.

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.541–4, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Assimilação de nutrientes. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 286–98 .

TARRANT, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian journal of Microbiology**, Ottawa, v.24, n.8, p. 967–80, 1978.

TEIXEIRA, K.R. S. **O mecanismo de regulação da FBN e sua diversidade**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997. 25p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 40).

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) — Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE/USDA. **World corn production, consumption, and stocks**. 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Table+04+Corn+Area%2c+Yield%2c+and+Production++++++++&hidReportRetrievalID=884&hidReportRetrievalTemplateID=1>>. Acesso em: 8 Oct. 2012.

VARGAS, C. et al. Signaling pathways meeting: the association between sugarcane and endophytic bacteria: **A genomic approach**. **Symbiosis**, Balaban, v.35, p.159–180, 2003.

WEBER, O.B. **Ocorrência e caracterização de bactérias diazotróficas em bananeiras (*Musa spp.*) e abacaxizeiros (*Ananas comosus [L] Merrill)* e seus efeitos no crescimento de mudas micropropagadas**. 1998. 192 f. Tese (Doutorado em Agronomia) — Faculdade de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.

WEBER, O. B. et al. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 210, p. 103–13, 1999.

WEBER, O.B. et al. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 201–5, 2001.

WILLIAMS, L.E. E.; MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**. Palo Alto, v. 52, p. 659–88, 2001.

YAMADA, T.; ABDALLA, S, R, S.; VITTI, G, C. Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira. **International Plant Nutrition Institute**, Piracicaba, 2007, 722p.

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.959–63, 2008.

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.1.435–8, 2005.

ZHANG, F.; MACKENZIE A.F.; SMITH, D.L. Nitrogen fertilizer and protein, lipid, and non-structural carbohydrate concentrations during the course of maize kernel filling. **Journal of Agronomy & Crop Science**, Amsterdam, v.172, p.171–81,1994.

APÊNDICE A – Protocolo para determinar NPK na folha feito no laboratório de análises de solo da Universidade Federal de Uberlândia

1 Soluções

1.1 Solução digestora para o nitrogênio

- 20 g de sulfato de lítio
- 1,2 g de selênio em pó
- 1000 mL de H₂O₂
- 1200 ml de H₂SO₄

Colocar um *becker* de 4 litros envolto com gelo. Adicionar os sólidos vagarosamente. Acrescentar o H₂O₂ e o H₂SO₄ aos poucos. (Reação muito exotérmica.)

1.2 Solução digestora nitroperclórica

- 177,8 ml de ácido nítrico 65% PA
- 22,2 ml de ácido perclórico 70% PA

1.3 Solução RM

- 500 mL de molibdato de amônio 5%
- 500 mL de vanadato de amônio 25%

1.4 Solução para destilação (indicador ácido bórico)

Em um Becker, colocar 10 mL de ácido bórico 2% com vermelho de metila e verde de bromocresol (solução vinho-cinza).

Aquecer 500 mL de água a 50°C.

Pesar

- 20 g de ácido bórico PA,
- 0,02 g de verde de bromocresol,
- 0,0132 g de vermelho de metila.

Em 400 ml de álcool etílico PA, dissolver o vermelho de metila e o verde de bromocresol. Juntar aos 500 ml de água aquecido até dissolver; depois completar para perfazer dois litros com água deionizada.

1.5 Solução para titulação

Solução de ácido sulfúrico 0,1N

M= Normalidade x equivalente do ácido x volume em litros

$$M= 0,1 \times 49 \times 2$$

$$M= 9,8$$

$$V= M/D$$

$$V= 9,8/1,84$$

$$V= 5,326$$

$$V/0,965 \text{ (pureza do ácido)}$$

$$V= 5,52 \text{ ml/2litros}$$

Titular com ácido sulfúrico 0,1N. Anotar o volume e jogar na fórmula (ponto de virada: rosa claro).

2 Preparo de amostra foliar

No estádio VT, coletar aleatoriamente 12 folhas do terço basal da folha +4 sem a nervura central das plantas, para cada parcela, utilizado só o terço médio de cada folha.

2.1 Lavação

2.1.2 Água corrente

2.2.2 Em água deiozonizada com detergente

2.1.3 Novamente em água corrente

2.1.3 Solução de HCL. Adicionar em um recipiente de 10L. 3,3 ml da solução de HCL 1/1 em dois litros de água deiozonizada

2.1.4 Em água deiozonizada

2.2 Retirar e descartar a nervura principal de cada folha

2.3 Secar em estufa de circulação de ar a 60°C por 72 horas

2.4 Triturar em moinho de facas

3 Digestão nitroperclórica

Homogeneizar e pesar uma alíquota de 0,5 g da amostra e colocá-las em tubo digestor, acrescentar 6 ml da solução digestora nitroperclórica e levar para o bloco digestor a:

– 50°C por 15 min.,

– 75 por 15 min.,

– 120 por 30 min.,

– 160 por 40 min.,

– 210 por 30 min.

Obs.: reparar se ficou aproximadamente 1 ml.

Deixar em repouso de 16 horas. Aquecer água a 50°C e colocar 50 ml em cada tubo e agitar. Deixar em repouso por mais 16 horas.

4 Destilação do nitrogênio foliar

Observação: usar destilador específico para nitrogênio e fazer a prova em branco de cada bloco. No funil superior, colocar 15 mL de hidróxido de sódio a 60%. Encaixar o tubo que veio da digestão e verter a soda. Na outra extremidade do aparelho, colocar o *becker* com a solução de ácido bórico, deixando completar o volume de 60 mL (solução fica verde-azulada). Titular com ácido sulfúrico 0,1 N (ponto de virada: rosa claro)

5 Potássio foliar

Pipetar 1 ml do extrato da digestão nitroperclórica. Colocar 9 ml de água deiozonizada. Fazer a leitura no aparelho fotômetro de chama. Ligar o aparelho 20 minutos antes.

6 Fósforo foliar

Em um Becker, pipetar 1 ml do extrato da digestão nitro-perclórica. Colocar 4 ml de água deiozonizada. Colocar 2 ml da solução RM. Esperar por 45 min e fazer a leitura no espectrofotômetro.

APÊNDICE B – Protocolo para determinar NPK no solo realizado no laboratório de análises de solo da Universidade Federal de Uberlândia

1 Soluções

1.1 Indicador de ácido bórico

Pesar 40 g de ácido bórico e dissolver em 500 ml de água destilada quente (50-60°C). Passar o conteúdo para um balão de 2L e colocar mais 1000 mL de água destilada. Reservar. Medir em uma proveta 400 mL de etanol. Em um *becker* de 50 ml pesar:

– 0,013 g de vermelho de metila,

– 0,020 g de verde de bromocresol,

Em cada Becker, ir dissolvendo o conteúdo e juntando o vermelho e o verde em um *becker* de 500 ml (sempre com o álcool). Depois juntar o conteúdo alcoólico no balão que contem o ácido bórico. Completar o volume para 2 litros. Pingar uma gota de NAOH 60% (vai mudar de cor). Agitar até homogeneizar.

1.2 Ácido sulfúrico 0,025M

$$m=M \times MM \times V(L)$$

em que:

m= massa

M= molaridade

MM= massa molar

V(L)= volume em litros

$$m= 0,025 \times 98 \times 1$$

$$m= 2,45$$

$$v=m/d$$

$$v=2,45/1,84$$

$$v= 1,33 \text{ mL}$$

$$v1= v/\text{pureza}$$

$$v1= 1,33/0,95$$

$$v1= 1,4 \text{ mL}$$

Dissolver 1,4 mL de ácido sulfúrico conc. Para 1 litro de água destilada.

Observação:

Normalidade= molaridade/2 ou Normalidade x 2 = molaridade

Fósforo e Potássio (método duplo ácido [mehlich-1])

Preparo de soluções (PA; PB; PC)

1.3 Solução “pa” (9 litros)

Em balão de 1 L: colocar 500 mL de água destilada, adicionar 36,55 mL de HCL conc, adicionar 6,25 mL de H2SO4 conc., completar ao volume e agitar, transferir para tambor, adicionar 8 litros com balão de 2L

1.4 Solução “pb”

Pesar 3,8g de molibdato de amônio, dissolver em 150 mL de água destilada aquecida (50-60°C) em *becker* de 200mL, deixar esfriar e transferir para balão de 200 mL.

Completar o volume. Colocar em balão de 1 L, colocar 80 mL de água destilada em balão de 200 mL, adicionar 70,7 mL de HCL conc. e agitar. Completar o volume para 200 mL. Juntar no balão que esta com o molibdato, adicionar 600 mL de água destilada e agitar

1.5 Solução "pc"

Pesar:

- 0,63 g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico,
- 1,25 g de sulfito de sódio (NA₂S₂O₅).
- 36,50 g de metassulfito de sódio (NA₂S₂O₅).

Passar o produto em almofariz. Guardar em vidro escuro com papel alumínio por no máximo 40 dias. Pesar 16,0 g do pó redutor e dissolver em 100 mL de água destilada quente (50-60°C). Transferir para frasco escuro e esperar cristalizar (3 a 6 dias). Após a cristalização, filtrar. Preparar nova a cada 3 semanas.

1.6 Solução kcl 0,1 m

Dissolver 74,5g de KCL EM 1000 ml água destilada.

2 Preparo de amostra solo

- Secar em casa de vegetação 300 mL por 24 horas,
- Padronizar com uso de almofariz e peneira de 100 m.
- Extrator duplo ácido método mehlich-1

Medir 3 g de solo e colocar em frasco de agitação de 50 mL, adicionar 30 mL da solução "PA", agitar por 5 minutos em agitador horizontal com 110-120 osc por min. Deixar em repouso ate o dia seguinte por 15 18 horas. Pipetar 3,0 mL do sobrenadante para copos descartáveis para determinar o "P". Pipetar 6,0 mL para copos descartáveis para determinar o "K".

2.1 Para determinação do "P"

Adicionar 3,0 mL da solução "PB" a alíquota do extrato (pipeta automática). Adicionar 3 gotas da solução "PC" e agitar. Após 15 min, determinar a absorbância da solução em 660 nm.

2.2 Para determinação do "K"

Determinar a intensidade da emissão de K⁺ da alíquota no fotômetro de chama.

2.3 Para determinação do "N" NH₄+NO₃+NO₂

Método Bremner e Keeney (BREMNER; KEENEY, 1966)

Pipetar 20 mL do extrato para um frasco de destilação. Adicionar 0,2 g de MgO com 0,2 g de liga devarda. Acoplar o tubo no destilador de nitrogênio. Coletar o destilado em um Becker contendo indicador de acido bórico. Titular com acido sulfúrico 0,025M.

Obs.: liga devarda deve estar bem fina.

O óxido de magnésio (MgO) — aquecer a 700°C por duas horas.

2.4 Cálculo de N total no solo

$N \text{ total} = V \text{ ácido} \times \text{normalidade} \times PM \times 100 / \text{peso da amostra em MG}$

$N \text{ total} = V \text{ ácido} \times 0,0125 \times 14 \times 100 / 3000.$

Impressão
GRÁFICA DA UFU
Edição textual, tradução
normalização e formatação
EDINA  SILVA
[serviços editoriais acadêmicos]
■ etalii@bol.com.br ■

