

ISABEL DAYANE DE SOUSA QUEIROZ

IMPLICAÇÕES DA INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasiliense* E DE NÍVEIS DE  
N EM MILHO TRANSGÊNICO NO CERRADO

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

Orientador:

Prof. Dr. Adão de Siqueira Ferreira

Co-orientadora:

Profa. Dra. Regina Maria Quintão Lana

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

ISABEL DAYANE DE SOUSA QUEIROZ

IMPLICAÇÕES DA INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasiliense* E DE NÍVEIS DE  
N EM MILHO TRANSGÊNICO NO CERRADO

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014.

Profa. Dra. Regina Maria Quintão Lana  
(co-orientadora)

UFU

Prof. Dr. Lucas Carvalho Basílio de Azevedo

UFU

Dra. Ana Luiza Dias Coelho Borin

EMBRAPA

Prof. Dr. Adão de Siqueira Ferreira  
ICIAG-UFU  
(Orientador)

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

Aos meus pais, Maria Dejanira e João Batista,  
dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser minha fortaleza e pelo dom da vida;

Aos meus pais, “dona Deja” e “seu Batista”, por todo amor e dedicação, e por sempre insistirem que o conhecimento é o bem mais precioso que temos;

Aos meus irmãos Robson, Adriane, Kátia, Roberta e Ana Paula, pela convivência espiritosa e por todo “amor de irmão” (risos);

Aos meus cunhados, que se tornaram família, pelo apoio e torcida;

Aos “Picaxus” da tia Bel: Diego, Ana Luiza, Arthur, Antônio, Gabriel, Beatriz, por serem fonte de esperança e grandes alegrias em todos os momentos;

Aos familiares, tios e primos, pelo incentivo e pela torcida, ainda que de longe;

Às avós, “vó Dedé” e “vó Dinha”, que fizeram tão bons pais para mim, e que lá do céu celebram mais uma etapa concluída em minha vida;

Ao meu amado, Robson Oliveira, pelo amor a mim dedicado; e pela paciência e espera;

Aos amigos de longa data, por que sempre me apoiaram e incentivaram;

Aos amigos que fiz na “viciosa” UFV, especialmente, Bruna, Tiago, Luciana, por serem tão lindos na minha vida;

Aos amigos e colegas que fiz nesta “danada” UFU, pelo carinho e por engrandecerem minha vida acadêmica, com conselhos, orientações e aqueles “toquezinhos” básicos;

Aos colegas da pós, Amilton, Everton, Fernanda, Guilherme, João Eduardo, Joseph, Larissa, Mariana, Marina, Paulo, Pedro Afonso, Reinaldo, Roberto, Sara, Wender, por compartilharem momentos e conhecimentos ao longo das horas de disciplinas e estudos extras;

Ao Marcos Faria, por toda ajuda intelectual e emocional;

Aos amigos Welldy, Risely, Henrique e Márcia, a quem vou levar para toda a vida, por se tornarem lindos anjos na minha vida;

Aos “meninos do laboratório” Angélica, Beatriz, Eduardo, Gilda, Marco Aurélio, Manoel e Marinho, pela ajuda com todas as análises e pelos momentos de distração e alegria;

Aos queridos Eduardo e Cida, pelos direcionamentos e carinhosa amizade;

Aos técnicos dos laboratórios e secretárias do ICIAG, pelos “dedinhos de proza” ao longo destes dois anos;

Aos professores Denise, Marli, Maria Amélia, Elias, Adão, Bruno, Amilton, pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas;

Aos professores do ICIAG, por se dedicarem ao ensino, com tanto esmero;

Aos alunos da agronomia (e da ambiental) pela ajuda nos experimentos e pelos muitos e engraçados momentos compartilhados;

À professora Regina, pela co-orientação e, principalmente, por ter se tornado uma grande amiga;

Ao professor Adão, por ter me acolhido nesta pós-graduação, pela orientação no laboratório, no campo, nos textos e, principalmente, por ter sido tão paciente e se comprometido para que este dia chegassem;

Aos doutores Lucas e Ana Luiza, por aceitarem compor a minha banca, apresentando valorosas contribuições para este trabalho;

Aos que acreditaram e desejaram este dia tanto quanto eu;

Agradeço, enfim, aos que colocaram tantas barreiras no meu caminho, graças a elas aprendi o que é superação e vitória!

## SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Introdução.....	1
Revisão bibliográfica.....	2
Material e métodos.....	10
Resultados e discussão.....	13
Conclusões.....	28
Referências bibliográficas.....	29

## RESUMO

QUEIROZ, ISABEL DAYANE DE SOUSA. **Implicações da inoculação com *Azospirillum brasiliense* e de níveis de N em milho transgênico no cerrado.** 2014. 41f. Dissertação (mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.<sup>1</sup>

O milho é um dos cereais de maior importância econômica e nutricional. Sua produção está diretamente relacionada ao fornecimento adequado de nutrientes, especialmente o nitrogênio, que pode ser fornecido pela adubação ou pela fixação biológica de nitrogênio. Um dos micro-organismos fixadores de nitrogênio mais importantes nas culturas gramíneas é o *Azospirillum* sp., que além de fornecer nitrogênio, melhora o ambiente radicular, aumentando a absorção de água e nutrientes pela planta. Objetivou-se com este trabalho, avaliar a eficiência de *Azospirillum brasiliense* no desenvolvimento e produtividade de milho transgênico em níveis crescentes de N. Dois experimentos de campo foram instalados em área contígua durante a safra 2011/2012, em solo de cerrado da Fazenda Experimental Capim Branco, Uberlândia - MG. O delineamento foi de blocos casualizados, com 6 repetições. Os tratamentos consistiram de 5 níveis de N, na ausência e na presença de *Azospirillum brasiliense*, via tratamento de sementes ( $100 \text{ mL ha}^{-1}$ , com concentração mínima de  $2 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ). Em ambos os experimentos foram avaliados: altura da planta e inserção da espiga, diâmetro de colmo, massa fresca e seca de parte aérea, teor de clorofila e de nutrientes foliar, produtividade de grãos e % de grãos ardidos. As plantas de milho responderam significativamente aos níveis de N, tanto na presença quanto na ausência de *Azospirillum brasiliense*. A adição de fertilizantes nitrogenados promoveu maior altura da planta e diâmetro de colmo. Na presença do *A. brasiliense* houve resposta linear aos níveis de N. A inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasiliense* melhorou a eficiência de absorção do nitrogênio pela planta. O incremento em massa fresca e seca de parte aérea, em função dos níveis de N foi maior quando as plantas foram inoculadas. Os teores de clorofila responderam linearmente aos níveis de N, tanto na presença como na ausência de *Azospirillum*. A incidência de grãos ardidos não foi significativamente influenciada pela aplicação de diferentes níveis de N. A massa de mil grãos respondeu linearmente aos níveis de nitrogênio. Na presença do *Azospirillum* o incremento foi o dobro do encontrado nas plantas não inoculadas. A produtividade de grãos de milho respondeu positivamente a adubação nitrogenada até a dose de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$ , apresentando produtividade de  $12 \text{ t ha}^{-1}$  na presença do *Azospirillum brasiliense* e  $11 \text{ t ha}^{-1}$  na ausência do *Azospirillum*. A inoculação com *Azospirillum brasiliense* não substitui o uso de fertilizantes nitrogenados, mas melhora a eficiência de adubação.

**Palavras-chave:** Adubação nitrogenada, bactérias diazotróficas, clorofila, FBN, indicadores fisiológicos e nutricionais, *Zea mays* L.

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Adão de Siqueira Ferreira – Universidade Federal de Uberlândia e Regina Maria Quintão Lana – Universidade Federal de Uberlândia.

## ABSTRACT

QUEIROZ, ISABEL DAYANE DE SOUSA. **Implications of inoculation of *Azospirillum brasiliense* and of N levels on transgenic maize in the savannah.** 2014. 41 f. Dissertation (Masters degree in Agriculture) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.<sup>1</sup>

Maize is one of the cereals with greatest economical and nutritional importance. Its production is directly related to adequate supply of nutrients, especially nitrogen, which can be added by fertilization, or by its biological fixation. One of the most important nitrogen fixing microorganisms in grasses is *Azospirillum* sp., which, besides supplying nitrogen, improves root environment, increasing water and nutrient absorption by the plant. This study evaluated the efficacy of *Azospirillum brasiliense* on transgenic maize development and yield under increasing levels of N. Two field experiments were done on adjacent areas in cropping season 2011/2012, on a savannah soil at the Experimental Farm Capim Branco, Uberlândia - MG. The experimental design was randomized blocks, with 6 replications. Treatments consisted of 5 N levels, and the lack or addition of *Azospirillum brasiliense*, via seed treatment (100 mL ha<sup>-1</sup>, with minimum concentration of 2x10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>). Plant and ear insertion height, stalk diameter, fresh and dry matter of shoots, chlorophyll and leaf nutrient contents, kernel yield and percentage of rotten kernels were evaluated in both experiments. Maize plants responded significantly to nitrogen levels, both in the presence or absence of *Azospirillum brasiliense*. Addition of nitrogen fertilizers promoted greater plant height and stalk diameter. The presence of *A. brasiliense* resulted in a linear response to N levels. Maize seed inoculation with *Azospirillum brasiliense* improved nitrogen absorption efficacy by the plant. Increase in shoot fresh and dry matter, as a function of N levels, was greater in inoculated plants. Chlorophyll contents responded linearly to N levels, both in the presence or absence of *Azospirillum*. Rotten kernels incidence was not significantly affected by the application of different N levels. The weight of one thousand kernels responded linearly to nitrogen levels. Increment of *Azospirillum* inoculated plants was the double that of non-inoculated plants. Maize kernel yield responded positively to nitrogen fertilization up to 200 kg ha<sup>-1</sup>, presenting 12 t ha<sup>-1</sup> in the presence of *Azospirillum brasiliense* and 11 t ha<sup>-1</sup> when it was not present. Inoculation with *Azospirillum brasiliense* did not substitute the use of nitrogen fertilizers; however, it improved the efficacy of fertilization.

**Keywords:** Nitrogen fertilization, diazotrophic bacteria, chlorophyll, NBF, physiologic and nutritional indicators, *Zea mays* L.

---

<sup>1</sup> Supervising committee: Adão de Siqueira Ferreira – Universidade Federal de Uberlândia and Regina Maria Quintão Lana – Universidade Federal de Uberlândia.

## INTRODUÇÃO

O milho é um cereal de importância mundial haja vista a crescente demanda por alimentos e o comprometimento cada vez maior dos governos para erradicação da fome. Além disso, o milho é importante na nutrição animal, e é matéria prima para a produção de biocombustível.

O Brasil é destaque mundial na produção de milho, com área plantada de 16 milhões de hectares e produção total de 81,3 milhões de toneladas. Produtividades superiores a 16 mil kg ha<sup>-1</sup> são alcançadas por empresas rurais que apresentam alto nível tecnológico, utilizando de forma racional os insumos agrícolas, principalmente fertilizantes. No entanto, a média de produtividade nacional, 5 mil kg ha<sup>-1</sup>, é baixa em relação ao potencial produtivo, principalmente, devido ao manejo inadequado da cultura, como seleção de híbridos e manejo da fertilidade dos solos.

O manejo da fertilidade é essencial para a produção agrícola na região do cerrado. Isto porque as características principais dos solos de cerrado são: elevada acidez e baixa fertilidade natural. O manejo da fertilidade visa elevar o teor de nutrientes no solo a níveis adequados para que a cultura expresse seu máximo potencial de rendimento.

Dentre estes nutrientes, o nitrogênio (N) é o mais exigido pela planta e pode ser disponibilizado por meio da mineralização da matéria orgânica do solo. No entanto, a principal fonte são os adubos nitrogenados, que representam um alto custo para o sistema produtivo.

O Brasil é o quarto maior consumidor de fertilizantes. Em 2013 apenas 30% dos 31 milhões de toneladas de fertilizantes comercializados no país, foram produzidos nacionalmente. No primeiro semestre de 2014, as importações de fertilizantes já ultrapassaram os 21 milhões de toneladas.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada pelas bactérias diazotróficas, é uma estratégia adicional na adubação nitrogenada e tem recebido destaque nas práticas de adubação. Este N fixado pode ser disponibilizado para a

cultura, melhorando a nutrição da planta, aumentando sua produção e minimizando os custos.

Um exemplo destas bactérias são as do gênero *Azospirillum*, que tem sido utilizado na agricultura, como promotoras do crescimento de plantas, aumentando o rendimento das culturas. Isto, porque estas bactérias podem promover o crescimento do sistema radicular, aumentar a absorção de água e nutrientes pelas raízes e solubilizar fosfatos. Estas bactérias podem também atuar como agente de controle biológico; melhorar os parâmetros fotossintéticos, promover incremento de biomassa vegetal e de produção, além de melhorar a eficiência da adubação.

Diversos estudos têm sido conduzidos com *Azospirillum* sp., principalmente no sul do Brasil, no entanto, poucas ainda são as pesquisas desenvolvidas no cerrado, que constitui-se, atualmente, a maior região brasileira produtora de grãos.

Assim, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasiliense*, via tratamento de sementes, nos componentes vegetativos e produtivos de milho transgênico, cultivado em solo de cerrado em diferentes níveis de nitrogênio.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Aspectos econômicos da cultura do milho

O milho é o cereal mais cultivado no mundo, após trigo e arroz (AWIKA, 2011). A cultura apresenta ampla possibilidade de usos, sendo as principais destinações: nutrição animal, alimentação humana, indústria química (GARCIA et al., 2006) e produção de etanol, principal destinação da produção nos Estados Unidos (AWIKA, 2011).

A cultura do milho apresenta elevada variabilidade genética que lhe confere adaptabilidade às diversas condições climáticas, podendo ser cultivado do sul ao norte do Brasil, em regiões de baixa altitude até altitudes acima de 2500 m (TEIXEIRA et al., 2002). A seleção de materiais genéticos adaptados à região de cultivo é determinante ao sucesso da lavoura, pois cerca de 50% do rendimento final de grãos está em função da escolha adequada do cultivar (CRUZ et al., 2010).

De acordo com dados de expectativa de produção do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), na safra 2011/2012 a produção mundial foi de 867,7 milhões de toneladas. Os principais países produtores são os Estados Unidos, a China e o Brasil que produziram, nesta safra, 343, 172 e 61 milhões de toneladas de milho, respectivamente (USDA, 2011).

No Brasil, conforme dados da Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2013) a área plantada com milho (primeira e segunda safras) na safra 2012/2013 foi de 15,9 milhões de hectares o que corresponde a 30% da área total cultivada no país. A produção de milho alcançou o recorde de mais de 81 milhões de toneladas (CONAB, 2013).

A produtividade de milho em muitas regiões brasileiras ainda está muito aquém do potencial genético dos híbridos de alta tecnologia disponíveis no mercado. Por exemplo, as regiões norte e nordeste apresentam produtividades médias de 3,2 e 2,1 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto nas regiões centro-oeste, sul e sudeste esta média ultrapassa 5,7 t ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2013).

Mas, mesmo as maiores médias ainda são consideradas baixas em vista do rendimento de grãos alcançado por grandes empresas rurais que conseguem produtividades maiores que 8,0 t ha<sup>-1</sup>, chegando a 14,0 t ha<sup>-1</sup> (CRUZ et al., 2011). Portanto, devem ser tomadas pelos produtores ações que aumentem a produtividade, como a utilização de micro-organismos capazes de disponibilizar nutrientes para a planta, por exemplo, o *Azospirillum* spp.

A baixa produtividade de milho pode ser atribuída à escolha de híbridos inadequados à região produtora, às condições climáticas, ao baixo capital investido pelos produtores e à má utilização do pacote técnico de produção, incluindo controle de pragas e doenças, espaçamento e densidade de plantas, manejo de fertilidade do solo, por meio de correção de acidez e adubação de plantio e cobertura, além da época de plantio e colheita (GOMES, et al. 2007; CRUZ et al., 2009).

A fertilidade do solo está entre as principais causas da redução da produtividade. Dentre os elementos essenciais, o nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura do milho, sendo necessários 17 kg ha<sup>-1</sup> de N para produção de 1 tonelada de grãos, considerando produtividade de 12 t ha<sup>-1</sup> (CANTARELLA, 2007). Tendo em vista a produção nacional da safra 2012/2013 de 81,5 milhões de toneladas de milho, seriam necessários 1,38 milhões de toneladas de N.

A deficiência de N compromete o desenvolvimento da planta e a produção final de grãos (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997; EPSTEIN; BLOOM, 2006). Sendo assim, a demanda por fertilizantes nitrogenados é bastante elevada, principalmente devido aos baixos teores de nitrogênio disponíveis no solo.

O Brasil apresenta forte dependência externa para aquisição de fertilizantes, assim, alternativas que melhorem ou minimizem o uso deste insumo, são extremamente importantes para a agricultura nacional.

## **O nitrogênio no sistema agrícola**

O nitrogênio é constituinte de compostos carbônicos, tais como aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos, hormônios, clorofila (TAIZ; ZEIGER, 2009). Assim, o N constitui-se elemento essencial no metabolismo das plantas, estimulando o crescimento e o desenvolvimento de raízes e parte aérea, promovendo maior absorção de água e outros nutrientes.

Por isso, este nutriente está diretamente relacionado com a produtividade das culturas. As formas de N absorvidas pela planta são  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , sendo a forma amoniacal, a que promove maiores rendimentos, uma vez que este composto é prontamente assimilado e incorporado a compostos carbônicos. Por outro lado, quando a planta absorve nitrato, este precisa ser reduzido a amônio para ser assimilado. Esta energia de redução é proveniente de carboidratos que poderiam ser utilizados para formação de grãos, ou crescimento da planta (DECHEM; NACHTIGALL, 2007).

A dinâmica do nitrogênio no solo é muito complexa e, por isso, o manejo da adubação nitrogenada exige atenção, no sentido de reduzir as perdas e maximizar o seu aproveitamento pela planta. Como aproximadamente 96% do N total da biosfera estão na matéria orgânica do solo (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006), este manejo requer atenção especial em solos tropicais. Isto, porque estes solos apresentam intensa atividade microbiana, que decompõe rapidamente a matéria orgânica, comprometendo a reserva de N no solo (MACHADO, 2001). Esta mineralização da matéria orgânica, pode não coincidir com a época de maior demanda pela cultura e, desta maneira, o N fica sujeito a perdas, seja por lixiviação, volatilização, imobilização, etc.

Os principais processos envolvendo o nitrogênio no solo são: mineralização, em que o N orgânico é disponibilizado para a solução do solo através da decomposição da matéria orgânica do solo (MOS); imobilização, que é a assimilação do N pela biomassa microbiana do solo; nitrificação, quando o íon amônio é convertido a nitrato; desnitrificação, que é a redução do nitrato à forma gasosa  $\text{N}_2$  ou  $\text{N}_2\text{O}$  perdida para a atmosfera; volatilização, que ocorre principalmente, quando a ureia não é incorporada ao solo e sua hidrólise eleva o pH, promovendo a perda de amônia para a atmosfera (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006; CANTARELLA, 2007).

Aproximadamente 78% da atmosfera constitui-se de nitrogênio na forma gasosa  $\text{N}_2$ , a qual não está disponível para a planta. Isto, porque é necessária muita energia para romper a tripla ligação entre os dois átomos de N (TAIZ; ZEIGER, 2009). Para que este nitrogênio possa ser utilizado pelas culturas, é necessário que seja fixado na forma de  $\text{NH}_4^+$ . Esta fixação pode acontecer por meio da fixação atmosférica, industrial ou biológica. E a fixação biológica é uma das formas mais importantes de incorporação de N aos sistemas agrícolas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Na fixação biológica de nitrogênio (FBN) a energia utilizada na formação de NH<sub>3</sub> provém do ATP e, em condições de pressão normal, temperatura ambiente e ausência de oxigênio, a enzima nitrogenase faz a redução do N<sub>2</sub> (SANTOS et al., 2008). A reação para este processo é:



em que e<sup>-</sup> representa elétron e Pi representa fósforo inorgânico.

A FBN é o segundo processo biológico, após a fotossíntese, fundamental para incorporar elementos essenciais da atmosfera (McGILL, 2007) e é responsável por até 65% de todo o N fixado (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), apresentando-se como a principal alternativa à grande quantidade de adubos nitrogenados aplicados às culturas.

Existem diversos sistemas fixadores de nitrogênio, derivados da associação de bactérias de vida livre, associativas ou simbióticas com as plantas. O sistema rizóbio-leguminosa é muito importante, pois incorpora grande quantidade de N em sistemas naturais e agrícolas (SANTOS et al., 2008). Além disso, esta relação simbiótica já está bastante elucidada, apresentando resultados satisfatórios, dispensando em alguns casos, a aplicação de adubo nitrogenado. Por outro lado, as respostas da associação de bactérias de vida livre e associativas com gramíneas ainda não estão bem definidas, os resultados apresentados são contrastantes e nem sempre conclusivos.

Dentre as bactérias diazotróficas, as do gênero *Azospirillum* já foram estudadas em diversas culturas: algodão (FAYEZ; DAW, 1987; VILELA; LOUREIRO; BÉLOT, 2005), tomate (BASHAN et al., 1995), arroz (PUENTE et al., 2013), braquiária (OLIVEIRA; OLIVEIRA; BARIONI JÚNIOR, 2007; SILVA et al., 2013), cana-de-açúcar (MUTHUKUMARASAMY; REVATHI; LAKSHMINARASIMHAN, 1999; PEREIRA et al., 2013), milho (GARCÍA DE SALOMONE; DÖBEREINER, 1996; HUNGRIA et al., 2010; FERREIRA et al., 2013a), sorgo (SARIG; OKON; BLUM, 1992; BERGAMASCHI, 2006) e trigo (BASHAN, 1998; MENDES et al., 2011).

### ***O gênero Azospirillum***

*Azospirillum* spp. são bactérias gram-negativas de vida livre, em forma de bastonete e, normalmente, possuem único flagelo, além de movimento vibratório característico (BASSI, 2013). Conseguem vantagem competitiva no processo de

colonização da rizosfera uma vez que possuem metabolismo versátil de nitrogênio e carbono. Podem utilizar como fonte de N a amônia, o nitrato e o N<sub>2</sub> (TRENTINI, 2010) e como fonte de carbono, ácidos orgânicos como malato e piruvato, além de frutose (QUADROS, 2009).

O gênero *Azospirillum* apresenta ampla distribuição geográfica ao redor do mundo. Embora estejam presentes em regiões temperadas, é abundantemente encontrado em regiões tropicais (BASHAN, 1999). Quando na ausência da planta hospedeira, sua capacidade de sobrevivência no solo é reduzida (BASHAN et al., 1995), no entanto, condições desfavoráveis estimulam mecanismos de proteção (formação de cistos e produção de melanina) que permitem a sobrevivência destas bactérias no solo (DEL GALLO; FENDIRIK, 1994).

Atualmente tem-se descritas 14 espécies de *Azospirillum*, que podem colonizar as raízes das plantas externamente, quando são encontradas em solo rizosférico (BASHAN; HOLGUIN, 1997) ou internamente, penetrando nos espaços intercelulares de raízes e parte aérea das plantas (ROESCH et al., 2008), neste último caso, classificadas como endofíticas facultativas (KAMNEV et al., 2005). Nos dois casos, apenas parte do N fixado pela bactéria é disponibilizada para a planta (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007).

As espécies de *Azospirillum* associadas ao sistema radicular das culturas, promovem melhoria nos parâmetros fotossintéticos das folhas (BARASSI et al., 2008; JORDÃO et al., 2010), nos incrementos de massa seca de planta (GARCÍA DE SALOMONE; DÖBEREINER, 1996; PEREIRA et al., 2013) e no aumento de produtividade (MACALINTAL; URGEL, 1992; LANA et al., 2012).

O modo de ação destas bactérias no solo ainda não está totalmente elucidado. No entanto, além da fixação biológica de nitrogênio (DÖBEREINER; PEDROSA, 1987; SESHADRI et al., 2000; BALDANI; BALDANI, 2005), o *Azospirillum* produz hormônios que podem modificar a concentração de fito-hormônio da planta, estimulando o seu crescimento. Já foi evidenciada, *in vitro*, a capacidade que estas bactérias têm de sintetizar auxina, especialmente, o ácido indol acético (THULER et al., 2003; CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2013), citocinina, giberelina (TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979) e etileno (STRZELCZYK et al., 1994).

Outros benefícios das bactérias do gênero *Azospirillum* são a solubilização de fosfatos (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; RODRIGUEZ et al., 2004), o estímulo ao desenvolvimento radicular, o aumento do número de pelos radiculares e do comprimento de raízes (ZIMMER; ROEBEN; BOTHE, 1988). Além disso, aumentam a condutividade hidráulica das raízes e reduzem os efeitos do estresse osmótico sobre o desenvolvimento radicular (SARIG; OKON; BLUM, 1992; PEREYRA et al., 2012).

Adicionalmente, pode promover o crescimento vegetal por meio da proteção da planta contra micro-organismos patogênicos: produzindo sideróforos (LODEWYCKX et al., 2002), ou induzindo resistência sistêmica a planta (JETIYANON; KLOEPFER, 2002). Quando cresce endofiticamente a planta, o *Azospirillum* pode aumentar a atividade da redutase do nitrato nas plantas (CASSÁN et al., 2008).

No entanto, o sucesso da associação desta bactéria com as plantas depende de condições específicas do solo (BASHAN et al., 1995; BASHAN et al., 2008) como pH (PITTNER et al., 2007), teor de matéria orgânica (DOBBELAERE; CROONENBORGHHS, 2002), disponibilidade hídrica (REIS JÚNIOR et al., 2000) e da interação com genótipos vegetais (REIS et al., 2000; PEREIRA et al., 2013).

O primeiro inoculante comercial, no Brasil, foi desenvolvido a partir da parceira estabelecida entre Embrapa Soja e o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, em 1996. O resultado dos ensaios de laboratório e testes de eficiência agronômica em campo em diversas safras com as culturas trigo e milho, foi a seleção das estirpes Ab V5 e Ab V6, que compõem o produto comercial.

### **Interação Milho – Nitrogênio – *Azospirillum***

A produtividade do milho está diretamente relacionada com a adubação nitrogenada. Em função da resposta positiva do milho à aplicação de N, diversos trabalhos têm buscado avaliar o efeito de níveis e fontes de nitrogênio, bem como a época e forma de aplicação deste fertilizante no desenvolvimento e na produtividade da cultura (BASSOI; REICHARDT, 1995; PÖTTKER; WIETHÖLTER, 2004; LARA CABEZAS; COUTO, 2007; HAMMAD et al., 2011; SAFDARIAN; RAZMJOO; DEHNAVI, 2014).

Souza e Soratto (2006), avaliando o efeito de fontes e níveis de N na cultura do milho em safrinha sob sistema de plantio direto, encontraram incremento linear na

produtividade de milho em função da aplicação de níveis crescentes de N. Kappes; Arf e Andrade (2013), avaliando a resposta de milho em diferentes manejos do solo e níveis de N, também encontraram resposta linear crescente em função dos níveis de N, para as variáveis: teor de N foliar, massa de mil grãos e produtividade.

O fornecimento de N é fundamental para a produção agrícola, no entanto, por ser um insumo caro, é conveniente que sejam utilizados meios para reduzir a necessidade de aplicação de fertilizante ao solo. A associação entre *Azospirillum* e planta apresenta grande potencial de redução da adubação nitrogenada ou melhoria da sua eficiência, das características fisiológicas das plantas e aumento na produtividade. Estes efeitos já foram relatados em diversas culturas (BASHAN et al., 2006; KUSS, 2006; OLIVEIRA; OLIVEIRA; BARIONI JÚNIOR, 2007; PIMENTEL et al., 2008; LOPES, 2013), especialmente na cultura do milho (DOBBELAERE; CROONENBORGHHS, 2002; SÁ JUNIOR, 2012; FERREIRA et al., 2013b).

Sabundjian et al. (2013), verificaram que o milho associado a *Urochloa ruziziensis*, quando inoculado com *Azospirillum brasiliense*, produziu em média 25% a mais de cobertura vegetal do que o tratamento sem inoculação. Este resultado corrobora os de Casanovas et al. (2002), que encontraram maior produção de biomassa e aumento no crescimento de raiz de plântulas de milho, em função da inoculação com *Azospirillum brasiliense*. Reis Júnior et al. (2008), também encontrou maior massa seca de milho em função da inoculação com *Azospirillum amazonense*. Esta característica é extremamente importante, especialmente, para as áreas cujo objetivo principal seja a produção de silagem ou a produção de palha para a semeadura direta.

Avaliando o desenvolvimento da cultura do milho em resposta à inoculação com *Azospirillum brasiliense* e *Herbaspirillum seropedicae* associada à adubação nitrogenada, Dartora et al. (2013) verificaram incremento de 15% no diâmetro de colmo, 12% na massa seca de parte aérea e 9% na produtividade de grãos no tratamento com inoculação em relação à testemunha.

Haja vista os benefícios da inoculação com *Azospirillum* e a importância econômica da cultura do milho, diversos trabalhos tem sido realizados com o intuito de aperfeiçoar os resultados desta associação (MARTÍNEZ-MORALES, 2003; SHARMA; BANIK, 2014). A associação *Azospirillum*-milho pode melhorar a eficiência de utilização do nitrogênio pela planta. A inoculação de *Azospirillum* na cultura do milho,

associada a aplicação de 24 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura promoveu produtividade total de 3,4 t ha<sup>-1</sup>, 24% a mais que o controle sem inoculação (HUNGRIA et al., 2010). Com a inoculação associada à dose de 24 kg ha<sup>-1</sup> de N e a aplicação adicional de 30 kg ha<sup>-1</sup> de N na fase de florescimento, o rendimento da cultura foi de 7 t ha<sup>-1</sup> (HUNGRIA, 2011).

Avaliando a inoculação de *Azospirillum* em diferentes genótipos de milho, Quadros (2009) observou que a adição de 50 kg ha<sup>-1</sup> de N promoveu rendimento de grãos significativamente equivalente à adição de 130 kg ha<sup>-1</sup>, evidenciando que a inoculação com *Azospirillum* pode suprir parte do N necessário à cultura do milho.

Por outro lado, Repke et al (2013) avaliando níveis de nitrogênio e *Azospirillum brasiliense* na cultura do milho, não encontraram resposta da cultura à inoculação, mas a massa seca da planta, massa de mil grãos e produtividade, apresentaram resposta quadrática ao fornecimento de níveis crescentes de N.

Considerando a divergência dos resultados das pesquisas, mais estudos são necessários acerca da associação *Azospirillum*-N-planta, para entender o seu funcionamento e os mecanismos que regem as respostas das culturas, traduzidas em aumento na produtividade, redução da demanda e melhoria na eficiência da adubação nitrogenada e maior sustentabilidade dos sistemas produtivos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram instalados, simultaneamente, em duas áreas adjacentes na Fazenda Experimental Capim Branco ( $18^{\circ}55'23''$  S,  $48^{\circ}17'19''$ W e 872 m de altitude) pertencente à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, durante a safra 2011/2012. O clima da região é, segundo classificação de Köppen-Geiger (1928), Aw: tropical com estação seca no inverno. A média de precipitação anual da região é de 1500 mm ano<sup>-1</sup>. A área experimental apresenta solo classificado como Latossolo vermelho escuro distrófico, com textura argilosa (58,0 g kg<sup>-1</sup> de argila).

Antes da implantação dos experimentos retirou-se amostragem de solo na profundidade de 0 a 20 cm, conforme CFSEMG (1999). A análise química de nutrientes, segundo metodologia da Embrapa (2011), foi realizada no Laboratório de Análise de Solo, do Instituto de Ciências Agrárias, UFU.

O solo, na camada de 0 a 20 cm, apresenta a seguinte caracterização química: pH em H<sub>2</sub>O = 5,5; 2,9 mg dm<sup>-3</sup> de fósforo disponível; 101,0 mg dm<sup>-3</sup> de potássio disponível; 12,0 mg dm<sup>-3</sup> de enxofre disponível; 1,0 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de cálcio trocável; 0,5 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de magnésio trocável; 0,0 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de alumínio trocável; 0,11 mg dm<sup>-3</sup> de boro; 2,6 mg dm<sup>-3</sup> de cobre; 9,0 mg dm<sup>-3</sup> de ferro; 0,7 mg dm<sup>-3</sup> de manganês; 0,3 mg dm<sup>-3</sup> de zinco; 21 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica; 4,86 cmol<sub>c</sub> cm<sup>-3</sup> de CTC a pH 7,0 e 36% saturação por bases.

A área experimental antes ocupada por pastagem, sem manejo de adubação foi preparada com uma gradagem pesada, seguida da aplicação de 1 t ha<sup>-1</sup> de gesso agrícola incorporado com grade pesada para suprimento de cálcio. Em seguida, utilizou-se grade niveladora e sulcador para abertura dos sulcos de plantio. A semeadura foi realizada manualmente em 14 de dezembro de 2011, utilizando-se 3,5 sementes por metro linear, para obtenção do estande de 70.000 sementes por hectare.

O híbrido transgênico utilizado foi DKB 390 VTPRO que apresenta ciclo precoce, altura de 2,20 a 2,40 cm, e ótima qualidade de colmo e raiz, além de alto potencial produtivo. É tolerante ao glifosato e produz duas toxinas do Bt (*Bacillus thuringiensis*), o que garante controle eficiente de lagarta e broca, constituindo-se uma

ferramenta importante no manejo integrado de pragas. Este híbrido foi escolhido por ter se mostrado responsivo ao *Azospirillum brasiliense* em ensaios de campo (MORAIS, 2012).

Por ocasião da semeadura, que aconteceu em dezembro de 2011, aplicou-se ao solo 18 kg ha<sup>-1</sup> de magnésio e 24 kg ha<sup>-1</sup> de enxofre na forma de sulfato de magnésio; 120 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> fornecidos via superfostato triplo; 50 kg ha<sup>-1</sup> de potássio na forma de cloreto de potássio e 50 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia, exceto nos tratamentos com nível 0 de N.

A adubação de cobertura, realizada no estádio de desenvolvimento V4, consistiu da aplicação de 100 kg ha<sup>-1</sup> de potássio, na forma de cloreto de potássio e a dose de N necessária para completar a dose de cada tratamento.

No estádio V8, a adubação foi realizada, via foliar com 40 g ha<sup>-1</sup> de molibdênio; 4,0 g ha<sup>-1</sup> de cobalto; 300 g ha<sup>-1</sup> de manganês e 147 g ha<sup>-1</sup> de enxofre e via solo com 400 g ha<sup>-1</sup> de boro e 2 kg ha<sup>-1</sup> de zinco via solo.

No estádio V7 o controle de plantas daninhas foi realizado, utilizando-se pulverizador costal com volume de calda de 350 L ha<sup>-1</sup>. Os herbicidas utilizados foram: atrazina (400 g L<sup>-1</sup>), na dose de 4,0 L ha<sup>-1</sup> e tembotriona (420 g L<sup>-1</sup>) na dose de 0,35 L ha<sup>-1</sup>.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, com 5 tratamentos e 6 repetições. Os tratamentos consistiram da aplicação de 5 níveis de nitrogênio (0, 50, 100, 150 e 200 kg ha<sup>-1</sup>) na cultura do milho. No primeiro experimento, as sementes de milho foram inoculadas com *Azospirillum brasiliense* na dose de 100 mL ha<sup>-1</sup>, conforme recomendação do fabricante. O inoculante utilizado foi o produto comercial Masterfix Gramínea® (cepas – Ab V5 e Ab V6), com concentração mínima de 2x10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>. No segundo experimento, foram aplicados 5 níveis de N na cultura do milho na ausência da bactéria. Cada parcela consistiu de 10 linhas com 6 metros de comprimento, espaçadas 0,5 m e a parcela útil para a colheita foi constituída das 4 linhas centrais, desprezando 1 metro de cada extremidade.

As variáveis analisadas foram: teor de clorofila e N foliar, massa fresca e massa seca da planta, altura da planta, altura de inserção da espiga, diâmetro de colmo, comprimento e diâmetro de espiga, peso de mil grãos, % de grãos ardidos e produtividade.

No estádio V8 de desenvolvimento da planta, fase em que ocorre a definição do número de fileiras, avaliou-se os teores de clorofila. O teor de clorofila foliar foi obtido por meio de leituras utilizando o clorofilômetro portátil ClorofiLOG® modelo CFL1030 (FALKER, 2008) que expressa o teor de clorofila em unidades adimensionais ICF (índice de clorofila Falker). O teor de N foliar foi determinado conforme metodologia proposta pela Embrapa (2000).

No estádio R1 de desenvolvimento da planta, foram avaliadas massa fresca e massa seca da parte aérea da planta. A massa fresca da planta foi obtida pela pesagem das folhas e colmos inteiros. A massa seca foi obtida pela pesagem das folhas e colmos após secagem a 65 °C por 72 horas em estufa com circulação forçada de ar.

No estádio R2 avaliou-se: altura da planta, altura de inserção da espiga e diâmetro de colmo. A altura da planta foi tomada a partir da superfície do solo até a inserção da última folha completamente expandida, utilizando-se régua graduada em cm. A altura de inserção da espiga foi tomada a partir da superfície do solo até a inserção da espiga, utilizando-se régua graduada em cm. O diâmetro de colmo foi medido na altura do segundo internódio, com paquímetro digital graduado em mm.

Na colheita, realizada em maio de 2012, foram avaliados os componentes produtivos: comprimento e diâmetro de espiga, peso de mil grãos, % de grãos ardidos e produtividade. O comprimento de espiga foi medido utilizando-se régua graduada em cm. Para medir o diâmetro de espiga utilizou-se paquímetro graduado em mm. O peso de mil grãos foi determinado no Laboratório de Análise de Sementes, UFU, conforme prescrição das Regras para Análise de Sementes/RAS, Brasil (2009). A % de grãos ardidos foi calculada a partir da pesagem dos grãos visualmente ardidos, provenientes de uma amostra de 250 g de grãos de cada parcela, conforme Brasil (1996). A produtividade de grãos foi obtida a partir da pesagem dos grãos colhidos na parcela útil, ajustando-se a umidade para 13%.

Os resultados dos dois experimentos foram submetidos à análise de regressão polinomial (VIEIRA, 2008) em função dos diferentes níveis de N, utilizando-se 0,05 de significância, para avaliação do efeito dos níveis de N na cultura do milho inoculado ou não com *Azospirillum brasilense*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O nitrogênio é muito importante no metabolismo de plantas, uma vez que é essencial à biossíntese de aminoácidos, proteínas, clorofilas, hormônios (TAIZ; ZEIGER, 2009). Por isso, o adequado suprimento de N está diretamente relacionado com a produção de grãos pela planta (YAMADA, 1997). Nos experimentos realizados neste trabalho, os resultados mostram que a inoculação com *Azospirillum brasiliense* altera a resposta fisiológica e produtiva da cultura do milho em decorrência dos níveis de nitrogênio aplicados à cultura do milho.

Dentre os processos fisiológicos vegetais, o de maior importância é a fotossíntese. Neste processo, a energia luminosa é absorvida por clorofilas localizadas nos tilacoides, e utilizada para transformar CO<sub>2</sub> e água, em oxigênio e carboidratos (MAGALHÃES; SILVA, 1987). A clorofila é constituída por um átomo central de magnésio cercado por um anel de porfirina, o qual contém 4 átomos de N. Por isso, o nitrogênio é essencial ao processo fotossintético.

O teor de clorofila pode servir como ferramenta na avaliação da nutrição nitrogenada, uma vez que há elevada correlação positiva entre o teor de N, e o teor de clorofila, isto porque, mais de 50% do N total nas folhas integram enzimas relacionadas ao cloroplasto e à fotossíntese (ROCHA et al., 2005). Argenta et al. (2001), Durães et al. (2004) e Coelho et al. (2005), encontraram correlação positiva entre leituras de clorofila e teores de nitrogênio foliar em plantas de milho.

Os teores de clorofila a, b e total apresentaram resposta linear aos níveis crescentes de N, na presença e ausência de *Azospirillum brasiliense* (Tabela 1). Soratto; Carvalho; Arf (2004) encontraram resposta quadrática do teor de clorofila em função do aumento da dose de N em feijoeiro. E Silva et al. (2011), avaliando a necessidade de fertilizantes nitrogenados na cultura do milho e sua relação com as leituras de clorofila, encontraram maior teor de clorofila foliar em função da aplicação de nitrogênio.

TABELA 1: Médias e equações polinomiais para do teor de clorofila a, b e total e teor foliar de N, no estádio V8, em função de níveis de N aplicados à cultura do milho, na ausência e presença de *Azospirillum brasiliense*.

Azospirillum brasiliense	Dose de Nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> )					Equação	R <sup>2</sup> (%)
	0	50	100	150	200		
<b>Clorofila a (ICF)</b>							
Ausência	33,6	34,3	35,9	36,0	36,2	y = 0,0138x + 33,82*	88,22
Presença	35,2	34,8	36,4	36,0	36,8	y = 0,0089x + 34,94*	68,95
<b>Clorofila b (ICF)</b>							
Ausência	14,5	15,8	17,8	18,3	19,3	y = 0,0243x + 14,73*	96,53
Presença	16,1	16,5	19,0	18,7	20,3	y = 0,0213x + 16,00*	89,30
<b>Clorofila total (ICF)</b>							
Ausência	48,2	50,1	53,7	54,3	55,6	y = 0,0382x + 48,55*	94,02
Presença	51,3	51,2	55,4	54,8	57,1	y = 0,0302x + 50,94*	83,90
<b>Teor de nitrogênio foliar (g kg<sup>-1</sup>)</b>							
Ausência	31,2	31,8	33,5	34,8	35,2	y = 0,0222x + 31,08*	96,28
Presença	31,7	32,4	34,4	34,2	33,8	y = 0,0121x + 32,11*	63,84

\*: significativo a 0,05 de significância.

Outros resultados de pesquisa com bactérias promotoras de crescimento de plantas, apontam que a inoculação das sementes com *A. brasiliense* proporcionou maior índice de clorofila na cultura do trigo (BASHAN et al., 2006) e do milho (JORDÃO et al., 2010; KAPPES; ARF; ANDRADE, 2013). Na cultura da cana-de-açúcar, Garcia et al. (2013) encontraram maior teor de clorofila nos tratamentos inoculados com bactérias dizotróficas em relação aos tratamentos com adubação mineral e sem adubação.

Pinto Júnior et al. (2012), por outro lado, avaliando a resposta de plantas de milho à inoculação de *A. brasiliense* associada à adubação nitrogenada, não encontraram diferença significativa no teor de clorofila em função da inoculação e da adubação nitrogenada. Assim como Morais (2012) e Müller et al. (2012) que, avaliando a resposta de plantas de milho à inoculação de *A. brasiliense*, também não encontraram diferença significativa no teor de clorofila.

O teor de clorofila respondeu positivamente a adubação nitrogenada porque o nitrogênio é constituinte da molécula de clorofila. A maior absorção de nitrogênio pela planta aumentou o teor de clorofila que implica em maior taxa de fotossíntese e,

portanto, maior acúmulo de carbono pela planta (JAKELAITIS; SILVA; FERREIRA, 2005). Este acúmulo de biomassa, associado ao aumento de absorção de água e nutrientes, aumenta a translocação e o acúmulo de nutrientes para os grãos. Por isso, neste trabalho, a mesma resposta linear crescente foi encontrada para massa de mil grãos e produtividade, na presença de *Azospirillum*.

Houve incremento no teor foliar de N, em função da adubação nitrogenada, na presença e na ausência de *Azospirillum* (Tabela 1). No entanto, em todos os níveis avaliados, o teor de N foliar ficou dentro da faixa de suficiência considerada, por Malavolta; Vitti; Oliveira (1997), adequada para a cultura do milho (28 a 35 g kg<sup>-1</sup> de N), mesmo quando não foi aplicado N. Isso pode ser explicado pela elevada atividade microbiológica atuante na área devido ao preparo do solo para a semeadura, e exposição da matéria orgânica a oxidação. A partir da mineralização desta matéria orgânica, o nitrogênio disponibilizado para a solução do solo e absorvido pela cultura foi suficiente para suprir o mínimo de N requerido pela cultura.

Goes et al. (2013) encontraram resposta quadrática do teor de nitrogênio foliar em função da aplicação de níveis crescentes de ureia na cultura do milho. Outros pesquisadores, testando níveis de nitrogênio na cultura do milho em plantio direto, encontraram resposta linear do teor de N foliar ao aumento da adubação nitrogenada (ARATANI; FERNANDES; MELLO, 2006; GOMES, et al., 2007).

Pinto Junior et al. (2012) e Gitti et al. (2013), avaliando presença e ausência de *Azospirillum brasiliense* em diferentes níveis de N, na cultura do milho, não encontraram diferenças significativas no teor de N foliar em função do aumento nos níveis de nitrogênio.

Pereira et al. (2013) encontraram aumento significativo no teor de N em ponteiro de cana-de-açúcar – variedade RB72454, em função da inoculação com um coquetel contendo as seguintes estírcipes: BR11335 (*Herbaspirillum seropedicae*), BR11504 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*), BR11281T (*Gluconacetobacter diazotrophicus*), BR11366T (*Burkholderia tropica*) e BR11145 (*Azospirillum amazonense*). Este trabalho também aponta para a especificidade entre bactérias e genótipos, uma vez que esta resposta não foi encontrada nas outras variedades avaliadas.

Avaliando a resposta da cultura do milho a diferentes níveis de nitrogênio e a inoculação com a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, Dotto et al. (2010), não encontraram diferença significativa no teor de N foliar em função das níveis de N ou da inoculação. Mas, o teor de N foliar no híbrido AS 1540 foi maior em relação ao híbrido 1570, demonstrando a maior eficiência na absorção do nitrogênio do primeiro. Este resultado aponta a necessidade de novas pesquisas envolvendo a relação bactéria-genótipo, uma vez que os diferentes materiais têm características genéticas particulares e, portanto, a interação com as bactérias pode se dar de maneira diferente.

O porte das plantas também é uma característica genética de cada híbrido, no entanto, esta característica pode ser expressa diferentemente por plantas cultivadas em condições nutricionais distintas. Ou seja, o estado nutricional também influencia o tamanho e a quantidade de massa vegetal produzida pela cultura.

As médias de massa fresca da planta – folhas + colmo (MFP) e massa seca da planta – folhas + colmo (MSP) estão apresentadas na tabela 2. A MFP é uma variável importante, especialmente em sistema de semeadura direta e em áreas cuja destinação do milho seja a produção de silagem. Isso, porque, quanto maior a produção de biomassa vegetal, maior será a geração de palha para a semeadura da cultura seguinte e o rendimento da silagem.

No presente trabalho, a massa fresca da planta apresentou resposta linear crescente aos níveis de N avaliados na presença e na ausência de *Azospirillum* (Tabela 2). Na presença do *Azospirillum*, o incremento de massa fresca foi de 1,08 g kg<sup>-1</sup> de N, portanto, valor maior que na ausência quando este ganho foi de apenas 0,67 g kg<sup>-1</sup> de N. Esta diferença se deve, provavelmente, a capacidade destas bactérias de sintetizar fitohormônios que, disponibilizados para as plantas, estimulam o crescimento das raízes finas das plantas, aumentando assim sua capacidade de absorção de águas e nutrientes (OLIVEIRA et al., 2008).

Machado et al. (1998) avaliando o efeito de adubação nitrogenada e inoculação com bactérias diazotróficas em milho, encontraram resposta de massa fresca da planta à adubação nitrogenada, mas não à inoculação.

TABELA 2: Médias e equações polinomiais para massa fresca e seca de planta (folhas + colmos), no estádio R1, em função de níveis de N aplicados à cultura do milho, na ausência e presença de *Azospirillum brasiliense*.

Azospirillum brasiliense	Dose de Nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> )					Equação	R <sup>2</sup> (%)
	0	50	100	150	200		
<b>Massa fresca da planta (g)</b>							
Ausência	1028,7	979,3	1165,9	1112,1	1130,7	$y = 0,6735x + 1016,00^*$	47,85
Presença	994,0	1029,2	1182,9	1177,5	1190,2	$y = 1,0812x + 1006,63^*$	80,81
CV (%)	11,37						
<b>Massa seca da planta (g)</b>							
Ausência	205,6	195,3	223,3	231,6	226,1	$y = 0,1549x + 200,88$	64,05
Presença	204,2	196,8	232,2	218,4	238,0	$y = 0,1784x + 200,07^*$	63,99
CV (%)	14,49						

\*: significativo a 0,05 de significância.

Quanto à massa seca da planta, houve resposta linear significativa aos níveis de N somente na presença do *Azospirillum*, sendo o incremento de 178 mg kg<sup>-1</sup> N (Tabela 2). A massa seca da planta é importante porque define a quantidade de carboidratos que será translocada para os grãos, então está diretamente relacionada com o tamanho dos grãos, bem como a produção da planta (SANGOI et al., 2005).

Esta resposta de massa seca na presença do *Azospirillum* pode estar relacionada à capacidade da bactéria disponibilizar para a planta parte do N<sub>2</sub> fixado. Ou ainda, ao acesso da planta ao N disponível no solo, em virtude da mineralização da matéria orgânica e também o N proveniente da adubação mineral. Haja vista que o nitrogênio é muito demandado pela cultura do milho, uma vez que é constituinte de aminoácidos, proteínas, clorofila, sua maior disponibilização para a cultura pode promover incrementos no acúmulo de carboidratos pela planta (KERBAUY, 2012).

A inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasiliense* é responsável pelo aumento da taxa de acúmulo de matéria seca, principalmente na presença de elevados níveis de nitrogênio, provavelmente, em função do aumento da atividade de enzimas fotossintéticas (DIDONET et al., 1996).

Ramos et al. (2010) também encontraram maior massa seca de parte aérea de milho em função da aplicação de N na presença de *Azospirillum lipoferum*, em relação a aplicação de N na ausência da bactéria.

Por outro lado, Aratani; Fernandes; Mello (2006), avaliando resposta da cultura do milho irrigado a doses de nitrogênio aplicadas em cobertura, em sistema de semeadura direta, não encontraram efeito das diferentes doses sobre a massa seca da planta.

Assim como Roberto et al. (2010) que não encontraram incremento de massa fresca de raiz ou de acúmulo de massa seca de parte aérea de plantas de milho, em função da aplicação de níveis de *Azospirillum brasiliense* na cultura do milho. E Verona et al. (2010) que, avaliando o efeito da inoculação de *Azospirillum* sp. e da aplicação de fitoreguladores em milho cultivado em casa de vegetação, também não encontraram diferença significativa na massa seca de raízes ou parte aérea em função da inoculação com *Azospirillum* sp.

Além da massa fresca e seca de plantas, a altura da planta, a inserção da espiga e o diâmetro de colmo, cujas médias são apresentadas na tabela 3, são características importantes e relacionadas ao rendimento de grãos.

A altura da planta é um parâmetro genético de cada híbrido, porém, a expressão desta característica pode ser influenciada pelo manejo da cultura e, principalmente, pela qualidade nutricional do solo.

Níveis crescentes de N promoveram incremento linear na altura da planta, na presença de *Azospirillum*, mas não na ausência (Tabela 3). Esta resposta da planta sugere a existência de uma interação sinérgica entre N e *Azospirillum*. O nitrogênio disponível no solo, proveniente da mineralização da matéria orgânica ou do fertilizante, melhora a condição nutricional de N para a planta. Mesmo que o N fixado pelo *Azospirillum* não esteja sendo transferido para a planta, visto que há N suficiente no solo; esta bactéria é capaz de produzir fito-hormônios que melhoraram o condicionamento do sistema radicular, aumentando a absorção de água e nutrientes (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

TABELA 3: Médias e equações polinomiais para altura de planta, altura de inserção da espiga e diâmetro de colmo, no estádio R2, em função de níveis de N aplicados à cultura do milho, na ausência e presença de *Azospirillum brasiliense*.

<i>Azospirillum brasiliense</i>	Dose de Nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> )					Equação	R <sup>2</sup> (%)
	0	50	100	150	200		
<b>Altura de planta (m)</b>							
Ausência	2,08	2,10	2,16	2,12	2,09	$y = -0,000006x^2 + 0,0012x + 2,07$	78,19
Presença	2,07	2,09	2,16	2,14	2,17	$y = 0,0005x + 2,0727^*$	81,08
CV (%)	3,4						
<b>Altura de inserção da espiga (m)</b>							
Ausência	1,20	1,22	1,23	1,22	1,18	$y = -0,000004x^2 + 0,0007x + 1,20$	94,87
Presença	1,19	1,20	1,24	1,21	1,25	$y = -0,000001x^2 + 0,0004 + 1,19$	60,27
CV (%)	4,5						
<b>Diâmetro de colmo (mm)</b>							
Ausência	21,2	21,4	21,8	23,2	22,8	$y = 0,0102x + 21,06^*$	82,85
Presença	21,1	21,5	21,6	22,5	22,3	$y = 0,0069x + 21,13^*$	83,22
CV (%)	5,6						

\*: significativo a 0,05 de significância.

Ramos et al. (2010), conduzindo milho em casa-de-vegetação, 30 dias após a germinação também encontraram altura de planta maior quando o N foi aplicado na presença de *Azospirillum lipoferum*, em relação à aplicação de N na ausência da bactéria. Müller (2013), em experimento de campo para avaliar o efeito de níveis crescentes de N associado à inoculação com *Azospirillum brasiliense* na cultura do milho, também encontrou maior altura de planta quando houve a inoculação.

Contudo, Cavalett et al. (2000), em experimento com ausência e presença de *Azospirillum* e nitrogênio, não encontraram diferenças significativas na altura de plantas de milho em função da inoculação com *Azospirillum* sp. ou da adubação nitrogenada. Lana et al (2012) avaliando inoculação de *Azospirillum brasiliense* na presença e ausência de nitrogênio aplicado em semeadura (0 e 20 kg ha<sup>-1</sup>) e em cobertura (0 e 100 kg ha<sup>-1</sup>) na cultura do milho, também não encontraram influência destes fatores sobre a altura de planta.

A altura de inserção da espiga também é uma característica definida geneticamente. No entanto, as condições de cultivo, em especial a fertilidade do solo,

podem afetar esta característica. Altura de planta e altura de inserção da espiga estão diretamente relacionadas à resistência ao acamamento (SANGOI et al., 2002), o qual afeta a produção final de grãos. Os resultados do presente trabalho mostram que a altura de inserção da espiga não foi influenciada pelos níveis de N (Tabela 3). Assim como Aratani; Fernandes; Mello (2006), que avaliando a resposta do milho irrigado à adubação nitrogenada em sistema de plantio direto, também não verificaram incrementos em altura de inserção da espiga em função dos níveis de N. Mas há relatos de resposta quadrática da altura de inserção da espiga em função dos níveis de N aplicados à cultura do milho em cobertura, tanto na forma de ureia quanto de sulfato de amônio (Goes et al., 2013).

O diâmetro de colmo também está relacionado à maior resistência da planta ao acamamento e apresentou incremento linear significativo em função do aumento nos níveis de nitrogênio, tanto na ausência quanto na presença da bactéria (Tabela 3). Como relatado por Oliveira et al. (2009) avaliando a resposta do milho a diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

Este aumento no diâmetro do colmo é importante, pois favorece o transporte de água e nutrientes da raiz para as folhas e, portanto, favorece a expressão do potencial produtivo do híbrido.

Dartora et al. (2013) verificaram que com a adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasiliense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho, houve incremento de 15% no diâmetro de colmo nos tratamentos com inoculação em relação ao tratamento testemunha. Pinto Júnior et al. (2012) também encontraram maior diâmetro de colmo em plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasiliense*, via tratamento de sementes.

Estes resultados divergem dos encontrados por Dotto et al. (2010) que, avaliando o efeito de *Herbaspirillum seropedicae* e níveis de N na cultura do milho, não encontraram efeito significativo de dose ou inoculação sobre o diâmetro de colmo. Assim como Portugal et al. (2012) que, avaliando níveis de N e inoculação com *Azospirillum brasiliense* na cultura do milho, também não encontraram efeito do *Azospirillum* ou dos níveis de N sobre o diâmetro de colmo.

Além disso, o colmo constitui-se eficiente estrutura de reserva, da qual os fotoassimilados podem ser translocados para os grãos (MAGALHÃES; JONES, 1990). Assim, o diâmetro do colmo, normalmente, está associado à produtividade de grãos (SORATTO et al., 2010).

As médias das variáveis produtivas: comprimento e diâmetro de espiga, massa de mil grãos, % de grãos ardidos e produtividade, em função dos níveis de nitrogênio na ausência e presença de *Azospirillum brasiliense* são apresentadas na tabela 4.

O comprimento da espiga é um dos atributos que pode afetar a produtividade de grãos (KAPPES et al., 2009) e, portanto, constitui-se importante variável a ser analisada na cultura do milho. Porém, neste trabalho, o comprimento de espiga não foi influenciado pela aplicação de níveis crescentes de N, tanto na presença quanto na ausência de *Azospirillum* (Tabela 4).

Portugal et al. (2012) e Ferreira et al. (2013a) também não encontraram efeito de níveis de N sobre o comprimento de espiga em experimento com níveis de N e presença e ausência de *Azospirillum* na cultura do milho.

No entanto, Okumura et al. (2013) encontraram resposta quadrática para comprimento de espiga, avaliando a fertilização de milho com níveis de N na forma de ureia tratada com inibidor de uréase em cobertura.

O diâmetro de espiga também está relacionado ao aumento de produtividade de grãos. Se considerar o mesmo número de grãos por espiga, espigas de milho com diâmetro maior apresentarão grãos maiores e, assim, o rendimento de grãos será maior.

Observou-se resposta linear do diâmetro de espiga em função do aumento dos níveis de N até 200 kg ha<sup>-1</sup>, tanto na presença quanto na ausência de *Azospirillum* (Tabela 4). Quando houve a inoculação, o incremento em diâmetro de espiga em função da aplicação de níveis crescentes de N foi, numericamente, 23% maior que na ausência de inoculação.

TABELA 4: Médias e equações polinomiais para comprimento de espiga, diâmetro de espiga, massa de mil grãos, % de grãos ardidos e produtividade, em função de níveis de N aplicados à cultura do milho, na ausência e presença de *Azospirillum brasiliense*.

<i>Azospirillum brasiliense</i>	Dose de Nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> )					Equação	R <sup>2</sup> (%)
	0	50	100	150	200		
<b>Comprimento de espiga (cm)</b>							
Ausência	13,3	13,5	13,7	14,0	14,0	$y = 0,0039x + 13,33$	93,12
Presença	13,7	13,5	14,2	13,8	14,3	$y = 0,0028x + 13,63$	41,47
CV (%)							
<b>Diâmetro de espiga (mm)</b>							
Ausência	51,8	51,6	52,1	53,0	52,9	$y = 0,0070x + 51,59^*$	79,76
Presença	51,9	51,3	52,9	52,9	53,2	$y = 0,0086x + 51,57^*$	70,58
CV (%)							
<b>Massa de mil grãos (g)</b>							
Ausência	357,1	364,3	376,1	378,0	374,8	$y = 0,0983x + 360,27^*$	74,68
Presença	345,9	365,3	379,9	380,4	389,2	$y = 0,2031x + 351,84^*$	89,44
CV (%)							
<b>% grãos ardidos</b>							
Ausência	2,2	2,2	1,4	1,7	1,8	$y = 0,00004x^2 - 0,0107x + 2,35$	59,83
Presença	1,7	2,0	1,9	2,0	0,8	$y = -0,00008x^2 + 0,0121x + 1,64$	86,39
CV (%)							
<b>Produtividade (kg ha<sup>-1</sup>)</b>							
Ausência	10659,9	10519,2	11658,2	11822,1	10979,7	$y = -0,06780x^2 + 17,4766x + 10399,50$	56,85
Presença	10321,3	10971,3	11763,1	11486,1	11947,9	$y = 7,5360x + 10544,34^*$	81,84
CV (%)							

\*: significativo a 0,05 de significância.

Esta melhor resposta na presença do *Azospirillum* se deve às características deste micro-organismo, pois além de realizar a fixação biológica do N, ele melhora o sistema radicular, aumentando a eficiência da adubação nitrogenada. Além disso, o diâmetro do colmo, que funciona como estrutura de reserva de fotoassimilados, aumentou com o aumento dos níveis de N aplicados ao solo. Assim, nos maiores níveis de N houve

maior translocação de fotoassimilados para os grãos. De modo que as espigas apresentaram maior diâmetro.

Koltun, et al. (2012), avaliando a inoculação com *Azospirillum brasiliense* em 27 genótipos de milho, encontraram efeito significativo da inoculação sobre o diâmetro de espigas.

Goes et al. (2013), avaliando fontes e níveis de N em cobertura de inverno e Okumura, et al. (2013), avaliando níveis de ureia tratada com inibidor de uréase encontraram ajuste quadrático e linear, respectivamente, do diâmetro de espiga em função dos níveis crescentes de N na cultura do milho.

Como dito anteriormente, o diâmetro da espiga está relacionado ao tamanho dos grãos e, portanto, à massa de mil grãos. Esta é uma variável de produção importante porque está diretamente relacionada à produtividade.

Quanto à massa de mil grãos, tanto na presença quanto na ausência de *Azospirillum* houve incremento em função dos níveis de nitrogênio. Na presença do *Azospirillum* e ausência de N, observou-se menor tamanho de grãos, uma vez que a massa de mil grãos foi menor. No entanto, com o aumento dos níveis de N, o incremento na presença da bactéria, foi de 200 mg kg<sup>-1</sup> de adubo aplicado à cultura do milho, enquanto na ausência da bactéria, este incremento foi de 100 mg kg<sup>-1</sup>, ou seja, quando a adubação de N foi associada à inoculação, houve o dobro de incremento.

Diferentemente deste experimento, Novakowiski et al. (2011), avaliando inoculação com *Azospirillum* e efeito residual de N encontrou resposta quadrática de massa de mil grãos a níveis de N aplicadas na cultura do milho. Sá Júnior (2012), por outro lado, testando modos de aplicação e níveis de *Azospirillum* na cultura do milho não encontrou diferença significativa na massa de mil grãos.

Lemos et al. (2013), avaliando a resposta de 5 cultivares de trigo à inoculação com *Azospirillum brasiliense* (AbV5) e aplicação de N em cobertura, encontraram maior massa de mil grãos para o cultivar CD150 quando a dose de N foi associada à inoculação, mas a massa de mil grãos não diferiu entre os fatores isolados, ou seja, somente aplicação de N em cobertura ou somente inoculação, não promoveram incremento no tamanho e peso dos grãos, por isso a massa de mil grãos não foi diferente. Este dado reforça a hipótese de que existe especificidade entre as estirpes de

*Azospirillum* e as espécies (PENOT et al., 1992), ou mesmo os cultivares de planta (WANI et al., 1985).

Aumentos de produtividade em função da inoculação com BPCP foram encontrados em milho (CAVALLET, et al., 2000; NOVAKOWISKI, et al., 2011;), trigo (MENDES, et al., 2011; PACENTCHUK; NOVAKOWISKI; SANDINI, 2011), cana-de-açúcar (LEAL, 2011) e cevada (SHIRINZADEH; SOLEIMANZADEH; SHIRINZADEH, 2013).

O híbrido de milho transgênico utilizado neste experimento apresenta alto potencial produtivo e responde a altos níveis de nitrogênio. Assim, a produtividade apresentou resposta linear crescente em função dos níveis de N quando houve inoculação (Figura 1). Na presença do *Azospirillum*, observou-se incremento de produtividade até a maior dose testada ( $200 \text{ kg ha}^{-1}$ ), na qual a produtividade estimada foi de  $12,0 \text{ t ha}^{-1}$ .

Esta resposta pode estar associada à capacidade de o *Azospirillum* aumentar a quantidade de raízes finas da planta, potencializando a absorção e o acúmulo de nutrientes pelas plantas (BASHAN; de-BASHAN, 2010). No entanto, mesmo considerando o nível 0 de N, a produtividade foi elevada. Provavelmente, porque havia N disponível no solo, proveniente da mineralização da matéria orgânica do solo.

Na ausência do *Azospirillum*, o aumento na dose de N, de 0 para  $200 \text{ kg ha}^{-1}$ , promoveu incremento de 3% (314 kg) na produção de grãos. Enquanto na presença do *Azospirillum*, este aumento foi de 16% (1630 kg). A partir deste resultado, pode-se propor a inoculação para cultivo com elevado nível tecnológico, uma vez que o custo da inoculação é, aproximadamente,  $15 \text{ R\$ ha}^{-1}$ . Considerando o nível de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$ , tem-se a produção de 22 sacas de milho a mais na presença do *Azospirillum*.

Esta é mais uma evidência de que a inoculação das plantas com *Azospirillum* melhora a resposta da planta à adubação, resultando em aumento de produção. Há muitos dados na literatura, mas ainda são necessárias pesquisas para correlacionar o acúmulo de nutrientes na parte aérea das plantas e nos grãos, com a produtividade das culturas em função da inoculação com *Azospirillum brasiliense*.

Vilela et al. (2012), encontraram resposta linear da produtividade de grãos em função de níveis de N, quando verificaram o efeito de manejo de milheto e níveis de N sobre as características produtivas do milho em sistema de plantio direto.

Morais (2012), em ensaio com alta tecnologia em milho, encontrou resposta quadrática da produtividade de grãos em função dos níveis de N, sendo a máxima produtividade ( $10,14 \text{ t ha}^{-1}$ ) alcançada na aplicação de  $260 \text{ kg ha}^{-1}$  de N. No entanto, em ensaio com baixa tecnologia, a produtividade média foi de  $8,6 \text{ t ha}^{-1}$ , tanto na dose de 100 quanto na dose de  $300 \text{ kg ha}^{-1}$  de N.

Em experimento com ausência e presença de *Azospirillum* e nitrogênio em milho, a produtividade de grãos quando a adubação nitrogenada foi realizada na presença de *Azospirillum* foi 16% maior em relação à adubação na ausência da bactéria (CAVALETT et al., 2000). Piccinin, et al. (2013), encontraram incremento na produção de trigo de  $559 \text{ kg ha}^{-1}$  em função da inoculação com *A. brasiliense*. Hungria et al. (2010) e Ferreira et al. (2013b), encontraram incrementos de quase 30% na produção de grãos com a inoculação de *Azospirillum* em milho.

Dotto, et al. (2010), avaliando a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* e diferentes níveis de N em dois híbridos, não encontraram influência significativa da inoculação na produção de grão. Mas, a inoculação promoveu um incremento de  $649 \text{ kg ha}^{-1}$  (8,6%) na produtividade do híbrido AS 1570, ao passo que o híbrido AS 1540 apresentou redução de  $360 \text{ kg ha}^{-1}$  (5,1%). Este resultado demonstra que diferentes híbridos apresentam respostas diferentes quando inoculadas com BPCP.

Como se pode observar na figura 1, a produtividade do milho diminuiu no maior nível de N, na ausência do *Azospirillum*, mas não na presença da bactéria.

Não se sabe exatamente o que motivou este comportamento, no entanto, o *Azospirillum* parece estar suprindo algum fator limitante à expressão da produtividade, já que há nitrogênio disponível para a planta. Esta proposta de que sempre há um nutriente em menor disponibilidade no solo e é este o que determina a produção da cultura é conhecida como “lei do mínimo” e foi proposta por Liebig em 1862.

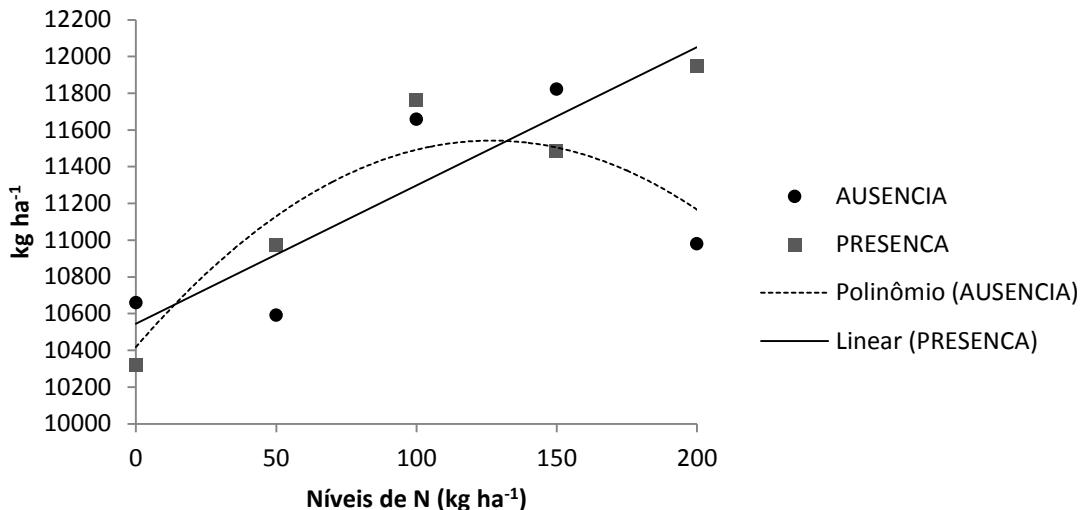


Figura 1: Produtividade de grãos em função níveis de nitrogênio, na ausência e presença de *Azospirillum brasiliense*, na cultura do milho.

Considerando esta diferença de comportamento da produtividade, na ausência e presença do *Azospirillum*, pode-se propor que esta bactéria seja capaz de modificar a fisiologia da planta de tal maneira que melhore a eficiência de translocação de nutrientes e fotoassimilados para o enchimento de grãos, aumentando a eficiência da adubação e também a produtividade da cultura.

Assim, mesmo em altos níveis de N, o *Azospirillum* é uma tecnologia promissora. Ao contrário do que acontece na associação simbiótica entre *Rhizobium* e feijão ou *Bradyrhizobium* e soja, em que níveis elevados de N no solo inibem a nodulação.

Os tratos culturais realizados na cultura do milho visam alcançar elevadas produtividades associadas à qualidade do grão. E uma das causas da perda de qualidade do grão de milho é a incidência de grãos ardidos.

Os grãos ardidos em milho são consequência das podridões de espigas em função de fungos presentes no campo de produção (*Fusarium* spp., *Gibberella zae*), que ocorre, principalmente, quando os grãos permanecem no campo após a maturidade fisiológica até colheita (MARCOS FILHO, 2005). As perdas relacionadas ao ardimento dos grãos são decorrentes da redução do tamanho dos grãos e da sua qualidade

nutricional (PINTO, 2007). Um grão de milho ardido tem a metade da massa de um grão sadio do mesmo tamanho (SANTIN, 2001).

Neste experimento, a incidência de grãos ardidos não foi significativamente influenciada pela aplicação de diferentes níveis de N (Tabela 4). No entanto, comparando-se somente as médias na dose 200 kg ha<sup>-1</sup> de N, a porcentagem de grãos ardidos foi 44% menor na presença de *Azospirillum*.

Novakowiski et al. (2011), avaliando o efeito residual da adubação nitrogenada e a inoculação de *Azospirillum brasiliense* na cultura do milho, também não encontraram efeito dos níveis de N sobre a porcentagem de grãos ardidos.

Basi et al. (2012), avaliando os componentes de rendimento da cultura em dois pontos de colheita sob níveis crescentes de N em cobertura na cultura do milho, não encontraram diferença na porcentagem de grãos ardidos em função dos níveis de N, mas quando a colheita foi realizada, no ponto de colheita convencional mecanizada, houve maior % de grão ardidos em relação à colheita realizada no ponto de maturidade fisiológica. Evidenciando que o ardimento dos grãos está mais relacionado ao tempo que ficam expostos às condições ambientais até a colheita.

Como pôde ser observada a inoculação de plantas de milho com *Azospirillum brasiliense* é capaz de incrementar significativamente as características vegetativas e produtivas da cultura do milho. No entanto, ainda são necessários estudos para demonstrar os aspectos fisiológicos e metabólicos da planta e da bactéria, bem como o comportamento do *Azospirillum* na presença dos fertilizantes.

## CONCLUSÕES

A adição de fertilizantes nitrogenados em doses crescentes promove maior desenvolvimento das plantas de milho, incrementa os teores de clorofila, biomassa vegetal, diâmetro de espiga, massa de mil grãos e produtividade, sendo este efeito mais evidente na presença de *Azospirillum brasiliense*.

A inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasiliense* melhora a eficiência da adubação nitrogenada.

O diâmetro de espiga e a massa de mil grãos respondem linearmente aos níveis de nitrogênio tanto na presença quanto na ausência de *Azospirillum brasiliense*.

A produtividade de grãos de milho responde até a dose de 200 kg ha<sup>-1</sup> e o rendimento de grãos supera em muito o custo do *Azospirillum brasiliense*.

A inoculação com *Azospirillum brasiliense* não substitui o uso de fertilizantes nitrogenados, mas melhora a resposta da planta à adubação, especialmente em níveis elevados.

O *Azospirillum brasiliense* pode ser utilizado em produções de alto nível tecnológico, com o adequado manejo de fertilidade e uso de híbridos transgênicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARATANI, R.G.; FERNANDES, F.M.; MELLO, L.M.M. Adubação nitrogenada de cobertura na cultura do milho irrigado, em sistema de plantio direto. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*, Garça, v.5, n.9, p1-10, 2006.
- ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F da; BORTOLINI, C.G.; FORSTHOFER, E.L.; STRIEDER, M.L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Lavras, v.13, n.2, p.158-167, 2001.
- AWIKA, J.M. Major cereal grains production and use around the world. In: AWIKA, J.M.; PIIRONEN, V.; BEAN, S. (eds.) *Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion*. Washington: ACS Symposium Series: American Chemical Society, v.1089, 2011. cap.1, p.1-13.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro v.77, n.3, p.549-579, 2005.
- BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. 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. cap.3, p.49-59.
- BASHAN, Y. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.44, n.2, p.168-174, 1998.
- BASHAN, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biology and Fertility of Soils*, Berlim, v.29, p.246-256, 1999.
- BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J.J.; LEYVA, L.A.; HERNANDEZ, J.P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasiliense*. *Biology and Fertility of Soils*, Berlim, v.42, p.279-285, 2006.
- BASHAN, Y.; de-BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. In: *Advances in Agronomy*. v.108, 2010. cap.4, p.77-136.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, p.103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; PUENTE, M.E.; BASHAN, L.E.; HERNANDEZ, J.P. Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. In: BARKA, E.A.; CLÉMENT, C. (Ed.) *Plant-Microbe Interactions*, Trivandrum: Research Signpost, 2008. cap.4, p.69-93.
- BASHAN, Y.; PUENTE, M.E.; RODRIGUES-MENDONZA, M.N.; TOLEDO, G.; HOLGUIN, G.; FERRERA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. Survival of *Azospirillum*

brasiliense in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.61, n.5, p.1938-1945, 1995.

BASI, S.; SANDINI, I.E.; MÜLLER, T.M.; KAMINSKI, T.H.; NOVAKOWISKI, J.H.; LOPES, E.C.P. Análise comparativa dos componentes de rendimento do milho em dois pontos de colheita sob diferentes níveis de nitrogênio em cobertura. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 29, 2012. Águas de Lindoia. Anais... Águas de Lindoia, 2012, p. 2141-2149, 2012. Disponível em <[http://www.abms.org.br/29cn\\_milho/07490.pdf](http://www.abms.org.br/29cn_milho/07490.pdf)>. Acesso em 08/02/2014.

BASSI, S. Associação de *Azospirillum brasiliense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. 2013. 50f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

BASSOI, L.H.; REICHARDT, K. Acúmulo de matéria seca e de nitrogênio em milho cultivado no período de inverno com aplicação de nitrogênio no solo via água de irrigação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.30, n.12, p.1361-1373, 1995.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.

BRASIL. Portaria n. 11 de 12 de abril de 1996. Estabelece critérios complementares para classificação do milho. Diário oficial da União, Brasília, DF, n.72, 1996.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (eds.). *Fertilidade do solo*. Viçosa: SBCS, 2007. cap.7, p.375-470.

CASANOVAS, E.M.; BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J. *Azospirillum* inoculation mitigates water stress effects in maize seedlings. *Cereal Research Communications*, v.30, p.343-350, 2002.

CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. 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. cap.4, p.61-86.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (pgpr) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, Nova York, p.1-20, 2013

CAVALLÉT, L.E.; PESSOA, A.C.S., HELMICHE, J.J.; HELMICHE, P.R.; OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental (Agriambi)*, Campina Grande, v.4, n.1, p.129-132, 2000.

COELHO, A.M.; CRUZ, J.L.; SANTOS, P.H.A.D.; AMARAL, L.R. do. Nitrogênio mineral no solo e índice de clorofila na folha como indicadores da necessidade de nitrogênio para o milho. In: Simpósio Internacional de Agricultura de Precisão, 3, 2005. Sete Lagoas. Anais... Sete Lagoas, 2005, CD-ROM.

CFSEMG – COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ed. Lavras, 1999. 359 p.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro de 2013. Brasília.

CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; PINTO, L.B.B.; QUEIROZ, L.R. Caracterização dos sistemas de produção de milho para altas produtividades. Circular Técnica 124. Sete Lagoas: Embrapa, 2009. 15p.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; GARCIA, J.C.; DUARTE, J.O. Cultivares. In: CRUZ, J.C. (ed.) Cultivo de milho. Embrapa Milho e Sorgo, Sistema de produção, Sete Lagoas, versão eletrônica 7ed., outubro de 2010. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_7ed/cultivares.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_7ed/cultivares.htm)>. Acesso em 10/01/2014.

CRUZ, J.C.; VERSIANI, R.P. FERREIRA, M.T.R. Cultivo de milho. Embrapa Milho e Sorgo, Sistema de produção, 1 Sete Lagoas, versão eletrônica 7ed. 2011. Disponível em

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/>>

Acesso em 12/01/2014.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V.F.; MARINI, D. SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasiliense* e *Herbaspirillum seropediae* na cultura do milho. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, v.7, n.10, p.1023-1029, 2013.

DEL GALLO, M.; FENDIRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. In.: OKON, Y. (Eds.). *Azospirillum* Plant associations. Boca Raton: CRC Press, 1994, p.57-75.

DECHEM, A.R.; NACHTIGALL, G.R. Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V, 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. cap.3, p.91-132.

DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasiliense*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.16, n.9, p.645-651, 1996.

DOBBELAERE, S. CROONENBORGH, A. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasiliense* an *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biology and Fertility of Soils, Berlim, v.36, p.284-297, 2002.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences, v.22, n.2, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. Science Tech Publishers, Madison and Springer-Verlag, Berlin, 1987, 155p. (Brock/Springer series in contemporary bioscience).

DOTTO, A.P.; LANA, 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 (Agrária), Recife, v.5, n.3, p.376-382, 2010.

DURÃES, F.O.M.; MAGALHÃES, P.C.; MARRIEL, I.E.; GAMAS, E.E.G.; CASELA, C.R.; OLIVEIRA, A.C. de; CANTÃO, F.R. Caracterização de genótipos para uso e eficiência de nitrogênio em milho e influência da adubação nitrogenada sobre a incidência e severidade da mancha foliar de *Phaeosphaeria maydis*. Circular Técnica, 53, Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2004. 8p.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Circular Técnica 6. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2000. 41p.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Documentos 132. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2011. 230p.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Londrina: Editora Planta, 2006. 403p.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA Ltda. Manual do medidor eletrônico de teor de clorofila (ClorofiLOG / CFL 1030). Porto Alegre: Falker Automação Agrícola, 2008. 33p. Disponível em < <http://www.falker.com.br/download.php>>. Acesso em 09/01/2013.

FAYEZ, M.; DAW, Z.Y. Efect of inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense* on cotton (*Gossipium barbadense*). Biology and Fertility of Soils, Berlim, v.4, p.91-95, 1987.

FERREIRA, A.S.; PIRES, R.R.; RABELO, P.G.; OLIVEIRA, R.C.; LUZ, J.M.Q.; BRITO, C.H. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. Applied Soil Ecology, Amsterdam, v.72, p.103-108, 2013b.

FERREIRA, V.E.N.; KAPPES, C.; PEREIRA, P.H.T.; KANACILO JUNIOR, W.K. Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e nitrogênio em cobertura no milho safrinha. In: Seminário Nacional Milho Safrinha, 12, 2013 Duorados. Anais... Dourados, 2013a. Disponível em: < <http://www.cpaو.embrapa.br/cds/milhosafinha2013/PDF/19.pdf>>. Acesso em 12/12/2013.

GARCÍA DE SALOMONE, I.E.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. Biology and Fertility of Soils, Berlim, v.21, n.3, p.193-196, 1996.

GARCIA, J.C.; MATTOSO, M.J.; DUARTE, J.O.; CRUZ, L.C. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. Circular Técnica 74. Embrapa Milho e Sorgo, 2006 12p.

GARCIA, J.C.; VITORINO, R.; AZANIA, C.A.M.; SILVA, D.M.; BELUCI, L.R. Inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar, variedade RB867515. Nucleus, Ituverava, v.10, n.1, p.99-108, 2013.

GITTI, D.C.; MIRANDA, R.A.S.; LOURENÇAO, A.L.F.; ROSCOE, R. Inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense* e níveis de nitrogênio em cobertura do milho safrinha. In: Seminário Nacional Milho Safrinha, 12, 2013 Duorados. Anais... Dourados, 2013. Disponível em: <<http://www.cpaو.embrapa.br/cds/milhosafrinha2013/PDF/80.pdf>>. Acesso em 21/01/2013.

GOES, R.J.; RODRIGUES, R.A.F.; TAKASU, A.T.; ARF, O. Características agronômicas e produtividade do milho sob fontes e níveis de nitrogênio em cobertura no inverno. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.12, n.3, p.250-259, 2013.

GOMES, R.F.; SILVA, A.G.da; ASSIS, R.L.de; PIRES, F.R. Efeito de níveis e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agronômicos da cultura do milho sob plantio direto. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v. 31, p. 931-938, 2007.

HAMMAD, H.M.; AHMAD, A.; KHALIQ, T.; FARHAD, W.; MUBEEN, M. Optimizing rate of nitrogen application for higher yield and quality in maize under semiarid environment. Crop and Environment, Faisalabad, v.2, n.1, p.38-41, 2011.

HUNGRIA, M. Documentos, 325. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 37p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p.

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

JAKELAITIS, A.; SILVA, A.A.; FERREIRA, L.R. Efeitos do nitrogênio sobre o milho cultivado em consórcio com *Brachiaria brizantha*. Acta Scientiarum, Biological Sciences, v.27, n.1, p.39-46, 2005.

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

JORDÃO, L.T.; LIMA, F.F.; LIMA, R.S.; MORETTI, P.A.E.; PEREIRA, H.V.; MUNIZ, A.S.; OLIVEIRA, M.C.N. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum brasiliense* sob diferentes níveis de nitrogênio e manejo com braquiária. In: FertBio, 2010, Guarapari. Anais... Guarapari, 2010. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/33879/1/id31707.pdf>>. Acesso em 18/01/2013.

KAMNEV, A.A.; TUGAROVA, A.V.; ANTONYUK, L.P.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.G.; GARDINER, P.H. Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: Comparison of endophytic and non-endophytic strains of *Azospirillum*

*brasiliense*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, v.19, n.1, p.91-95, 2005.

KAPPES, C.; ARF, O.; ANDRADE, J.A.C. Produtividade do milho em condições de diferentes manejos do solo e de níveis de nitrogênio. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.37, n.5, p.1310-1321, 2013.

KAPPES, C.; CARVALHO, M.A.C.; YAMASHITA, O.M.; SILVA, J.A.N. Influência do nitrogênio no desempenho produtivo do milho cultivado na segunda safra em sucessão à soja. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v.39, n.3, p.251-259, 2009.

KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012 431p.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. Klimate der Erde. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928. Wall-map 150cmx200cm

KOLTUN, A.; CAVALCANTE, A.P.; NAKAGAWA, C.S.; DIAS, H.A.C.; LOPES, K.B.A.; KRAUSE, M.D.; DALTO, P.G.; POCKEMBACHER, R.; MARINO, T.P.; OLIVEIRA, A.L.M.; FERREIRA, J.M. Efeito da Inoculação de *Azospirillum brasiliense* AbV5 em híbridos de milho de um dialelo parcial. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 29, 2012. Águas de Lindoia. Anais... Águas de Lindoia, 2012. Disponível em: <[http://www.abms.org.br/29cn\\_milho/09399.pdf](http://www.abms.org.br/29cn_milho/09399.pdf)>. Acesso em 18/01/2013.

KUUS, A.V. Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. 2006. 109f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

LANA, M.C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J.E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. Revista Ceres, Viçosa, v.59, n.3, p.399-405, 2012.

LARA CABEZAS, W.A.R.; COUTO, P.A. Imobilização de nitrogênio da ureia e do sulfato de amônio aplicado em pré-semeadura ou cobertura na cultura de milho, no sistema de plantio direto. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.31, n.4, p.739-752, 2007.

LEAL, L.T. Resposta de genótipos de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas no Rio Grande do Sul. 2011. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

LEMOS, J.M.; GUIMARÃES, V.F.; VENDRUSCOLO, E.C.G.; SANTOS, M.F.S.; OFFEMANN, L.C. Resposta de cultivares de trigo à inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense*, e à adubação nitrogenada em cobertura. Científica, Jabitacabal, v.41, n.2, p.189-198, 2013.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; DER LELIE, D.V. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. Critical Reviews in Plant Sciences, Boca Raton, v.21, n.6, p.583-606, 2002.

LOPES, V.R. Melhoramento genético de cana-de-açúcar em associação com bactérias promotoras do crescimento vegetal. 2013. 134f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MACALINTAL, E.M.; URGEL, G.V. Effects of *Azospirillum* inoculated seed pieces and rate of nitrogen application on yields of sugarcane. *Philippine Sugar Quarterly*, v.3, p.8-10, 1992.

MACHADO, A.T.; SODEK, L.; DÖBEREINER, J.; REIS, V.M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.33, n.6, p.961-970, 1998.

MACHADO, P.L.O.A. Documentos, 24. Manejo da matéria orgânica de solos tropicais: abrangências e limitações. Rio de Janeiro: Embrapa. 2001. 20p.

MAGALHÃES, A.C.N., SILVA, W.J. da. Determinantes genético-fisiológicos da produtividade do milho. In: Paterniani, E.; VIEGAS, G.D. (eds.) Melhoramento e produção do milho no Brasil. 2ed. Piracicaba/ESALQ: Fundação Cargill, 1987. p.349-375.

MAGALHÃES, P.C.; JONES, R. Aumento de fotoassimilados na taxa de crescimento e peso final dos grãos de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.25, n.12, p.1747-1754, 1990.

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

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

MARTÍNEZ-MORALES, L.J.; SOTO-URZÚA, L.; BACA, B.E.; SÁNCHEZ-AHÉDO, J.A. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasiliense*. *FEMS Microbiology Letters*, v.228, n.2, p.167-173, 2003.

McGILL, W.B. The physiology and biochemistry of soil organisms. In: PAUL, E.A. (ed.) *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. 3ed. Burlington: Academic Press, 2007. cap.9, p.231-256.

MENDES, M.C.; ROSÁRIO, J.G.; FARIA, M.V.; ZACCHE, J.C.; WALTER, A.L.B. Avaliação da eficiência agronômica de *Azospirillum brasiliense* na cultura do trigo e os efeitos na qualidade de farinha. *Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, Guarapuava, v.4, n.3, p.95-110, 2011.

MORAIS, T.P. Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasiliense* em híbridos de milho. 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

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

MÜLLER, T.M. Inoculação de *Azospirillum brasiliense* associada a níveis de crescentes de adubação nitrogenada e o uso do bioestimulante vegetal na cultura do milho. 2013. 97f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Centro-oeste, UNICENTRO, Guarapuava, 2013.

MÜLLER, T.M.; BAZZANEZI, A.N.; VIDAL, V.; TUROK, J.D.N.; RODRIGUES, J.D.; SANDINI, I.E. Inoculação de *Azospirillum brasiliense* no tratamento de sementes e

sulco de semeadura na cultura do milho. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 29, 2012. Águas de Lindoia. Anais... Águas de Lindoia, 2012. Disponível em: <[http://www.abms.org.br/29cn\\_milho/06618.pdf](http://www.abms.org.br/29cn_milho/06618.pdf)>.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Diazotrophic associations in sugar cane cultivation in South India. *Tropical Agriculture*, v.73, n.3, p.171-178, 1999.

NOVAKOWISKI, J.H.; SANDINI, I.E.; FALBO, M.K.; MORAES, A.; NOVAKOWISKI, J.H.; CHENG, N.C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasiliense* na cultura do milho. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.32, n.1, p.1687-1698, 2011.

OLIVEIRA, F.A.; CAVALCANTE, L.F.; SILVA, I.F.; PEREIRA, W.E.; OLIVEIRA, J.C.; FILHO, J.F.C. Crescimento do milho adubado com nitrogênio e fósforo em um Latossolo Amarelo. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)*, Recife, v.4, n.3, p.238-244, 2009.

OLIVEIRA, J.P.; SILVA, M.L.R.B.; LIRA, M.C.C.P.; BURITY, H.A. Fixação do N<sub>2</sub> associativa e em vida livre. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. (eds.). *Micro-organismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Guaíba: Agrolivros, 2008. cap.4, p.97-118.

OLIVEIRA, P.P.A.; OLIVEIRA, W.S.; BARIONI JÚNIOR, W. Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com *Azospirillum brasiliense* e fertilizada com nitrogênio. Circular Técnica n.54. São Carlos: Embrapa, 2007. 6p.

OKUMURA, R.S.; YANO, G.T.; MARIANO, D.C.; ZACCHEO, P.V.C.; TAKAHASHI, H.W. Nutrição nitrogenada no milho fertilizado com uréia tratada com inibidor de urease. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.34, n.1, p.157-170, 2013.

PACENTCHUK, F.; NOVAKOWISKI, J.H.; SANDINI, I.E., Inoculação de *Azospirillum brasiliense* cepa BR11005 e adubação nitrogenada: efeitos na produtividade da cultura do trigo. In: Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, 5, 2011. Dourados. Anais..., Dourados, 2011. Disponível em <[http://www.cpa.br/aplicacoes/cd\\_trigo/trabalhos/SOLOS/Inocula%C3%A7%C3%A3o%20de%20Azospirillum%20brasiliense%20cepa%20BR%2011005.pdf](http://www.cpa.br/aplicacoes/cd_trigo/trabalhos/SOLOS/Inocula%C3%A7%C3%A3o%20de%20Azospirillum%20brasiliense%20cepa%20BR%2011005.pdf)>. Acesso em 21/01/2013.

PENOT, I.; BERGES, N.; GUINGUENE, C.; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France, using biochemical tests and plasmid profiles. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.38, n.8, p.798-803, 1992.

PEREIRA, W.; LEITE, J.M.; HIPÓLITO, G.S.; SANTOS, C.L.R.; REIS, V.M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. *Revista Ciência Agronômica*, Ceará, v.44, n.2, p.363-370, 2013.

PEREYRA, M.A.; GARCÍA, P.; COLABELLI, M.N.; BARASSI, C.A.; CREUS, C.M. A better water status in wheat seedlings induced by *Azospirillum* under osmotic stress is related to morphological changes in xylem vessels of the coleoptile. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.53 p.94-97, 2012.

PICCININ, G.G.; BRACCINI, A.L.; DAN, L.G.M.; BAZOL, G.L.; HOSSA, K.R.; PONCE, R.M. Rendimento e desempenho agronômico da cultura do trigo em manejo com *Azospirillum brasiliense*. Revista Agrarian, Dourados, v.6, n.22, p.393-401, 2013.

PIMENTEL, M.S.; RICCI, M.S.F.; COSTA, J.R.; REIS, V.M.; SANTOS, V.L.S.; SILVA, M.F. Desenvolvimento e nutrição de mudas de cafeiro inoculadas com bactérias promotoras de crescimento. Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas, v.14, n.2, p.221-230, 2008.

PINTO JUNIOR, A.S.; GUIMARÃES, V.F.; RODRIGUES, L.F.O.S.; OFFEMANN, L.C.; COSTA, A.C.P.R.; SILVA, M.B.; DRANSKI, J.A.L.; BANDEIRA, K.B.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Resposta a inoculação de estirpes de *Azospirillum brasiliense* na cultura do milho na região oeste do Paraná. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 29, 2012. Águas de Lindoia. Anais..., Águas de Lindoia, 2012. Disponível em: <[http://www.abms.org.br/29cn\\_milho/02552.pdf](http://www.abms.org.br/29cn_milho/02552.pdf)>.

PINTO, N. F. J. de A. Reação de cultivares com relação à produção de grãos ardidos em milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. 4 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 144).

PITTNER, E.; DALLA SANTA, O.R.; MOURA, M.O.; MONTEIRO, M.C.; DALLA SANTA, H.S. Flutuação populacional de bactérias do gênero *Azospirillum* em solo cultivado com milho e em campo nativo. Ambiência. Guarapuava, v.3, n.2, p.243-252, 2007.

PORTUGAL, J.R.; ARF, O.; LONGUI, W.V.; GITTI, D.C.; BARBIERI, M.K.F.; GONZAGA, A.R.; TEIXEIRA, D.S. Inoculação com *Azospirillum brasiliense* via foliar associada à níveis de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 29, 2012. Águas de Lindoia. Anais..., Águas de Lindoia, 2012. Disponível em: <[http://www.abms.org.br/29cn\\_milho/06298.pdf](http://www.abms.org.br/29cn_milho/06298.pdf)>.

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

PUENTE, M.L.; GARCÍA, J.E.; MARONICHE, G.A.; ARGUSSAIN, G.G.; PIRCHI, H.J.; PERTICARI, A. Plant-growth promotion of argentinean isolates of *Azospirillum brasiliense* on rice (*Oryza sativa* L.) under controlled and field conditions. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, v.13, p.1361-1369, 2013.

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

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

REIS JÚNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes hídricos. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.32, n.3, p.1139-1146, 2008.

REIS JÚNIOR, F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.35, n.5, p.985-994, 2000.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.; Döbereiner, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. Critical Reviews in Plant Sciences, v.19, p.227-247, 2000.

REPKE, R.A.; CRUZ, S.J.S.; SILVA, C.J.; FIGUEIREDO, P.G.; BICUDO, S.J. Eficiência da *Azospirillum* brasileiro combinada com níveis de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, v.12, n.3, p.214-226, 2013.

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

ROCHA, R.N.C.; GALVÃO, J.C.C.; TEIXEIRA, P.C.; MIRANDA, G.V.; AGNES, E.L.; PEREIRA, P.R.G.; LEITE, U.T. Relação do índice SPAD, determinado pelo clorofilômetro com teor de nitrogênio na folha e rendimento de grãos em três genótipos de milho. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.4, n.2, p.161-171, 2005.

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

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. Naturwissenschaften, v.91, n.11, p.552-555, 2004.

ROESCH, L.F.W.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M. TRIPPLETT, E.W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. Plant and Soil, Haia, v.302, p.91-104, 2008.

SÁ JÚNIOR, ADÍLIO. Comportamento agronômico do milho em resposta ao modo de aplicação e concentrações de *Azospirillum brasiliense*. 2012. 51f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

SABUNDJIAN, M.T.; ARF, O.; KANEKO, F.H.; FERREIRA, J.P. Adubação nitrogenada em feijoeiro em sucessão a cultivo solteiro e consorciado de milho e *Urochloa ruziziensis*. Pesquisa Agropecuária Tropical, v.43, n.3, p.292-299, 2013.

SAFDARIAN, M.; RAZMJOO, J; DEHNAVI, M.M. Effect of nitrogen sources and rates on yield and quality of silage corn, Journal of Plant Nutrition, v.37, n.4, p.611-617, 2014.

SANGOI, L.; ALMEIDA, M.L.; GRACIETTI, M.A.; HORN, D.; SCHWEITZER, C.; SCHMITT, A.; BIANCHET, P. Rendimento de grãos, produção e distribuição de massa seca de híbridos de milho em função do aumento da densidade de plantas. Revista Brasileira Agrociência, Pelotas, v.11, n.1, p.25-31, 2005.

SANGOI, L.; ALMEIDA, M.L.; SILVA, P.R.F.; ARGENTA, G. Bases morfofisiológicas para maior tolerância dos híbridos modernos a altas densidades de plantas. Bragantia, Campinas, v.61, n.2, p.101-110, 2002.

SANTIN, J.A. Fungos de pré e pós colheita e qualidade de grãos de milho. 2001. 200f. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

SANTOS, C.E.R.S; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica do N<sub>2</sub> em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. (eds.). Micro-organismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Guáiba: Agrolivros, 2008. cap.1, p.17-41.

SARIG, S.; OKON, Y.; BLUM, A. "Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on growth dynamics and hydraulic conductivity of *Sorghum bicolor* roots." Journal of Plant Nutrition, v.15, n.6-7, p.805-819, 1992.

SESHADRI, S.; MUTHUKUMARASAMY, R.; LAKSHMINARASIMHAN, C.; IGNACIMUTHU, S. Current Science, Bangalore, v.79, n.5, p.565-567, 2000.

SHARMA, R.C.; BANIK, P. Arbuscular mycorrhiza, Azospirillum and chemical fertilizers application to baby corn (*Zea mays* L.): effects on productivity, nutrients use efficiency, economic feasibility and soil fertility. Journal of Plant Nutrition, v.37, n.2, p.209-223, 2014.

SHIRINZADEH, A.; SOLEIMANZADEH, H.; SHIRINZADEH, Z. Effect of seed priming with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on agronomic traits and yield of barley cultivars. World Applied Sciences Journal, v.21, n.5, p.727-731, 2013

SILVA, M.A.G.; MUNIZ, A.S.; MANNIGEL, A.R.; PORTO, S.M.A.; MARCHETTI, A.N.; GRANNEMANN, I. Monitoring and evaluation of need for nitrogen fertilizer topdressing for maize leaf chlorophyll readings and the relationship with grain yield. Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v.54, n.4, p.665-674, 2011

SILVA, M.C.P.; FIGUEIREDO, A.F.; ANDREOTE, F.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.29, p.163-171, 2013.

SOUZA, E.F.C.; SORATTO, R.P. Efeito de fontes e níveis de nitrogênio em cobertura no milho safrinha, em plantio direto. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.5, n.3, p.395-405, 2006.

SORATTO, R.P.; CARVALHO, M.A.C.; ARF, O. Teor de clorofila e produtividade do feijoeiro em razão da adubação nitrogenada. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.39, n.9, p.895-901, 2004.

SORATTO, R.P.; PEREIRA, M.; COSTA, T.A.M.; LAMPERT, V.N. Fontes alternativas e doses de nitrogênio no milho safrinha em sucessão à soja. Revista Ciência Agronômica, v.41, n.4, p.511-518, 2010.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TEIXEIRA, F.F.; ANDRADE, R.V.; OLIVEIRA, A.C.; FERREIRA, A.S.; SANTOS, M.X. Diversidade no germoplasma de milho coletado na região nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo, Sete Lagoas*, v.1, n.3, p.59-67, 2002.

THULER, D.S.; FLOH, E.I.S., HANDRO, W., Barbosa, H.R. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. *Letters in applied microbiology*, v.37, n.2, p.174-178, 2003.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.37, p.1016-1024, 1979.

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

United States Department of Agriculture - USDA, 2011 <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>> Acesso em 03 de novembro de 2013.

VERONA, D.A.; DUARTE JÚNIOR, J.B.; ROSSOL, C.D.; ZOZ, T.; COSTA, A.C.T. Tratamento de sementes de milho com Zeavit®, Stimulate® e inoculação com *Azospirillum* sp. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010. Goiânia. Anais... Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. p.3731-3737. 2010, CD-ROM.

VIEIRA, S.; Introdução à bioestatística; Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 4<sup>a</sup> ed. 360p.

VILELA, P.M.C.A.; LOUREIRO, M.F.; BÉLOT, J.L. Bactérias diazotróficas na cultura do algodoeiro sob diferentes sistemas de cultivo em Campo Verde – MT. In Congresso Brasileiro de Algodão, 5, 2005. Anais... Salvador, 2005. Disponível em <[http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos\\_cba5/434.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/434.pdf)>. Acesso em 08/02/2013.

VILELA, R.G.; ARF, O.; GITTI, D.C.; KAPPES, C.; GOES, R.J.; DAL BEM, E.A.; PORTUGAL, J.R. Manejo do milheto e níveis de nitrogênio na cultura do milho em sistema de plantio direto. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.11, n.3, p.234-242, 2012.

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

YAMADA, T. Manejo de nitrogênio na cultura do milho. In: FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. (ed.) *Tecnologia da produção de milho*. Piracicaba: Universidade Federal de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997. p.121-130.

ZIMMER, W.; ROEBEN, K.; BOTHE, H. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. *Planta*, v.176, n.3, p.333-342, 1988.