

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFICIÊNCIA DA *Azospirillum brasilense* NA FIXAÇÃO DE  
NITROGÊNIO EM MILHO**

**RODRIGO ALBERTO REPKE**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia (Agricultura)

BOTUCATU – SP  
Fevereiro-2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFICIÊNCIA DA *Azospirillum brasilense* NA FIXAÇÃO DE  
NITROGÊNIO EM MILHO**

**RODRIGO ALBERTO REPKE**  
Engenheiro Agrônomo

**Orientador: Prof. Dr. SILVIO JOSÉ BICUDO**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia (Agricultura)

BOTUCATU – SP  
Fevereiro 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R425e Repke, Rodrigo Alberto, 1988-  
Eficiência da *azospirillum brasilense* na fixação de nitrogênio em milho / Rodrigo Alberto Repke. - Botucatu : [s.n.], 2013  
x , 57 f.: il. color, grafs., tabs.

Dissertação(Mestrado)- Universidade Estadual Paulista.  
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2013  
Orientador: Silvio José Bicudo  
Inclui bibliografia

1. Milho. 2. *Azospirillum brasiliense*. 3. Nitrogênio - Fixação. 4. Adubação nitrogenada. I. Bicudo, Silvio José. II.Universidade Estadual Paulista."Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas.III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

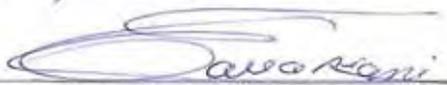
TÍTULO: EFICIÊNCIA DA *Azospirillum brasilense* NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO  
EM MILHO

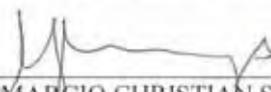
ALUNO: RODRIGO ALBERTO REPKE

ORIENTADOR: PROF. DR. SILVIO JOSÉ BICUDO

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:

  
Prof. Dr. DR. SILVIO JOSÉ BICUDO

  
Prof. Dr. CLAUDIO CAVARIANI

  
Prof. Dr. MARCIO CHRISTIAN S. DOMINGUES

Data da Realização: 20 de fevereiro de 2013.

À Deus pelo dom da vida,

Aos meus pais e irmãos, Helio Alberto Repke e Rita de Cássia Esteves Repke, Luiz Fernando Repke e Juliana Cristina Repke, alicerce de tudo.

Aos meus avós, Alberto Repke e João Peres Esteves (*in memoriam*), Alduina Aparecida Vanni Repke e Thereza Brito Esteves, pelo apoio e incentivo.

À Mahyara, pelo afeto e companheirismo.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Silvio José Bicudo pela valiosa orientação pessoal e profissional.

A todos os mestres e doutores que contribuíram com minha formação.

Aos meus amigos funcionários da Fazenda experimental da FCA.

Aos meus amigos: Sihélio, Silvia, Felipe, Priscila, Débora, Carlos Jorge, Pedro e Murilo.

Aos funcionários da Biblioteca do Lageado pela eficiência, gentileza e bom humor.

À Capes pela concessão de bolsa de estudo.

E a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

**SUMÁRIO**

LISTA DE TABELAS .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
1 RESUMO .....	1
2 SUMMARY .....	3
3 INTRODUÇÃO.....	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
4.1 A cultura do milho .....	7
4.2 O elemento nitrogênio (N).....	8
4.3 Gênero <i>Azospirillum</i> .....	10
4.4 Associação de <i>Azospirillum</i> com a planta .....	11
4.5 Potencial de inoculação de <i>Azospirillum</i> em plantas de milho.....	12
5 MATERIAL E MÉTODOS .....	14
5.1 Delineamento experimental, tratamentos e análise estatísticas .....	14
5.2 Localização da área experimental.....	15
5.3 Descrição do clima .....	16
5.4 Solo.....	16
5.5 Preparo do solo da área experimental.....	17
5.6 Híbrido de milho.....	17
5.7 Tratamentos das sementes com a solução de bactérias fixadores de nitrogênio .....	17
5.8 Semeadura e adubação de implantação .....	18
5.8.1 Aplicação de nitrogênio (N) na implantação .....	18
5.8.2 Adubação de cobertura .....	19
5.9 Tratos culturais .....	19
5.10 Avaliações .....	19

5.10.1.1 Avaliações morfológicas da planta de milho.....	19
5.10.1.2 Determinação da massa da matéria seca de plantas ( $\text{kg ha}^{-1}$ ).....	19
5.10.1.3 Determinação da área foliar fotossinteticamente ativa ( $\text{m}^2 \text{ha}^{-1}$ ).....	20
5.10.1.4 Determinação da altura de planta e diâmetro do colmo das plantas (cm).....	20
5.10.2 Avaliações morfológicas das espigas .....	20
5.10.2.1 Massa de matéria seca da espiga (g).....	20
5.10.2.2 Comprimento da espiga (cm) .....	21
5.10.2.3 Diâmetro da espiga (cm).....	21
5.10.2.4 Número de fileira de grãos .....	21
5.10.2.5 Diâmetro do sabugo (cm) .....	21
5.11 Determinação da produtividade de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ).....	21
5.12 Massa de mil grãos (g) .....	21
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
6.1 Análises de variância dos componentes da planta.....	22
6.2 Análises de regressão e correções de <i>Pearson</i> dos componentes da planta .....	27
6.3 Análise de variância, regressão e correlação de <i>Pearson</i> dos componentes da espiga .....	36
7 CONCLUSÕES .....	44
8 REFERÊNCIAS .....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Tratamentos aplicados em ensaio de campo com híbrido de milho 2B587Hx, realizado na Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de Botucatu (FCA/UNESP)..	15
2. Resultados da análise química do solo da área experimental, nas camadas de 0-20 e 20-40 cm de profundidade, amostrado antes da instalação do experimento..	17
3. Análise de variância para acúmulo de matéria seca da área foliar fotossinteticamente ativa de plantas de milho submetidas ao uso de bactérias diazotróficas <i>Azospirillum brasilense</i> , inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE)..	25
4. Análise de variância para acúmulo de matéria seca do colmo de planta de milho submetidas ao uso de bactérias diazotróficas <i>Azospirillum brasilense</i> , inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).....	25
5. Análise de variância para área foliar de planta de milho submetidas ao uso de bactérias diazotróficas <i>Azospirillum brasilense</i> , inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).....	26
6. Análise de variância para altura de planta de milho submetidas ao uso de bactérias diazotróficas <i>Azospirillum brasilense</i> , inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio em três épocas de avaliação, 20, 40 e 60 dias após a emergência (DAE)..	26
7. Análise de variância para diâmetro do colmo de planta de milho submetidas ao uso de bactérias diazotróficas <i>Azospirillum brasilense</i> , inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE). .....	27
8. Correlações simples de <i>Pearson</i> para acúmulo de matéria seca do colmo da planta aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE) <i>versus</i> componentes da espiga M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita....	29
9. Correlações simples de <i>Pearson</i> para acúmulo de matéria seca da folha da planta aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE) <i>versus</i> componentes da espiga	

M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita. ....	30
10. Correlações simples de <i>Pearson</i> para área foliar da planta aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE) <i>versus</i> componentes da espiga M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita. ....	32
11. Correlações simples de <i>Pearson</i> para altura de planta aos 20, 40 e 60 dias após a emergência (DAE) <i>versus</i> componentes da espiga M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita. ....	34
12. Correlações simples de <i>Pearson</i> para diâmetro do colmo da planta aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE) <i>versus</i> componentes da espiga M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita. ....	36
13. Análise de variância para acúmulo dos componentes da espiga de planta de milho, M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita, submetidas ao uso de bactérias diazotróficas <i>Azospirillum brasilense</i> , inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio. ....	37
14. Correlações simples de <i>Pearson</i> para produtividade <i>versus</i> componentes da espiga M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita .....	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Dados climatológicos do período de realização do experimento de dezembro de 2010 a abril de 2011. Botucatu-SP, 2012.....	16
2. Análise de regressão para matéria seca do colmo de planta de milho submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha <sup>-1</sup> em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE)..	28
3. Análise de regressão para matéria seca da folha de planta de milho submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha <sup>-1</sup> em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).	28
4. Análise de regressão para área foliar de planta de milho submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha <sup>-1</sup> em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).....	31
5. Análise de regressão para altura de planta de milho submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha <sup>-1</sup> em três épocas de avaliação, 20, 40 e 60 dias após a emergência (DAE).	33
6. Análise de regressão para diâmetro do colmo de planta de milho submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha <sup>-1</sup> em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).	35
7. Análise de regressão da produtividade de grãos na colheita, submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha <sup>-1</sup> .	38
8. Análise de regressão da massa de matéria seca da espiga de planta de milho, submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha <sup>-1</sup> .	39
9. Análise de regressão do comprimento da espiga de planta de milho, submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha <sup>-1</sup> .	40
10. Análise de regressão do comprimento da espiga de planta de milho, submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha <sup>-1</sup> .	40
11. Análise de regressão da massa de mil grãos de planta de milho, submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha <sup>-1</sup> .	41
12. Análise de regressão da produtividade de grãos na colheita, submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha <sup>-1</sup> .	41

## 1 RESUMO

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo, porém apresenta desafios quanto ao manejo correto da adubação. Sua elevada demanda por nitrogênio tem sido a principal responsável por excessivas doses de fertilizantes nitrogenados sintéticos aplicados na cultura. Como consequência, há aumento no custo de produção da lavoura e impactos negativos ao meio ambiente. Dessa forma, é necessário estudar métodos alternativos que promovam o desenvolvimento das plantas e garantam a produtividade, buscando aliar eficiência, viabilidade econômica e segurança ambiental. Bactérias diazotróficas podem fixar nitrogênio atmosférico e produzir substâncias promotoras do crescimento, podendo reduzir a utilização de fertilizantes nitrogenados na cultura do milho. Para testar essa hipótese, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência agrônômica na cultura do milho, do uso de bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*, inoculada via sementes em combinação com doses de nitrogênio. A pesquisa foi composta por um ensaio conduzido no campo experimental da Fazenda Lageado em Botucatu-SP, pertencente à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas, em delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições, em esquema fatorial duplo. Tendo o fator 1, dois níveis: sem e com aplicação da solução da bactéria *Azospirillum brasilense* nas sementes e o fator 2, seis doses totais de nitrogênio: zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>-1</sup>. Foi utilizado o híbrido de milho transgênico 2B587 Hx, ciclo precoce, porte baixo, indicado para semeadura no verão. As avaliações morfológicas da planta e da espiga foram realizadas aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE). A produtividade de grãos foi aferida aos 115 DAE. A

inoculação da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* acompanhada ou não de doses de nitrogênio sintético, não interferiu no desenvolvimento de plantas e produtividade da cultura do milho. A inoculação da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* não interferiu na expressão dos efeitos da adubação com nitrogênio sintético na cultura do milho.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, fixação biológica de nitrogênio, adubação nitrogenada.

EFFICIENCY OF *AZOSPIRILLUM BRASILIENSE* ON THE NITROGEN FIXATION OF CORN. Botucatu, 2013. 57 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: RODRIGO ALBERTO REPKE

Adviser: SILVIO JOSÉ BICUDO

## 2 SUMMARY

Corn is a cereal grown worldwide; however it presents challenges with regards to the proper fertilizer management. Its high demand for nitrogen has been primarily responsible for excessive doses of synthetic nitrogen fertilizer applied to the crop. As a result, it can be observed an increase in cost of crop production and negative impacts to the environment. Thus, it is necessary to study alternative methods that promote the plant growth and ensure productivity, improving efficiency, economic viability and environmental safety. Diazotrophic bacteria can fix atmospheric nitrogen and produce growth promoting substances which can reduce the use of nitrogen fertilizers in the corn cultivation. To test this hypothesis, this study had the objective to evaluate the agronomic efficiency in corn, using Diazotrophic *Azospirillum brasilense* inoculated via seeds in combination with nitrogen levels. The research consisted in a field trial, where the experimental design was a randomized block, with four replications in a double factorial. Factor 1: with and without the application of the solution of the bacterium *Azospirillum brasilense* in seeds, and factor 2: six total doses of nitrogen: zero, 180, 155, 130, 105 and 80 kg ha<sup>-1</sup>. The hybrid of the transgenic corn 2B587 Hx, early maturity, small size was used, suitable for planting in the summer. The morphological evaluations of plant and cob were evaluated at 20, 40, 60, 80 and 100 days after emergence (DAE). Grain yield was measured at 115 DAE. Inoculation of corn seeds with *Azospirillum* had no effect on growth and productivity of corn plants. The adoption of this practice did not replace the use of nitrogen fertilizers mither allows dose reduction of nitrogen being applied.

Using the solution of *Azospirillum brasilense* did not affect the response of synthetic nitrogen applied to the corn cultivation.

**Keywords:** *Zea mays*, biological nitrogen fixation, nitrogen fertilization.

### 3 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura mundialmente importante em virtude de sua diversidade de utilização, extensão da área cultivada (aproximadamente 162 milhões de hectares) e de sua elevada capacidade produtiva, de até 30 t ha<sup>-1</sup> de grãos. Porém, o seu rendimento médio nacional em torno de 5,4 t ha<sup>-1</sup> de grãos, além do potencial de produção, razão que justifica estudos voltados à melhoria dos sistemas de produção de milho para alcance de maior produtividade e rentabilidade (CONAB, 2011).

O manejo inadequado da adubação ainda se configura com um dos principais gargalos ao aumento da produtividade. O milho é uma cultura exigente em fertilidade do solo, com destaque para o nitrogênio (N), cuja deficiência pode reduzir entre 10 a 22% o rendimento de grão (SUBEDI; MA, 2009).

O N pode ser encontrado em diversas formas na biosfera. A atmosfera contém cerca de 80% de nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>), cujo aproveitamento pelas plantas só é possível por processos industriais ou fixação biológica por alguns organismos procariotos (PREININGER; GYURJÁN, 2001). O aumento da demanda por fertilizantes nitrogenados, aliada ao seu elevado custo, tem direcionado as pesquisas para o processo de fixação natural.

Após décadas de pesquisas, principalmente com as bactérias do gênero *Azospirillum*, a adoção dessa tecnologia nos sistemas agrícolas ainda é incipiente. A principal barreira à utilização do *Azospirillum* na cultura do milho tem sido a inconsistência dos

resultados de pesquisa, que podem variar de acordo com a cultivar, condições edafoclimáticas e metodologia de condução da pesquisa.

A continuidade da realização de ensaios de inoculação em solos de diferentes regiões, para avaliar o potencial das bactérias diazotróficas, verificar a viabilidade da inoculação de sementes com bactérias do gênero *Azospirillum* e adequar doses de fertilizantes nitrogenados na cultura mostra-se, ainda, oportuna.

A realização do presente trabalho objetivou avaliar a eficiência agronômica na cultura do milho, do uso de bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense*, inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio.

## **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 A cultura do milho**

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea anual, de metabolismo C<sub>4</sub>, alógama de origem americana (GARCIA et al., 2006). Seu sistema radicular fasciculado pode atingir 3 m de profundidade, mas, a maior parte das raízes encontra-se na camada de 0-30 cm de profundidade no solo. O caule é do tipo colmo cheio, constituído por nós e entrenós. Suas folhas lanceoladas-paralelinérveas são inseridas no caule alternadamente. Apresenta inflorescências masculina, pendão, e feminina, espiga, sendo o fruto classificado como cariopse (MAGALHÃES et al., 1994).

Mundialmente, o milho é o terceiro cereal mais cultivado, depois do arroz e do trigo podendo, ser utilizado na alimentação humana e animal, na fabricação de cosméticos, de bebidas e de biocombustível (AWIKA, 2011). Os maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos, a China e o Brasil, nesta ordem produtores de 316, 177 e 57 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2011). Vários fatores contribuem para este quadro como, por exemplo, o cultivo por pequenos e médios agricultores (PEDRINHO, 2009), o baixo investimento no milho safrinha, as condições climáticas desfavoráveis de algumas regiões produtoras, a utilização de variedades ou híbridos não adaptados as condições edafoclimáticas de determinada região, e outros. No Brasil, os maiores estados produtores de

milho são: Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás, que respondem por 56% da produção brasileira (CONAB, 2011).

O milho é exigente em nitrogênio, são demandados 20 kg ha<sup>-1</sup> de N para cada tonelada de grão produzido (COELHO et al., 2010). Plantas deficientes em N apresentam amarelecimento das folhas mais velhas, seguidas de clorose generalizada e perda foliar. Em alguns casos pode ser observado deformações nas pontas das espigas (MARTINS et al., 2008). Levando em conta que a maioria dos solos das regiões tropicais é pobre em N, torna-se de fundamental importância a realização da adubação nitrogenada para suprir a demanda das plantas de milho pelo referido nutriente (BORTOLINI et al., 2001; SOUZA, 2006).

No entanto, geralmente apenas 50% do N aplicado no solo são aproveitados pelas plantas, sendo o restante perdido por lixiviação, volatilização, entre outras causas (SAIKIA; JAIN, 2007). A existência de interações entre o N e bactérias diazotróficas na assimilação desse nutriente pode se transformar no principal caminho para a redução da dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos (REIS JÚNIOR et al., 2008a).

#### **4.2 O elemento nitrogênio**

O nitrogênio está presente nos aminoácidos e proteínas, participa com quatro átomos na molécula de clorofila e é componente dos ácidos nucléicos que são indispensáveis nos núcleos celulares e protoplasma e onde se situam os controles hereditários. É essencial para utilização de carboidratos pela planta, além de estimular o crescimento e o desenvolvimento de folhas, do caule e das raízes, promovendo maior absorção de outros nutrientes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009). É o nutriente absorvido em maior quantidade, em muitos sistemas de cultivo, razão para sua indisponibilidade constituir fator limitante ao pleno desenvolvimento e produção das plantas (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

O nitrogênio pode ser incorporado ao solo através de compostos orgânicos, restos vegetais e animais, e/ou inorgânicos (fertilizantes nitrogenados sintéticos), fixação biológica, simbiótica ou não, e fixação por descargas elétricas. No solo, o nitrogênio pode ser mineralizado, imobilizado ou perdido por volatilização, lixiviação e/ou ser extraído pelas plantas (McSHAFFREY, 2006).

Segundo Huergo (2006), a mais importante fonte de N é a atmosfera. No entanto, é indisponível para mais de 99% dos organismos vivos (GALLOWAY et al., 2003). A reação de redução de N atmosférico a amônia ( $\text{NH}_3$ ) exige uma carga energética muito alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados (KIM; REES, 1994).

O processo de fixação de N desenvolvido por Haber-Bosch utiliza temperaturas de 300 a 500°C e pressão acima de 300 atm, com catalisadores a base de ferro, consumindo muita energia e encarecendo o preço do fertilizante (BUCHANAN et al., 2000).

Na natureza, alguns organismos procariotos conseguem assimilar o N atmosférico e transformá-lo em  $\text{NH}_3$ , processo chamado de fixação biológica realizado através do complexo enzimático nitrogenase (CANTARELLA, 2007).

A fixação biológica pode ser responsável por aproximadamente 65% do total de N fixado na Terra (AZEVEDO, 2010) sendo assim o segundo processo biológico mais importante depois da fotossíntese (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Nas raízes de muitas plantas cultivadas existem populações ativas de microorganismos diazotróficos (fixadores de N), em associações que, com o passar do tempo sofreram especificações produzindo relações muito estreitas entre a planta e a bactéria (MARCHIORO, 2005).

Devido aos altos custos dos fertilizantes nitrogenados sintéticos e o fato do Brasil importar, atualmente, 73% do N utilizado (HUNGRIA, 2011), muitas pesquisas tem sido direcionadas ao estudo do processo natural de fixação biológica do nitrogênio (CANTARELLA; DUARTE, 2004; CONCEIÇÃO et al., 2009).

No Brasil, a simbiose rizóbio-soja se destaca pela eficiência (ARAÚJO, 2008). A ponto de permitir dispensar total ou parcial, da adubação nitrogenada sem reduzir a produtividade (ALVES et al., 2003). Neste sentido, a busca de bactérias que realizam a fixação de N em gramíneas tem sido o foco principal de muitas pesquisas (JAMES, 2000; KENNEDY; ISLAM, 2001; RONCATO-MACCARI et al., 2003).

A contribuição da fixação biológica de N ao desenvolvimento de espécies gramíneas foi demonstrado para arroz irrigado (BODDEY; DOBEREINER, 1995), para cana-de-açúcar (JAMES, 2000), para o trigo (KENNEDY; ISLAM, 2001) e para o sorgo (RONCATO-MACCARI et al., 2003).

Deste modo, a inoculação de bactérias diazotróficas pode ser uma alternativa na busca pela sustentabilidade dos sistemas agrícolas ao promover menor dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos, com os microorganismos atuando na disponibilidade de N para a planta (BALDANI et al., 2002).

### 4.3 Gênero *Azospirillum*

Dentre os microorganismos fixadores de N encontrados em associações com gramíneas, as espécies do gênero *Azospirillum* constituem um dos grupos mais estudados (BALDANI et al., 1997; BASHAN; HOLGUIN, 1997; HARTMANN; BALDINI, 2006).

Esses microorganismos pertencem à subclasse  $\alpha$  das proteobactérias, a qual comporta um grande número de bactérias simbióticas e associativas a plantas, tais como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Gluconacetobacter* (HARTMANN; BALDINI, 2006). O gênero *Azospirillum* engloba várias espécies. As primeiras a serem descritas foram *A. lipoferum* e *A. brasiliense*, na década de 1970 (TARRAND et al., 1978). Nos anos seguintes, foram descobertas as espécies *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. largimobile* (SLY; STACKEBRANDT, 1999), *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001), *A. otyzae* (XIE; YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007a), *A. zae* (MEHNAZ et al., 2007b), *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008) e *A. fonnosense* (LIN et al., 2011).

Essas bactérias são gram-negativas de vida livre, com metabolismo de carbono e N bastante versáteis, conferindo-lhes competitividade durante o processo de colonização (QUADROS, 2009). Utilizam no seu metabolismo fontes de N como amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular (TRENTINI, 2010). O *Azospirillum* spp. apresenta ampla distribuição nos solos tropicais e subtropicais, mas, a literatura é escassa sobre a sua sobrevivência nesses solos na ausência de planta hospedeira (DEL GALLO; FENDIRIK, 1994).

As espécies de *Azospirillum* desenvolvem associações com várias espécies vegetais, muito embora era imaginado anteriormente que habitavam somente a rizosfera (BASHAN; HOLGUIN, 1997; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Porém,

alguns estudos mostraram que elas podem ser também endofíticas facultativas (SCHLOTER et al., 1994; HUERGO et al., 2008), capazes, portanto de colonizar internamente os tecidos das raízes e da parte aérea das plantas sem causar danos (TERYER; HOLLIS, 2002).

A forma de ação das *Azospirillans* ainda não foi totalmente compreendida. Até o momento, sabe-se que possuem capacidade de fixar N atmosférico quando associadas com gramíneas (ELMERICH; NEWTON, 2007), podendo atuar na solubilização do fosfato inorgânico (VERMA et al., 2001). No entanto, a associação com a planta depende do genótipo do vegetal e de condições específicas do solo (INIGUEZ et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

#### **4.4 Associação de *Azospirillum* com a planta**

Bactérias do gênero *Azospirillum* têm estimulado o crescimento vegetal, aumentando a produtividade e a concentração de N em plantas de diversas culturas como algodão, tomate, cana-de-açúcar e brachiaria sp (REIS et al., 2000). Barassi et al. (2008) observaram aumento da eficiência fotossintética das folhas e condutância estomática, incremento na produção de matéria seca e maior altura em várias espécies de vegetais. A inoculação em sementes de trigo, cevada e aveia-branca aumentou significativamente a produtividade, com variações entre estes cereais de inverno (DIDONET, 1998; DALLA SANTA et al., 2004).

Segundo Hungria et al. (2010), em gramíneas a adoção desta tecnologia pode proporcionar redução de 50% no uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos. Além disso, a inoculação em gramíneas poderia acelerar a taxa de germinação de sementes e incrementar a produção de matéria seca e o acúmulo de N na planta, aumentando a produção de grãos (FAGES, 1994; FALLIK; OKON, 1996; PANDEY et al., 1998).

Em ensaio com *Sorghum bicolor* L. Moench cultivado em hidroponia, a senescência foliar foi retardada nas plantas inoculadas com *A. brasiliense* favorecendo, assim, o acúmulo de matéria seca e a produção de grãos (SARIG et al., 1990). Para Döbbelaere et al. (2003), essa contribuição das bactérias é maior quando as plantas recebem doses variáveis de fertilizante nitrogenado. Didonet et al. (1996) já chamavam a atenção para a maior eficiência bactéria-planta em razão da adição de fertilizante nitrogenado, quando comparado ao uso

isolado da bactéria. Esses autores observaram que a produção de grãos de trigo por plantas oriundas de sementes inoculadas com *A. brasiliense*, e complementado com 15 kg de N ha<sup>-1</sup>, não diferiu do tratamento que recebeu na adubação de cobertura, mais 45 kg de N ha<sup>-1</sup>.

Apesar de vários estudos demonstrarem os efeitos benéficos do uso de *Azospirillum*, a contribuição da fixação biológica tem sido questionada uma vez que a transferência do N fixado para a planta ocorre muito lentamente e apenas uma pequena parte torna-se disponível para o vegetal (DOMMELEN et al., 1998) e as bactérias não secretam altas quantidades de amônia durante o crescimento diazotrófico (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Deste modo, a capacidade das bactérias de produzir substâncias promotoras do crescimento (CASSAN et al., 2001), promover aumento da taxa de absorção de minerais pelas raízes (LAMBRECHT et al., 2000) e suprimir doenças pela competição com microorganismos fitopatogênicos (BERG, 2009) tem sido levados em consideração.

Neste sentido, Lambrecht et al. (2000) reportaram maior crescimento devido à biossíntese e secreção bacteriana de auxina (principalmente, ácido indol-acético – IAA) de plantas inoculadas com *Azospirillum*, segundo esses autores, a presença deste hormônio na rizosfera promoveria maior desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente maior absorção de água e nutrientes pelas plantas. Esta alteração na morfologia das raízes decorrente do IAA secretado por *Azospirillum* já foi comprovada em outro estudo com plantas de trigo (SPAEPEN et al., 2008).

#### **4.5 Potencial de inoculação de *Azospirillum* em plantas de milho**

Observa-se em estudos, que a inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* em plantas de milho resultou, na maioria dos casos, em aumento de produtividade e/ou matéria seca e acúmulo de N (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994; SALAMONE; DÖBEREINER, 1996; OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

Segundo Mehnaz e Lazarovitis (2006) a inoculação de plantas de milho com *A. lipoferum*, resultou em promoção de crescimento vegetal, expresso em maiores pesos (massas) de raiz e parte aérea. Para estes autores, mesmo constatada a capacidade desta bactéria em fixar nitrogênio, o crescimento vegetal foi atribuído, principalmente, à sua significativa produção de ácido indol-acético (AIA).

A inoculação de sementes de milho com *A. amazonense* refletiu em maior produção de matéria seca e acúmulo de N nas raízes de milho, quando comparado às plantas não inoculadas (SILVA, 2005; REIS JÚNIOR et al., 2008b).

Em estudo conduzido a campo na Argentina, estirpes de *Azospirillum* praticamente dobraram o número de grãos por espiga e aumentaram em 59% o peso dos grãos (FULCHIERI; FRIONI, 1994). Cavallet et al. (2000) observaram incremento médio de 17% na produção de grãos em função da inoculação. Em estudo mais recente, Hungria et al. (2010) registraram que o *Azospirillum* proporciona aumento no rendimento de 24 a 30% em relação ao milho não inoculado.

Embora muitos estudos revelem respostas positivas da inoculação de *Azospirillum* sobre o crescimento das plantas, algumas pesquisas ainda reportam resultados inconsistentes, sendo os fatores que interferem nas respostas das culturas ainda desconhecidos (BASHAN; HOLGUIN, 1997; BASHAN, 1998; CAMPOS et al., 1999). Bartchechen et al., (2010) verificaram a inoculação das sementes de milho com *A. brasiliense*, embora tenha proporcionado um incremento em produtividade em relação à testemunha, configurou resultados inferiores à aplicação de doses de N em cobertura.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento experimental, tratamentos e análise estatísticas

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, em esquema fatorial duplo. O fator 1 teve dois níveis, sem e com aplicação da solução da bactéria *Azospirillum brasilense* nas sementes, e o fator 2, seis níveis, correspondentes a doses totais de nitrogênio de zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>-1</sup> (Tabela 1).

A parcela experimental correspondeu 25,5 m<sup>2</sup>, sendo 6 linhas de 5 m, espaçadas a 0,85 m objetivando densidade de 58.824 plantas por hectare.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e comparados através do teste T. Realizou-se a análise de regressão polinomial em função das doses de N nos tratamentos com e sem aplicação de *Azospirillum brasilense*. Os parâmetros morfológicos da planta, componentes da espiga e produtividade, foram estudados através da correlação simples de *Pearson*.

**Tabela 1.** Tratamentos aplicados em ensaio de campo com híbrido de milho 2B587Hx, realizado na Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu (FCA/UNESP)

Trat.	Solução de <i>Azospirillum brasilense</i> *	Doses de Nitrogênio Kg ha <sup>-1</sup>			
		Total	Implantação	Cobertura	
				V4	V6
1	Sem	Zero	Zero	Zero	Zero
2	Com	Zero	Zero	Zero	Zero
3	Sem	180	30	80	70
4	Com	180	30	80	70
5	Sem	155	30	80	45
6	Com	155	30	80	45
7	Sem	130	30	80	20
8	Com	130	30	80	20
9	Sem	105	30	75	Zero
10	Com	105	30	75	Zero
11	Sem	80	30	50	Zero
12	Com	80	30	50	Zero

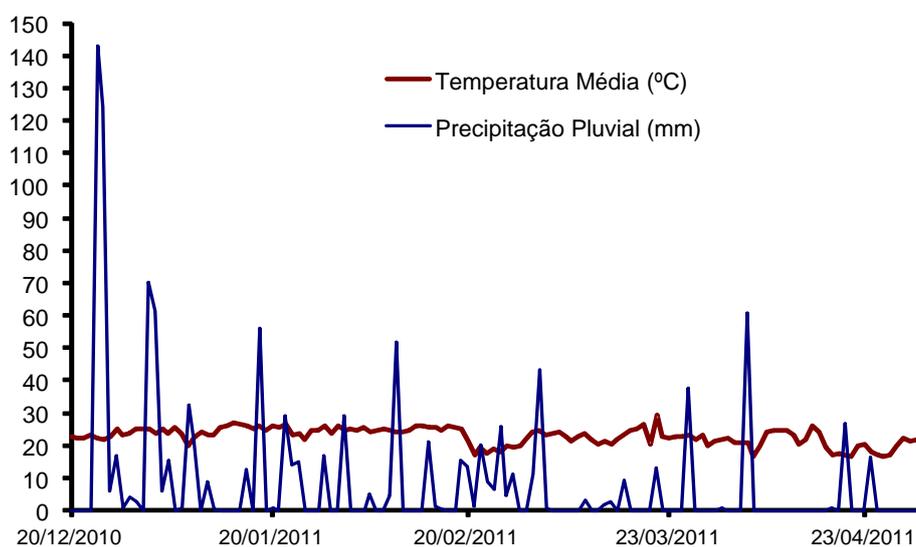
\* Número de bactérias por ml<sup>-1</sup> = 2.10<sup>8</sup>

## 5.2 Localização da área experimental

A pesquisa foi conduzida no campo experimental da Fazenda Lageado em Botucatu-SP, pertencente a Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu (FCA/UNESP), no ano agrícola 2010/2011. A localização geográfica desta área está definida pelas seguintes coordenadas: latitude 22°51'S, longitude 48°26' WGrw e altitude de 786m.

### 5.3 Descrição do clima

O clima de Botucatu-SP, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cwb que significa clima mesotérmico com inverno seco. A estação seca da região é bem definida e ocorre entre os meses de maio a setembro. A Figura 1 contém os dados climatológicos relativos ao período experimental de dezembro de 2010 a abril de 2011, período o qual se deu o desenvolvimento da cultura do milho, coletados no posto meteorológico pertencente ao Departamento de Solos e Recursos Ambientais da FCA/UNESP.



**Figura 1.** Dados climatológicos do período de realização do experimento de dezembro de 2010 a abril de 2011. Botucatu-SP, 2012.

### 5.4 Solo

O solo da área experimental foi classificado como Latossolo Vermelho distroférico de textura argilosa (CARVALHO et al., 1983; EMBRAPA, 1999), com relevo suave ondulado e com boa drenagem. A área vinha sendo cultivada com milho no verão e aveia preta no inverno.

Foram realizadas amostragens do solo em 20 pontos da área experimental, nas camadas de 0–20 e 20–40 cm de profundidade para formar uma amostra composta de cada camada do solo. As amostras de solo foram secas em estufa com aeração forçada a 60°C por 48 horas, desboroadas e passadas em peneira com 2 mm de malha para serem submetidas a análises químicas.

A caracterização química do solo, feita de acordo com as metodologias de Raij et al. (2001), é disposta na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados da análise química do solo da área experimental, nas camadas de 0-20 e 20-40 cm de profundidade, amostrado antes da instalação do experimento.

Profundidade cm	pH	M.O	P resina	Al <sup>3+</sup>	H + Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S
	CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>3</sup>	mg dm <sup>3</sup>		mg dm <sup>3</sup>						mg dm <sup>3</sup>	
0 - 20	5,1	43	31	2	31	4,7	46	20	71	101	70	17
20 - 40	5,1	36	16	2	34	2,8	41	19	63	97	65	17

### 5.5 Preparo do solo da área experimental

O preparo do solo foi realizado através de aração e gradagem, grade aradora com 10 discos de 26 polegadas e grade niveladora com 32 discos de 18 polegadas.

### 5.6 Híbrido de milho

Foi utilizado o híbrido transgênico 2B587 Hx, ciclo precoce, porte baixo, indicado para semeadura no verão. Apresenta bom empalhamento, grãos de coloração amarelo-alaranjada e textura semidentada.

### 5.7 Tratamentos das sementes com a solução de bactérias fixadores de nitrogênio.

Foi aplicada a dose recomendada pelo fabricante, equivalente a 100 mL do inoculante comercial ha<sup>-1</sup> do produto Masterfix Gramíneas Líquido, na concentração de 2.10<sup>8</sup> bactérias por ml<sup>-1</sup>. No presente estudo a densidade de semeadura prevista foi de 58.824 sementes por ha<sup>-1</sup>, sendo que para a inoculação dos tratamentos com solução da bactéria

*Azospirillum brasilense* utilizou-se 1.800 sementes, onde minutos antes da semeadura foram aplicados 3,06 ml do produto comercial, resultando em média 340 mil unidades formadoras de colônia por semente.

No dia da instalação do experimento a solução de bactéria foi aplicada nas sementes a serem utilizadas, cuja não apresentavam tratamento com fungicida e inseticida. Para tanto foram utilizados sacos plásticos onde as sementes previamente contadas receberam o produto. Para homogeneização da distribuição da solução, as embalagens foram agitadas por cinco minutos após a aplicação do produto.

## **5.8 Semeadura e adubação de implantação**

A semeadura foi realizada manualmente, no dia 20 de dezembro de 2010. Foram dispostas na linha de semeadura duas sementes a cada 0,20 m, em profundidade média de 0,04 m em linhas espaçadas 0,85 m entre si. Cinco dias após a emergência das plântulas foi realizado o desbaste deixando uma planta a cada 0,20 m, objetivando densidade de 58.824 plantas por hectare, mantida até o ponto de colheita.

A adubação de implantação consistiu da aplicação de fertilizante formulado N-P-K na concentração 0-20-20, sendo as fontes de  $P_2O_5$  e  $K_2O$ , superfosfato-tríplo e cloreto de potássio respectivamente. Foram aplicados  $300 \text{ kg ha}^{-1}$  do formulado no fundo do sulco de semeadura objetivando a obtenção de produtividades entre 8 a 10 t de grãos  $\text{ha}^{-1}$  (Raij et al. 1997).

Os tratamentos constituídos com doses de nitrogênio receberam na adubação de semeadura  $30 \text{ kg N ha}^{-1}$ , via pulverização de calda na parede do sulco de semeadura. A fonte de fertilizante nitrogenado para a composição da calda foi uréia (45% de N).

### **5.8.1 Aplicação de nitrogênio (N) na implantação**

Para aplicação das doses de N, foi utilizado um pulverizador costal de pressão constante com barras de 2 bicos (Bicos = S.S. CO. FULLJET FL-8VC), espaçados a 0,85 m, com pressão de  $3,1 \text{ kgf cm}^{-2}$  e velocidade de aplicação de  $1 \text{ m s}^{-1}$ .

A parcela experimental correspondeu a 6 linhas de 5 m, espaçadas a 0,85 m (25,5 m<sup>2</sup>), onde foi aplicado 1,35 L da solução uréia + água, correspondendo a um volume de calda de 533,3 L ha<sup>-1</sup>.

A aplicação de nitrogênio foi realizada na parede do sulco aberto para semeadura.

### **5.8.2 Adubação de cobertura**

A adubação de cobertura foi realizada quando as plantas atingiram os estádios fenológicos V4 e V6, como dispostas na Tabela 1. Também via pulverização com solução de uréia. Foi utilizado o mesmo pulverizador empregado na aplicação do adubo nitrogenado na semeadura, inclusive com as mesmas regulagens de pressão e velocidade de aplicação. A distância entre os bicos de aplicação passou a ser de 0,75 m.

### **5.9 Tratos culturais**

Aos 30 dias após a emergência (DAE) foram aplicados herbicidas Proof (Atrazina) e Soberan (Tembotrione), nas doses de 3.000 ml ha<sup>-1</sup> e 250 ml ha<sup>-1</sup>, respectivamente, para o controle de plantas daninhas. Devido à baixa ocorrência de pragas e doenças não foram realizadas aplicações de defensivos agrícolas.

### **5.10 Avaliações**

#### **5.10.1 Avaliações morfológicas da planta de milho**

As avaliações referentes a morfologia da planta foram realizadas aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência das plântulas (DAE). Para massa de matéria seca de plantas e área foliar fotossinteticamente ativa foram coletadas cinco plantas à cada avaliação, o que corresponde a 0,85 m<sup>2</sup> de área amostrada.

##### **5.10.1.1 Determinação da massa da matéria seca de plantas (kg ha<sup>-1</sup>)**

Para determinação da massa da matéria seca, as plantas de milho foram cortadas rente ao solo. A biomassa coletada foi separada em folhas fotossinteticamente ativas

do restante da planta. A seguir, o material vegetal foi picado, subamostrado e seco em estufa com aeração forçada a 65°C até atingir massa constante. A área de cada amostra foi de 0,85 m<sup>2</sup>, deixando-se sempre 0,50 m de bordadura interna, entre uma amostragem e outra, realizadas na mesma fileira.

#### **5.10.1.2 Determinação da área foliar fotossinteticamente ativa (m<sup>2</sup> ha<sup>-1</sup>)**

Antes da secagem, as folhas passaram pelo integrador de área foliar, modelo LI 3100 da LI-COR, para determinação da área foliar fotossinteticamente ativa.

#### **5.10.1.3 Determinações da altura e diâmetro do colmo das plantas (cm)**

A determinação da altura média da planta foi realizada com régua graduada de madeira e compreendeu a distância entre a região da superfície do solo e a inserção da folha +1, aos 20, 40 e 60 DAE. Simultaneamente foi determinado o diâmetro de colmo, aos 20, 40, 60, 80 e 100 DAE. Considerou-se o diâmetro do segundo internódio, a partir do colo da planta com uso de paquímetro. Todas avaliações foram feitas sempre nas mesmas dez plantas contíguas na linha de semeadura, representativas da área útil de cada parcela.

#### **5.10.2 Avaliações morfológicas das espigas**

Aos 115 DAE, quando o ponto de colheita foi antigido, os grãos com 23% de água foram colhidas amostras de 10 espigas de plantas presentes na área útil da parcela, para determinações de:

##### **5.10.2.1 Massa de matéria seca da espiga (g)**

Para determinação da massa da matéria seca, as espigas amostradas foram trituradas. Foi realizada uma subamostragem da biomassa. A seguir, o material vegetal subamostrado e seco em estufa com aeração forçada a 65°C até atingir massa constante.

#### **5.10.2.2 Comprimento da espiga (cm)**

O comprimento médio (cm) de espiga, determinado através de medidas da base até o ápice da espiga com régua graduada.

#### **5.10.2.3 Diâmetro da espiga (cm)**

O diâmetro médio (cm) de espiga foi obtido no ponto correspondente ao centro da espiga com o uso de paquímetro.

#### **5.10.2.4 Número de fileira de grãos**

O número médio de fileiras de grãos da espiga foi determinado, considerando-se as mesmas espigas utilizadas nas determinações do comprimento e diâmetro médio de espiga e sabugo.

#### **5.10.2.5 Diâmetro do sabugo (cm)**

O diâmetro médio (cm) de sabugo foi determinado no terço médio com o uso de paquímetro.

#### **5.11 Determinação da produtividade de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ )**

A produtividade de grãos foi obtida a partir da debulha e pesagem dos grãos oriundos de espigas colhidas de vinte plantas contíguas na área útil das parcelas, sendo os dados extrapolados para área de um hectare e corrigidos para 13% de teor de água, com base nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

#### **5.12 Massa de mil grãos (g)**

A massa de mil grãos foi determinada com base em Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Análises de variância dos componentes da planta

Nas tabelas 3, 4, 5, 6 e 7 são dispostos os resultados da análise de variância (teste F) dos dados de avaliações de características das plantas de milho em função das aplicações de inoculante as sementes e fertilizante nitrogenado.

Foi detectada, em todas as avaliações realizadas, ausência de efeitos decorrentes da aplicação do inoculante com *Azospirillum brasilense* às sementes de milho. E da interação *inoculante x doses* de nitrogênio. Apenas efeito isolado de doses de nitrogênio foi constatado pela análise estatística.

Embora estudos relatem respostas positivas da inoculação de *Azospirillum* sobre o crescimento das plantas (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994; SALAMONE; DÖBEREINER, 1996; OKON; VANDERLEYDEN, 1997; MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006), a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum* não resultou, em efeitos qualquer das características avaliadas.

Ausência de respostas à inoculação de sementes de milho com *Azospirillum* também são encontradas na literatura, com os de Roberto et al. e Verona et al. (2010) em pesquisas com doses de solução contendo bactéria *Azospirillum*.

Esses resultados também confirmam as pesquisas de Campos et al. (1999; 2000) que, trabalhando com a inoculação de *Azospirillum* em vários estádios das

culturas de trigo, de aveia e de milho não encontraram respostas agronômicas favoráveis à associação em nenhum dos parâmetros avaliados.

Os fatores que interferem nas respostas das culturas a inoculação de *Azospirillum* ainda não estão totalmente esclarecidos. Para Okon e Labandera-González (1994), os resultados de sucesso encontrados na literatura da associação planta-*Azospirillum* estão relacionados, na maioria das vezes, a fatores da própria bactéria, como a escolha da estirpe, o número ideal de células por sementes e sua viabilidade.

Arsac et al. (1990) chamaram a atenção para a concentração da bactéria na solução do inoculante, como mais importante que a dose do mesmo utilizada. Para os autores, a concentração bacteriana ótima que promove o crescimento de plantas de milho é de 10 milhões de células viáveis mL<sup>-1</sup>, ou seja, aproximadamente 17 mil unidades formadoras de colônia semente<sup>-1</sup>. Níveis acima do ótimo apresentam efeito inibitório ao crescimento das plantas inoculadas, enquanto concentrações baixas simplesmente não têm efeito algum na fase vegetativa.

Porém, o produto comercial utilizado nesse estudo contém estirpes da bactéria *A. brasilense* em concentração mínima de 200 milhões de células viáveis mL<sup>-1</sup>, conforme preconizado pela legislação brasileira (HUNGRIA, 2011). Considerando a dose utilizada neste experimento de 100 mL ha<sup>-1</sup>, a concentração bacteriana teórica foi de aproximadamente, 340 mil unidades formadoras de colônia semente<sup>-1</sup>, bem superior, portanto, no mencionado por Arsac et al. (1990). Conforme Fages (1994) e Puente et al. (2009), a ausência da resposta a inoculação pode estar relacionada ao excesso de unidades formadoras de colônia.

A contribuição da fixação biológica, pode-se dizer que a transferência do N fixado para a planta ocorre muito lentamente. Apenas uma pequena parte torna-se disponível para o vegetal e as bactérias não secretam altas quantidades de amônia durante o crescimento diazotrófico. Com isso, a capacidade das bactérias em produzir substâncias promotoras de crescimento ou promover aumento da taxa de absorção de minerais pelas raízes tem sido levado em consideração (LAMBRECHT et al., 2000; CASSAN et al., 2001).

Outro fator seria um decréscimo na proporção de diazotróficos no solo em virtude de uma supressão competitiva dos microorganismos heterotróficos na presença de formas combinadas de N. O fertilizante nitrogenado alteraria o estado da planta e influenciaria

a associação com os microorganismos. Além da diminuição da população de bactérias diazotróficas, Muthukumarasamy et al., (1999) e Bergamaschi (2006) verificaram que a diversidade destas bactérias também pode ser comprometida pela adição de adubos nitrogenados ao solo.

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

Diante do exposto, a colonização de plantas de milho por *Azospirillum brasiliense* pode ter sido afetada por muitos fatores bióticos e abióticos, sendo que a inoculação com estas bactérias não produziu efeitos significativos no crescimento e produtividade das plantas de milho.

O efeito de interação entre *Azospirillum* e doses de N nos caracteres vegetativos avaliados. A cultura do milho demanda grande quantidade de N, e tem resposta à adubação nitrogenada, esse fato aliado à ausência de reação dos microorganismos diazotróficos com as plantas de milho não é um sistema natural muito eficiente de aporte de N. Os resultados obtidos em diversas pesquisas já citados mostram que a resposta à inoculação é bastante variável e dependente de vários fatores.

Os acúmulos de matéria seca da área foliar fotossinteticamente ativa e do colmo das plantas de milho foram influenciados pelos aumentos das doses de N em todas as épocas de avaliação (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3.** Análise de variância para acúmulo de matéria seca da área foliar fotossinteticamente ativa de planta de milho submetidas ao uso de bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense*, inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).

	GL	QM				
		20	40	60	80	100
Inoculante (I)	1	154,8008 ns	223,9000 ns	52018,2 ns	43048,9 ns	33603,7 ns
Doses de N (DN)	5	520,5595 *	138084,1 **	607140,4 *	1080322,7 **	922792,8 **
I x DN	5	39,5775 ns	7540,6 ns	54399,9 ns	6676,8 ns	5682,7 ns
CV%	---	8,11	13,35	15,65	5,79	12,37

\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste f

\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste f

<sup>ns</sup>Não significativo

**Tabela 4.** Análise de variância para acúmulo de matéria seca do colmo de planta de milho submetidas ao uso de bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense*, inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).

	GL	QM				
		20	40	60	80	100
Inoculante (I)	1	42,1125 ns	20,9220 ns	1694215,4 ns	89567,42 ns	10853820,1 ns
Doses de N (DN)	5	2871,5241 **	276236,9 **	3483654,0 *	16615662,2 **	48948872,4 **
I x DN	5	9,1557 ns	13533,1 ns	258764,0 ns	2484473,8 ns	824501,9 ns
CV%	---	12,55	8,02	16,47	16,97	10,95

\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste f

\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste f

<sup>ns</sup>Não significativo

A área foliar apresentou desenvolvimento diferenciado em função do aumento das doses de nitrogênio a partir dos 40 DAE (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise de variância para área foliar de planta de milho submetidas ao uso de bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense*, inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).

	GL	QM				
		20	40	60	80	100
Inoculante ( I )	1	2,075 ns	5,420 ns	473,000 ns	25,317 ns	627,347 ns
Doses de N (DN)	5	2,697 ns	407,874 **	3576,563 **	1634,796 **	2116,833 **
I x DN	5	0,978 ns	40,790 ns	206,701 ns	413,118 ns	115,900 ns
CV%	---	14,54	6,52	8,27	9,82	19,87

\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste f

\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste f

<sup>ns</sup>Não significativo

A altura das plantas foi influenciada pelas doses de nitrogênio nas três épocas avaliadas (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise de variância para altura de planta de milho submetidas ao uso de bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense*, inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio em três épocas de avaliação, 20, 40 e 60 dias após a emergência (DAE).

	GL	QM		
		20	40	60
Inoculante ( I )	1	0,021 ns	3,521 ns	23,942 ns
Doses de N (DN)	5	7,641 **	451,449 **	601,237 **
I x DN	5	0,555 ns	12,178 ns	37,591 ns
CV%	---	8,23	8,21	2,76

\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste f

\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste f

<sup>ns</sup>Não significativo

O diâmetro do colmo foi influenciado pela aplicação crescente de doses de N (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise de variância para diâmetro do colmo de planta de milho submetida ao uso de bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense*, inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).

	GL	QM				
		20	40	60	80	100
Inoculante ( I )	1	0,0033 ns	0,0052 ns	0,0052 ns	0,0133 ns	0,0113 ns
Doses de N (DN)	5	0,0554 *	0,0462 **	0,0437 *	0,0875 **	0,1235 **
I x DN	5	0,0168 ns	0,0132 ns	0,0047 ns	0,0118 ns	0,003 ns
CV%	---	8,85	5,76	5,00	5,79	4,25

\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste f

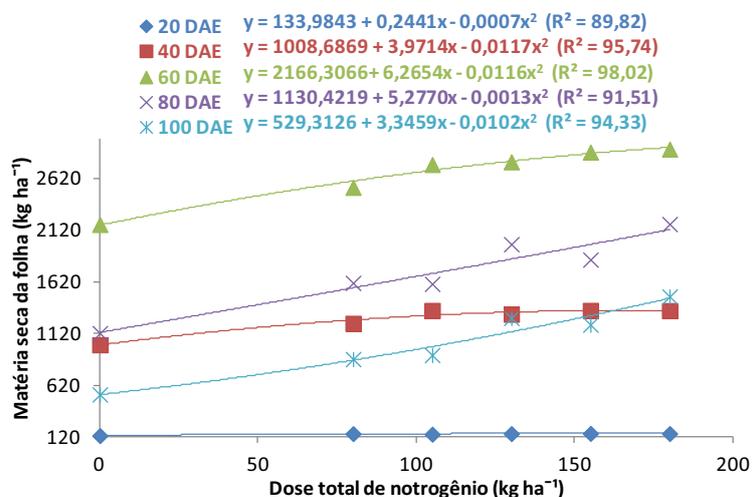
\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste f

<sup>ns</sup>Não significativo

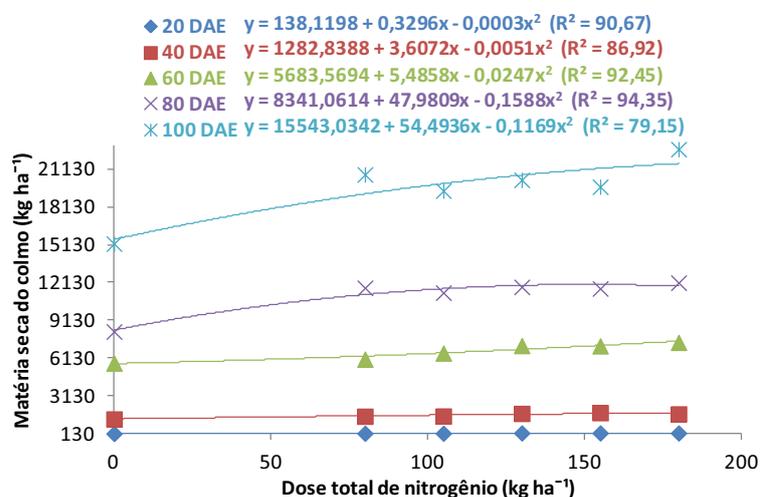
## 6.2 Análises de regressão e correlações de *Pearson* dos componentes da planta

Nas figuras 2, 3, 4, 5, 6 e tabelas 8, 9, 10, 11 e 12 são apresentadas as equações de regressão e os coeficientes de correlação de *Pearson* respectivamente da: massa de matéria seca da área foliar fotossinteticamente ativa, massa de matéria seca do colmo, área foliar fotossinteticamente ativa, altura de planta e diâmetro do colmo de milho, em 5 épocas de avaliação, conforme as doses de N aplicadas.

Em todas as épocas de avaliação, foram observados efeitos quadráticos nas massas de matéria seca da folha (MMSF) e massas de matéria seca do colmo (MMSC) das plantas de milho com elevação das doses de nitrogênio (Figuras 2 e 3).



**Figura 2.** Análise de regressão para matéria seca da folha de planta de milho submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>1</sup> em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).



**Figura 3.** Análise de regressão para matéria seca do colmo de planta de milho submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>1</sup> em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).

Os resultados obtidos corroboram outros publicados, que reportam-se a respostas positivas relacionadas ao acúmulo de massa de matéria seca pelas plantas em função da aplicação de doses de N (AMADO; MIELNICZUK; AITA, 2002; ARAÚJO; FERREIRA; CRUZ, 2004; GOMES et al. 2007).

Esse estudo junto com outros disponíveis na literatura evidencia a estreita relação do crescimento das plantas de milho com o suprimento de N. O processo de crescimento do vegetal depende do N para realização da síntese de proteína, absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular, proporcionando uma vegetação verde e abundante, com aumento da folhagem e rápido crescimento (MALAVOLTA, 2006; OKUMURA et al. 2011).

O maior crescimento da planta, representado por um bom desenvolvimento de colmo e folhas, influenciou positivamente o desenvolvimento dos componentes de espiga aqui estudados (Tabela 8 e 9).

**Tabela 8.** Correlações simples de *Pearson* para acúmulo de matéria seca do colmo da planta aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE) *versus* componentes da espiga, M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita.

		Dias após a emergência				
		20	40	60	80	100
M.S.C	X M.S.E	0,685 **	0,716 **	0,410 *	0,618 **	0,580 **
	Ø sabugo	0,761 **	0,755 **	0,592 **	0,538 **	0,478 *
	Ø espiga	0,777 **	0,808 **	0,664 **	0,608 **	0,558 **
	C.E	0,637 **	0,797 **	0,527 **	0,591 **	0,624 **
	N.F	0,237 ns	0,302 ns	0,023 ns	-0,069 ns	0,041 ns
	M.M.S	0,771 **	0,817 **	0,596 **	0,659 **	0,523 **
	Produtividade	0,717 **	0,795 **	0,655 **	0,635 **	0,581 **

\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro

\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro

<sup>ns</sup>Não significativo

**Tabela 9.** Correlações simples de *Pearson* para acúmulo de matéria seca da folha de planta aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE) *versus* componentes da espiga, M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita.

		Dias após a emergência				
		20	40	60	80	100
M.S.F X	M.S.E	0,586 **	0,560 **	0,644 **	0,688 **	0,698 **
	Ø sabugo	0,410 *	0,387 ns	0,614 **	0,682 **	0,691 **
	Ø espiga	0,369 ns	0,339 ns	0,548 **	0,682 **	0,751 **
	C.E	0,563 **	0,552 **	0,624 **	0,738 **	0,748 **
	N.F	-0,007 ns	-0,029 ns	0,065 ns	0,103 ns	0,054 ns
	M.M.S	0,437 *	0,414 *	0,551 **	0,704 **	0,773 **
	Produtividade	0,369 ns	0,348 ns	0,456 *	0,655 **	0,721 **

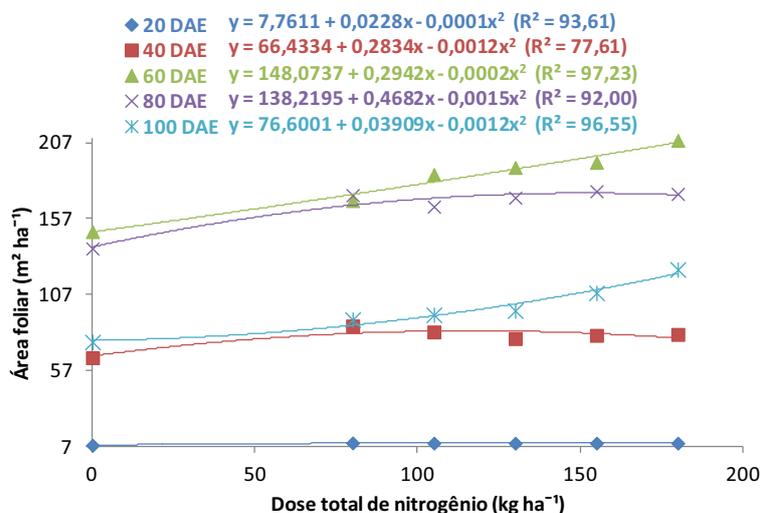
\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro

\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro

<sup>ns</sup>Não significativo

A planta necessita apresentar boa capacidade de assimilar CO<sub>2</sub> e sintetizar carboidratos durante a fotossíntese. Considera-se como importante característica condicionadora de produção, a extensão da área foliar que permanece fisiologicamente ativa após a emergência das espigas (FANCELLI; NETO, 2000).

Para a área foliar fotossinteticamente ativa, foi observando-se efeitos quadráticos em todas as épocas de avaliação para doses de N superiores de 105 kg ha<sup>-1</sup> (Figuras 4). Os maiores valores de área foliar foram registrados aos 60 DAE (florescimento), diminuindo a partir dessa fase, independente do tratamento.



**Figura 4.** Análise de regressão para área foliar de planta de milho submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>-1</sup> em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).

O aumento do teor de N disponibilizado às plantas proporciona maior crescimento e aumento da área foliar. Além de ser constituinte dos aminoácidos livres e proteicos, o N está presente em outros compostos importantes, como as bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas) e os ácidos nucleicos (DNA e RNA), fundamentais à divisão celular e, portanto, à formação e ao crescimento da parte aérea das plantas (MENGEL; KIRKBY, 2001).

A escassez de nitrogênio afeta diretamente o crescimento da planta e, conseqüentemente, sua área foliar, comprometendo assim, sua capacidade fotossintética. Além disso, a deficiência de N pode acelerar a senescência foliar, devido ao retranslocamento de nitrogênio das folhas mais velhas para os pontos de crescimento, diminuindo a área foliar fotossinteticamente ativa (WOLSCHICK, 2003). Segundo Fancelli e Dourado Neto (2000), a aceleração da senescência foliar em plantas de milho, próximo ao florescimento, promove significativa queda no rendimento da cultura, principalmente pela redução do comprimento e diâmetro das espigas, peso de espigas e de grãos.

Folhas bem nutridas em N tem maior capacidade de assimilar CO<sub>2</sub> e sintetizar carboidratos durante a fotossíntese, resultando em maior crescimento e duração da

área foliar (CASTRO et al., 2008). Na fase de grão leitoso a planta necessita apresentar teores de sólidos solúveis prontamente disponíveis, objetivando a evolução do processo de formação de grãos, assim, a fotossíntese mostra-se imprescindível. Em termos gerais, considera-se como importante característica condicionadora de produção, a extensão da área foliar que permanece fisiologicamente ativa após a emergência das espigas (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

**Tabela 10.** Correlações simples de *Pearson* para área foliar da planta aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE) *versus* componentes da espiga, M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita.

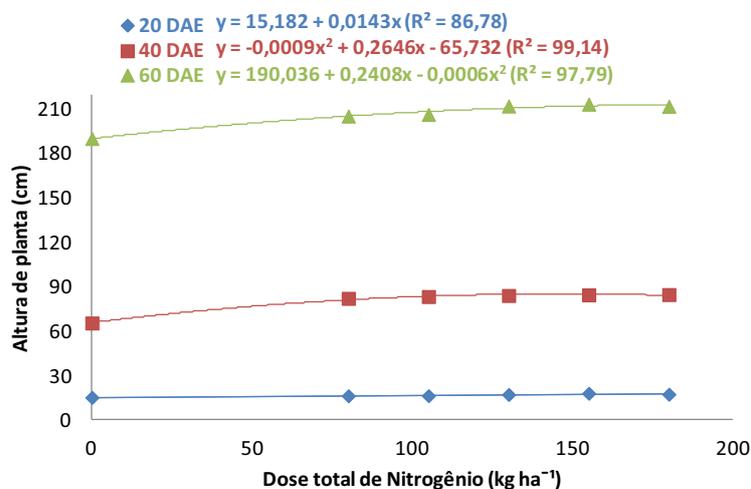
		Dias após a emergência				
		20	40	60	80	100
Área foliar	X M.S.E	0,497 *	0,426 *	0,707 **	0,742 **	0,699 **
	Ø sabugo	0,326 ns	0,145 ns	0,742 **	0,578 **	0,652 **
	Ø espiga	0,398 ns	0,379 ns	0,759 **	0,641 **	0,684 **
	C.E	0,372 ns	0,399 ns	0,776 **	0,697 **	0,693 **
	N.F	0,460 ns	-0,115 ns	0,226 ns	0,037 ns	0,193 ns
	M.M.S	0,349 ns	0,384 ns	0,747 **	0,673 **	0,594 **
	Produtividade	0,270 ns	0,417 *	0,749 **	0,688 **	0,553 **

\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro

\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro

<sup>ns</sup>Não significativo

O crescimento da área foliar fotossinteticamente ativa aos 20 dias após a emergência (DAE) o foi linear, acompanhando o aumento da dose de nitrogênio (N). Nas demais épocas foram observados efeitos quadráticos, a partir dos 40 DAE o crescimento em altura continuou sendo maior nas plantas adubadas com nitrogênio (N), no entanto, aumentos da dose de N não resultaram a maior altura de planta aos 60 DAE (Figura 5).



**Figura 5.** Análise de regressão para altura de planta de milho submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>1</sup> em três épocas de avaliação, 20, 40 e 60 dias após a emergência (DAE).

Segundo Castro et al. (2008), a altura de planta é influenciada pela disponibilidade de nitrogênio no solo, uma vez que este nutriente participa diretamente na divisão e expansão celular e no processo fotossintético. Isso evidencia que plantas nutridas adequadamente com N podem ter maior desenvolvimento vegetativo. Porém, para Silva et al. (2003) o efeito do aumento da dose de N na altura de plantas de milho é visível somente até determinada fase de crescimento pois, com o paulatino o auto-sombreamento das plantas, assim como o sombreamento mútuo entre plantas, deve contribuir para a redução do crescimento até que a altura máxima seja atingida quando do florescimento.

Diversos são os trabalhos na literatura que corroboram com os resultados aqui apresentados. Sousa et al. (2002), também observaram alturas menores de plantas quando o N esteve ausente nos tratamentos. Vilella (2001) registrou maior altura de plantas quando aplicado 180 kg ha<sup>-1</sup> de N. Silva et al. (2003), estudando os efeitos da aplicação de doses de nitrogênio na cultura do milho, constataram resposta positiva na altura de plantas com elevação das doses de nitrogênio. No estudo de Wolschick et al. (2003), a partir dos 44 DAE até o final do estágio vegetativo das plantas, não foram observadas diferenças na altura das plantas entre os tratamentos que receberam adubação nitrogenada e

somente as plantas do tratamento sem N apresentaram altura das plantas estatisticamente inferiores.

No presente estudo, a maior disponibilidade de N promoveu o maior crescimento em altura das plantas de milho. O aumento da altura das plantas em todas as épocas avaliadas correlacionou-se positivamente (Tabela 11) com os parâmetros avaliados da espiga, com exceção ao número de fileiras de grãos.

**Tabela 11.** Correlações simples de *Pearson* para altura de planta aos 20, 40 e 60 dias após a emergência (DAE) *versus* componentes da espiga, M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita.

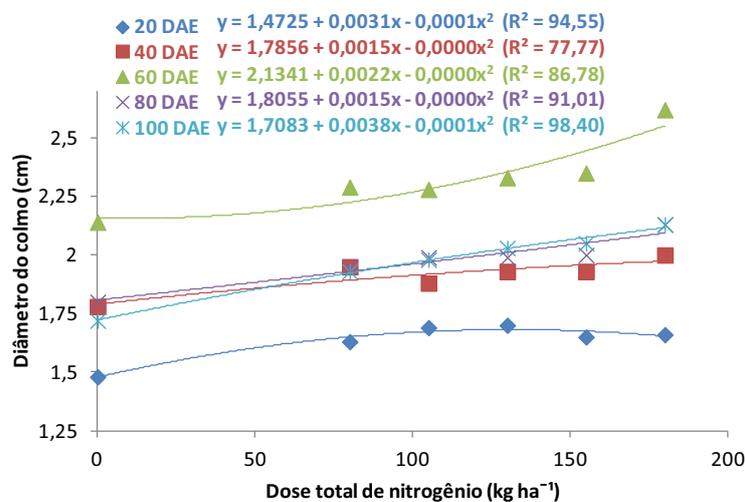
		Dias após a emergência			
		20	40	60	
<b>Altura</b>	X	M.S.E	0,545 **	0,708 **	0,799 **
		Ø sabugo	0,575 **	0,529 **	0,707 **
		Ø espiga	0,494 *	0,577 **	0,703 **
		C.E	0,552 **	0,647 **	0,809 **
		N.F	0,334 ns	0,129 ns	0,274 ns
		M.M.S	0,703 **	0,760 **	0,856 **
		Produtividade	0,606 **	0,691 **	0,789 **

\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro

\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro

<sup>ns</sup>Não significativo

Para doses de N superior a 80 kg ha<sup>-1</sup> o efeito sobre o diâmetro do colmo foi pouco significativo, em todas épocas de avaliação, sendo este efeito melhor representado por equações quadráticas (Figura 6).



**Figura 6.** Equações da análise de regressão para diâmetro do colmo de planta de milho submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>1</sup> em cinco épocas de avaliação, 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE).

O aumento na dose de N produziu incrementos significativos no diâmetro do colmo. Por sua vez, o diâmetro de colmo apresentou correlações positivas na maioria dos componentes da espiga, com exceção para o número de fileiras (Tabela 12).

**Tabela 12.** Correlações simples de *Pearson* para diâmetro do colmo da planta aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência (DAE) *versus* componentes da espiga, M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita.

		Dias após a emergência				
		20	40	60	80	100
Ø colmo X	M.S.E	0,491 *	0,467 *	0,604 **	0,720 **	0,736 **
	Ø sabugo	0,411 *	0,333 ns	0,542 **	0,487 *	0,614 **
	Ø espiga	0,309 ns	0,340 ns	0,442 *	0,684 **	0,764 **
	C.E	0,520 **	0,420 *	0,590 **	0,644 **	0,721 **
	N.F	0,261 ns	0,043 ns	0,015 ns	0,048 ns	-0,034 ns
	M.M.S	0,628 **	0,574 **	0,537 **	0,641 **	0,767 **
	Produtividade	0,533 **	0,547 **	0,496 *	0,718 **	0,725 **

\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro

\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro

<sup>ns</sup>Não significativo

### 6.3 Análises de variância, regressão e correlação de *Pearson* dos componentes da espiga.

Na tabela 13 são dispostos os resultados da análise de variância (teste F) dos dados de avaliações de características das espigas, da massa de mil sementes e da produtividade de milho em função das aplicações de inoculante as sementes e fertilizante nitrogenado. Assim como verificado para características das plantas, foi constatado pela análise estatística efeito isolado, de doses de nitrogênio.

**Tabela 13.** Análise de variância para acúmulo dos componentes da espiga de planta de milho, M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita, submetidas ao uso de bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense*, inoculadas via sementes em combinação com doses de nitrogênio.

	GL	QM						
		MS - Espiga	C.E	Ø espiga	Nº de fileira	Ø sabugo	M.M.S	Produtividade
Inoculante ( I )	1	570,4923 ns	1,5408 ns	0,0675 ns	0,0033 ns	0,0033 ns	7,3164 ns	372691,2 ns
Doses de N (DN)	5	1955,8389 **	8,0160 **	0,5665 **	0,2113 ns	0,2248 **	3874,6 **	18761298,1 **
I x DN	5	340,8073 ns	0,5278 ns	0,0240 ns	0,1093 ns	0,1133 ns	93,8 ns	311182,3 ns
CV%	---	7,22	5,20	2,91	4,20	4,37	9,47	9,62

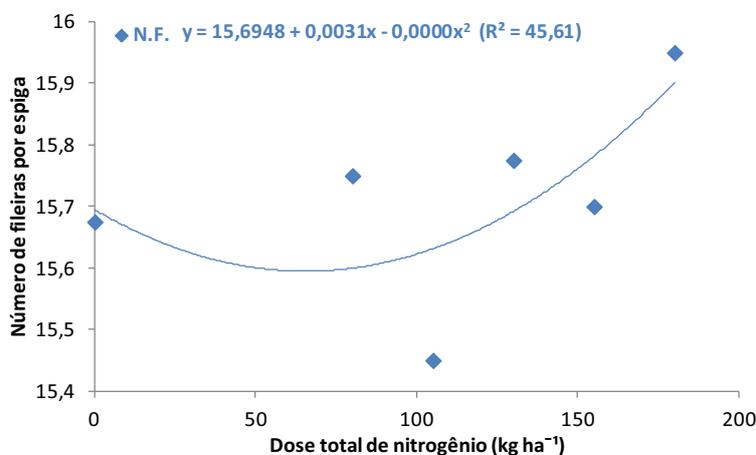
\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste f

\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste f

<sup>ns</sup>Não significativo

Segundo Hanway (1963), os componentes da espiga como diâmetro, comprimentos de sabugo e espiga, o número de fileiras e a massa de mil sementes são características que auxiliam na identificação de ocorrência de condições adversas ao bom desenvolvimento da planta, principalmente quando acontecem entre os estádios fenológicos de definição de diâmetro de sabugo e tamanho da espiga, e o período de florescimento, após a exteriorização do pendão e dos estigmas da espiga, associado a definição do número de grãos por espigas.

Com exceção do número de fileiras, todos os componentes da espiga avaliados respondem significativamente as doses de N aplicadas (Figura 7).



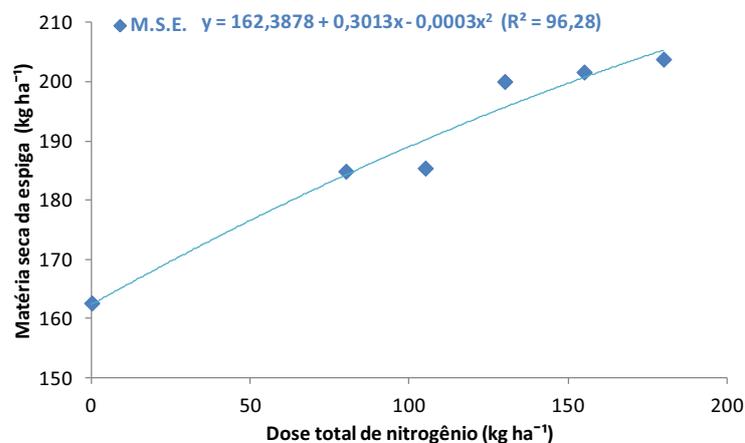
**Figura 7.** Análise de regressão da produtividade de grãos na colheita, submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>-1</sup>.

A não alteração do número de fileiras observada discorda dos resultados apresentados por Carmo et al. (2012) que obtiveram aumento linear significativo dessa característica, em resposta ao aumento das doses de N.

De acordo com Fancelli e Dourado-Neto (2000), o número de fileiras de grãos é definida no estágio V8, fase em que a disponibilidade de nutrientes, especialmente de N, é muito importante uma vez que nesta época é iniciada elevação da demanda desse nutriente pela planta.

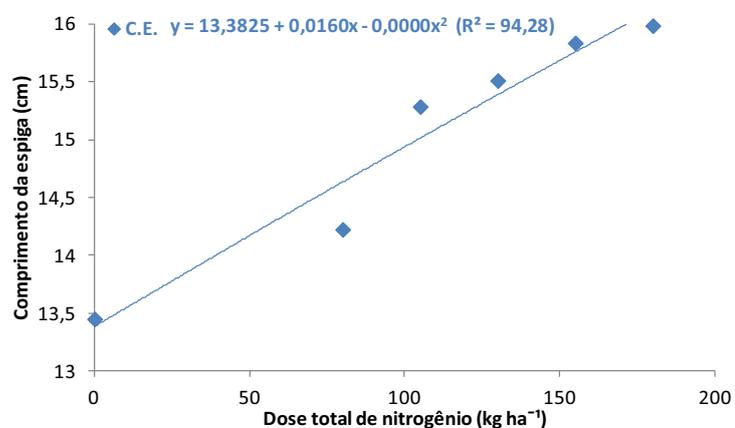
Por outro lado, Casagrande e Fornasieri Filho (2002) e Tomazela (2005) não verificaram efeito de doses crescentes de N no número de fileiras de grãos por espiga. Segundo estes autores, a ausência ou existência de registro de efeito na literatura, pode ser explicado pelas diferentes condições de solo e de ambiente nas diferentes áreas experimentais, além da grande variabilidade entre os híbridos disponíveis atualmente, quanto à característica estudada.

O aumento da massa da matéria seca das espigas com o aumento da disponibilidade de N (Figura 8), pode ser explicado pelos aumentos nos componentes de produção como observado para diâmetros de sabugo e espiga, comprimento de espiga e massa de mil grãos (Tabela 13). Os resultados encontrados foram semelhantes aos publicados por Silva et al., (2003).



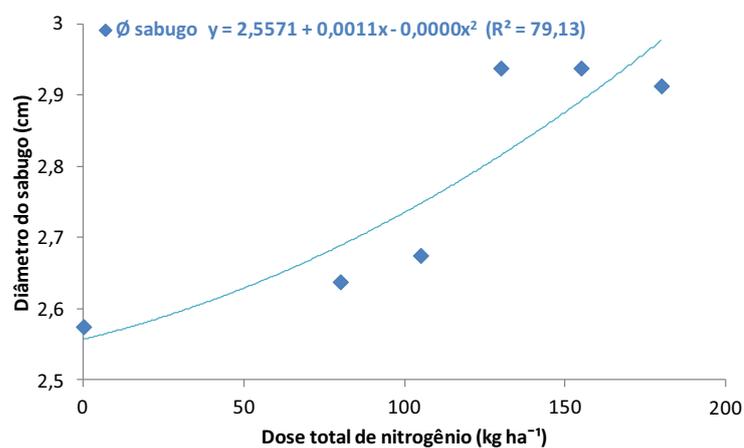
**Figura 8.** Análise de regressão da massa de matéria seca da espiga de plantas de milho, submetidas a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>-1</sup>

Ainda conforme Hanway (1963) a deficiência de nutrientes aos 20, 40, 60, 80 e 100 pode reduzir seriamente o tamanho das espigas a serem colhidas (Figura 9). Quando não limitado por outros fatores, a maior disponibilidade de N aumenta o potencial da planta em definir maior número e massa de sementes por espiga (HANWAY, 1963; MAGALHÃES et al., 1995; PÖTTKER; WIETHÖLTER, 2004).



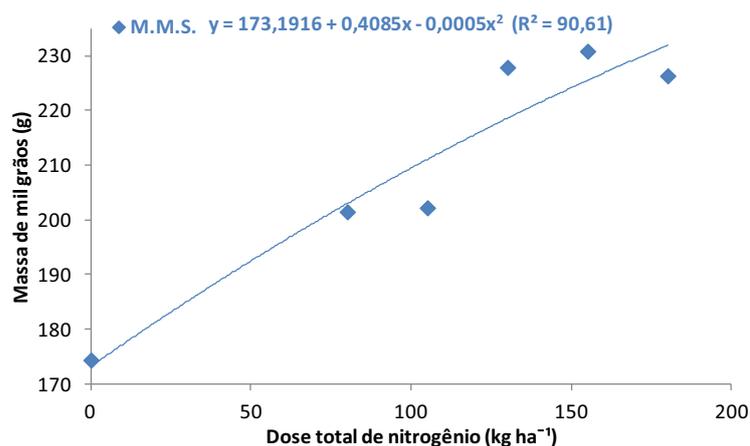
**Figura 9.** Análise de regressão do comprimento da espiga (cm) de plantas de milho, submetidas a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>-1</sup>.

Os valores de diâmetro de sabugo encontrados na Figura 10, discordam dos valores apresentados por Heinrichs et al. (2003), o qual não obteve aumento significativo no diâmetro de sabugo de milho, em resposta ao aumento das doses de N.

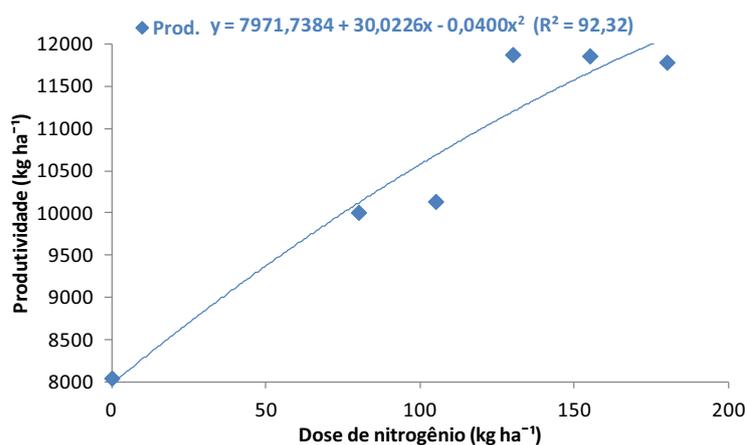


**Figura 10.** Análise de regressão do comprimento da espiga (cm) de plantas de milho, submetidas a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>-1</sup>.

Nas figuras 11, e 12 são dispostos as equações de regressão de características da espiga da massa de mil sementes e da produtividade de plantas de milho, como consequência das doses de N aplicadas. Foi constatado ajuste quadrático com valores elevados de  $r^2$ , quanto ao número de fileiras de grãos (Figura 7).



**Figura 11.** Análise de regressão da massa de mil grãos de plantas de milho, submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>-1</sup>.



**Figura 12.** Análise de regressão da produtividade de grãos na colheita, submetida a seis doses de nitrogênio, zero, 180, 155, 130, 105 e 80 kg ha<sup>-1</sup>.

Para a massa de mil sementes e produtividade de grãos, as respostas à adubação nitrogenada na literatura são variadas. Oliveira e Caires (2003) verificaram aumento linear da massa de mil sementes em função do aumento das doses de N e que tal componente de produção foi decisivo para aumentar a produtividade de grãos. Já Casagrande e Fornasieri Filho (2002) não constataram efeito de doses e de épocas de aplicação de N na massa de mil sementes. Escosteguy et al. (1997) comparando diferentes doses de N, que variaram de 0 a 160 kg ha<sup>-1</sup>, também não obtiveram diferenças significativas em relação a esta característica.

Segundo Cruz et al., (2008) os componentes da espiga além de influenciarem na massa da matéria seca das espigas, também influem de forma substancial a produtividade de grãos. Essa correlação foi observada no presente estudo (Tabela 14). Com exceção do número de fileiras por espiga, todos os demais componentes avaliados apresentaram correlação positiva com a produtividade. A massa de mil grãos (M.M.S) e massa seca da espiga (M.M.E) foram os componentes que tiveram a maior correlação (0,930), seguido do diâmetro da espiga (0,818).

**Tabela 14.** Correlações simples de *Pearson* para produtividade *versus* componentes da espiga, M.S.E.: matéria seca da espiga, Ø sabugo: diâmetro do sabugo, Ø espiga: diâmetro da espiga, C.E.: comprimento da espiga, N.F.: número de fileiras de grãos, M.M.S.: massa de mil grãos e produtividade na colheita.

Produtividade	X	Componentes da espiga					
		M.S.E	Ø sabugo	Ø espiga	C.E	N.F	M.M.S
		0,930 **	0,679 **	0,818 **	0,779 **	0,212 ns	0,930 **

\*Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro

\*\*Significativo a nível de 1% de probabilidade de erro

<sup>ns</sup>Não significativo

A massa de mil sementes é influenciada pela taxa de enchimento e pelo tempo de acúmulo de massa seca (WANG et al., 1959; RICHARDS, 2000).

Outras pesquisas avaliando produtividade de milho com diferentes doses de N resultaram em produtividades de grãos aumentadas conforme foram elevadas as doses de N. No ensaio de Araújo et al. (2004) a dose de 240 kg ha<sup>-1</sup> de N proporcionou um aumento de 28% na produtividade de grãos, quando comparada ao tratamento testemunha que recebeu a

dose zero kg ha<sup>-1</sup> de N. Amaral Filho et al. (2005) verificaram que o aumento nas doses de nitrogênio de zero kg ha<sup>-1</sup> para 150 kg ha<sup>-1</sup> proporcionou maior massa de mil grãos e com efeitos positivos na produtividade de grãos.

## 7 CONCLUSÕES

A aplicação da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* via solução nas sementes acompanhada ou não de doses de nitrogênio sintético, não interfere no desenvolvimento de plantas e produtividade da cultura do milho.

A inoculação da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* não interfere na expressão dos efeitos da adubação com nitrogênio sintético na cultura do milho.

## 8 REFERÊNCIAS

ALVES, B.R.J.; DODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant and Soil*, The Hague, v.252, p.1-9, 2003.

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

AMARAL FILHO, J. P. R.; FORNASIERI FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J. C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, v. 29, n. 3, p. 467-473, 2005.

ARAÚJO, S.C. Realidade e perspectivas para o uso de *Azospirillum* na cultura do milho. *Informações Agrônomicas*, Piracicaba, n.122, p.4-6, 2008.

ARAÚJO, L.A.N.; FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P. Adubação nitrogenada na cultura do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n.8, p.771-777, 2004.

ARSAC, J.F. et al. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie*, Paris, v. 10, p.640-654, 1990.

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, p.1-13, 2011.

AZEVEDO, P.T.M. Minhocas, fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em mudas de Araucária angustifolia 2010. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba. 2010.

BALDANI, J.I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, v.29, p.911-922, 1997.

BALDANI, J.I. et al. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433p.

BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.49-59.

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

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

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

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

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

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

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

BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

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

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

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

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

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, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.375-470.

CARMO, M.S; Cruz, S.C.S; SOUZA, E.J; CAMPOS, L.F.C; MACHADO, C.G. doses e fontes de nitrogênio no desenvolvimento e produtividade da cultura de milho doce (*Zea mays* convar. *saccharata* var. *rugosa*). Biosci. J., Uberlândia, v. 28, Supplement 1, p. 223-231, 2012.

CARVALHO, W. A.; ESPÍNDOLA, C. R.; PACCOLA, A. Levantamento de solos da Fazenda Experimental Lageado – Estação Experimental “Presidente Médici”. Bol. Fac. Cienc. Agron., UNESP, Botucatu, n. 1, p. 1-94, 1983.

CASAGRANDE, J. R. R.; FORNASIERI FILHO, D. Adubação nitrogenada na cultura do milho safrinha. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.37, n.1, p.33-40, 2002.

CASSAN, F. et al. *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA<sub>20</sub> and metabolize the resultant aglycones to GA<sub>1</sub> in seedlings of Rice dwarf mutants. Plant Physiology. Washington. v.125, n.4, p.2053-2058, 2001.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos. 1ª Ed. Editora Agronômica Ceres, 2008. 864p.

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

COELHO, A.M. et al. Nutrição e adubação do milho. In: CRUZ, J.C. (eds.) Sistema de Produção. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010. Versão eletrônica. (Documentos EMBRAPA-CNPMS). Disponível em: <[http://www.xnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_6\\_edVferaduba.ntm](http://www.xnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_edVferaduba.ntm)>. Acesso em: 05 nov. 2012.

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

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

CRUZ, S. C. S.; PEREIRA, F. R. S.; SANTOS, J. R.; ALBUQUERQUE, A. W.; PEREIRA R. G. Adubação nitrogenada para o milho cultivado em sistema plantio direto, no Estado de Alagoas. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, v.12, n.1, p.62-68, 2008.

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

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

DIDONET. A.D. Resultados de pesquisa sobre inoculação de trigo, de cevada e de milho com bactérias do gênero *Azospirillum*. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT. 1998. 10p. (EMBRAPA-CNPT. Pesquisa em Andamento, 4).

DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, v.31, p.645-651, 1996.

- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in The rhizosphere. CRC Criticai Review in Plant Science. Boca Raton. v.22, p.107-149, 2003.
- DOMMELEN, VA. et al. (Methyl) ammonium transpait in the nitrogen-fixing bacterixim *Azospirillum brasiliense*. Journal of Bacteriology. Washington, v.180, p.2652-2659, 1998.
- ECKERT. B. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-erass Miscanthus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v.51, p. 17-26, 2001.
- ELMERICH. C: NEWTON, W.E; Associative and eudoplrytic nitrogen-fíxing bactéria and cyauobacterial associatiuous. Netherlands: Sprínger, 2007. 321p.
- EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: Embrapa, 1999. 412p.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Londrina: Editora Planta, 2006. 403p.
- ESCOSTEGUY, P.A.V.; RIZZARDI, M.A.; ARGENTA, G. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em duas épocas de semeadura. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.21, p.71-77, 1997.
- FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field expemments. In: OKON. Y. (eds.) *Azospiríuum Plant Associations*. Boca Raton: CRC Press. 1994. p.88-105.
- FALLIK, E.; OKON, Y. The response ofmaize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. World Journal of Microbiology and Biotechuology. Oxford. v.12, p.511-515, 1996.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. Produção de Milho. Ed. Agropecuária, Guaíba. 360 p., 2000.
- FULCHTERI. M.: FRIONI, L. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. Soil Biology and Biochemistry. Elmsford. v.26, p.921-923, 1994.
- GALLOWAY, J.N. et al. The nitrogen cascade. Bioscience. Washington, v.53, n.4, p.341-356, 2003.

GARCIA, J.C.; MATTOSO, M.J.; DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. Sete Lagoas, 2006. 12 p. (Circular Técnica. EMBRAPA, n. 74)

GOMES, R.F.; SILVA, A.G. da; ASSIS, R.X. de; PIRES, F.R. Efeito de doses e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agrônômicos da cultura do milho sobre plantio direto. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v. 31. n. 5. p. 931-938. 2007.

GRUZSKA, M. Índice relativo de clorofila para o diagnóstico do estado de nitrogênio em híbridos de milho. 2012. 103p. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal) – Universidade estadual de ponta grossa, Ponta Grossa. 2012.

HANWAY, J. J. Growth stages of corn (*Zea mays* L.). Agronomy Journal, Madison, v.55, n.5, p.487-491, 1963.

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

HEINRICH, R. et al. Doses de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. Revista Científica Eletrônica de Agronomia, Garça, n. 4, p. 1-5, 2003.

HUERGO, L.F. Regulação do metabolismo do nitrogênio em *Azospirillum brasilense*. 2006. Tese (Doutorado Pós-Graduação em Ciências Bioquímica) - Ciências Bioquímica, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2006. 170 p.

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

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2011. 38p. (Documentos EMBRAPA-SOJA, ISSN 2176-2937, n.325).

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

- INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Saint Paul. v.17. n.10. p.1078-1085. 2004.
- JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, Amsterdam, v.65, p.197-209, 2000.
- KENNEDY, I.R.; ISLAM, N. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. Melbourne, v.41, n.3, p.447-457, 2001.
- KHAMMAS, K.M. et al. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology*. Paris, v.140, n.9, p.679-693, 1989.
- KIM, J.; REES, D.C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, Washington, v.33, n.2, p.389-398, 1994.
- LAMBRECHT, M. et al. índole 3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology*. Cambridge. v.8, n.7, p.298-300, 2000.
- LIN, S.Y. et al. *Azospirillum formosense* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from agricultural soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Publicado online em 8 jul. 2011.
- McSHAFFREY, D. *Environmental Biology: ecosystems. The nitrogen cycle*, 2006. Disponível em: <<http://www.marietta.edu/~biol/102/ecosystem.html>>. Acesso em: 02 nov. 2012.
- MAGALHÃES, F.M. et al. A new acidtolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. Rio de Janeiro, v.55, p.417-430, 1983.
- MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; PAIVA, E. *Fisiologia da planta de milho*. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1994. 27p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 20).
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F.O.M. & PAIVA, E. *Fisiologia da planta de milho*. Sete Lagoas, EMBRAPA-CNPMS, 1995. 27 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 20).
- MALAVOLTA, E. *Manual de nutrição mineral de plantas*. Piracicaba: Editora Ceres, 2006. 631p.

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

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

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonasputida*, *Ghiconacetobacter azotocaptans*. and *Azospirillum lipoferum* on com plant growth iinder greenhouse conditions. *Microbial Ecology*. New York. v.51, n.3, p.326-335, 2006.

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

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

MENGEL, K.; KIRKBY, E. Principles of plant nutrition. 5.ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849p.

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

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G. & LAKSHMINARASIMAHAN, C. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugar cane varieties. *Biol. Fertil. Soil*, 29:157-164, 1999.

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

OLIVEIRA, J.M.S.; CAIRES, E.F. Adubação nitrogenada em cobertura para o milho cultivado após aveia preta no sistema plantio direto. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.25, p.351-357, 2003.

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

OKON, Y.; YANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News*, Ann Arbor, v.63, p.364-370, 1997.

OKUMURA R.S; MARIANO, D.C; ZACCHEO, PVC. Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia* v.4, n.2, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H. & QUAGGIO, J.A. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas, Instituto Agrônomo, 2001. 284p.

- RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.).  
Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2.ed. rev. e atual.  
Campinas: Instituto Agronômico/Fundação IAC, 1997. 285p. (Boletim Técnico, 100).
- REINHOLD, B. et al. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov, a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass {*Leptochloa fusca* (L) Kunth). International Journal of Systematic Bacteriology. Reading, v.37, p.43-51, 1987.
- REIS JÚNIOR, F.B. et al. Isolamento, caracterização e seleção de estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* associadas a diferentes variedades de milho cultivadas no Cerrado. Planaltina: EMBRAPA-CERRADOS, 2008a. 36p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento EMBRAPA-CERRADOS, ISSN 1676-918X, n.206).
- REIS JÚNIOR, F.B. et al. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.32, n.3, p.1139-1146, 2008b.
- REIS, V.M.; BALDINI, J.I; BALDINI, V.L.D; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm Trees. CRC Criticai Review in Plant Science. Boca Ratou, v.19, p.227-247, 2000.
- RICHARDS, R.A. Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. Journal of Experimental Botany, Oxford. v.51, p.447-458, 2000.
- ROBERTO, V.M.O.; SILVA, C.D.: LOBATO, P.N. Resposta da cultura do milho à aplicação de diferentes doses de inoculante {*Azospirillum brasilense*) 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.
- RONCATO-MACCARI, L.D.B. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. FEMS Microbiology Ecology, Amsterdam, v.45, n.1. p.39-47, 2003.
- SALAMONE, I.E.G.; DÒBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v.21, p.193-196, 1996.
- SANTOS, H.P; PEREIRA, L.R. Efeito de sistemas de sucessão de cultura de inverno sobre algumas características agrônômicas de milho em plantio direto. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.29, p.1691-1694, 1994.

SCHLOTTER, M. et al. Immunological studies of The wheat-root colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 using strain specific monoclonal antibodies. In:

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

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

SILVA, P. S. L.; OLIVEIRA, F. H. T.; SILVA, P. I. B. Efeitos da aplicação de doses de nitrogênio e densidades de plantio sobre os rendimentos de espigas verdes e de grãos de milho. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v. 21, n. 3, p. 452-455, 2003.

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

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

SOARES, M.A. Influência de nitrogênio, zinco e boro e de suas respectivas interações no desempenho da cultura de milho (*Zea Mays* L.). 2003. 92.f, Dissertação de mestrado Piracicaba USP-ESALQ, 2003.

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

SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. Adubação com nitrogênio. In: SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. Cerrado: correção do solo e adubação. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. p. 129-145.

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

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

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

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

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

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

TOMAZELA, A. L. Adubação nitrogenada e de micronutrientes na produtividade e incidência de doenças foliares em milho. Piracicaba: ESALQ/USP 2005. 58p. (Dissertação Mestrado)

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

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World corn production, consumption. and stocks. 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdRepoil.aspx?hidRepoilRetriCom+Production%2c+Consumption%+++++++&hidReportRetrievalI=59&evalTemplateID=7>>. Acesso em: 09 nov. 2012.

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

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

VILLELA, T. E. A. Época de semeadura e de corte de plantas de milho para silagem. 2001. 86 f. Tese (Mestrado) – UFLA, Lavras, MG.

WANG, G.; KANG, M. S.; MORENO, O. Genetic analyses of grain-filling rate and duration in maize. *Field Crops Research*, Amsterdam, v.61, p.211-222, 1999.

WOLSCHICK, D.; CARLESSO, R.; PETRY, M. T; JADOSKI, S. O. Adubação nitrogenada na cultura do milho no sistema plantio direto em ano com precipitação pluvial normal e com “El Niño”. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.27, p.461-468, 2003.

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

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