



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

POLIANA APARECIDA LEONEL ROSA

**ACÚMULO DE MATÉRIA SECA, EXTRAÇÃO E
EXPORTAÇÃO DE NUTRIENTES POR HÍBRIDOS DE
MILHO INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense***

Ilha Solteira
2017

POLIANA APARECIDA LEONEL ROSA

**ACÚMULO DE MATÉRIA SECA E EXTRAÇÃO DE
NUTRIENTES POR HÍBRIDOS DE MILHO INOCULADOS
COM *Azospirillum brasilense* NO CERRADO**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia, Unesp – Campus de Ilha
Solteira, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia – Especialidade: Sistemas de
Produção.**

**Prof. Dr. Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho
Orientador**

Ilha Solteira
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

R788a Rosa, Poliana Aparecida Leonel.
Acúmulo de matéria seca, extração e exportação de nutrientes por híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense* / Poliana Aparecida Leonel
Rosa. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2017
98 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia . Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2017

Orientador: Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho
Inclui bibliografia

1. Zea mays L.
2. Inoculação de bactérias promotoras de crescimento.
3. Marcha de absorção de nutrientes.
4. Exportação de nutrientes.
5. Produtividade de grãos.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ACÚMULO DE MATÉRIA SECA, EXTRAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE NUTRIENTES DE HÍBRIDOS DE MILHO INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense*

AUTORA: POLIANA APARECIDA LEONEL ROSA

ORIENTADOR: MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA, especialidade: SISTEMAS DE PRODUÇÃO pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. MARCELO ANDREOTTI
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. REGES HEINRICHS
Departamento de Agronomia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

Ilha Solteira, 15 de fevereiro de 2017

Dedico...

Àqueles pelos quais enfrento os obstáculos da vida sempre na esperança de vencer, e poder retribuir o que me deram com tanto esforço: meu avô Luiz, minha mãe Fátima e meu pai Pedro (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos e oportunidades que me tem concedido, e por me possibilitar mais esta conquista.

Ao Prof. Dr. Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho pela orientação, amizade, confiança, compreensão, entusiasmo, dedicação e pelos conhecimentos transmitidos nesse período, os quais quero levar por toda a vida.

À minha família: meu avô, minha mãe e meu pai pelo amor incondicional, conselhos e exemplos de vida que me foram dados, por todo incentivo e apoio nas dificuldades e conquistas do caminho.

À 39ª Turma de Agronomia e aos ingressantes de 2015 do PPGA da Unesp de Ilha Solteira, em especial aos amigos (as): Gabriela Tedeschi, Nayara Garcia, Mariele Penteado, Mayara Rodrigues, Jaqueline Carvalho, Ligia Videira, Yane Silva, Karina Sakurai, Giseli Lima, Flávia Meirelles, Murilo Sgobi, Willian Ferreira, Epitácio Souza, Tiago Calves, Priscila Casado, Ana Carolina Glória e Eva Liliane, pela amizade, auxílio, paciência, companheirismo, bons momentos vividos e experiências compartilhadas. E também aos colegas que não cito aqui, mas que também estimo, e levo o melhor de cada um comigo.

Aos amigos do Grupo de Oração Universitário Ângelus (GOU), pelos momentos de partilha, oração, confraternização e alegria.

Ao corpo docente pelos ensinamentos ministrados e fundamental contribuição em minha formação profissional, em especial aos professores Marlene Cristina, Carolina Bonini, Jacira Isepon, Marcelo Andreotti, Marco Eustáquio, Salatiér Buzetti, Edson Lazarini, Orivaldo Arf, Aparecida Boliani, Kátia Maltoni, João Andrade, João Luis Zocoler e Regina Castilho.

À banca examinadora pelas considerações e sugestões feitas ao trabalho.

Aos amigos da equipe de Nutrição de Plantas: Murilo Sgobi, Fernando Galindo, Eduardo Marcandalli, Guilherme Baggio, Caio Tritapepe, João Leonardo, Maikon Azambuja e Alexandre Rosa pela contribuição para instalação e condução deste e de outros experimentos e pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários/amigos dos Laboratórios de Nutrição de Plantas, Física do Solo, Fertilidade do Solo, da Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão da FEIS/UNESP, do Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, da seção de Pós-Graduação e da biblioteca pelo coleguismo, auxílio e dedicação.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Ilha Solteira, pela estrutura física e oportunidade de realização deste trabalho.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES pela concessão de bolsa de estudo e apoio financeiro.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... A vida é muita para ser insignificante”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

Gramíneas inoculadas com *Azospirillum brasilense* apresentam sistema radicular mais desenvolvido o que favorece a maior absorção de nutrientes e água, dessa maneira a extração de nutrientes durante o ciclo do milho, crescimento e produtividade da cultura podem ser maiores. Porém, a resposta a esta inoculação pode variar conforme a afinidade da bactéria com o genótipo da planta. Neste sentido, objetivou-se avaliar o acúmulo de matéria seca, extração de nutrientes e o índice de clorofila foliar (ICF) em diferentes estádios fenológicos, exportação de nutrientes pelos grãos, componentes de produção e produtividade de grãos de híbridos de milho inoculados ou não com *A. brasilense*. O experimento foi desenvolvido em Selvíria - MS, em um Latossolo Vermelho Distrófico em sistema plantio direto. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 4 repetições, dispostos em um esquema fatorial 2 x 2, sendo dois híbridos de milho (DKB 390 VT PRO e DKB 350 VT PRO), inoculados ou não com *A. brasilense* na semente (200 mL ha⁻¹ de inoculante líquido contendo as estirpes AbV5 e AbV6). Procedeu-se também a análise de regressão em esquema de parcela subdividida com 4 repetições, em que as parcelas foram constituídas pelos 4 tratamentos descritos acima, e as subparcelas por 6 épocas de coletas de plantas (V4, V8, R1, R2, R4 e R6), para avaliação do ICF, acúmulo de matéria seca e extração de nutrientes. A inoculação com *A. brasilense* propiciou maior acúmulo de matéria seca de raízes e total. O máximo acúmulo total nos híbridos de milho de N, P, Ca, Mg, S, Cu e Zn ocorre no estágio R4, de K, B, Fe e Mn entre os estádios R2 e R4 e o pico de ICF no estágio R1. Contudo, dependendo do nutriente e híbrido de milho, a inoculação com *A. brasilense* pode antecipar ou atrasar o máximo acúmulo do nutriente. Independentemente do híbrido e da inoculação com *A. brasilense*, a extração de nutrientes por plantas de milho em ordem decrescente foi de N>K>Ca>P>Mg>S>Fe>Mn>Zn>Cu>B, enquanto a exportação foi N>K>P>Mg>S>Ca>Zn>Fe>Mn>Cu>B. As plantas de milho inoculadas extraíram e exportaram maiores quantidades de macronutrientes comparada as não inoculadas, com exceção do S e do Ca. Estas também extraíram maiores quantidades de Fe e Mn, e exportaram maiores quantidades de Fe, Mn e Zn. O híbrido triplo inoculado se destacou com as maiores exportações relativas de nutrientes. A inoculação com *A. brasilense* pode contribuir de maneira mais sustentável com a biofortificação agrônômica deste cereal. Os híbridos de milho inoculados com *A. brasilense* foram 18% mais produtivos em grãos que os não inoculados.

Palavras-chave: *Zea mays* L. Inoculação. Bactérias promotoras de crescimento. Marcha de absorção de nutrientes. Produtividade de grãos. Exportação de nutrientes.

DRY MATTER ACCUMULATION AND NUTRIENTS UPTAKE BY CORN HYBRIDS INOCULATED WITH *Azospirillum brasilense* IN THE CERRADO

ABSTRACT

Grasses inoculated with *Azospirillum brasilense* have root system more developed which favors the greater uptake of nutrients and water, thus the extraction of nutrients during the corn crop cycle, growth and crop productivity can be increased. However, the response to this inoculation may vary depending on the affinity of the bacterium with plant genotype. The objective of this study was to evaluate the accumulation of dry matter, nutrients extraction and foliar chlorophyll content (ICF) in different phenological stages, nutrients removal by grains, production components and grain yield of corn hybrids inoculated or not with *Azospirillum brasilense*. The experiment was developed in Selvíria - MS, in an Oxisol Dystrophic under no - tillage system. A randomized block experimental design was used with four replications in a 2 x 2 factorial arrangement as follows, two corn hybrids (DKB 390 VT PRO and DKB 350 VT PRO), with or without seed inoculation with *A. brasilense* (200 mL ha⁻¹ inoculant containing strains AbV5 and AbV6). Regression analysis was performed in a split-plot scheme with 4 replications, where the plots were constituted by the 4 treatments described above, and the sub-plots for 6 planting seasons (V4, V8, R1, R2, R4 and R6) for leaf chlorophyll index, dry matter accumulation and nutrient extraction. Inoculation with *A. brasilense* resulted in a greater accumulation of root dry matter (29% increase in root DM) and total dry matter. The maximum total accumulated in corn hybrids of N, P, Ca, Mg, S, Cu and Zn occurs at the R4 stage, of K, B, Fe and Mn between stages R2 and R4, and peak of ICF at R1 stage. However, depending of the nutrient and corn hybrid, inoculation with *A. brasilense* can anticipate or delay the maximum accumulation of nutrient. Regardless of the hybrid and the inoculation with *A. brasilense*, nutrient extraction by corn plants in descending order was N> K> Ca> P> Mg> S> Fe> Mn> Zn> Cu> B, while export was N> K> P> Mg> S> Ca> Zn> Fe> Mn> Cu> B. The inoculated maize plants extracted and exported larger quantities of macronutrients compared to those not inoculated, except for S and Ca. These also extracted larger amounts of Fe and Mn, and exported larger amounts of Fe, Mn and Zn. The triple inoculated hybrid stood out with the highest relative exports of nutrients. The inoculation with *A. brasilense* can contribute in a more sustainable way with the agronomic biofortification of this cereal. The hybrids of corn inoculated with *A. brasilense* were 18% more productive in grains than those not inoculated.

Key words: *Zea mays* L. Inoculation. Growth promoting bacteria. March of nutrient absorption. Grain yield. Nutrients removal.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Precipitação pluvial e temperaturas máxima, média e mínima registradas durante o experimento, no período de novembro de 2014 a abril de 2015, em Selvíria - MS. As plantas de milho foram coletadas nos estádios fenológicos V4, V8, R2, R4 e R6..... 25
- Figura 2** - Índices de clorofila foliar (ICF) avaliados em 6 estádios do ciclo da cultura do milho. Selvíria – MS, (Safrá 2014/15)..... 32
- Figura 3** - Acúmulo de matéria seca das raízes (a), parte vegetativa (folhas+colmos) (b), parte reprodutiva (pendão + espiga) (c) e planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015..... 44
- Figura 4** - Nitrogênio (N) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015..... 51
- Figura 5** - Fósforo (P) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015..... 52
- Figura 6** - Potássio (K) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015..... 53
- Figura 7** - Cálcio (Ca) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015..... 54
- Figura 8** - Magnésio (Mg) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015..... 55
- Figura 9** - Enxofre (S) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015..... 56
- Figura 10** - Boro (B) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015..... 63
- Figura 11** - Cobre (Cu) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na

	planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, 2015.....	64
Figura 12	- Ferro (Fe) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, 2015.....	65
Figura 13	- Manganês (Mn) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, 2015.....	66
Figura 14	- Zinco (Zn) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, 2015.....	67
Figura 15	- Momento da semeadura mecânica dos híbridos de milho (esquerda) e área completamente semeada (direita).....	95
Figura 16	- Cultura do milho no estágio V4/V5.....	95
Figura 17	- Plantas de milho em estágio V6 (esquerda) e momento avaliação do índice de clorofila foliar no estágio V4 (direita).....	96
Figura 18	- Cultura do milho no estágio V8.....	96
Figura 19	- Plantas de milho em pleno florescimento masculino (pendoamento) (esquerda) e espiga de uma planta de milho no estágio R1/R2 (direita)...	97
Figura 20	- Plantas de milho em estágio R2 – grãos leitosos (esquerda) e espiga em estágio R4 – grão farináceo (80 DAE) (direita).....	97
Figura 21	- Plantas em estágio R5 (esquerda) e espigas de milho em estágio R6 (maturidade fisiológica/colheita) (direita).....	98
Figura 22	- Preparação do sistema radicular das plantas de milho (esquerda) e sua lavagem (direita).....	98
Figura 23	- Sistema radicular de plantas de milho (esquerda) e realização das análises das amostras das diferentes partes das plantas em laboratório (direita).....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Estádios fenológicos de uma planta de milho.....	18
Tabela 2	- Índice de clorofila foliar (ICF) e concentrações foliares de N, P, K, Ca, Mg e S no milho, por ocasião do florescimento, em função de híbridos e inoculação ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, safra 2014/15.....	31
Tabela 3	- Desdobramento da interação híbrido e inoculação com <i>A. brasilense</i> , da análise de variância referente ao índice de clorofila foliar (ICF) das plantas de milho. Selvíria – MS, safra 2014/15.....	31
Tabela 4	- Concentrações foliares de Cu, Fe, Mn e Zn no milho, em função de híbridos e inoculação ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, safra 2014/15.....	35
Tabela 5	- Altura de planta, altura de inserção da espiga e diâmetro do colmo de milho, em função de híbridos e inoculação ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, safra 2014/15.....	36
Tabela 6	- Comprimento e diâmetro da espiga, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira e número de grãos por espiga do milho, em função de híbridos e inoculação ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, safra 2014/15.....	38
Tabela 7	- Desdobramento da interação híbrido e inoculação com <i>A. brasilense</i> , da análise de variância referente à diâmetro da espiga em plantas de milho. Selvíria – MS, safra 2014/15.....	39
Tabela 8	- Massa de 100 grãos e produtividade de grãos de milho em função de híbridos e inoculação ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, safra 2014/15.....	41
Tabela 9	- Matéria seca de raízes (MS raízes), matéria seca da parte vegetativa (MSPV), matéria seca da parte reprodutiva (MSPR) e matéria seca total (MS total) no final do ciclo (R6) de híbridos de milho inoculados ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, safra 2014/15.....	48
Tabela 10	- Extração de macronutrientes em kg ha ⁻¹ e em kg t ⁻¹ de grãos produzido de híbridos de milho inoculados ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria –MS, 2015.....	71
Tabela 11	- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com <i>A. brasilense</i> para extração de S em kg ha ⁻¹ e em kg t ⁻¹ de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.....	72
Tabela 12	- Exportação de macronutrientes em kg ha ⁻¹ , em kg t ⁻¹ de grão produzido e exportação relativa (%) de híbridos de milho inoculados ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, 2015.....	74

Tabela 13	- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com <i>A. brasilense</i> para extração de Ca em kg t ⁻¹ de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.....	75
Tabela 14	- Extração de micronutrientes em g ha ⁻¹ e em g t ⁻¹ de grão produzido de híbridos de milho inoculados ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, 2015.....	77
Tabela 15	- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com <i>A. brasilense</i> para extração de Cu em g ha ⁻¹ e em g t ⁻¹ de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.....	78
Tabela 16	- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com <i>A. brasilense</i> para extração de Zn em g ha ⁻¹ e em g t ⁻¹ de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.....	78
Tabela 17	- Exportação de micronutrientes em g ha ⁻¹ , em g t ⁻¹ de grão produzido e exportação relativa (%) de híbridos de milho inoculados ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> . Selvíria – MS, 2015.....	80
Tabela 18	- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com <i>A. brasilense</i> para exportação de Fe em g ha ⁻¹ e em g t ⁻¹ de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.....	81
Tabela 19	- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com <i>A. brasilense</i> para exportação de Mn em g ha ⁻¹ e em g t ⁻¹ de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.....	81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	IDENTIFICAÇÃO DOS ESTÁDIOS FENOLÓGICOS DO MILHO.....	16
2.2	NUTRIÇÃO MINERAL E ADUBAÇÃO NA CULTURA DO MILHO.....	18
2.3	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) E <i>Azospirillum brasilense</i>	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1	LOCALIZAÇÃO E HISTÓRICO DE MANEJO.....	25
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS UTILIZADOS....	26
3.3	INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	26
3.4	COLETAS E AVALIAÇÕES REALIZADAS.....	27
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	ÍNDICE DE CLOROFILA FOLIAR (ICF) E CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES FOLIARES.....	30
4.2	ALTURA DE PLANTAS, ALTURA DE INSERÇÃO DA ESPIGA E DIÂMETRO BASAL DO COLMO.....	35
4.3	COMPRIMENTO E DIÂMETRO DA ESPIGA, NÚMERO DE FILEIRAS POR ESPIGA, NÚMERO DE GRÃOS POR FILEIRA DA ESPIGA E NÚMERO DE GRÃOS POR ESPIGA.....	37
4.4	MASSA DE 100 GRÃOS E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS.....	40
4.5	ACÚMULO DE MATÉRIA SECA (MS) AO LONGO DO CICLO.....	43
4.6	ACÚMULO FINAL DE MATÉRIA SECA (MS) NOS ÓRGÃOS DA PLANTA E TOTAL.....	47
4.7	ACÚMULO DE MACRONUTRIENTES AO LONGO DO CICLO.....	49
4.8	ACÚMULO DE MICRONUTRIENTES AO LONGO DO CICLO.....	61
4.9	EXTRAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE MACRONUTRIENTES.....	70

4.10	EXTRAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES.....	76
5	CONCLUSÕES.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICE.....	94

1 INTRODUÇÃO

A população mundial ultrapassou sete bilhões de pessoas em 2011 e continua crescendo aceleradamente a cada década. Segundo relatório divulgado pelo Centro Regional de Informação das Nações Unidas - UNRIC (2014) estima-se que ultrapassará cerca de nove bilhões de pessoas em 2050, e 10 bilhões no ano de 2100. Logo, produzir sustentavelmente quantidade suficiente de alimentos para suprir a demanda da população mundial ainda é um dos grandes desafios da humanidade.

Neste contexto, se destaca o milho, o qual é o alimento base para produção animal. O Brasil é o terceiro maior produtor e segundo maior exportador mundial de milho (ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD/FAO, 2016), sendo esta uma cultura de intensa representatividade para o país e cultivada em todo território nacional. Porém, para obtenção de elevadas produtividades de grãos é essencial o fornecimento adequado de nutrientes, com destaque para o nitrogênio (N), o qual é o nutriente mais absorvido e que influencia diretamente no crescimento e produção da cultura. Dessa forma, o manejo da adubação nitrogenada é realizado com o intuito de se obter altas produtividades, entretanto, em função da dinâmica do N no solo, são adicionadas grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados, o que onera o custo de produção dos agricultores e pode poluir o ambiente. Portanto, são necessárias novas tecnologias e manejos visando aliar redução dos custos com aumento de produtividade, reduzindo o uso de fertilizantes nitrogenados, assim como a emissão de gases de efeito estufa.

Assim, para uma agricultura mais sustentável, é crescente e explicável o interesse pelo uso de inoculantes contendo bactérias que promovem o crescimento e incrementam a produtividade de plantas. O Brasil tem tradição de pesquisa em fixação biológica de N₂ por *Azospirillum* em associações com gramíneas, mas até recentemente não havia inoculantes comerciais com essas bactérias no país (HUNGRIA et al., 2010).

Diversas pesquisas (BARASSI et al. 2008; BASHAN; BASHAN, 2010) tem demonstrado o potencial de inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* em culturas de interesse agrônomo, estimulando o crescimento das plantas por múltiplos mecanismos, incluindo síntese de fitohormônios, melhoria da nutrição nitrogenada, melhoria em parâmetros fotossintéticos das folhas, atenuação/minimização de estresse e controle biológico da microbiota patogênica. E em consequência disso, e o que é mais relevante, promovendo incrementos em produtividade da cultura do milho no Brasil (HUNGRIA et al. 2010;

NOVAKOWISK et al. 2011; LANA et al. 2012; ARAÚJO et al. 2015). Inclusive com incrementos na eficiência da adubação nitrogenada na cultura do milho, proporcionando também maior absorção de fósforo (GALINDO et al., 2016).

O genótipo da planta possivelmente desempenhe papel essencial na colonização das bactérias, existindo cultivares com alto e baixo potencial para essa associação (QUADROS et al., 2014). Levando em consideração que existe acúmulo diferencial de nutrientes em cada cultivar, estágio de maturação, fertilidade do solo e condições climáticas, pode-se supor que as práticas de manejo cultural que alterem a produtividade possam também alterar a remobilização de nutrientes das diferentes partes da planta para os grãos (VASCONSELLOS; VIANA; FERREIRA, 1998).

A habilidade de determinada espécie de planta em retirar nutrientes do solo e as suas quantidades exigidas variam não só de acordo com o híbrido, mas são dependentes também do grau de competição existente, clima e sistema de cultivo. Estes fatores influenciam tanto a disponibilidade como a absorção de nutrientes pelas raízes e, conseqüentemente, o crescimento da parte aérea (MARSCHNER, 2012). Logo, o conhecimento da marcha de absorção de nutrientes e do acúmulo de matéria seca em função dos estádios fenológicos da cultura do milho é de fundamental importância para auxiliar estratégias de definição das quantidades e das épocas de realização de adubações e das quantidades mínimas que devem ser restituídas ao solo para fins de manutenção da fertilidade do solo (VON PINHO et al., 2009).

Com base em observações experimentais tem sido notado efeito pronunciado da inoculação com *Azospirillum brasilense* no crescimento inicial de plantas, em detrimento do maior desenvolvimento do sistema radicular que pode propiciar maior absorção de nutrientes e água. Com isso, a extração de nutrientes durante o ciclo do milho, crescimento e produtividade da cultura podem ser alterados. Considerando ainda, que a resposta a esta inoculação pode variar conforme a afinidade da bactéria com os híbridos de milho, tal pesquisa é necessária para quantificar e entender melhor como a inoculação com *A. brasilense* influencia na nutrição de plantas de milho.

Neste sentido, objetivou-se avaliar o acúmulo de matéria seca, extração e exportação de nutrientes em diferentes estádios fenológicos de híbridos de milho (um simples e um triplo) inoculados ou não com *Azospirillum brasilense* no cerrado. Assim como averiguar o índice de clorofila foliar, os componentes de produção e a produtividade de grãos destes híbridos de milho, com ou sem a inoculação desta bactéria.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ESTÁDIOS FENOLÓGICOS DO MILHO

A fenologia das plantas tem diversas aplicações importantes na agricultura. A caracterização dos eventos fenológicos permite identificar todo desenvolvimento das plantas, a fim de estabelecer relações com as condições do ambiente (clima, em particular), sob diferentes ambientes (anos, épocas ou locais). Deste modo, torna-se possível avaliar e descrever com precisão o impacto de eventuais fenômenos adversos. Para caracterizar as necessidades e sensibilidades das espécies, se faz necessário descrever seus estádios fenológicos (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014).

As aplicações da fenologia seriam para se determinar os períodos críticos das culturas à deficiência hídrica, auxiliar nos períodos em que há maior demanda de necessidade de água, na elaboração dos zoneamentos agrícolas, para épocas de melhor aplicação de fertilizantes, nos estudos de adaptação de cultivares (para a classificação de cultivares ou híbridos quanto à precocidade manejo de pragas), planejamento das melhores épocas de semeadura e tratos culturais (BERGAMASCHI, 2006).

A avaliação da capacidade de absorção e da remobilização dos nutrientes em cada estágio do desenvolvimento da planta fornece dados importantes para a avaliação de sua eficiência na utilização de cada nutriente e pode ser utilizada no planejamento de uma agricultura mais ecológica (sustentável) e economicamente mais eficiente.

Estudar a marcha de absorção de nutrientes e o acúmulo de matéria seca, em função dos estádios fenológicos da cultura do milho, é de fundamental importância para subsidiar estratégias de definição das quantidades e das épocas de realização de adubações e das quantidades mínimas que devem ser restituídas ao solo para fins de manutenção da fertilidade (VON PINHO et al., 2009). Como exemplo, definir o estágio de desenvolvimento da cultura do milho que exerce grande influência no aproveitamento do N do fertilizante pelo milho (VARVEL; SCHEPERS; FRANCIS, 1997).

Os cultivares são classificadas quanto à duração do ciclo de maturação, e essa classificação é fundamentada no acúmulo de graus-dia (GD) até o florescimento. O conceito de graus-dia baseia-se em observações de que o crescimento e o desenvolvimento das plantas em diversos ecossistemas são mais relacionados com o acúmulo de temperatura acima de certo valor base (10 °C para o milho) do que apenas com o tempo. A diferença entre a temperatura média diária e a temperatura mínima ou temperatura base (10 °C) fornece o valor

diário de graus-dia. Quando a temperatura máxima for maior do que 30 °C considera-se este valor (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003). Assim, a classificação se dá da seguinte maneira: milhos hiperprecoces (< 790 GD), precoces (> 790 e < 830 GD), precoces/intermediários (> 830 e < 889 GD) e semiprecoces/tardios (> 890 GD).

Introduziu-se esse conceito de graus-dia (GD) para superar inadequações no calendário para prever eventos fenológicos, bem como para o zoneamento agroclimático das culturas, uma vez que esses independem da época e local de cultivo da planta. A disponibilidade térmica tem influência direta sobre o desenvolvimento fenológico das plantas, de tal forma que locais ou períodos mais quentes determinam desenvolvimento mais rápido delas. Consequentemente, em regiões ou mesmo épocas mais quentes, há maior precocidade no desenvolvimento das plantas (BERGAMASCHI, 2006). A temperatura apresenta-se como elemento climático mais importante para prever os eventos fenológicos da cultura, desde que não haja deficiência hídrica (WAGNER et al., 2011).

No geral, todas as plantas de milho seguem um mesmo padrão de desenvolvimento, onde são dotadas de 20-21 folhas totais, florescem com cerca de 65-70 dias após a emergência (DAE) e atingem a maturidade fisiológica com cerca de 120-125 dias após a emergência, porém, os intervalos de tempo específicos entre os estádios e os números totais de folhas desenvolvidas podem variar entre os híbridos, entre anos agrícolas, datas de semeadura e locais de cultivo (MAGALHÃES et al., 2002).

Para qualquer híbrido, a taxa de desenvolvimento da planta está diretamente relacionada com a temperatura, de tal forma que o período de tempo entre os estádios variará de acordo com a temperatura, tanto dentro de uma safra quanto entre safras. Estresses ambientais, tais como deficiências de nutrientes ou de água podem dilatar o tempo entre os estádios vegetativos, porém encurtando o tempo entre os estádios reprodutivos. O número de grãos que se desenvolvem, o tamanho final dos grãos, a taxa de incremento na massa dos grãos e a duração do período de crescimento reprodutivo variarão entre híbridos e condições ambientais (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003).

A divisão do ciclo da cultura do milho em estádios distintos de desenvolvimento (vegetativos - V e reprodutivos - R), conforme a Tabela 1, permite o estabelecimento de relações entre elementos ligados à fisiologia da planta, ao clima, aos aspectos fitotécnicos, fitossanitários e o desempenho da cultura. Este sistema identifica com precisão os estádios da planta de milho. Porém, todas as plantas de determinada área ou lavoura não estarão no mesmo estágio ao mesmo tempo. Quando se estiver estabelecendo o estágio de desenvolvimento de uma lavoura de milho, cada estágio específico de V ou R é definido

somente quando 50% ou mais das plantas no campo estiverem naquele estágio ou além dele (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003).

Cada estágio vegetativo é definido de acordo com a folha de inserção mais alta cuja aurícula seja visível. No início do ciclo, as plantas de milho têm seu ponto de crescimento abaixo da superfície do solo, até aproximadamente seis folhas (estádio V6). Em torno do estágio V8 o primórdio da inflorescência masculina (pendão) se diferencia e a planta começa a alongar os primeiros entrenós (BERGAMASCHI, 2008).

Tabela 1- Estádios fenológicos de uma planta de milho.

ESTÁDIOS VEGETATIVOS	ESTÁDIOS REPRODUTIVOS
VE – Emergência	R1 – Florescimento feminino
V1 – Primeira folha	R2 - Grão Leitoso
V2 – Segunda folha	R3 - Grão pastoso
V3 – Terceira folha	R4 - Grão farináceo
V4 – Quarta folha	R5 - Grão farináceo-duro
V5 – Quinta folha	R6 - Maturidade Fisiológica
V6 – Sexta folha	
V(n) – Enésima folha	
VT –Pendoamento	

Fonte: adaptado de Ritchie, Hanway e Benson (2003).

2.2 NUTRIÇÃO MINERAL E ADUBAÇÃO NA CULTURA DO MILHO

As recomendações nutricionais procuram suprir as prováveis limitações que as plantas poderão ter durante o seu ciclo vegetativo e/ou reprodutivo e, com isso, identificar os insumos a serem aplicados de maneira mais econômica ao sistema solo-planta, e estas são feitas com base na análise de solo. Assim como outras culturas, o milho também é bastante exigente em fertilidade e requer que suas exigências nutricionais sejam plenamente atendidas, para que possa expressar todo seu potencial produtivo, em virtude da grande extração de nutrientes do solo.

As plantas necessitam de 17 elementos considerados essenciais. Pode-se começar pela necessidade de água e dos diferentes compostos orgânicos para a sua sobrevivência. Nesses compostos, encontram-se H, C e O, que são incorporados aos tecidos vegetais a partir da absorção de H₂O pelas raízes e da incorporação de CO₂, pelos processos fotossintéticos. Normalmente, o tecido vegetal possui 43% de C, 44% de O e 6% de H. Além desses três elementos, outros seis (N, P, K, S, Ca e Mg) chamados macronutrientes, são absorvidos em quantidades (kg ha⁻¹) com percentuais elevadas. Os nutrientes exigidos em menores

quantidades (mg ha^{-1}) são: Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Cl, Co e Ni, denominados micronutrientes (VASCONCELLOS; PEREIRA FILHO; CRUZ, 2002).

O N é o nutriente exigido em maior quantidade pela cultura do milho, sendo que sua deficiência pode reduzir a produtividade de grãos entre 14 e 80% (NEHMI et al., 2004). O N é importante em vários processos essenciais para vida da planta, como constituinte da molécula de clorofila, aminoácidos, bases nitrogenadas, coenzimas, enzimas e ácidos nucléicos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Dessa forma, o manejo desse nutriente tem sido uma das práticas agrícolas mais estudadas para melhorar a sua eficiência de uso. Essa necessidade existe porque a maior parte do N do solo se encontra em combinações orgânicas, sendo essa forma não absorvida pelos vegetais (MALAVOLTA, 2006).

Em muitas situações, esse nutriente é suprido insuficientemente, e suas recomendações de adubação em cobertura variam em função do tipo de cultivo, indicando-se para altas produtividades em cultivo de sequeiro: 50 a 90 kg ha^{-1} de N e, para cultivo irrigado: 120 a 150 kg ha^{-1} de N (SOUZA et al., 2003). Em anos nos quais as condições climáticas são favoráveis à cultura do milho, a quantidade de N requerida para otimizar a produtividade de grãos pode alcançar valores superiores a 150 kg ha^{-1} . Quantidade tão elevada dificilmente será suprida somente pelo solo, havendo necessidade de usar outras fontes suplementares deste nutriente. Dentre estas, destaca-se a utilização, isolada ou combinada, de adubos minerais, leguminosas e esterco (AMADO; MIELNICZUK; AITA, 2002).

A adubação nitrogenada influencia positivamente na produtividade de grãos da cultura do milho, como também aumenta o índice de área foliar, massa de 1.000 grãos, altura de plantas, rendimento de biomassa e índice de colheita (BÜLL, 1993). E segundo Piekielek et al. (1995), o teor de clorofila na folha pode ser utilizado para prever o nível nutricional de N nas plantas, pelo fato de que a quantidade desse pigmento correlaciona-se positivamente com o teor de N na planta.

A avaliação da capacidade de absorção e da remobilização do N em cada estágio de desenvolvimento da planta fornece dados importantes para a avaliação de sua eficiência na utilização desse nutriente e pode ser utilizada no planejamento da agricultura ecológica e economicamente mais eficiente (BORGES et al., 2006).

As necessidades nutricionais de qualquer planta são determinadas pela quantidade de nutrientes que esta extrai durante o seu ciclo. Esta extração total dependerá, portanto, da produtividade obtida e da concentração de nutrientes nos grãos e na palhada. Assim, é necessário colocar à disposição da planta a quantidade total de nutrientes que esta extrai, que devem ser fornecidos pelo solo e por meio de adubações.

Maggio (2006) constatou que a curva de crescimento do híbrido milho doce inicialmente foi lento, intensificando-se posteriormente, com maiores incrementos a partir dos 45 DAP; a massa seca do milho doce foi de 13.577 kg ha⁻¹ na parte vegetativa e 12.625 kg ha⁻¹ na parte reprodutiva, totalizando 26.203 kg ha⁻¹ de massa seca aos 99 DAP; no final do ciclo, o acúmulo médio de massa seca por planta foi de 476,42 g, assim distribuída, órgãos vegetativos (folhas + colmo) com 51,82% e órgãos reprodutivos (espigas + pendão) com 48,12%; a extração de nutrientes seguiu a seguinte ordem decrescente K>N>P>Ca>Mg>S>Fe>Mn>Zn>B>Cu; sendo que a concentração dos nutrientes na planta variou com a idade e o órgão considerado.

Coelho e França (2014), trabalhando com doses moderadas a altas de fertilizantes em plantas de milho, observaram que a extração de N, P, K, Ca e Mg aumentou linearmente com o aumento na produção, e que a maior exigência do milho foi de N e K, seguindo-se do Ca, Mg e P. Com relação aos micronutrientes, as quantidades requeridas pelas plantas de milho são muito pequenas. Por exemplo, para produtividade de 9 t ha⁻¹ de grãos, foram extraídos: 2.100 g de Fe, 340 g de Mn, 110 g de Cu, 400 g de Zn, 170 g de B e 9 g de Mo. Entretanto, a deficiência de um deles pode ter tanto efeito na desorganização de processos metabólicos quanto à deficiência de um macronutriente como, por exemplo, o nitrogênio. Dessa forma, a exigência nutricional da cultura pode variar com as condições edafoclimáticas, híbridos e fases fenológicas ao longo de seu ciclo produtivo do milho. Assim como o manejo da cultura também pode influenciar a composição nutricional, com destaque para adubação, irrigação e tecnologias que proporcionem o maior desenvolvimento do sistema radicular, como a inoculação com *Azospirillum brasilense*, que pode propiciar maior absorção de água e nutrientes.

O acúmulo e a distribuição dos nutrientes minerais na planta depende de seu estágio de desenvolvimento. De acordo com Taiz e Zeiger (1999), em determinado instante, os diversos órgãos da planta apresentam-se em diferentes estágios de desenvolvimento, o que consequentemente influenciará a sua composição mineral. A dose de determinado nutriente é definida para evitar possível deficiência ou consumo de luxo (a planta absorve mais do que necessita e essa quantidade a mais, não tem reflexo na produtividade), e serve para determinar a curva ótima de consumo/extração de nutrientes (MAGGIO, 2006).

2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) E *Azospirillum brasilense*

Há previsões que nos próximos anos haverá considerável incremento no uso de fertilizantes no Brasil para atender à intensificação da agricultura e à recuperação de áreas que estão extremamente cultivadas e/ou degradadas. Porém, o mercado brasileiro de fertilizantes é frágil e com grande dependência das importações. Portanto, é fundamental encontrar alternativas para o uso mais eficiente dos fertilizantes e, nesse contexto, alguns microrganismos, como as bactérias fixadoras de N atmosférico, bactérias promotoras do crescimento de plantas, fungos micorrízicos, entre outros, podem desempenhar papel relevante e estratégico para garantir altas produtividades a baixo custo e com menor dependência de importação de insumos (HUNGRIA, 2011).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) correspondem a um grupo de microrganismos benéficos às plantas devido à capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989).

O gênero *Azospirillum* pertence ao grupo das BPCP, e possuem como principais características a capacidade de FBN, o aumento da atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas e a produção de hormônios como auxinas, citocininas, giberilinas e etileno (TIEN, GASKINS, HUBBELL, 1979; BOTTINI et al., 1989; STRZELCZYK, KAMPERT, LI, 1994; CASSÁN et al., 2008; HUERGO et al., 2008). Em geral, acredita-se que as BPCP beneficiam o crescimento das plantas por uma combinação de todos esses mecanismos (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

A espécie *Spirillum lipoferum* foi inicialmente descrita por Beijerinck e, em 1978, foi proposta a sua reclassificação como *Azospirillum*, juntamente com a descrição de duas espécies, *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978). Dessa forma, as bactérias do gênero *Azospirillum* obtiveram destaque mundialmente a partir da década de 1970, com a descoberta pela pesquisadora da Embrapa, Dra. Johanna Döbereiner (1924-2000), da capacidade de FBN dessas bactérias quando em associação a gramíneas, e já foram então descritas 14 espécies neste gênero (HUNGRIA, 2011).

O processo de FBN em gramíneas ocorre por meio de bactérias diazotróficas. Especificamente para a cultura do milho, a *Azospirillum brasilense* é uma das bactérias que vem proporcionando resultados positivos. Estas bactérias são caracterizadas pelo formato de

bastonetes, as quais são comumente uniflageladas, gram-negativas, com movimento vibratório característico e padrão flagelar misto (HALL; KRIEG, 1984).

Inoculantes contendo *Azospirillum* spp. são comercializados para inoculação em milho, com aumento de 26% na produtividade de grãos, porém, com fornecimento de parte do N requerido pela planta pelo fertilizante mineral. Ao contrário das leguminosas, a inoculação de gramíneas com essas bactérias endofíticas ou associativas, ainda que essas consigam fixar N₂, não consegue suprir totalmente as necessidades das plantas em N (HUNGRIA, 2011). A interação positiva entre estas bactérias e o milho tem sido demonstrada por vários autores, entretanto, o maior obstáculo para a utilização desta tecnologia é a inconsistência de resultados em condições de campo, ligada a fatores como condições edafoclimáticas e interações com a biota do solo (DOBBELAERE et al., 2001; REIS, 2007).

Segundo Didonet, Rodrigues e Kenner (1996), as bactérias do gênero *Azospirillum* quando presentes nas plantas em quantidades apropriadas, estimulam a densidade e o comprimento de pelos radiculares, assim como a taxa de aparecimento de raízes laterais e a área de superfície de raiz. Este aumento da superfície de contato das raízes potencializa o aproveitamento e utilização de nutrientes minerais e água resultando em melhor desenvolvimento das plantas e maior produtividade das culturas (BALDANI et al., 1997). Levantamentos de diversos experimentos realizados em vários países mostraram que a inoculação com *Azospirillum* em gramíneas resultou, na maioria dos casos, em aumento de matéria seca, produtividade e acúmulo de nitrogênio. Mazzuchelli, Sossai e Araujo (2014) também constataram que o uso de *Azospirillum brasilense* nas sementes aumentou em 21,9% a produtividade do milho safrinha.

A inoculação a campo com bactérias do gênero *Azospirillum* spp. além da fixação biológica do N, aumenta a superfície de absorção das raízes da planta, decorrente das modificações morfológicas do sistema radicular, alterando o número de radículas e o diâmetro médio das raízes laterais, o que promove ganhos de produtividade (IKEDA, 2010).

Possivelmente, devido ao maior crescimento radicular e melhor nutrição das plantas, há também vários relatos de maior tolerância a agentes patogênicos de plantas (CORREA et al., 2008). Também deve-se considerar os resultados positivos dessas bactérias devido a menor poluição ambiental, que resulta da produção e utilização de fertilizantes nitrogenados, bem como pela redução na emissão de gases de efeito estufa, assim, além da economia para os agricultores, o uso de inoculantes contendo *Azospirillum* contribui para a conservação do ambiente e pode ser objeto de negociações futuras no comércio de créditos de carbono (CORREA et al., 2008).

A inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense* vem ganhando destaque em função de algumas vantagens quando comparado à adubação mineral, principalmente por não existirem perdas do N fixado, como ocorre com fertilizantes minerais, isso gera melhor aproveitamento deste N pelas plantas (SOARES, 2009). No Brasil, esta técnica pode gerar economia de 30 a 50 kg ha⁻¹ de N na forma de adubo sintético (FANCELLI, 2010). De acordo com Hungria (2011), a inoculação das sementes associada à adição de 24 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 30 kg ha⁻¹ de N no estágio de florescimento, proporcionou produtividades médias em torno de 7.000 kg ha⁻¹ e desta forma, viabiliza a “safrinha” em regiões onde é possível produzir duas safras por ano.

O processo de FBN depende de vários fatores. Para a bactéria estabelecer interação positiva com a planta é indispensável à utilização de estipes de *Azospirillum brasilense* selecionadas (HUNGRIA, 2011), capazes de competir com os microrganismos presentes no solo. Outro fator a ser considerado é a escolha do genótipo a ser inoculado, pois a relação benéfica de associação entre o híbrido e a bactéria é determinada pela qualidade dos exsudatos liberados pelas raízes da planta (NEHL; ALLEM; BROWN, 1997). Bactérias do gênero *Azospirillum* podem atuar no crescimento vegetal por meio da redução do nitrato até amônia, podendo essa energia ser disponibilizada para outros processos vitais do metabolismo (FERREIRA; FERNANDES; DÖBEREINER, 1987), porém, este processo de fixação biológica também necessita de energia na forma de adenosina-tri-fosfato (ATP) para acontecer (HOFFMANN, 2007).

Pesquisadores do estado do Paraná testaram e selecionaram estirpes de *Azospirillum* que melhor sobreviviam no solo, se adaptavam as tecnologias empregadas em milho e promoviam maior crescimento de planta. Foram promissores estes estudos e permitiram a autorização pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) das estirpes de *A. brasilense* AbV4, AbV5, AbV6 e AbV7 na produção de inoculantes comerciais para a cultura do milho, demonstrando que há incremento médio de 24 a 30% na produtividade de grãos de milho quando inoculados com *A. brasilense* (HUNGRIA, 2011).

Pesquisas relacionadas à eficiência do uso de inoculantes à base de *A. brasilense* foram negligenciadas por muitos anos devido à inconsistência dos resultados que vinham sendo obtidos, sendo que recentemente voltaram a ser o foco de muitos pesquisadores em função da necessidade do desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável.

As gramíneas apresentam algumas primazias quando comparadas as leguminosas. Elas possuem um sistema radicular fasciculado, possuindo vantagens sobre o sistema pivotante das leguminosas para extrair água e nutrientes do solo, que aliado a outros fatores fisiológicos,

promove maior atividade fotossintética (C4), por esse motivo o interesse na FBN em gramíneas é grande (BASI, 2013). Nem todo o N necessário para a cultura do milho é fornecido pela associação com a bactéria, fazendo da técnica uma forma de suplementação de N para a cultura. No entanto, esta alternativa pode propiciar redução no uso de fertilizantes minerais nitrogenados (DÖBEREINER, 1992).

Plantas inoculadas com *Azospirillum* spp. tem a morfologia do sistema radicular alterados como o aumento do número de radículas, do diâmetro médio das raízes laterais e de adventícias, o que possibilita a exploração de maior volume de solo, e aumenta a superfície de absorção das raízes da planta (QUADROS, 2009). Consequentemente proporcionando maior acúmulo de N nas plantas, aumento na massa seca, levando a uma elevação na produtividade de grãos de milho (HUNGRIA et al., 2010), além de surtir em significativa economia de fertilizantes minerais nitrogenados aplicados a cultura. Por isso, o interesse na utilização dessa bactéria promotora de desenvolvimento capaz de contribuir para a nutrição de plantas tem aumentado e tende a aumentar nos próximos anos, devido ao alto valor financeiro investido anualmente com fertilizantes e em relação ao que se chama de Agricultura Sustentável (HUNGRIA et al., 2010).

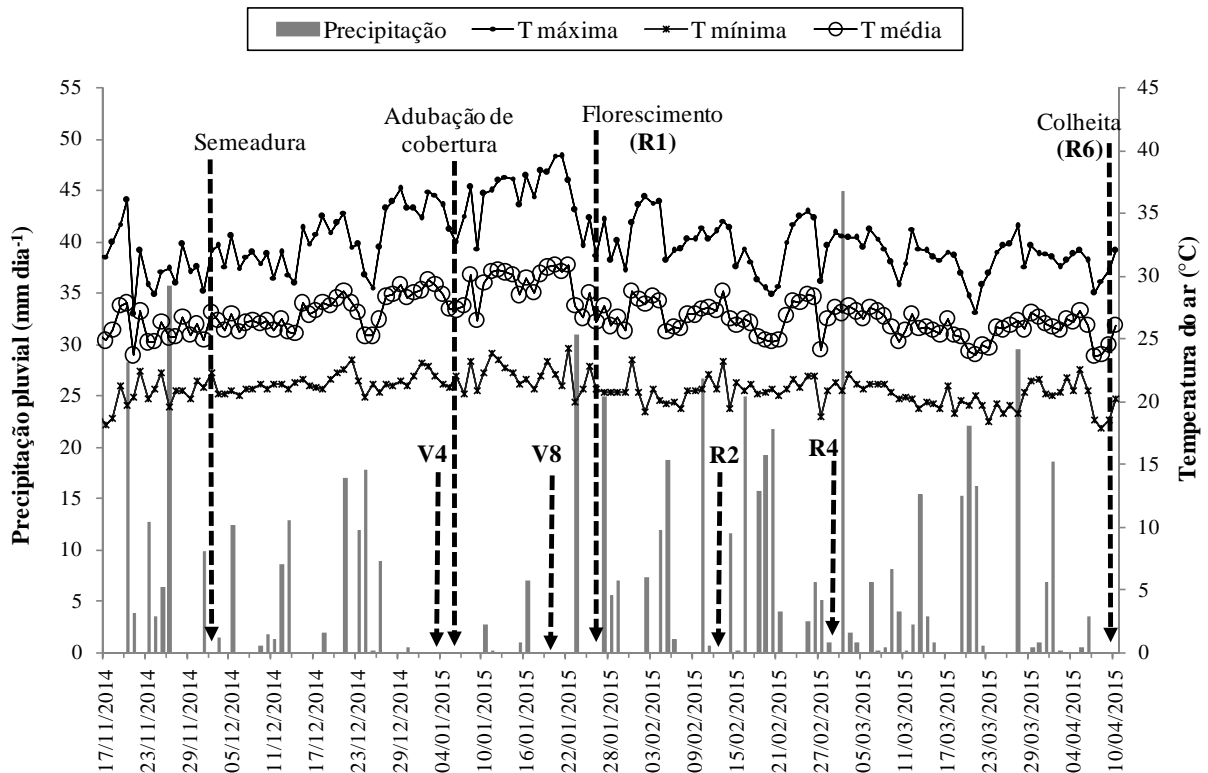
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCALIZAÇÃO E HISTÓRICO DE MANEJO

O experimento foi desenvolvido na safra 2014/15, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNESP – Campus de Ilha Solteira, localizada no município de Selvíria – MS. A área está situada nas seguintes coordenadas geográficas: latitude 22° 23' S e longitude 51° 27' W, com altitude de 335 m. O solo foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico típico argiloso de acordo com Santos et al. (2013), com granulometria na profundidade de 0,00-0,20 m de 420, 50 e 530 g kg⁻¹ de areia, silte e argila, respectivamente, o qual foi cultivado por culturas anuais há mais de 28 anos, sendo os últimos 12 anos em sistema plantio direto e a cultura anterior a semeadura do milho foi o trigo.

O tipo climático da região é classificado como Aw de acordo com Köppen, com precipitação média anual de 1370 mm, temperatura média anual de 23,5 °C e umidade relativa do ar entre 70 e 80 % (média anual). As condições climáticas no decorrer do experimento estão ilustradas na Figura 1.

Figura 1- Precipitação pluvial e temperaturas máxima, média e mínima registradas durante o experimento, no período de novembro de 2014 a abril de 2015, em Selvíria - MS. As plantas de milho foram coletadas nos estádios fenológicos V4, V8, R1, R2, R4 e R6.



Fonte: Elaboração da própria autora.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com 4 repetições, dispostos em esquema fatorial 2 x 2, sendo dois híbridos de milho, com e sem inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*.

Utilizou-se os seguintes híbridos de milho: o híbrido simples DKB 390 VT PRO, de ciclo precoce (870 GD), grão semiduro amarelo-alaranjado, com população média de 60-65 mil plantas ha⁻¹; e o híbrido triplo DKB 350 VT PRO, de ciclo precoce (860 GD), grão semiduro alaranjado, com população média de 65-70 mil plantas ha⁻¹; ambos transgênicos (resistentes à lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*)), de alta resistência ao acamamento, alto nível de tecnologia e destinados à produção de grãos (CRUZ; PEREIRA FILHO; QUEIROZ, 2014).

As parcelas apresentavam 20 m de comprimento com seis linhas espaçadas de 0,45 m, considerando como área útil da parcela as quatro linhas centrais, desprezando-se 0,5 m das extremidades, e foram também subdivididas no tempo em seis estádios fenológicos do milho (V4, V8, R1, R2, R4 e R6) de acordo com Ritchie, Hanway e Benson (2003), para analisar o acúmulo de matéria seca, extração, exportação de nutrientes e índice de clorofila foliar.

3.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

Os atributos químicos do solo na camada arável determinados antes da instalação do experimento, segundo metodologia proposta por Raij et al. (2001) apresentaram os seguintes resultados: 22 mg dm⁻³ de P (resina); 6 mg dm⁻³ de S-SO₄; 28 g dm⁻³ de MO.; 5,4 de pH (CaCl₂); K, Ca, Mg, H+Al = 3,2; 29,7; 21,4 e 33,8 mmolc dm⁻³, respectivamente; Cu, Fe, Mn, Zn (DTPA) = 5,9; 30,0; 93,9 e 1,3 mg dm⁻³, respectivamente; 0,21 mg dm⁻³ de B (água quente) e 61% de saturação por bases.

Realizou-se a dessecação prévia da flora daninha da área com os herbicidas glifosato (1800 g ha⁻¹ do i.a.) e 2,4-D (670 g ha⁻¹ do i.a.), 15 dias antes da semeadura, e após 7 dias foi empregado o desintegrador mecânico (Triton) no preparo da palhada da área. Na adubação de semeadura forneceu-se 400 kg ha⁻¹ da formulação 08-28-16, o que equivale a 32 kg ha⁻¹ de N, 112 kg ha⁻¹ P₂O₅ e 64 kg ha⁻¹ de K₂O para todos os tratamentos, baseado na análise do solo e na exigência da cultura do milho.

A inoculação das sementes foi realizada com inoculante líquido contendo as estirpes AbV5 e AbV6 de *Azospirillum brasilense* (garantia de 2x10⁸ UFC mL⁻¹), na dose de 200 mL

por hectare de sementes semeadas, com o auxílio de uma betoneira limpa para incorporação e foi efetuada cerca de uma hora antes da semeadura da cultura à sombra. A semeadura foi realizada de forma mecanizada no dia 02/12/14, sendo semeadas 3,3 sementes por metro, com espaçamento de 0,45 m entre linhas dos híbridos de milho citados anteriormente. A emergência de plântulas ocorreu sete dias após semeadura, no dia 09/12/2014. Para o controle de plantas daninhas em pós-emergência, utilizou-se a mistura dos herbicidas tembotriona (84 g ha⁻¹ do i.a.) e atrazina (1000 g ha⁻¹ do i.a.), mais a adição de óleo vegetal (720 g ha⁻¹ do i.a.) na calda herbicida.

A adubação nitrogenada de cobertura do milho foi realizada no dia 06/01/15 quando as plantas se encontravam no estágio V4, na dose de 150 kg ha⁻¹ de N (fonte ureia). O fertilizante foi distribuído manualmente sobre a superfície do solo, nas entrelinhas do milho e aproximadamente à 15 cm das plantas. Quando necessário e, inclusive após a adubação nitrogenada de cobertura, para minimizar as perdas de N por volatilização da amônia, a área foi irrigada por um sistema de aspersão do tipo pivô central, com lâmina de água média de 13 mm. A colheita foi realizada no dia 06/04/15 (118 DAE).

3.4 COLETAS E AVALIAÇÕES REALIZADAS

As coletas das plantas de milho foram realizadas nos seguintes estádios fenológicos: V4 (26 DAE), V8 (41 DAE), R1 (50 DAE), R2 (65 DAE), R4 (80 DAE) e R6 (118 DAE). As plantas foram coletadas de forma aleatória procurando-se amostrar plantas normais e representativas de cada parcela, sendo que cada amostra foi composta por cinco plantas inteiras.

Nos estádios fenológicos do milho foram avaliados:

- *Índice de clorofila foliar (ICF)*: determinado (em todos estádios exceto R6) indiretamente por meio de leituras no terço médio dos limbos de folhas situadas opostamente e abaixo da espiga principal (quando as plantas se encontravam em estádios reprodutivos) e na última folha totalmente expandida contando do ápice para a base (quando as plantas se encontravam em estádios vegetativos), de 5 plantas por parcela, por meio do clorofilômetro portátil marca ClorofiLOG®, modelo CFL 1030 (Falker Automação Agrícola®), que por meio de sensores, analisa duas faixas de frequência de luz e pelas relações de absorção de diferentes frequências, fornece medições dos teor de clorofila total,

expressas em unidades dimensionais chamadas ICF (Índice de Clorofila Foliar) (FALKER, 2008).

- *Concentração foliar de nutrientes (estado nutricional das plantas):* por ocasião do florescimento feminino das plantas foi realizada a amostragem de folhas na área útil de cada parcela coletando-se o terço médio dos limbos de 20 folhas situadas opostamente e abaixo da espiga principal (CANTARELLA; RAIJ; CAMARGO, 1997), sendo estas lavadas em água e secas em estufa de ventilação de ar forçado à 65 °C até a obtenção de massa constante, sendo posteriormente moídas em moinho tipo Wiley para determinação do teor de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn, segundo metodologia de Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).
- *Acúmulo de matéria seca (MS):* nos 6 estádios fenológicos citados anteriormente, foram coletadas 5 plantas inteiras com raízes, sendo este órgão coletado cuidadosamente com enxadão até a profundidade de cerca de 0,40 m ocupando um raio de 0,25 m ao entorno da planta, e meticulosamente lavado com água. Em seguida procedeu-se a separação morfológica em órgãos vegetativos (folhas + colmos), reprodutivos (pendão + espiga (brácteas + sabugo + grãos)), raízes e grãos, para secagem em estufa de ventilação de ar forçado à 65 °C até a obtenção de massa constante. Posteriormente, realizou-se a pesagem e com base nos dados de matéria seca (MS) e na população de plantas por hectare, foram calculados os acúmulos de MS em cada parte da planta e na planta inteira.
- *Acúmulo de nutrientes na planta toda e em seus diferentes órgãos:* após determinação da MS, as amostras dos diferentes órgãos das plantas foram moídas em moinho tipo Wiley e submetidas às análises químicas para determinação dos teores de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn, de acordo com a metodologia proposta por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), para posterior cálculo da *extração e exportação de nutrientes (kg ou g ha⁻¹) e (kg ou g t⁻¹ grão produzido)*.

Na maturidade fisiológica do milho (estádio R6) foram avaliados:

- *Altura de plantas:* definida como sendo a distância (m) do nível do solo ao ápice do pendão do milho;

- *Altura de inserção da espiga*: definida como sendo à distância (m) do nível do solo até a inserção da espiga principal;
- *Diâmetro basal do colmo*: utilizando-se um paquímetro manual para medição, tomando como base o segundo entrenó da planta;
- *Massa de 100 grãos*: determinada em balança de precisão (0,01g) à 13% de umidade (base úmida – b.u.);
- *Produtividade de grãos*: determinada por meio da coleta das espigas das plantas contidas em 5 metros das 4 linhas úteis de cada parcela. Após a trilhagem mecânica, os grãos foram quantificados e os dados transformados em kg ha⁻¹ a 13% (base úmida).

Foram ainda coletadas 10 espigas de milho na ocasião da colheita para as seguintes avaliações:

- *Comprimento da espiga (despalhada)*: determinado do ápice até a base da espiga;
- *Diâmetro da espiga (despalhada)*;
- *Número de fileiras por espiga*: obtido em função da relação do número de fileiras de grãos em cada espiga;
- *Número de grãos por fileira da espiga*: determinado em função da relação entre o número de grãos em cada fileira da espiga;
- *Número de grãos por espiga*: obtido a partir da contagem do número de grãos em cada espiga de milho, de cada unidade experimental;

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste F) e teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias dos híbridos de milho e da inoculação ou não com *Azospirillum brasilense* e, ajustadas as equações de regressão para o efeito das épocas de coleta (estádios fenológicos do milho). Para realização das análises estatísticas utilizou-se o programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ÍNDICE DE CLOROFILA FOLIAR (ICF) E CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES FOLIARES

Quanto ao índice de clorofila foliar avaliado por ocasião do florescimento (Tabela 2), houve interação significativa entre híbridos de milho e inoculação com *Azospirillum brasilense*. O desdobramento da interação dos fatores híbrido e inoculação para o ICF no estágio R1 consta na Tabela 3 onde observa-se que, tanto com quanto sem inoculação o híbrido simples DKB 390 obteve maior ICF. O híbrido triplo DKB 350 apresentou maior ICF quando inoculado, enquanto que, o ICF do híbrido DKB 390 não foi influenciado pela inoculação, indicando que o híbrido triplo demonstrou melhor potencial de associação com esta bactéria. Resultados semelhantes também foram encontrados por Quadros et al. (2014) utilizando dois híbridos simples (AS 1575 e P 32R48) e um triplo (SHS 5050), e por Galindo et al. (2016) utilizando um híbrido triplo (DKB 350), os quais constataram efeito positivo da inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasilense*, em que o ICF foi maior nos tratamentos com a presença da bactéria diazotrófica em relação aos tratamentos onde não houve inoculação. De acordo com Dobbelaere et al. (2001), este resultado pode estar relacionado à fixação biológica do nitrogênio atmosférico, e aos mecanismos de promoção do crescimento, que podem incrementar a capacidade das plantas em absorver este nutriente do solo.

Ainda Quadros et al. (2014) observaram que a inoculação com *Azospirillum* manteve o teor de clorofila foliar de plantas de milho significativamente maior até o estágio R3 inclusive com o aumento da matéria seca da parte aérea das plantas. Jordão et al. (2010) também constataram efeito positivo da inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasiliense*, em que o índice de clorofila foliar foi maior nos tratamentos com a presença da bactéria diazotrófica em relação aos tratamentos onde não houve inoculação.

Tabela 2- Índice de clorofila foliar (ICF) e concentrações foliares de N, P, K, Ca, Mg e S no milho, por ocasião do florescimento, em função de híbridos e inoculação ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, safra 2014/15.

	ICF	N	P	K	Ca	Mg	S
	-----g kg ⁻¹ de MS-----						
Híbridos							
DKB 390	91,82	31,69 a	2,68 b	17,16 a	3,07 a	1,52 a	1,38 b
DKB 350	66,79	32,31 a	3,37 a	14,58 b	2,33 b	1,05 b	2,43 a
DMS (5%)	2,02	1,16	0,42	1,69	0,28	0,10	0,20
Inoculação							
Com <i>Azo</i>	82,54	31,94 a	3,08 a	15,59 a	2,77 a	1,33 a	1,71 b
Sem <i>Azo</i>	76,06	32,05 a	2,97 a	16,16 a	2,64 a	1,24 a	2,10 a
DMS (5%)	2,02	1,16	0,42	1,69	0,28	0,10	0,20
Teste F							
Híbrido (H)	789,24**	1,45 ^{ns}	14,00**	11,88**	37,52**	110,70**	137,65**
Inoculação (I)	52,87**	0,04 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,59 ^{ns}	1,14 ^{ns}	4,33 ^{ns}	18,98**
H x I	107,69**	3,40 ^{ns}	2,91 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,92 ^{ns}	3,32 ^{ns}
Média geral	79,30	32,00	3,02	15,87	2,70	1,29	1,91
CV (%)	2,25	3,21	12,27	9,42	9,01	6,91	9,43

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** , * e ^{ns}: significativas em p <0,01, 0,01 <p <0,05, e não significativos, respectivamente.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 3- Desdobramento da interação híbrido e inoculação com *A. brasilense*, da análise de variância referente ao índice de clorofila foliar (ICF) das plantas de milho. Selvíria – MS, safra 2014/15.

Híbridos	Inoculação	
	Com <i>Azospirillum</i>	Sem <i>Azospirillum</i>
DKB 390	90,43 aA	93,20 aA
DKB 350	74,65 bA	58,93 bB
DMS (5%)	2,85	

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

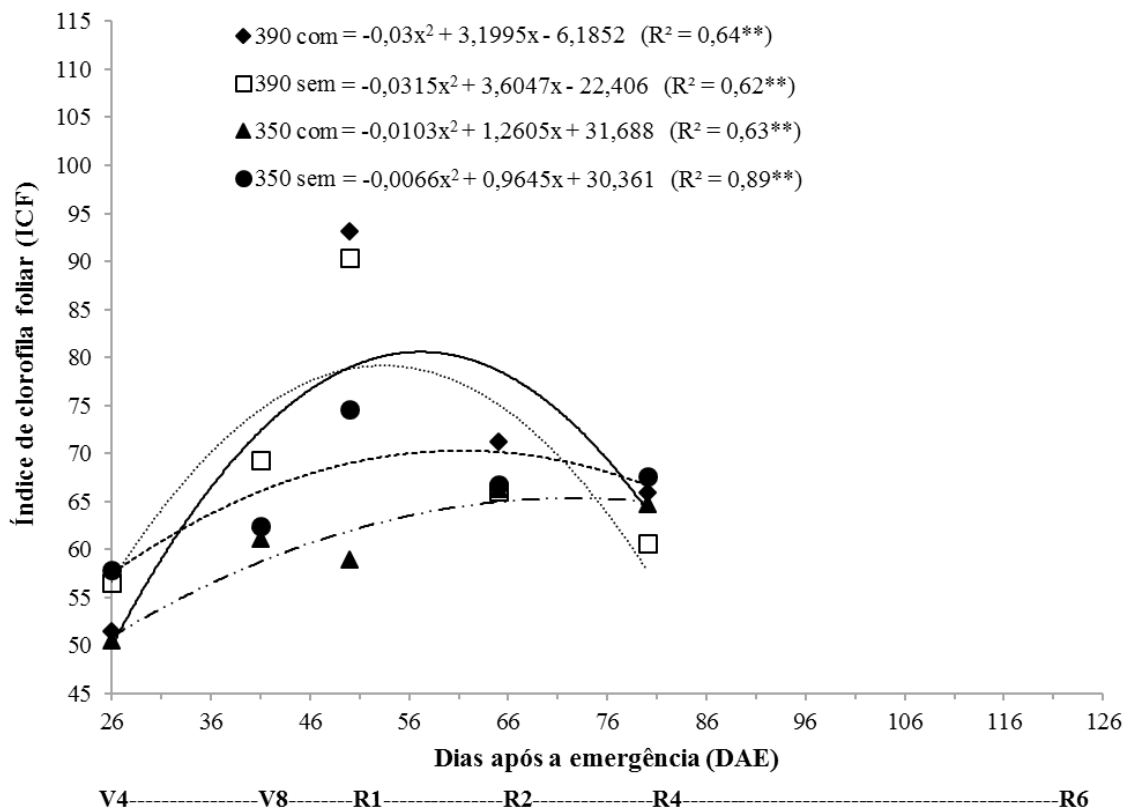
Fonte: Elaboração da própria autora.

Em contrapartida, Sangoi et al. (2015) não verificaram influência da inoculação com *Azospirillum sp.* via semente sobre o índice de clorofila foliar do milho, o que pode ser explicado pelo fato de que quando a planta absorve quantidade excessiva de N e o nutriente se acumula na forma de nitrato, assim sendo o nitrogênio não se associa à molécula de clorofila, não sendo detectado pelo medidor de clorofila (RAMBO et al., 2007).

Com relação ao índice de clorofila foliar avaliado ao longo do ciclo da cultura (Figura 2), houve ajuste a funções quadráticas, e é possível observar que valores máximos foram alcançados no florescimento (50 DAE) para a maioria dos tratamentos, que geralmente é o

estádio que as plantas se encontram em sua máxima atividade fotossintética. O híbrido triplo DKB 350 inoculado se destacou apresentando maiores valores de ICF em todos os estádios de avaliação em relação a ele mesmo não inoculado, novamente indicando que este híbrido estabeleceu melhor associação com o *Azospirillum brasilense*, e que a inoculação influenciou no índice de clorofila foliar do milho.

Figura 2 - Índices de clorofila foliar (ICF) avaliados ao longo do ciclo da cultura. Selvíria – MS, (Safrá 2014/15).



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

O nitrogênio é um dos constituintes da molécula de clorofila, sendo assim, o ICF se correlaciona positivamente com o teor de N na planta. Entretanto, neste trabalho a concentração de N foliar (Tabela 2), não seguiu esse comportamento, de modo que não houve diferença significativa entre as fontes de variação, e os híbridos inoculados não apresentaram maiores valores em relação aos não inoculados, ou seja, os tratamentos não influenciaram os teores de N foliar das plantas de milho. Mas ainda assim, é importante salientar que as concentrações foliares deste nutriente estavam dentro da faixa considerada adequada para a cultura, de acordo com Cantarella, Raij e Camargo (1997), que é de 27-35 g de N kg⁻¹ de M.S.

Possivelmente, a elevada dose de fertilizante nitrogenado aplicado em cobertura (cerca de 24 dias antes da coleta do material para análise) mascarou o resultado do verdadeiro teor de N, não apresentando então diferenças entre os tratamentos.

Machado et al. (1998) encontraram semelhanças entre concentrações foliares de N na cultura do milho, comparando o uso isolado de adubação nitrogenada em cobertura (100 kg ha⁻¹ de N) em relação ao uso associado à inoculação de bactérias diazotróficas.

As concentrações foliares de P, K, Ca e Mg (Tabela 2) foram influenciados somente pelos híbridos, enquanto que os teores de S foram influenciados tanto pelos híbridos quanto pela inoculação. O híbrido triplo DKB 350 apresentou maiores teores de P e S, e o híbrido simples DKB 390 obteve superiores teores de K, Ca e Mg. A inoculação influenciou negativamente o teor de S foliar, apresentando-se este valor 19% inferior, quando comparado a ausência de inoculação.

As concentrações foliares de P se encontram dentro da faixa adequada de 2,0-4,0 g kg⁻¹ (CANTARELLA; RAIJ; CAMARGO, 1997). Por outro lado, as concentrações médias de K foliar (Tabela 2), estavam abaixo do preconizado (CANTARELLA; RAIJ; CAMARGO, 1997), cuja faixa é de 17,0 a 35,0 g kg⁻¹. Esperava-se obter concentrações de K adequadas no milho em razão da adubação com K aplicada, e dos teores no solo da área experimental, que estavam dentro da faixa adequada de disponibilidade. Ademais, o fato do K não fazer parte de nenhum composto celular no vegetal (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997), associado à consideração da liberação de 100% do K proveniente dos resíduos culturais, deveria apresentar rápida disponibilização à planta, com conseqüente aproveitamento, contudo tal contribuição não foi satisfatória, ou a exigência em K destes híbridos de milho pode ser menor comparado ao preconizado nos híbridos estudados na década de 1990, para o estabelecimento da faixa de suficiência utilizada para o diagnóstico.

As concentrações de S foliar estavam dentro da faixa considerada adequada para a cultura (CANTARELLA; RAIJ; CAMARGO, 1997), ou seja entre 1,5 a 3,0 g kg⁻¹. As concentrações médias de Ca também ficaram dentro do preconizado como adequado (CANTARELLA; RAIJ; CAMARGO, 1997), cuja a faixa adequada é de 2,5 a 8,0 g kg⁻¹, enquanto que, para o Mg, a concentração média ficou abaixo do preconizado como adequado (CANTARELLA; RAIJ; CAMARGO, 1997), cuja a faixa é de 1,5 a 5,0 g kg⁻¹, com exceção da média do híbrido DKB 390, a qual a concentração foliar de Mg estava adequada.

Cruz et al. (2008), avaliando um híbrido triplo de milho (BRS 3150), cultivado também em sistema de semeadura direta, obteve concentrações foliares de macronutrientes semelhantes ao do presente trabalho (25 g kg⁻¹ de N, 3 g kg⁻¹ de P, 27 g kg⁻¹ de K, 3 g kg⁻¹ de

Ca, 3 g kg⁻¹ de Mg e 2 g kg⁻¹ de S).

Enxofre e nitrogênio são nutrientes que interagem entre si, essenciais para a síntese de proteínas na cultura do milho, o suprimento inadequado de um desses nutrientes acarreta desbalanceamento, resultando em prejuízos na qualidade do produto colhido, além de redução na produção de grãos. Segundo Malavolta e Moraes (2007), o S aumenta o teor de metionina nas proteínas dos cereais e o N pode mudar a proporção de albuminas, globulinas, polaminas e glutelinas.

Existe também uma estreita relação entre fósforo e magnésio, este último um importante ativador enzimático de quase todas as enzimas fosforilativas, tanto as de incorporação quanto de P inorgânico, formando uma conexão entre o ATP e/ou ADP e a molécula da enzima. Tal transferência energética é essencial para processos de fotossíntese, respiração, síntese de compostos orgânicos, absorção iônica e trabalho mecânico como a expansão radicular (MALAVOLTA, 2006; PRADO, 2008; MARSCHNER, 2012).

A respeito da concentração dos micronutrientes avaliados (Tabela 4), Cu, Fe, Mn e Zn variaram em relação aos híbridos de milho, e mais uma vez o híbrido triplo DKB 350 se sobressaiu, apresentando maiores teores de nutrientes (72% de Cu, 52% de Fe, 27% de Mn e 25% de Zn) quando comparado ao DKB 390. A inoculação influenciou significativamente apenas o teor de Zn, que nos híbridos inoculados foi 17% inferior aos não-inoculados.

Apesar da inoculação não ter influenciado significativamente a concentração foliar de Cu, percebe-se observando a tabela 4, que os híbridos inoculados com *A. brasilense* apresentaram maior concentração foliar de Cu (acréscimo de 16%) e conseqüentemente menor concentração de Zn, devido a inibição competitiva existente entre estes dois nutrientes. Este tipo de inibição ocorre quando dois elementos competem pelo mesmo sítio de absorção na planta, sendo que a presença de um diminui a absorção do outro (MALAVOLTA, 1980). No entanto, as concentrações de Zn encontram-se ainda dentro da faixa considerada adequada por Cantarella, Raij e Camargo (1997) que é de 15-100 mg kg⁻¹.

De acordo com Lutz, Genter e Hawkins (1972) e Warnock (1970) a concentração de Zn na planta de milho varia conforme o pH do solo e do teor de P no solo e tecido vegetal. Borges et al. (2007) avaliando um híbrido duplo precoce de milho, observou teores dentro da faixa recomendada para Cu (8,5 mg kg⁻¹) e Zn (26 mg kg⁻¹), e acima da mesma para Fe (309 mg kg⁻¹) e Mn (383 mg kg⁻¹).

Tabela 4- Concentrações foliares de Cu, Fe, Mn e Zn no milho, em função de híbridos e inoculação ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, safra 2014/15.

	Cu	Fe	Mn	Zn
	-----mg kg ⁻¹ de MS-----			
Híbridos				
DKB 390	31,50 b	85,67 b	56,50 b	16,00 b
DKB 350	54,33 a	129,83 a	72,00 a	20,00 a
DMS (5%)	8,15	12,66	8,91	2,10
Inoculação				
Com <i>Azo</i>	46,17 a	106,17 a	63,00 a	16,33 b
Sem <i>Azo</i>	39,67 a	109,33 a	65,50 a	19,67 a
DMS (5%)	8,15	12,66	8,91	2,10
Teste F				
Híbrido (H)	40,12**	62,27**	15,48**	18,48**
Inoculação (I)	3,25 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,40 ^{ns}	12,85**
H x I	0,77 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,30 ^{ns}	4,62 ^{ns}
Média geral	42,92	107,75	64,25	18,00
CV (%)	16,80	10,39	12,26	10,34

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** , * e ^{ns}: significativas em $p < 0,01$, $0,01 < p < 0,05$, e não significativas, respectivamente.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Segundo Büll (1993), na planta de milho os níveis nutricionais considerados críticos são: N (27,5 g kg⁻¹), P (1,9 g kg⁻¹), K (17,5 g kg⁻¹), Ca (2,3 g kg⁻¹), Mg (1,5 g kg⁻¹), S (1,5 g kg⁻¹), para macronutrientes; e Cu (6 mg kg⁻¹), Fe (50 mg kg⁻¹), Mn (42 mg kg⁻¹), Zn (15 mg kg⁻¹), para micronutrientes.

O Cu, Fe e Mn apresentaram concentrações foliares médias adequadas (CANTARELLA; RAIJ; CAMARGO, 1997), cuja faixa adequada para estes nutrientes é de 6-20, 30-250 e 20-200 mg kg⁻¹, respectivamente. As concentrações de micronutrientes do presente trabalho foram superiores tanto aos valores considerados críticos por Büll (1993), quanto aos encontrados por Cruz et al. (2008) estudando a cultura do milho (exceto para zinco), que observaram as concentrações de: 8 mg kg⁻¹ de Cu, 91 mg kg⁻¹ de Fe, 15 mg kg⁻¹ de Mn e 30 mg kg⁻¹ de Zn.

4.2 ALTURA DA PLANTA, ALTURA DE INSERÇÃO DA ESPIGA E DIÂMETRO BASAL DO COLMO

O híbrido triplo DKB 350 apresentou maior altura de plantas (incremento médio de 0,15 m quando comparado ao DKB 390) (Tabela 5), o que possivelmente ocorreu devido maior variabilidade genética (heterogeneidade) do híbrido triplo em relação a homogeneidade

do híbrido simples. Por outro lado, o híbrido simples DKB 390 foi superior na altura de inserção de espiga e obteve maior diâmetro basal do colmo (0,14 m e 0,33 cm superior ao DKB 350, respectivamente). Dentre as avaliações biométricas, a inoculação com *Azospirillum brasilense* influenciou apenas à altura de inserção da espiga, incrementando-a em 6% em relação a ausência de inoculação, o que demonstra o efeito da bactéria na síntese de fitohormônios como as auxinas, que promovem o alongamento celular e crescimento de plantas.

Tabela 5- Altura da planta, altura de inserção da espiga e diâmetro basal do colmo de milho, em função de híbridos e inoculação ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, safra 2014/15.

	Altura de plantas (m)	Altura de inserção da espiga (m)	Diâmetro do colmo (cm)
Híbridos			
DKB 390	2,21 b	1,15 a	2,35 a
DKB 350	2,36 a	1,01 b	2,02 b
DMS (5%)	0,12	0,06	0,24
Inoculação			
Com <i>Azo</i>	2,33 a	1,11 a	2,16 a
Sem <i>Azo</i>	2,23 a	1,05 b	2,21 a
DMS (5%)	0,12	0,06	0,24
Teste F			
Híbrido (H)	7,08*	31,86**	9,89*
Inoculação (I)	2,46 ^{ns}	5,23*	0,18 ^{ns}
Média geral	2,28	1,08	2,19
CV (%)	4,82	4,57	9,61

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**, * e ^{ns}: significativas em $p < 0,01$, $0,01 < p < 0,05$, e não significativas, respectivamente.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Muller (2013) avaliando a inoculação via semente com *A. brasilense* observou incremento na altura de plantas e de inserção da espiga de milho. Sendo que para a altura de plantas e altura de inserção da espiga, de plantas inoculadas, os valores observados foram de 2,22 e 1,22 m; enquanto que no presente trabalho foi de 2,33 e 1,11 m, ou seja, as plantas cresceram mais porém com aumento significativo apenas para altura de inserção da espiga. Em contrapartida, avaliando a inoculação com *A. brasilense*, Lana et al. (2012) e Portugal (2015) não verificaram incremento na altura de plantas e altura de inserção de espiga, e Pandolfo et al. (2015) também descreveram que a altura de plantas, de inserção da espiga e o diâmetro do colmo também não foram influenciados pela inoculação com tal bactéria, resultados estes que em parte corroboram com os obtidos nesta pesquisa.

Kappes et al. (2013) trabalhando com inoculação via semente do híbrido DKB 390 relataram incremento significativo na altura de plantas e de inserção de espiga (incremento de 3%) nas plantas inoculadas, porém o diâmetro do colmo permaneceu o mesmo com a inoculação, semelhante ao que ocorreu no presente trabalho.

Possivelmente, a maior altura de inserção de espiga verificada em plantas inoculadas esteja relacionada à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias, como fitormônios como o ácido indol-acético (AIA), excretados por *Azospirillum* que desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas em geral (BASHAN; HOLGUIN, 1997). Dartora et al. (2013) avaliando inoculação com a combinação de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, constataram incremento no diâmetro do colmo de plantas de milho, porém esta inoculação não influenciou na altura destas plantas, assim como na presente pesquisa.

4.3 COMPRIMENTO E DIÂMETRO DA ESPIGA, NÚMERO DE FILEIRAS POR ESPIGA, GRÃOS POR FILEIRA E GRÃOS POR ESPIGA

A inoculação com *A. brasilense* não influenciou o comprimento da espiga, número de grãos por fileira e número de grãos por espiga, e ainda este último componente não foi influenciado pelos híbridos testados (Tabela 6). Entretanto, Cavallet et al. (2000) e Kappes et al. (2013) relataram resposta positiva da inoculação com *Azospirillum brasilense* com incremento de 3,7 e 6%, respectivamente, no comprimento de espigas de cultivares de milho.

Tabela 6- Comprimento e diâmetro da espiga, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira e número de grãos por espiga do milho, em função de híbridos e inoculação ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, safra 2014/15.

	Comprim. de espiga (cm)	Diâmetro espiga (cm)	Nº fileiras por espiga	Nº grãos por fileira	Nº de grãos por espiga
Híbridos					
DKB 390	18,10 b	5,05	16,67 a	32,38 b	533 a
DKB 350	19,98 a	4,92	15,00 b	38,67 a	586 a
DMS (5%)	1,54	0,21	1,08	2,37	55,6
Inoculação					
Com <i>Azo</i>	18,73 a	5,15	16,50 a	35,33 a	579 a
Sem <i>Azo</i>	19,33 a	4,82	15,17 b	35,71 a	540 a
DMS (5%)	1,54	0,21	1,08	2,37	55,6
Teste F					
Híbrido (H)	7,42*	2,13 ^{ns}	12,22**	36,16**	4,65 ^{ns}
Inoculação (I)	0,79 ^{ns}	13,14**	7,80*	0,13 ^{ns}	2,52 ^{ns}
H x I	0,05 ^{ns}	3,38**	1,96 ^{ns}	2,93 ^{ns}	2,02 ^{ns}
Média geral	19,03	4,99	15,83	35,52	559,56
CV (%)	7,15	3,71	6,03	5,89	8,78

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**, * e ^{ns}: significativas em $p < 0,01$, $0,01 < p < 0,05$, e não significativas, respectivamente.

Fonte: Elaboração da própria autora.

O híbrido triplo apresentou comprimento de espiga e número de grãos por fileira 10 e 19% superior, respectivamente, ao híbrido simples DKB 390. Possivelmente isso se deu por conta da semeadura tardia dos híbridos e pelo efeito do clima (Figura 1), com ocorrência de altas temperaturas durante o ciclo (principalmente entre V3 e R1), então o DKB 350 (por ser um híbrido triplo, de maior adaptabilidade, menos exigente que o híbrido simples DKB 390) se adaptou melhor à essas condições, e o híbrido simples não respondeu tão bem as mesmas. Mello (2012), avaliando dois híbridos simples (DKB 245 e AG 8025) observou diferença de 12% no comprimento da espiga dos mesmos.

Ocorreu interação significativa entre híbridos e inoculação, para o diâmetro da espiga, e o desdobramento se encontra na Tabela 7. O híbrido DKB 390 apresentou maior diâmetro de espiga quando inoculado com *Azospirillum brasilense*, e o DKB 350 foi indiferente à inoculação. Com a inoculação houve maior diâmetro da espiga para o híbrido simples DKB 390, e na ausência da bactéria, os híbridos apresentaram semelhantes diâmetros da espiga; de forma que o híbrido simples demonstrou sua maior responsividade a maior disponibilidade de N propiciada pela inoculação com as bactérias.

A inoculação com *Azospirillum brasilense* propiciou maior número de fileiras por espiga (Tabela 6). Estes resultados diferem dos encontrados por Kappes et al. (2013) e

Cavallet et al. (2000) que não constatarem influência da inoculação de sementes com *A. brasilense* no número de fileiras por espiga e diâmetro de espiga.

Há uma relação como é possível observar, entre o número de fileiras por espiga e o número de grãos por fileira, sendo que em ambos os híbridos, com o incremento do número de grãos por fileira conseqüentemente o número de fileiras por espiga foi reduzido e vice-versa devido ao efeito compensatório manifestado nas espigas. Esse efeito (embora não significativo) também se manifesta com relação a inoculação, pois na sua presença há maior número de fileiras por espiga, resultando portanto em menor número de grãos por fileira e menor comprimento de espiga.

Tabela 7- Desdobramento da interação híbrido e inoculação com *A. brasilense*, da análise de variância referente ao diâmetro da espiga em plantas de milho. Selvíria – MS, safra 2014/15.

Híbridos	Inoculação	
	Com <i>Azospirillum</i>	Sem <i>Azospirillum</i>
DKB 390	5,31 aA	4,80 aB
DKB 350	5,00 bA	4,84 aA
DMS (5%)	0,30	

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Godoy et al. (2011) não relataram incremento no número de grãos por fileira e número de grãos por espiga testando inoculação com *A. brasilense* via sementes em milho. Também Novakowski et al. (2011) descreveram que o número de grãos por fileira e o número de fileiras por espiga não foram influenciados significativamente pela inoculação com esta bactéria, possivelmente porque estas avaliações sejam mais dependentes do genótipo do milho.

Componentes de produção como número de fileiras por espiga e tamanho da espiga são definidos nos estádios V4-V6, necessitando nesse período de fornecimento adequado de N, deste modo a ocorrência de deficiência de N nesta fase reduz o número de óvulos nos primórdios da espiga (SCHRODER et al., 2000).

Para Repke et al. (2013), os fatores que interferem nas respostas das culturas à inoculação de *Azospirillum* ainda não estão totalmente esclarecidos. Resultados de sucesso encontrados na literatura da associação planta - bactéria 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 (MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006).

Embora a inoculação não tenha influenciado significativamente o número de grãos por espiga, ainda assim é possível observar incremento de 7,2% nos híbridos inoculados, o que de certa forma explica os resultados positivos da produtividade de grãos, que serão descritos a seguir.

Avaliando três híbridos de milho (dois híbridos simples e um híbrido triplo) inoculados com uma mistura de três espécies de *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. oryzae*), Quadros et al. (2014) verificaram que houve interação entre os genótipos de milho e as bactérias inoculadas, de modo que, cada híbrido testado respondeu de forma diferente à inoculação. A inoculação por *Azospirillum* em milho demonstrou estimular o desenvolvimento das plantas no período vegetativo, aumentando a probabilidade de obter-se um estande de plantas uniforme, maior resistência ao estresse e maior concentração de clorofila nas folhas, podendo resultar em maior produtividade da cultura.

4.4 MASSA DE 100 GRÃOS E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS

Com relação à massa de 100 grãos (Tabela 8), apesar de ser um importante componente da produtividade do milho, não foi influenciado pela inoculação e nem tampouco pelos híbridos testados. Tais dados corroboram com os encontrados por Kappes et al. (2013), Repke et al. (2013), Basi (2013) e Araújo et al. (2015) que também não observaram influência significativa da inoculação com *A. brasilense* na massa de mil grãos.

Trabalhando com sete híbridos associados ou não a inoculação com *Azospirillum brasilense*, Santos et al. (2011), verificaram que não houve diferença em nenhum dos híbridos em relação a inoculação para a massa de mil grãos. Também Portugal et al. (2012) não constataram diferenças na massa de mil grãos de milho (primeira safra) com aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* em relação ao sem aplicação foliar.

Tabela 8- Massa de 100 grãos e produtividade de grãos de milho em função de híbridos e inoculação ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, safra 2014/15.

	Massa de 100 grãos (g)	Produtividade de grãos (kg ha ⁻¹)
Híbridos		
DKB 390	31,91 a	6832 a
DKB 350	29,98 a	6443 a
DMS (5%)	2,39	646
Inoculação		
Com <i>Azo</i>	30,17 a	7186 a
Sem <i>Azo</i>	31,72 a	6089 b
DMS (5%)	2,39	646
Teste F		
Híbrido (H)	3,35 ^{ns}	1,86 ^{ns}
Inoculação (I)	2,16 ^{ns}	14,77 ^{**}
H x I	1,34 ^{ns}	2,56 ^{ns}
Média geral	30,95	6637
CV (%)	6,83	8,61

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** , * e ^{ns}: significativas em $p < 0,01$, $0,01 < p < 0,05$, e não significativas, respectivamente.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Borrás e Otegui (2001) descrevem que a massa de grãos é o componente da produção menos alterado por variações nas práticas de manejo e adubação. Contudo, de acordo com Ohland et al. (2005), esta é uma característica influenciada pelo genótipo, pela disponibilidade de nutrientes e pelas condições climáticas durante os estádios de enchimento dos grãos.

Novakowski et al. (2011), trabalhando com a cultura do milho observaram que quando foi efetuada a inoculação por *A. brasilense*, a massa de mil grãos foi inferior quando comparada à adubação nitrogenada, contudo superior ao controle (sem fertilizante nitrogenado e sem inoculação de *A. brasilense*), o que indica que tais formas de manejo isoladas não apresentam bons resultados, porém a combinação das mesmas (fertilizante nitrogenado + bactéria) pode reduzir a quantidade de insumos utilizada na cultura, elevando a massa de grãos e consecutivamente a produtividade da cultura.

A bactéria inicialmente pode ter utilizado alguma forma de N para o seu estabelecimento e depois pode não ter sido eficiente em fixar o N atmosférico e fornecê-lo a planta (PORTUGAL, 2015), pois segundo Tarrand, Krieg e Dobereiner (1978), o *Azospirillum* pode usar NH_4^+ , NO_3^- , aminoácidos e N_2 como fonte de N para seu crescimento. Entretanto, Costa et al. (2015) constataram que a inoculação via semente é capaz de incrementar 8,5 g na massa de mil grãos para cada kg de fertilizante nitrogenado aplicado.

Com relação a produtividade de grãos não houve interação entre híbridos e inoculação (Tabela 8), e os híbridos não diferiram entre si, o que demonstra efeito da época de cultivo. Por conta das condições de temperaturas elevadas ao longo do ciclo (Figura 1), principalmente entre V3 e R2, a cultura acumulou graus-dias mais rapidamente encurtando seu ciclo, o que fez com que os híbridos (principalmente o simples DKB 390) não conseguissem expressar todo o seu potencial produtivo.

Contudo, a inoculação com *A. brasilense* propiciou maior produtividade de grãos de milho, com aumento de 1.097 kg ha⁻¹ em relação à testemunha não inoculada, correspondendo a um incremento de 18%. Estes resultados podem ser explicados pela maior absorção e acúmulo de nutrientes nos grãos de milho, que serão apresentados posteriormente, quando os híbridos de milho foram inoculados. Isto se deve a capacidade desta bactéria ser diazotrófica (fixação biológica de N₂), e principalmente pela capacidade do *A. brasilense* em sintetizar hormônios que contribuem no crescimento dos tecidos das plantas, principalmente do sistema radicular, o qual mais vigoroso possibilita maior absorção de água e nutrientes, assim como maior redistribuição de nutrientes e fotoassimilados para espiga.

Semelhantemente, Kappes et al. (2013) relataram acréscimo de cerca de 9% (896 kg ha⁻¹) na produtividade do híbrido DKB 390 quando as sementes foram inoculadas com *A. brasilense* em condições de cerrado. Cavallet et al. (2000) também constataram incrementos de cerca de 17% na produtividade de grãos de milho em função da inoculação com *Azospirillum* spp. Da mesma forma, Hungria et al. (2010) verificaram que esta bactéria proporcionou aumento de 24 a 30% na produtividade de grãos de milho quando comparado a ausência de inoculação. Por sua vez, Lana et al. (2012) relataram que a inoculação de *Azospirillum brasilense* promoveu incrementos de 7-14% na produtividade de grãos de milho, mesmo sem a adição de N pelo fertilizante. Entretanto, Godoy et al. (2011) não observaram incremento na produtividade de milho, com *Azospirillum brasilense* associado a doses de N. Por outro lado, Novakowski et al. (2011) e Galindo et al. (2016) verificaram que a produtividade de grãos de milho foi maior com a inoculação de *A. brasilense* via semente quando comparada a testemunha, mesmo com o aumento da quantidade de N aplicada. O que também se deve levar em consideração é o fato de que clima e tipo de solo interferem na adaptação das bactérias inoculadas, o que pode dependendo do local de estudo, influenciar nos resultados da inoculação (QUADROS et al., 2014).

Segundo Muller (2013), a inoculação com *A. brasilense* no sulco de semeadura incrementa a produtividade de grãos de milho, além de promover aumento de altura da planta e altura de inserção de espiga, beneficiando as características morfológicas da planta. De

acordo com Costa et al. (2015), a inoculação com *A. brasilense* aumenta a altura de plantas de milho, diâmetro do caule, teor de clorofila foliar, matéria seca de raízes e parte aérea, massa de mil grãos, comprimento da espiga e a produtividade o de grãos, quando o milho é inoculado via semente ou via foliar.

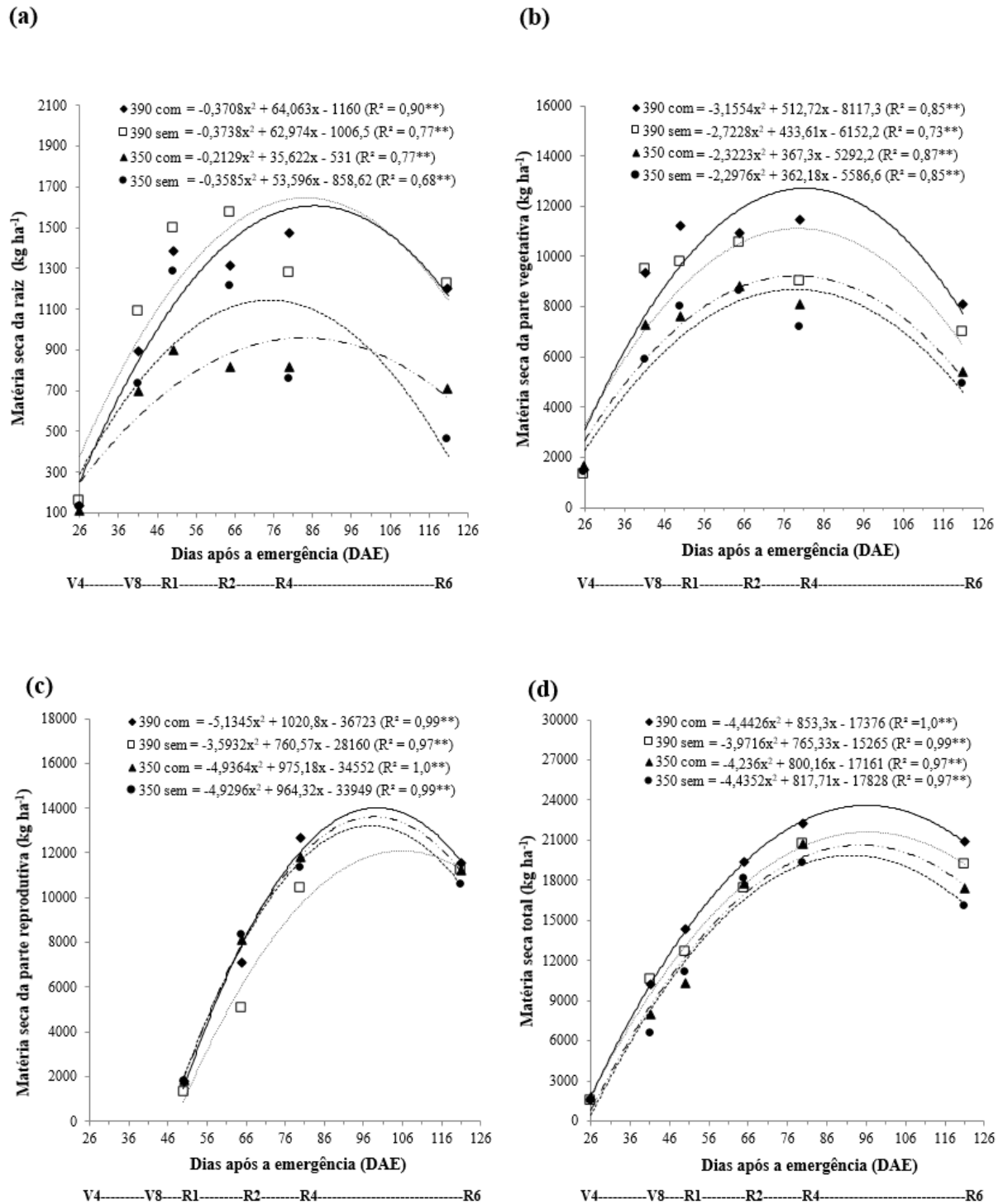
4.5 ACÚMULO DE MATÉRIA SECA (MS) AO LONGO DO CICLO

Para a matéria seca de raízes dos híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense* (Figura 3a), houve ajuste a funções quadráticas, com maiores acúmulos de MS de raízes entre R1 e R4, devido essa ser a fase de florescimento e ocorrência da polinização (que define o número de óvulos que serão fecundados e darão origem aos grãos) até a fase que os grãos se encontram farináceos. Nesse período a planta precisa estar bem nutrida, assimilar elevada quantidade dos nutrientes, e qualquer estresse ambiental pode resultar em má formação da espiga (pontas chochas) (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003). Por isso nessa etapa o sistema radicular precisa estar bem desenvolvido. Ao longo do ciclo obviamente ocorre a senescência do sistema radicular, assim como do restante dos órgãos vegetativos da planta.

O pico de acúmulo de MS de raízes do híbrido triplo (DKB 350) tanto com quanto sem a inoculação foi no florescimento (Figura 3a). No híbrido simples (DKB 390) isso aconteceu mais tardiamente, em estádios posteriores ao florescimento, sendo em R2 quando não foi inoculado e R4 quando foi inoculado. Neste último, houve maior sobrevivência do sistema radicular que permaneceu ativo por mais tempo, absorvendo água e nutrientes por um maior volume de raízes (incremento de 29% de raízes como veremos posteriormente na tabela 9) resultando então em maior produtividade de grãos devido à inoculação com a bactéria.

O híbrido DKB 350 inoculado com *Azospirillum brasilense*, quando comparado ao mesmo híbrido não inoculado, do início do desenvolvimento da cultura até o enchimento de grãos ocorreu menor acúmulo de MS de raízes, contudo nos estádios finais do ciclo (R4 à R6) os valores do híbrido inoculado se elevaram e este alcançou maior acúmulo de MS de raízes na maturidade fisiológica (704 kg ha⁻¹, sendo 54% superior ao mesmo híbrido não inoculado); confirmando a competência destas bactérias em promover o crescimento dos tecidos vegetais, assim como relataram Dobbelaere et al. (2002).

Figura 3- Acúmulo de matéria seca das raízes (a), parte vegetativa (folhas+colmos) (b), parte reprodutiva (pendão + espiga) (c) e planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

A matéria seca da parte vegetativa no início do ciclo (V4) (Figura 3b), assim como das raízes, também representa pouco do total de matéria seca acumulada pela parte vegetativa até o final do ciclo, sendo que em média apenas 1497 kg ha⁻¹ ou 23% foi o que se observou de MSPV no primeiro estágio de coleta.

Os maiores acúmulos de MS da parte vegetativa se concentram entre V8 (oitava folha com bainha totalmente expandida) e R4. Porém com pico de acúmulo ocorrendo em R2 para todos os tratamentos (uma vez que esse estágio envolve o início do enchimento de grãos, ou seja, quando as folhas e colmos da planta começam a entrar em processo de senescência e, conseqüentemente, perda de matéria seca), exceto para DKB 390 inoculado que aconteceu após o estágio de grão leitoso (mais especificamente em R4), obtendo este híbrido também, maior valor de acúmulo de MS da parte vegetativa em relação aos outros tratamentos, com 11.489 kg ha⁻¹, e sendo 16% superior quando este não foi inoculado. Também o DKB 350 quando foi inoculado alcançou maior pico de acúmulo (8849 kg ha⁻¹) em relação à quando não foi (8588 kg ha⁻¹). Esses resultados não assemelham-se aos encontrados por Borges (2006) que estudando dois híbridos simples de milho precoces (GNZ2004 e P30F33) observou maior acúmulo de folhas e colmos em R5, e por Vasconcelos et al. (1983), que relataram pico de acúmulo mais antecipado, próximo ao florescimento, entretanto, os dois autores verificaram valores de MS da parte vegetativa semelhantes à do presente trabalho.

A redução da MS da parte vegetativa do pico de acúmulo ao final do ciclo da cultura, que ocorreu na maioria dos tratamentos após o início do enchimento de grãos, foi mais intensa para o híbrido triplo inoculado (33% de decréscimo), sendo a menor perda de 22% para o híbrido simples não inoculado; enquanto que Vasconcelos; Viana; Ferreira (1998) encontraram reduções em materiais menos produtivos de cerca de 19 e 11% para a MS da parte vegetativa de uma variedade e de um híbrido duplo, respectivamente.

A MS da parte vegetativa no final do ciclo representou da MS total, cerca de 39% para o DKB 390 inoculado e 28% para o DKB 390 não inoculado (sendo que primeiro ao longo de todo o ciclo da planta sempre foram verificados valores que superavam os demais tratamentos); e 31,4 e 31% para o DKB 350 inoculado e não inoculado, demonstrando a propensão do híbrido simples para o crescimento da parte vegetativa quando inoculado com *A. brasilense*, provavelmente pelo efeito fitohormonal das auxinas estimulado por estas bactérias.

Dartora et al. (2013), trabalhando com a mistura de estirpes de bactérias diazotróficas, relataram incrementos no diâmetro basal do colmo, matéria seca de parte aérea e produtividade de grãos de milho, em função da interação diferenciada das bactérias com a

planta. Quadros et al. (2014) também observaram aumento de MS da parte aérea em híbridos de milho inoculados com *Azospirillum* spp.

Os máximos acúmulos de MS da parte reprodutiva dos tratamentos ficaram entre R4 e R6 (Figura 3c), quando os grãos possuem cerca de 70% de umidade e já acumularam em torno de metade de sua massa seca da maturação (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003), até a sua plena maturidade fisiológica. Neste período os híbridos inoculados apresentaram sempre maiores valores de MS da parte reprodutiva em relação aos não inoculados, sendo que o híbrido DKB 390 inoculado se destacou com o maior acúmulo nestes órgãos em relação aos demais tratamentos (12.634 kg ha⁻¹, 13% superior ao não inoculado), e o híbrido DKB 350 inoculado com 11.799 kg ha⁻¹ (apenas 4% superior ao não inoculado). De acordo com Bergonci et al. (2001), o acúmulo de matéria seca vegetal é decorrente do mecanismo fotossintético, o qual incorpora matéria orgânica na planta, deste modo, todo e qualquer fator que interfira significativamente na fotossíntese irá afetar o acúmulo de matéria seca, destacando-se a nutrição mineral, radiação e disponibilidade hídrica.

O híbrido DKB 390 não inoculado atingiu o pico MS da parte reprodutiva no estágio R6, e nos demais tratamentos em R4. Semelhantemente, Borges (2006) ao avaliar dois híbridos simples de milho precoces, em um Latossolo Vermelho Distroférrico do sul de Minas Gerais, verificou máximo acúmulo de MS nos grãos+sabugos em R6, porém com valores muito superiores ao deste trabalho.

Com relação a MS total das plantas de milho (Figura 3d), o acúmulo inicial foi lento para todos os tratamentos até os 26 DAE, sendo que o DKB 350 inoculado foi o híbrido que conseguiu acumular mais MS até esse período, chegando ao valor de 1775 kg ha⁻¹ de MS total (correspondente a 10% do acúmulo total no final do ciclo). Após os 26 DAE (V4) e até a retirada da cultura do campo ocorreu significativo incremento da MS total, com um pequeno decréscimo entre R4 e R6. Nota-se comumente redução na quantidade de MS da planta no término de seu ciclo, especialmente após a formação da metade da massa total de grãos (VASCONCELLOS et al., 1983), o que provavelmente ocorre devido à senescência de parte das folhas e à lixiviação de potássio das folhas e do colmo, além do aumento da capacidade de dreno da espiga (VON PINHO et al., 2009).

A redução de acúmulo de MS e nutrientes no final do ciclo de desenvolvimento das plantas foi descrita também nos trabalhos de Bassoi e Reichardt (1995) e Duarte et al. (2003), porém, estes não avaliavam a interação do *Zea mays* com tal bactéria. Em contrapartida, Vasconcellos et al. (1983) e Von Pinho et al. (2009) observaram respostas lineares estudando o acúmulo de MS em diferentes genótipos de milho.

Os maiores acúmulos de MS total ficaram entre R2 (início do enchimento de grãos, quando o amido começa a se acumular no interior do grão) e R6, e os acúmulos máximos dos tratamentos foram em R4 para todos os tratamentos, sendo os híbridos inoculados os que apresentaram maiores acúmulos de MS total, com destaque para o DKB 390 inoculado o qual foi 7% superior ao não inoculado, 31% superior em relação ao DKB 350 não inoculado, e 21% superior em relação ao DKB 350 inoculado (que por sua vez se sobressaiu em 8% comparado com a sua versão não inoculada).

Os valores de matéria seca total acumulada pelos híbridos de milho foram de 20.889 e 17.327 kg ha⁻¹ para os híbridos 390 e 350 inoculados, e de 19.212 e 15.997 kg ha⁻¹ para os mesmos híbridos não inoculados, respectivamente. Valores estes iguais ou superiores aos encontrados em outros trabalhos que também estudaram a matéria seca de plantas de milho, embora sem a avaliação de raízes, como o de Hiroce, Furlani e Lima (1989) e o de Duarte et al. (2003) que constataram média de 13.500 e 16.200 kg ha⁻¹, respectivamente. Porém Von Pinho et al. (2009) também em Latossolo Vermelho obtiveram 31.300 kg ha⁻¹ de MS total. Os resultados alcançados nesse trabalho demonstram a maior capacidade de acúmulo de MS do híbrido simples DKB 390, supostamente devido ao maior porte da planta, diâmetro do colmo e produtividade de grãos desse híbrido. Também o que é de crucial importância a se considerar é o crescimento do tecido vegetal pela síntese de hormônios promovida pelo *A. brasilense* nas plantas, visto que nos híbridos inoculados o acúmulo de MS total foi superior aqueles onde não foi utilizada esta bactéria.

Os maiores acúmulos de MS total para os híbridos inoculados com *A. brasilense* se devem a superioridade da MS da parte vegetativa e, principalmente, da MS da parte reprodutiva (grãos) propiciado por esta bactéria diazotrófica. Incrementos relativos na produção de matéria seca de plantas de milho também foram constatados por Braccini et al. (2012), com a inoculação de sementes por *A. brasilense*.

4.6 ACÚMULO FINAL DE MATÉRIA SECA (MS) NOS ÓRGÃOS DA PLANTA E TOTAL

Para a produção de matéria seca (MS) de raízes, das partes vegetativa e reprodutiva e total do milho, não houve interação entre híbridos e inoculação com *A. brasilense* (Tabela 9). Porém, verificou-se que a inoculação com *A. brasilense* proporcionou significativo aumento da MS das raízes dos híbridos, incremento este de 211,5 kg ha⁻¹ (29% superior ao não inoculado). Tal comportamento foi possível devido ao estímulo fitohormonal e promotor do

crescimento de plantas propiciado por esta bactéria, que neste caso incrementou o volume de raízes dos híbridos.

Tabela 9- Matéria seca das raízes (MS raízes), matéria seca da parte vegetativa (MSPV), matéria seca da parte reprodutiva (MSPR) e matéria seca total (MS total) no final do ciclo (R6) de híbridos de milho inoculados ou não com *A. brasilense*. Selvíria – MS, safra 2014/15.

	MS raízes	MSPV	MSPR	MS total
-----kg ha ⁻¹ -----				
Híbridos				
DKB 390	1.114 a	7.570 a	11.367 a	20.051 a
DKB 350	582 b	5.195 b	10.886 a	16.662 a
DMS (5%)	97,6	1.278	3.208	4.203
Inoculação				
Com <i>Azospirillum</i>	954 a	6.787 a	11.367 a	19.108 a
Sem <i>Azospirillum</i>	742 b	5.977 a	10.886 a	17.605 a
DMS (5%)	97,66	1.278	3.208	4.203
Teste F				
Híbrido (H)	152,14**	17,68**	0,12 ^{ns}	3,33 ^{ns}
Inoculação (I)	24,01**	2,06 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,65 ^{ns}
H x I	0,63 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}
Média geral	848	6.382	11.126	18.356
CV (%)	10,18	17,70	25,49	20,24

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

** , * e ^{ns}: significativas em $p < 0,01$, $0,01 < p < 0,05$, e não significativos, respectivamente.

A MS de raízes e MS da parte vegetativa foram influenciadas pelos híbridos de milho, sendo que o híbrido simples DKB 390 superou o triplo DKB 350 em 92% para a MS de raízes e em 46% para a MS da parte vegetativa (Tabela 9), devido ao maior porte da planta e diâmetro do colmo desse híbrido, o que se explica pela maior homogeneidade e heterose deste híbrido. Entretanto, a MS da parte reprodutiva e MS total não foram influenciadas significativamente pelos híbridos e inoculação, apesar dos maiores valores numéricos obtidos para o tratamento inoculado (4% maior na MS reprodutiva e 9% maior na MS total) e para o híbrido simples.

Muñoz-Garcia, Caballero-Mellado e Valdés (1991), estudando a inoculação de sementes de milho com *A. brasilense* também relataram aumento na MS de raízes, da ordem de 54 a 86%, e de 23 a 64% na MS da parte aérea. Ferreira et al. (2013), avaliando o *A. brasilense* em solo argiloso, também verificaram maiores valores de massa seca da planta nos tratamentos com esta bactéria. Por sua vez, Didonet et al. (1996) relataram diversas evidências de que a inoculação via sementes com *A. brasilense* em milho, seja responsável pelo aumento da taxa de acúmulo de MS, principalmente associado a altas doses de N, o que pode estar relacionado com o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e da assimilação de nitrogênio.

Reis Júnior et al. (2008) verificaram maior produção de MS e acúmulo de N nas raízes em raízes de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum amazonense*.

Com base em dados de pesquisa de 22 anos com experimentos de inoculação a campo, Okon e Vanderleyden (1997) constataram que bactérias do gênero *Azospirillum* spp. promovem ganhos em produtividade em importantes culturas nas mais variadas condições de clima e solo; contudo, enfatizam que os incrementos não são simplesmente devido a fixação biológica do nitrogênio, mas se devem também ao aumento da superfície de absorção das raízes da planta e, conseqüentemente, no aumento do volume de solo explorado. Devido ao fato da inoculação modificar a morfologia do sistema radicular, aumentando não apenas o número de radículas, mas, também, o diâmetro médio das raízes laterais e adventícias. Muitos desses efeitos ou parte deles podem ser atribuídos à produção de substâncias promotoras de crescimento (auxinas, giberilinas e citocininas) pelas bactérias, e não somente a fixação biológica de nitrogênio (VINHAL-FREITAS; RODRIGUES, 2010).

Barilli et al. (2011) verificaram aumento na porcentagem de emergência e semelhantemente nas massas secas de raízes e da parte aérea do milho com a inoculação de *A. brasilense*, porém precocemente (aos 12 dias após a semeadura). Por outro lado, Okon e Vanderleyden (1997) relataram respostas positivas para a cultura do milho como aumento de matéria seca e acúmulo de N na planta, principalmente em genótipos não melhorados inoculados com *A. brasilense* com baixa disponibilidade de N no solo, diferindo assim, de certa forma, dos resultados positivos obtidos nesta pesquisa com híbridos de milho adubados com 150 kg ha⁻¹ de N.

4.7 ACÚMULO DE MACRONUTRIENTES AO LONGO DO CICLO

Quanto ao acúmulo de macronutrientes é possível observar que, durante o crescimento e desenvolvimento da planta, a absorção não se faz nas mesmas quantidades durante seus diferentes estádios, e a curva que ilustra a marcha de absorção (extração em função do tempo) é comumente uma sigmóide (MALAVOLTA, 1980).

As quantidades de macronutrientes acumulados nas raízes nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura são pequenas (Figuras 4a, 5a, 6a, 7a, 8a e 9a), e neste trabalho o híbrido que se sobressaiu no acúmulo inicial de nutrientes nas raízes no primeiro estágio de coleta (V4) para a maioria dos macronutrientes, foi o DKB 390 não inoculado sendo os valores obtidos de 1,6; 0,4; 3,4; 0,2; 0,2 e 0,2 kg ha⁻¹ de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente. Entretanto, a partir desse estágio (também devido à adubação nitrogenada de cobertura que

alavanca o desenvolvimento da cultura) a absorção desses nutrientes foram se intensificando. Borges (2006) também relatou que a quantidade de nutrientes absorvidos no início do ciclo do milho é ínfima, uma vez que os elementos contidos nas sementes ainda são mobilizados e translocados para a raízes e parte aérea até cerca de 21 dias após a semeadura, e depois desse período é importante que a região do solo que circunda as raízes possua altas concentrações de tais elementos, pois diferenças na absorção e acúmulo de nutrientes começam a se manifestar.

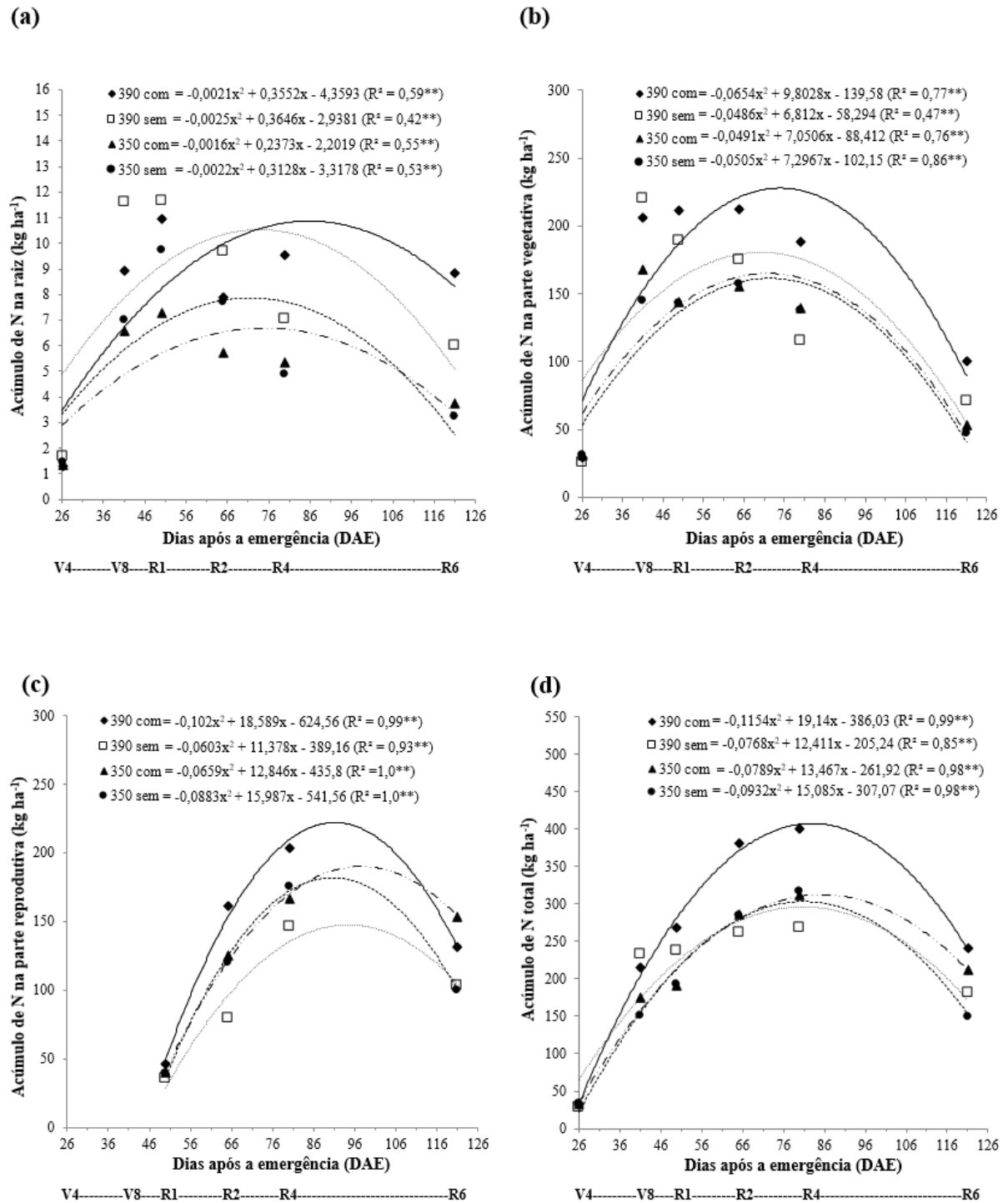
Neste mesmo órgão da planta (raízes) em todos os híbridos, o pico máximo de acúmulo de todos os macronutrientes ocorreu entre 50 e 80 dias (R1-R4), exceto para o P, onde o DKB 390 e DKB 350 não inoculados e o DKB 390 inoculado apresentaram pico de acúmulo mais precocemente, em V8 (Figura 5a). Por outro lado, ainda este último híbrido apresentou pico de acúmulo de S nas raízes mais tardiamente, na maturidade fisiológica (R6) (Figura 9a).

No fim do ciclo da cultura, há uma redução nas quantidades de todos os macronutrientes acumulados nas raízes, mais expressivamente nos híbridos não inoculados (menor volume do sistema radicular) sendo essa redução, do pico de acúmulo até R6 de: 64-86% no DKB 350 (na qual 67% de N, 86% de P, 69% de K, 69% de Ca, 64% de Mg e 75% de S) e de 36-73% no DKB 390 (na qual 49% de N, 73% de P, 65% de K, 42% de Ca, 38% de Mg e 36% de S). Ou seja, redução de 1,5-7,3 vezes no DKB 350 e 1,6-5,2 no DKB 390, provavelmente devido à maior manutenção de nutrientes pelo híbrido simples. Essa redução somente não ocorreu para o S no DKB 390 inoculado. Enquanto que para os híbridos inoculados a percentagem de redução foi de 13-67% no DKB 350 e de 18-61% no DKB 390. Portanto a bactéria fez com que os híbridos apresentassem menor redução de nutrientes do pico de acúmulo até o final do ciclo.

O híbrido que acumulou maior quantidade de macronutrientes nas raízes no final do ciclo (em R6) foi o DKB 390 inoculado, exceto para o Mg que foi mais acumulado por este mesmo híbrido na ausência de inoculação (Figura 8a).

Quando se relaciona a MS de raiz e os nutrientes contidos nestes tecidos, o que se nota é que o híbrido triplo quando inoculado com *A. brasilense*, em relação ao não inoculado, consegue manter maior massa de raízes durante o período compreendido entre o estágio de pico de acúmulo até o final do ciclo, o que possibilita manter seu acúmulo de nutrientes nas raízes durante maior período até que a cultura seja colhida, fornecendo nutrientes durante todo o ciclo. Portanto, esse decréscimo no acúmulo de macronutrientes nas raízes é resultado da redução de MS das raízes e dos processos de remobilização de nutrientes deste órgão para parte aérea da planta, mas especificamente para os grãos.

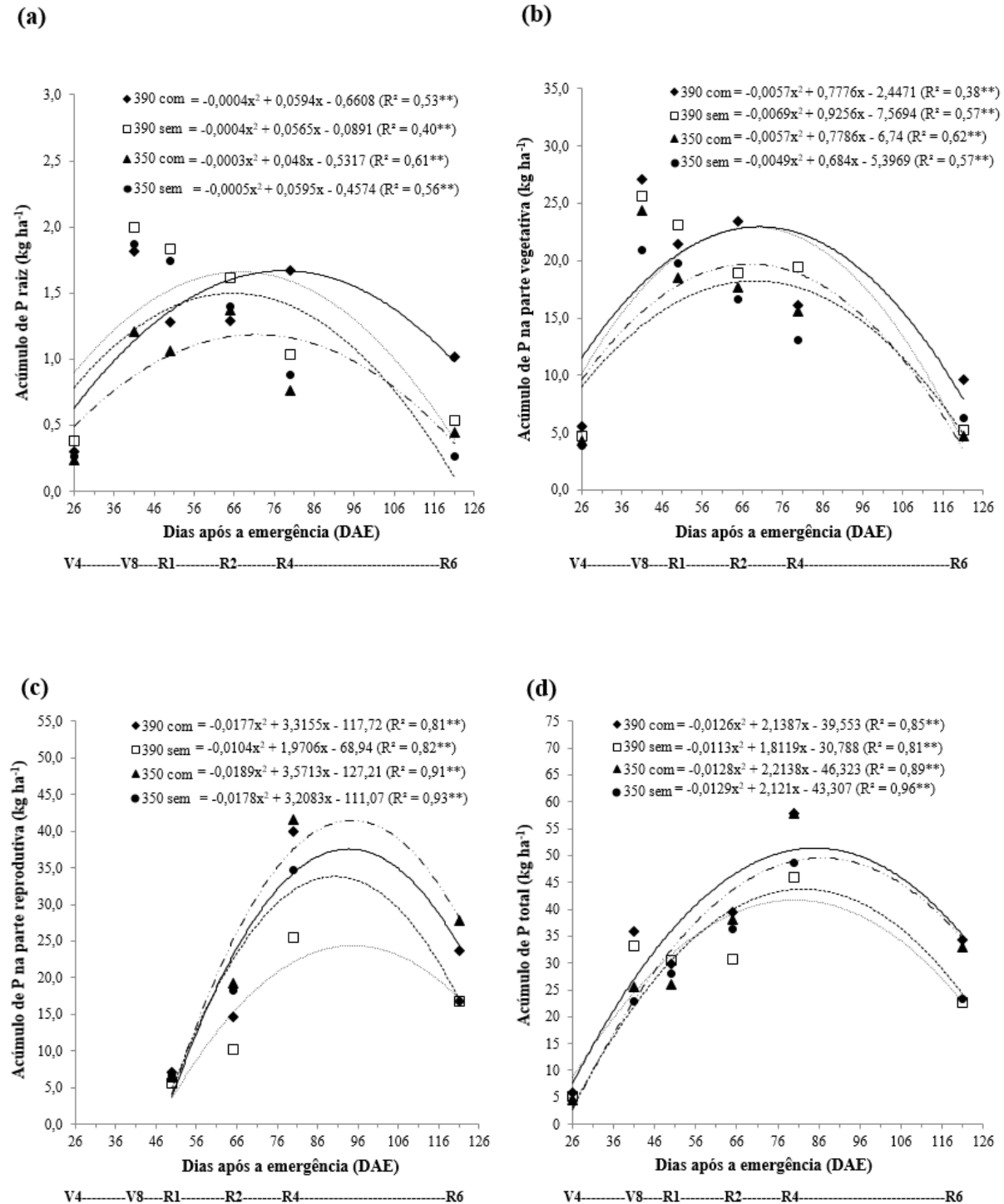
Figura 4- Nitrogênio (N) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

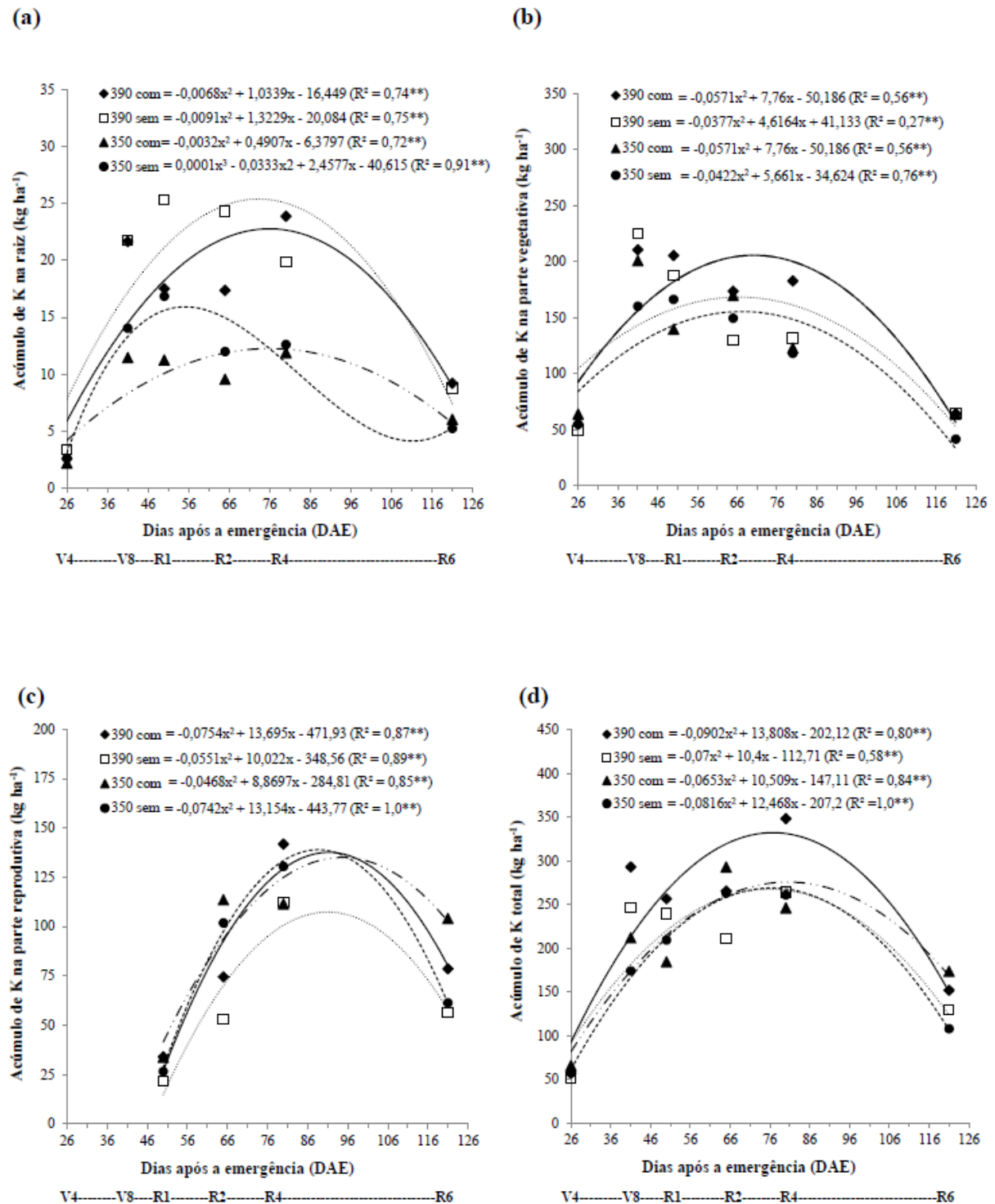
Figura 5- Fósforo (P) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

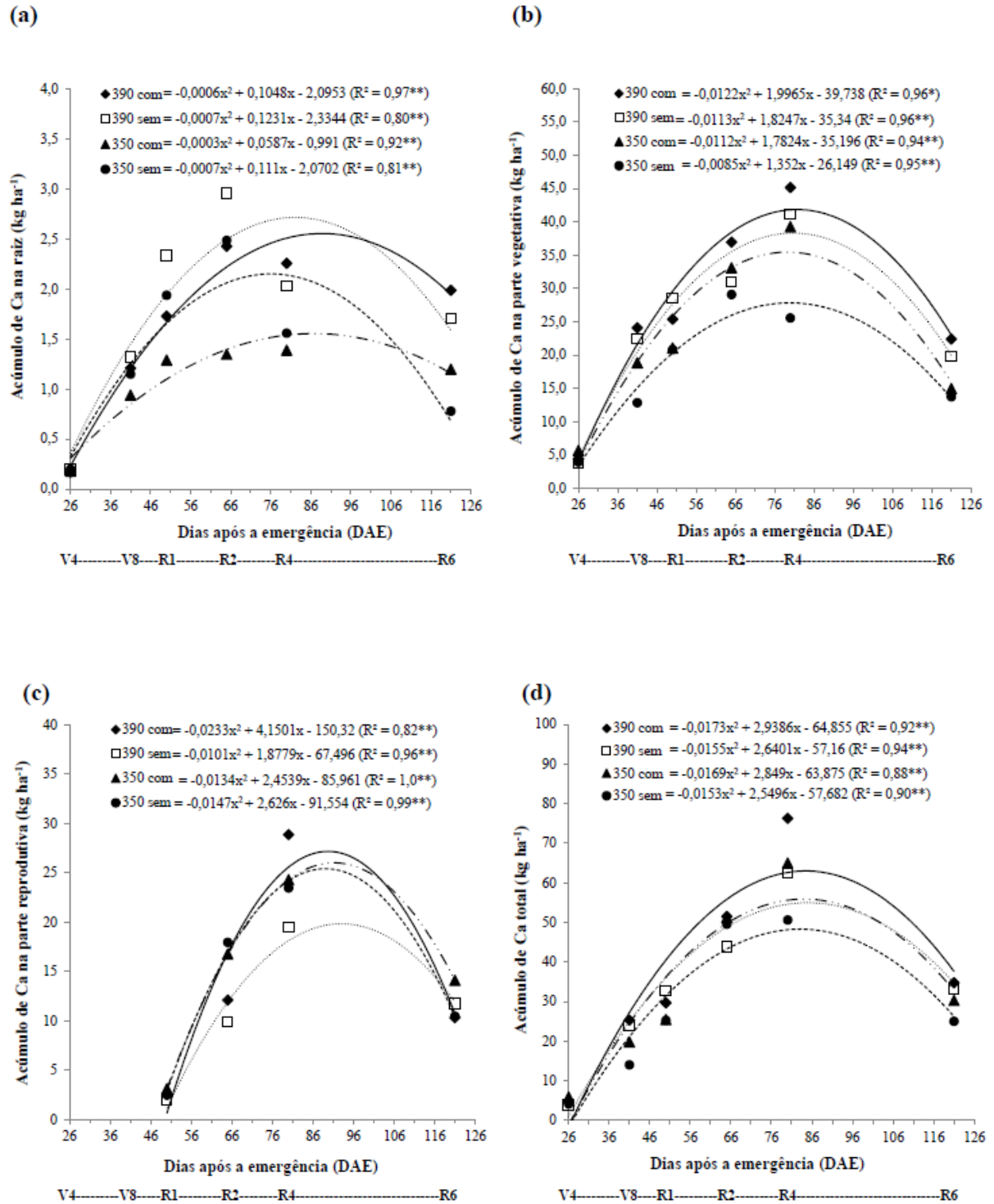
Figura 6- Potássio (K) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

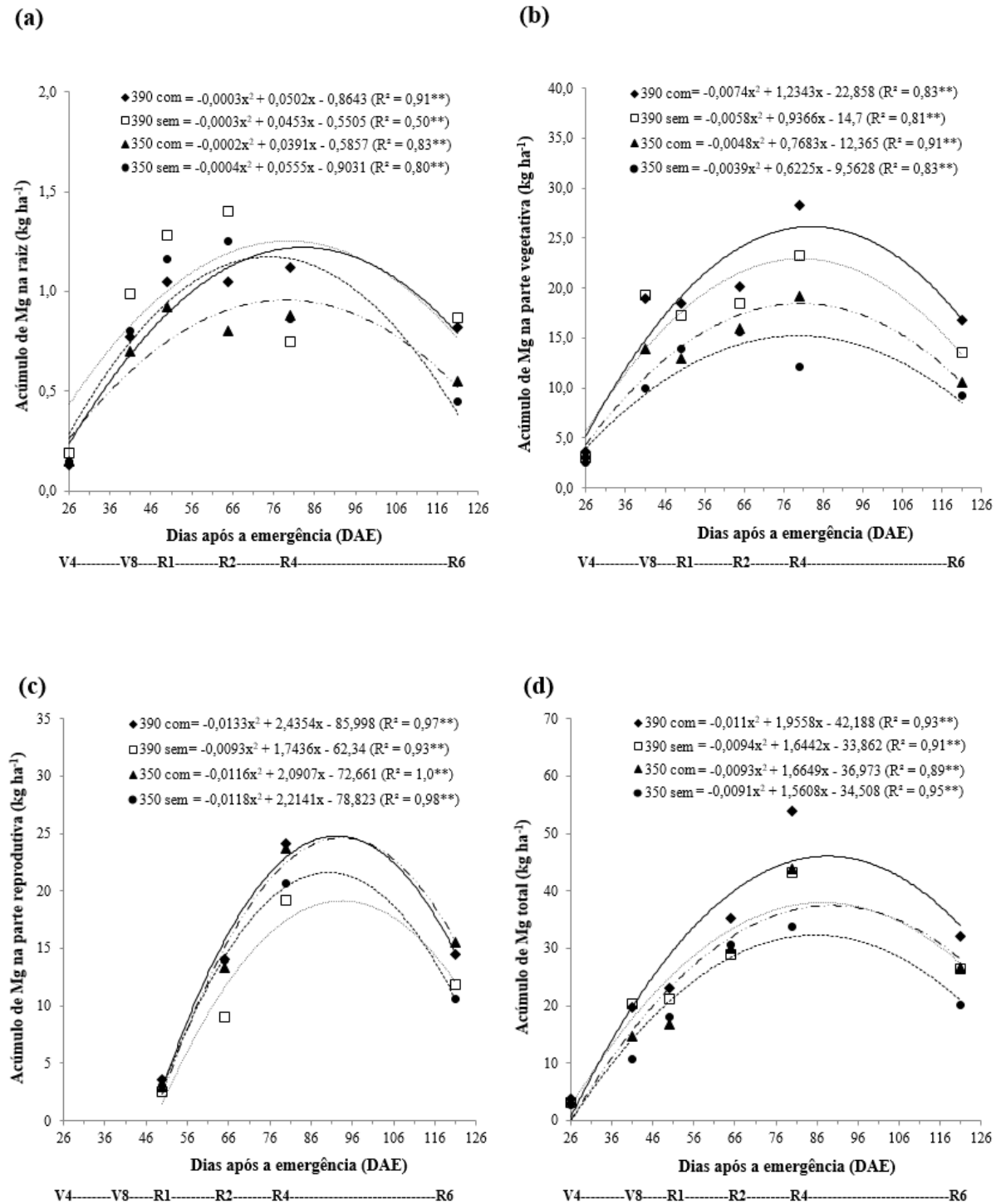
Figura 7- Cálcio (Ca) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

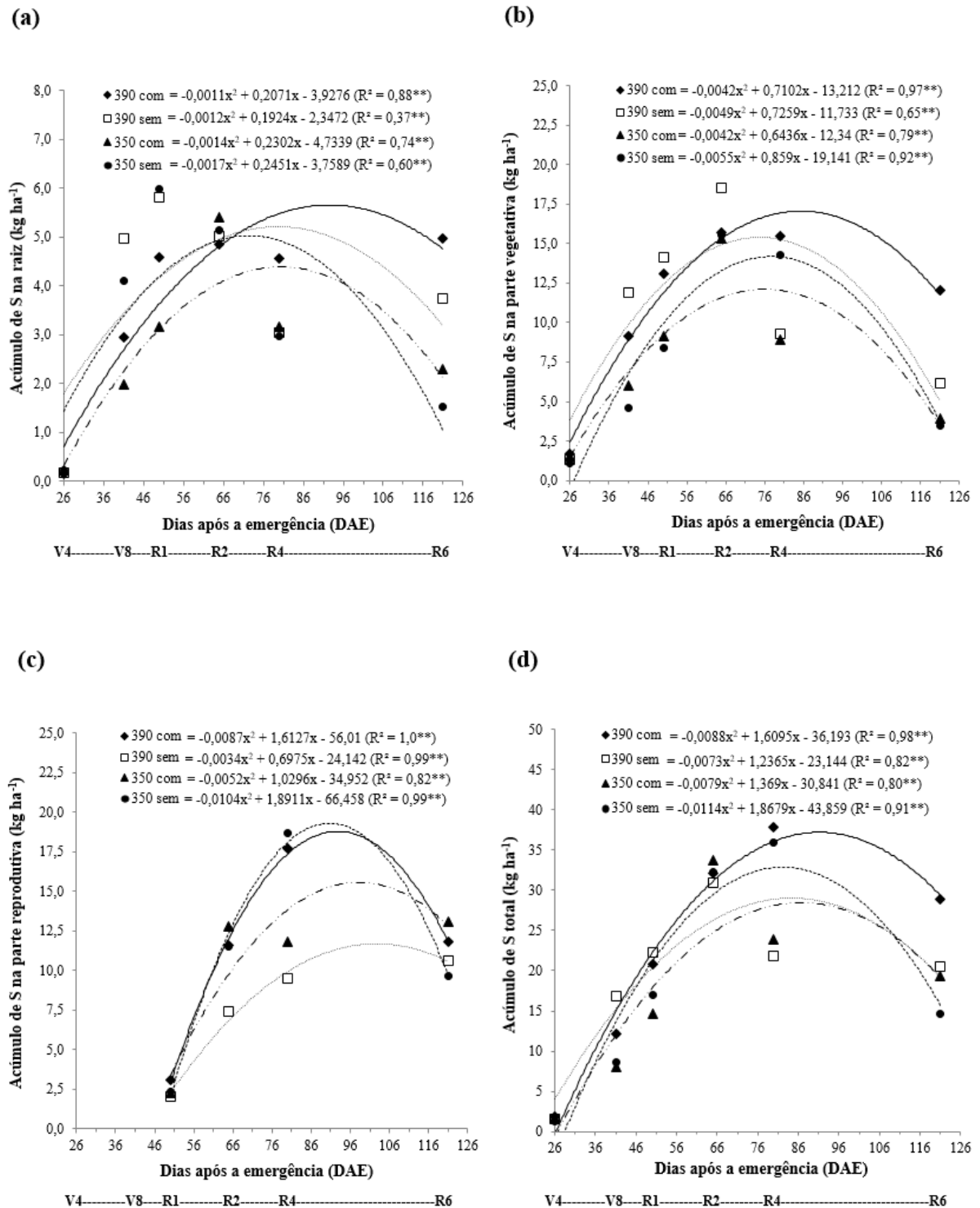
Figura 8- Magnésio (Mg) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 9- Enxofre (S) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Em relação à parte vegetativa, as quantidades médias de macronutrientes acumulados no período inicial (estádio V4) com exceção do K, também foram pequenas, sendo para o híbrido triplo DKB 350 inoculado de apenas: 31,5; 4,3; 63,9; 5,6; 3,34 e 1,5 kg ha⁻¹ de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente (Figuras 4b, 5b, 6b, 7b, 8b e 9b). Nesta parte da planta, para todos os macronutrientes o pico máximo de acúmulo ocorreu principalmente entre 41 e 65 dias (V8-R2), com exceção do Ca e Mg que nos híbridos DKB 390 e 350 inoculados e 390 não inoculado aconteceu mais tardiamente, em R4 (Figuras 7b e 8b).

No híbrido DKB 350 inoculado, notou-se que o pico máximo de acúmulo de N e K na parte vegetativa ocorreu mais precocemente (estádio V8), quando comparado ao mesmo híbrido não inoculado (estádios R2 e R1, respectivamente), sendo 7 e 21% superior ao não inoculado (Figuras 4b e 5b); enquanto que para Ca e Mg apesar de ser mais tardiamente (estádio R4), foi 35 e 23% superior ao não inoculado (Figuras 7b e 8b). Para o DKB 390 inoculado e não inoculado não houve diferença para o acúmulo de K, Ca e Mg na parte vegetativa e os picos ocorreram no mesmo estágio. Contudo, para o híbrido simples houve diferença no acúmulo de N, onde o pico do inoculado foi mais tardio (estádio R2) do que o não inoculado (estádio V8), possivelmente devido ao maior volume do sistema radicular e à fixação biológica de N pelas bactérias inoculadas. Ainda sobre o híbrido DKB 390 inoculado, este obteve maior pico de acúmulo para o P, Ca e Mg em relação à todos os outros tratamentos. Quando se compara as inoculações em relação ao híbrido DKB 350 verifica-se que quando inoculado este atingiu maior pico de acúmulo para todos os nutrientes (exceto o S).

Desde o período de máximo acúmulo até o final do ciclo da cultura, as quantidades de macronutrientes acumuladas na parte vegetativa começaram a decair. Esta considerável redução no acúmulo destes nutrientes se deve à redistribuição/remobilização dos mesmos das folhas e colmos para a parte reprodutiva da planta, mais especificamente para o enchimento dos grãos (especialmente como foi observado para o N, P e S) (Figuras 4b, 5b e 9b). Comportamento semelhante também foi observado por Vasconcelos et al. (1998) e Borges (2006) ao estudar o acúmulo de nutrientes em milho, com grande redistribuição das partes vegetativas para as reprodutivas.

O híbrido DKB 390 inoculado apresentou maior acúmulo de todos os macronutrientes na parte vegetativa no estágio final (R6) quando comparado aos outros tratamentos, com valores de 100,4; 9,6; 22,4; 16,8 e 12,1 kg ha⁻¹ de N, P, Ca, Mg e S (Figuras 4b, 5b, 6b, 7b, 8b e 9b); exceto para o K no qual a ausência de inoculação neste mesmo híbrido proporcionou maior acúmulo, com valor de 64,61 kg ha⁻¹. O maior acúmulo de nutrientes na parte

vegetativa do DKB 390 inoculado provavelmente se deu pelo fato do híbrido apresentar MS da parte vegetativa entre 16 e 64% superior aos outros tratamentos. Hiroce, Furlani e Lima (1989), estudando uma variedade de milho também verificaram maior crescimento vegetativo em virtude do maior acúmulo de MS, N e K na parte aérea.

Na parte reprodutiva da planta (PR=pendão+brácteas+sabugo+grãos), para todos os tratamentos, as quantidades dos macronutrientes acumulados aumentaram até o estágio R4, exceto o S, que acumulou linearmente até a maturidade fisiológica (R6) no DKB 350 inoculado e DKB 390 não inoculado (Figuras 4c, 5c, 6c, 7c, 8c e 9c).

O acréscimo no acúmulo de nutrientes na parte reprodutiva da planta é consequência do aumento da quantidade de MS da parte reprodutiva. De acordo Duncan, Hatfield e Ragland (1965) e Vasconcelos, Viana e Ferreira (1998), isto explica a diferencial movimentação dos produtos sintetizados (e armazenados nas diversas partes da planta) para os grãos. De acordo com Genter, Jones e Carter (1970) juntamente com o colmo, também folhas e palha das espigas (brácteas), após a fase leitosa dos grãos (R2), perdem/translocam nutrientes, sendo que as maiores reduções ocorrem nas partes da planta que ficam localizadas acima da inserção da espiga.

Os picos de acúmulo para todos os nutrientes, exceto K e S para o DKB 350 inoculado e S para o DKB 390 não inoculado foram todos em R4, quando a cultura está em estágio de grão farináceo (Figuras 5c e 9c). Os híbridos inoculados proporcionaram maiores quantidades acumuladas dos macronutrientes na parte reprodutiva em relação aos híbridos não inoculados (exceto para o S onde o DKB 350 não inoculado superou os demais tratamentos, (possivelmente devido a menor competição com NO_3^-), e para o N no qual também este mesmo híbrido não inoculado foi superior ao inoculado), principalmente o híbrido DKB 390 com maiores valores (203,6 kg ha⁻¹ de N; 40,0 kg ha⁻¹ de P; 141,9 kg ha⁻¹ de K; 28,9 kg ha⁻¹ de Ca; 24,1 kg ha⁻¹ de Mg e 17,7 kg ha⁻¹ de S) que o DKB 350 (Figuras 4c, 5c, 6c, 7c, 8c e 9c), por ser um híbrido simples, mais vigoroso.

Semelhantemente, porém em plantas de trigo, Didonet et al. (2000) observaram que a inoculação com *Azospirillum* spp. promoveu melhor aproveitamento do N acumulado na biomassa e este foi translocado mais eficientemente para os grãos, o que contribuiu para o incremento do teor de proteínas nos grãos, sendo isto muito importante, pois o milho é alimento básico para aves e suínos.

O híbrido simples DKB 390 inoculado proporcionou, em relação ao mesmo não inoculado, acréscimo no pico de acúmulo para todos os macronutrientes (39% para N, 57% para P, 26% para K, 48% para Ca, 25% para Mg e 67% para S) (Figuras 4c, 5c, 6c, 7c, 8c e 9c).

9c). Enquanto que o DKB 350 inoculado apresentou acréscimo no pico de acúmulo somente para alguns macronutrientes (P, Ca e Mg), variando apenas de 4 a 20%. Portanto, em relação ao pico de acúmulo de macronutrientes pode-se dizer que, o híbrido simples promoveu melhor associação com a bactéria *Azospirillum brasilense*, de modo que devido ao maior volume do sistema radicular deste híbrido inoculado, conseqüentemente a planta absorveu e acumulou maior quantidade destes nutrientes.

Os acúmulos dos macronutrientes na parte reprodutiva no final do ciclo (R6) também foram superiores nos híbridos inoculados, quando comparado aos não inoculados, entretanto, o DKB 350 se destacou com 154,0; 27,7; 104,1; 14,1; 15,5 e 13,1 kg ha⁻¹ de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente, sendo superior em 54,9% para N; 65,4% para P, 69,6% para K; 34,8% para Ca; 46,9% para Mg e 35,2% para S, em relação ao DKB 350 não inoculado.

Duarte et al. (2003) ao estudar diferentes cultivares de milho, verificaram que na maturidade fisiológica dos grãos o Ca foi o nutriente que manteve maior acúmulo nas folhas, devido ao seu menor acúmulo nas espigas durante o florescimento e maturidade fisiológica dos grãos, e também pelo fato de ser um nutriente pouco móvel na planta. O mesmo comportamento também foi constatado na parte vegetativa e reprodutiva dos híbridos de milho do presente trabalho, provavelmente devido ao fato do Ca ser considerado praticamente imóvel no floema.

De modo geral, ressalta-se que com o desenvolvimento da parte reprodutiva, houve redução na quantidade de nutrientes acumulados na parte vegetativa da planta, principalmente no DKB 390 inoculado para o N (durante estádios R1-R4), DKB 350 inoculado para o P (estádios R1-R4) e S (estádios R4-R6). Esses resultados assemelham-se aos observados por Duarte et al. (2003) em cultivares de milho, onde os maiores acúmulos de N, P e S, durante a evolução da parte reprodutiva, em relação à planta toda se concentravam nas espigas. A partir dos resultados observados nesse trabalho é possível inferir que em uma planta de milho a espiga se faz o maior dreno de nutrientes. Coelho (2006) descreveu que o ciclo da planta de milho apresenta períodos diferentes de intensa absorção de nutrientes do solo, ocorrendo o primeiro durante a fase de desenvolvimento vegetativo, entre V4 e V12, quando o número potencial de grãos está sendo definido; e o segundo, quando o potencial produtivo é atingido, que é durante a fase reprodutiva ou de formação da espiga.

De acordo com Von Pinho et al. (2009), geralmente, a absorção e acúmulo da maior parte dos nutrientes do solo seguem quantitativamente a mesma performance de desenvolvimento da planta. França e Coelho (2001) citaram que os nutrientes são absorvidos durante todo o ciclo, e as diferenças averiguadas nas velocidades de absorção ocorrem em

razão do estádio em que a planta está, e da translocação de nutrientes das folhas e colmos para os órgãos reprodutivos.

O acúmulo total de nutrientes na planta inteira durante seu desenvolvimento inicial ocorreu de forma lenta, com exceção do K, e até os 26 DAE (V4) o híbrido DKB 350 inoculado alcançou valores de 32,9 kg ha⁻¹ de N; 4,6 kg ha⁻¹ de P; 66,1 kg ha⁻¹ de K; 5,8 kg ha⁻¹ de Ca, 3,5 kg ha⁻¹ de Mg e 1,7 kg ha⁻¹ de S (Figuras 4d, 5d, 6d, 7d, 8d e 9d).

Os máximos de acúmulo para a maioria dos macronutrientes dos tratamentos se deram em R4 aos 80 DAE, exceto para K no DKB 350 inoculado e não inoculado, e para S no DKB 350 inoculado e DKB 390 não inoculado, que ocorreram em R2 (Figuras 5d e 9d). Para algumas destas exceções, quando se compara com e sem a inoculação com *Azospirillum brasilense* notou-se que para o DKB 390 a bactéria diazotrófica atrasou o pico de acúmulo, fazendo com que o híbrido alcançasse maior de acúmulo (37,8 kg ha⁻¹ de S - acréscimo de 22%). Contudo, para o DKB 350 essa bactéria fez com que o pico de acúmulo fosse adiantado ao estádio (R2). Semelhantemente, Duarte et al. (2003) relataram que o acúmulo de MS e de nutrientes, atingiu valores de pico máximo antes do período de maturidade fisiológica dos grãos.

Arnon (1975) descreveu que as exigências de N pela planta são mínimas nos estádios iniciais e se elevam com aumento da taxa de crescimento, alcançando o pico máximo entre o início do florescimento e o início da formação de grãos, o que ocorreu um pouco mais tarde no presente trabalho, em R4, aos 80 DAE. Por outro lado, Von Pinho et al. (2009) relataram acúmulos máximos desse nutriente na parte aérea do milho somente na maturidade fisiológica dos grãos (R6). Portanto, dependendo do híbrido e do clima, pode haver muita variação nos picos de acúmulo de nutrientes do milho.

Nos dois híbridos de milho, a inoculação com *Azospirillum brasilense* promoveu acréscimo no pico de acúmulo total de macronutrientes, exceto para N e S no DKB 350 que ocorreu o inverso (redução) (Figuras 4d e 9d). No DKB 350 houve aumento de 19% para P, 11% para K, 28% para Ca e 30% para Mg. Sendo que o maior destaque foi para a inoculação do DKB 390 com incremento de 50% para N, 26% para P, 32% para K, 22% para Ca e 25% para Mg em relação ao mesmo sem inoculação (Figuras 4d, 5d, 6d, 7d e 8d).

Para o acúmulo máximo de P na planta inteira, os híbridos simples e triplo inoculados, apresentaram valores muito similares. Entretanto, para ao acúmulo de N o híbrido simples foi 28% superior ao híbrido triplo, mostrando-se mais responsivo a inoculação devido a sua maior homogeneidade e heterose, resultando assim em maior produtividade de grãos.

Também no estágio final do ciclo da cultura, os tratamentos inoculados superaram aos sem inoculação no acúmulo total de macronutrientes na planta inteira. Isso provavelmente ocorreu por influência maior da parte reprodutiva da planta, onde os acúmulos nos híbridos inoculados tiveram mesma tendência. Novamente o que se destaca com maiores valores de acúmulo total de macronutrientes é o DKB 390 em relação ao DKB 350, exceto para K onde o primeiro foi 14% inferior ao segundo (Figura 5d).

No estágio R6, o híbrido DKB 390 foi capaz de acumular um total de macronutrientes de 240,8; 34,3; 152,2; 34,7; 32,1 e 28,8 kg ha⁻¹ de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente, sendo superior em 33% para N; 52% para P, 18% para K; 5% para Ca; 22% para Mg e 41% para S quando não inoculado (Figuras 4d, 5d, 6d, 7d, 8d e 9d). Este maior acúmulo pode ser resultado da maior matéria seca total do híbrido simples inoculado, que foi de 9 a 31% superior aos outros tratamentos.

As quantidades acumuladas de macronutrientes são semelhantes às obtidas por Duarte et al. (2003) para média de cinco genótipos de milho, e inferiores aos valores relatados por Von Pinho et al. (2009), estudando dois híbridos simples, sendo um de alto potencial de produtividade de MS e outro de alto potencial de produtividade de grãos. Contudo, vale destacar que nestas pesquisas não foram mensurados os acúmulos de nutrientes nas raízes das plantas de milho como na presente pesquisa.

4.8 ACÚMULO DE MICRONUTRIENTES AO LONGO DO CICLO

Em relação ao acúmulo de micronutrientes nas raízes houve ajuste a funções quadráticas, e para a maioria dos micronutrientes o pico máximo de acúmulo ocorreu em R1 (florescimento), sendo esta a época de maior demanda da planta por estes elementos.

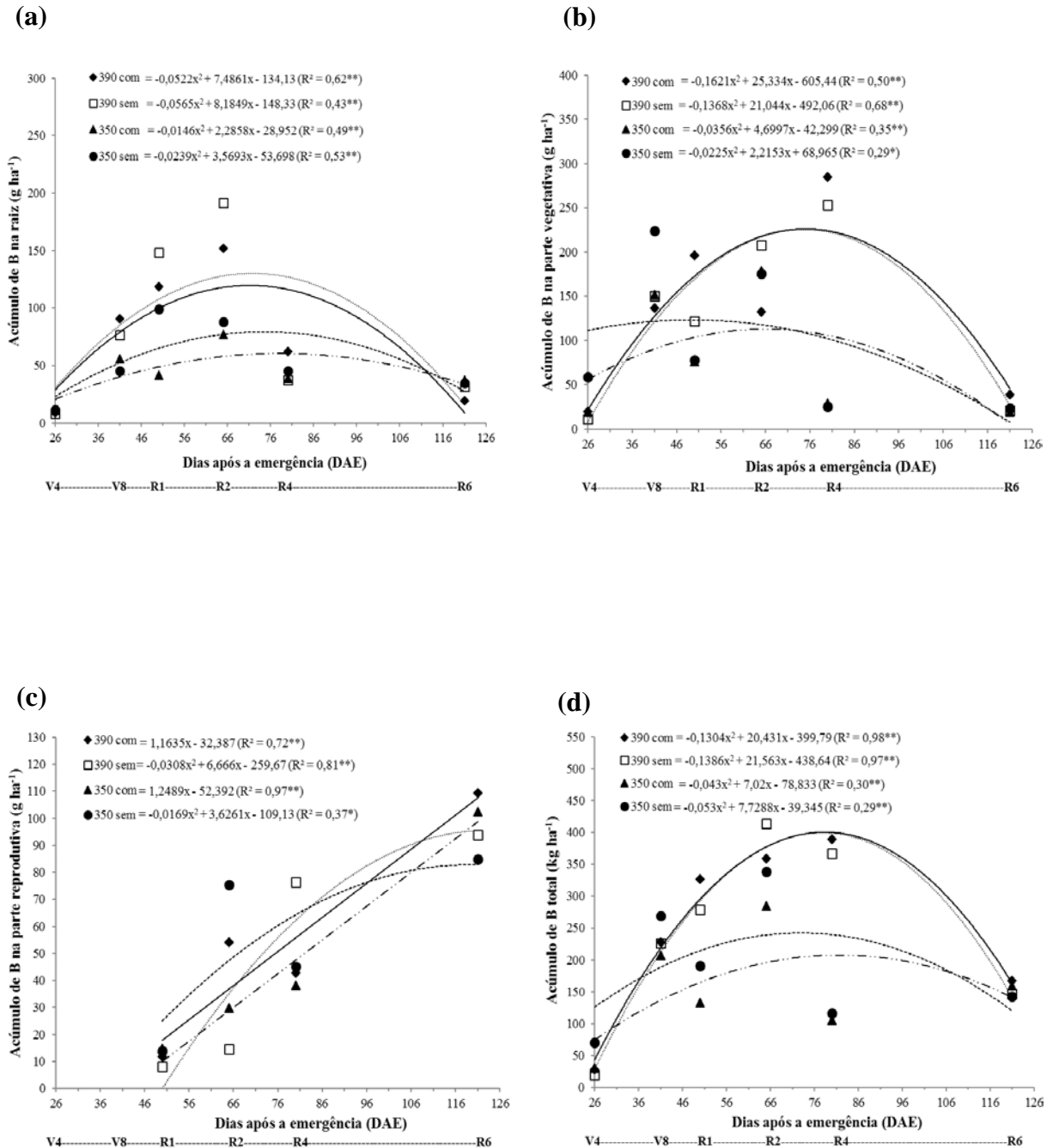
O *Azospirillum brasilense* promoveu incremento no acúmulo de todos os micronutrientes nas raízes quando os híbridos foram inoculados com esta bactéria, de forma que, no final do ciclo, o híbrido triplo DKB 350 inoculado apresentou incremento de 8,6; 8,7; 54,8; 67,0 e 25,1% de B, Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente, em relação ao não inoculado; e o híbrido DKB 390 inoculado apresentou incremento de 38,0; 42,9; 47,6 e 21,8% de Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente (Figuras 10a, 11a, 12a, 13a e 14a).

Neste órgão, o pico máximo de acúmulo ocorreu após o florescimento (estádio R1) para a maioria dos tratamentos e nutrientes. A inoculação postergou em cerca de 15 dias o pico de acúmulo Zn nas raízes, e entre 30 e 68 dias o pico de acúmulo de Cu nas raízes, demonstrando o efeito do *A. brasilense* nas raízes.

Ao final do ciclo da cultura, observou-se redução de todos os micronutrientes acumulados nas raízes, devido a senescência deste órgão, sendo que nos híbridos inoculados a redução foi cerca de 9-87% para o DKB 390 e 51-68% para o DKB 350, e nos híbridos não inoculados cerca de 29-84% para o DKB 390 e 65-84% para o DKB 350. Desta maneira houve menor redução de micronutrientes nas raízes do DKB 350 inoculado, híbrido triplo de maior variabilidade entre plantas.

Na maturidade fisiológica, os híbridos inoculados superaram os não inoculados no acúmulo de todos os micronutrientes no sistema radicular (exceto o B no DKB 390), e foi o híbrido DKB 390 que conseguiu acumular maior quantidade destes micronutrientes neste órgão no estágio R6.

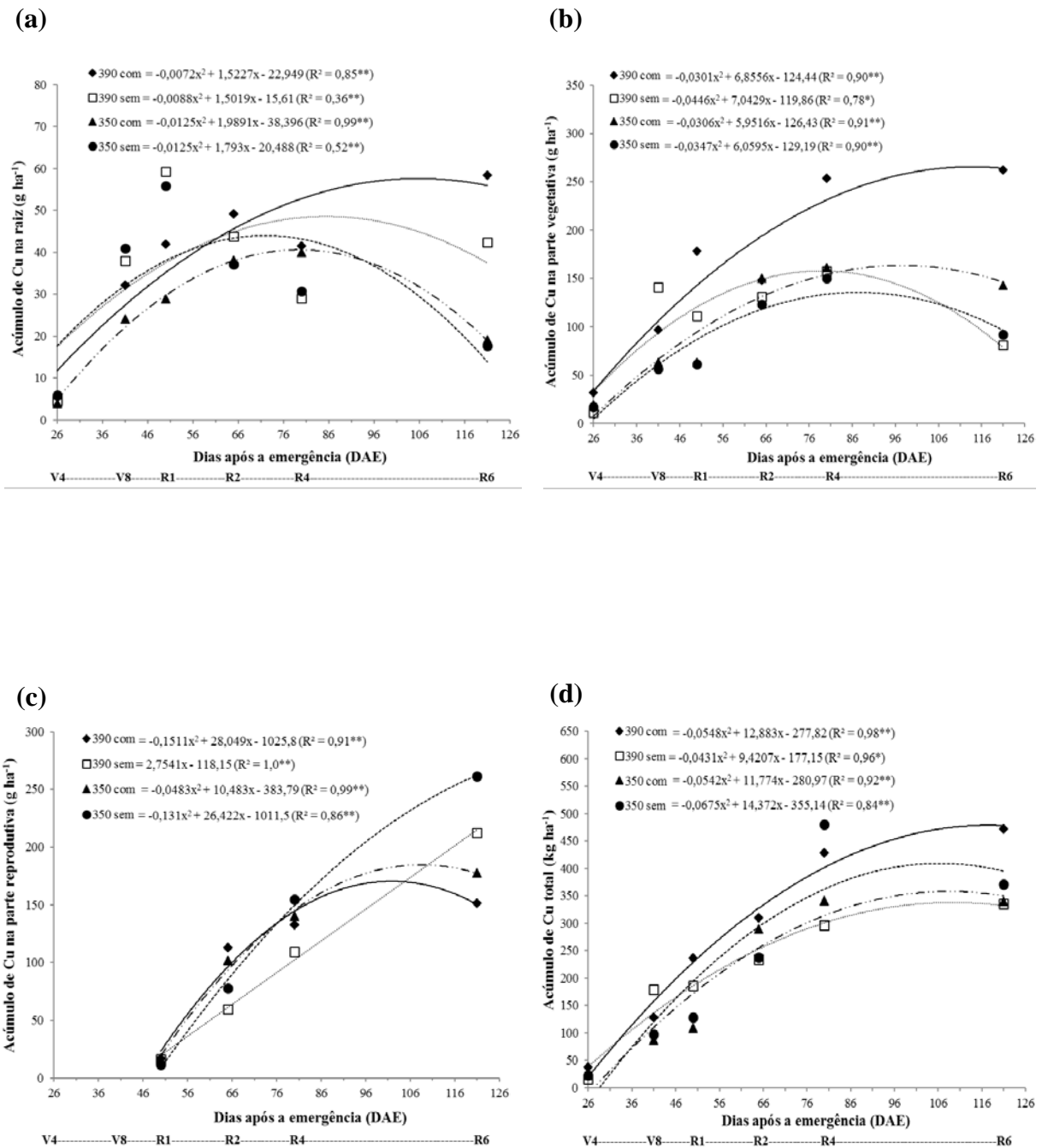
Figura 10- Boro (B) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

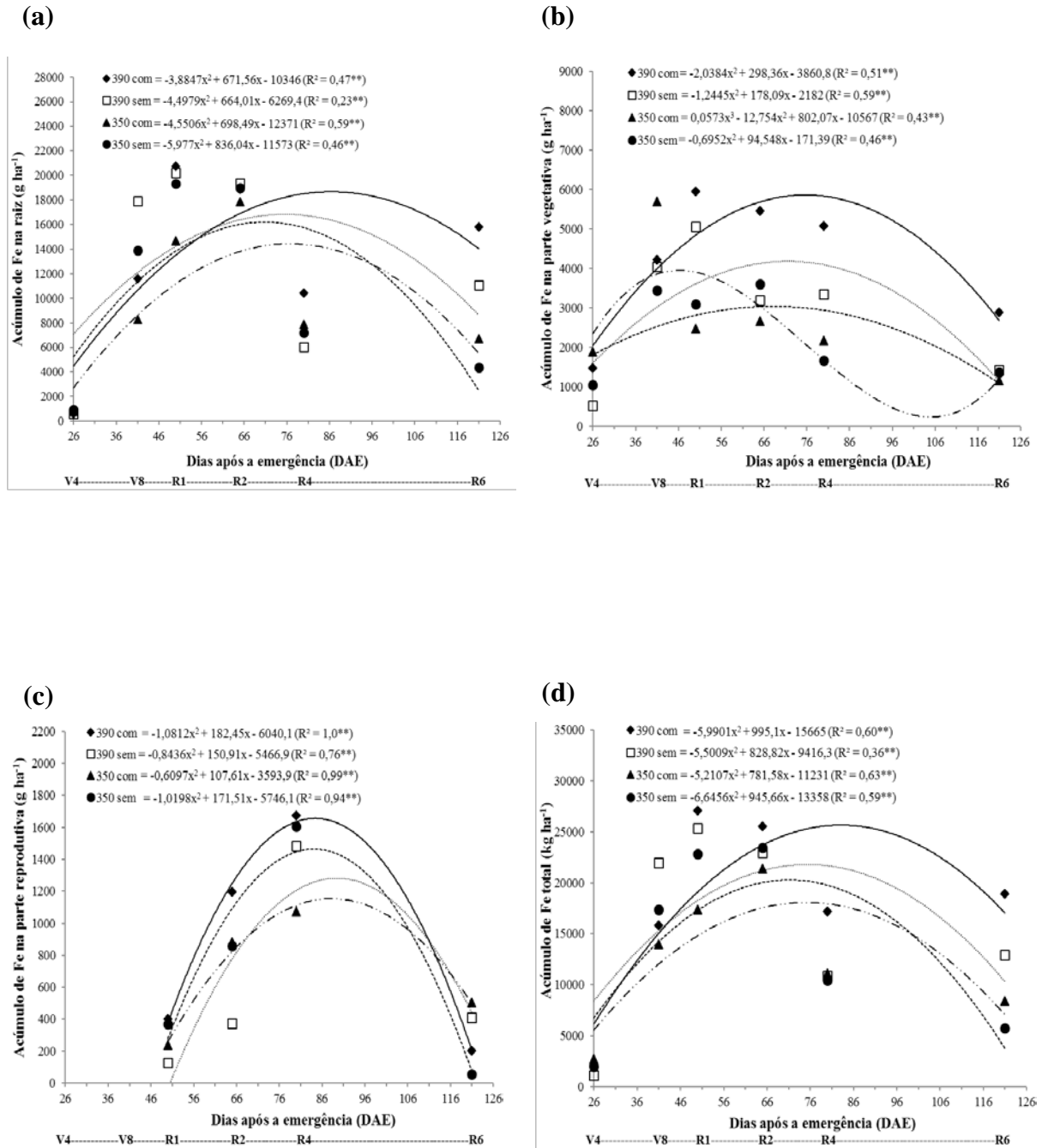
Figura 11- Cobre (Cu) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

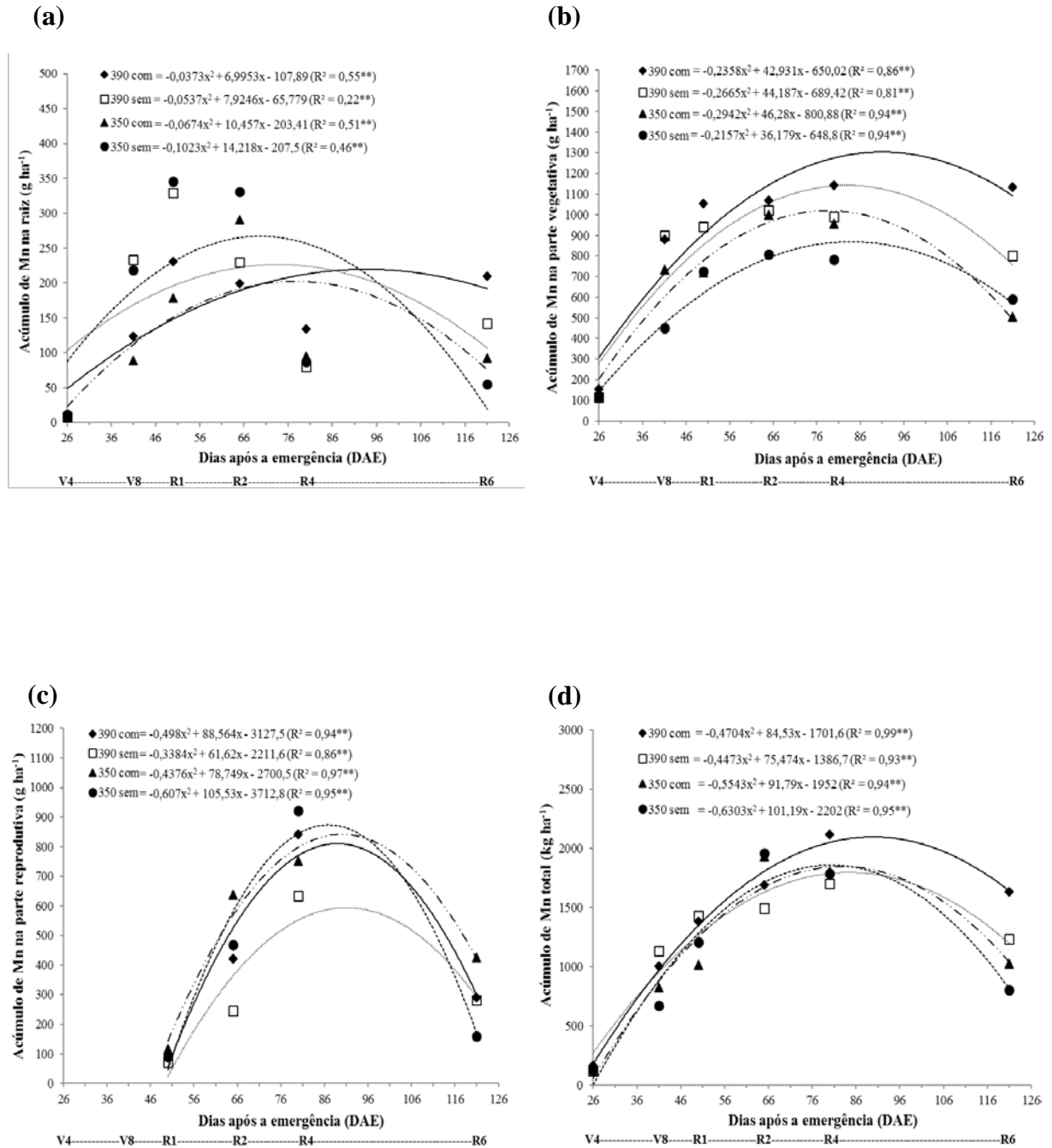
Figura 12- Ferro (Fe) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

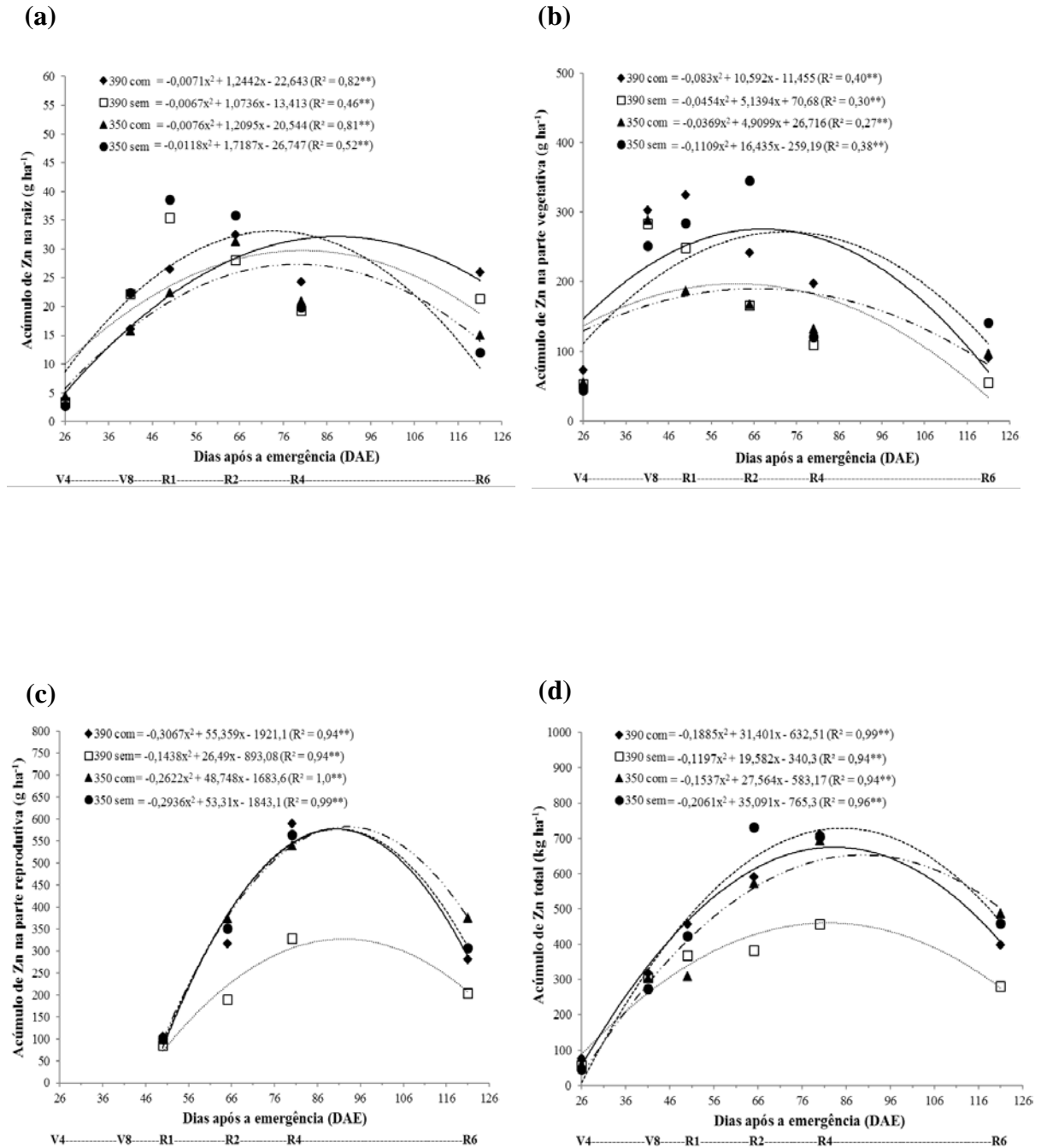
Figura 13- Manganês (Mn) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 14- Zinco (Zn) acumulado nas raízes (a), na parte vegetativa (folhas+colmos) (b), na parte reprodutiva (pendão+espiga) (c) e na planta inteira (total) (d) de dois híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.



** e * – significativo a 1% e 5% de probabilidade por meio do teste F.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Na parte vegetativa houve ajuste a funções quadráticas para o acúmulo de todos os micronutrientes (Figuras 10b, 11b, 12b, 13b e 14b), exceto para o Fe no híbrido 350 inoculado que houve ajuste à função cúbica.

Os picos máximos de acúmulo de micronutrientes ocorreram entre 41 e 80 DAE (V8-R4), porém para o Cu no DKB 390 inoculado, o pico de acúmulo se deu mais tardiamente, na maturidade fisiológica (R6), semelhante ao que ocorreu com os macronutrientes. A inoculação antecipou em 24 dias o pico de acúmulo de Fe e Zn na parte vegetativa (o que antes ocorria somente em R2 passou a ocorrer já em V8) para o DKB 350, e postergou o pico de acúmulo de Cu, Mn e Zn em 41, 15 e 9 dias no DKB 390, respectivamente. Ainda no pico de acúmulo, os valores observados em g ha^{-1} foram os maiores para o DKB 390 inoculado, devido a melhor exploração do solo pelo maior volume do sistema radicular, sendo eles 285 de B, 262 de Cu, 5954 de Fe, 1144 de Mn e 325 de Zn. Corroborando com estes resultados, Duarte et al. (2003) estudando 5 genótipos e avaliando apenas parte aérea das plantas, constataram valores de pico de acúmulo em g ha^{-1} de 210 de B, 125 de Cu, 5648 de Fe, 980 de Mn e 331 de Zn, porém variando entre 86 e 105 dias após a emergência da cultura. Enquanto que Borges (2006), estudando dois híbridos simples de milho observou picos de acúmulo de micronutrientes dos 56 aos 125 DAS, encontrando valores em g ha^{-1} de 393 de B, 130 de Cu, 584 de Mn e 392 de Zn, na parte aérea das plantas.

No término de ciclo, mais especificamente em R6, o híbrido simples DKB 390 inoculado se sobressaiu novamente (exceto para o Zn acumulado que o DKB 350 não inoculado foi maior) em relação aos outros tratamentos foi apresentando valores de 39, 262, 2892 e 1134 g ha^{-1} de B, Cu, Fe e Mn (Figuras 10b, 11b, 12b, 13b e 14b), e estes valores correspondem a um incremento de 84, 223, 103, 42 e 63% de B, Cu, Fe e Mn, respectivamente, em relação ao mesmo híbrido não inoculado. Diante do exposto é possível relatar que a bactéria diazotrófica teve melhor especificidade/associação com o híbrido simples em relação ao acúmulo de micronutrientes. Também neste mesmo estágio da cultura do milho, Duarte et al. (2003) verificaram valores de acúmulo de cerca de 70 g ha^{-1} de B, 111 g ha^{-1} de Cu, 402 g ha^{-1} de Mn e 197 g ha^{-1} de Zn na parte aérea de plantas de milho.

Na parte reprodutiva das plantas (Figuras 10c, 11c, 12c, 13c e 14c), que envolve os órgãos de interesse ou produto final (espigas) destas plantas, o acúmulo de nutrientes se deu de maneira quadrática na maioria dos casos, exceto para B nos híbridos inoculados e Cu no híbrido DKB 390 não inoculado que ocorreram de forma linear crescente (Figuras 10c e 11c).

O pico de acúmulo dos micronutrientes Fe, Mn e Zn ocorreram no estágio R4, aos 80 DAE (Figuras 12c, 13c e 14c), que é quando os grãos acumularam cerca de metade da sua

massa seca da maturação e possuem em torno de 70% de umidade; e para B e Cu, o pico de acúmulo ocorreu na maturidade fisiológica (R6) aos 118 DAE (Figuras 10c e 11c), quando os grãos atingiram sua máxima massa seca, e foram observados valores (g ha^{-1}) de cerca de 85-109 para B, 152-262 para Cu, 1073-1673 para Fe, 634-921 para Mn, 328-589 para Zn. Borges (2006) também obteve pico máximo de acúmulo de micronutrientes (B, Cu, Mn e Zn), nas estruturas reprodutivas de híbridos de milho, em sua maior parte ocorrendo no estágio de maturidade fisiológica da cultura, com valores (em g ha^{-1}) de 364 de B, 173 de Cu, 2804 de Mn e 261 de Zn. Nestes órgãos da planta, o *Azospirillum brasilense* não antecipou e também não postergou o pico de acúmulo de micronutrientes (Figuras 10c, 11c, 12c, 13c e 14c).

O B é mais importante para o desenvolvimento reprodutivo que para o crescimento vegetativo do milho (DELL; HUANG, 1997), de modo que sua deficiência pode causar má formação de espigas e também redução na produtividade de grãos (MOZAFAR, 1987). Além disso, o Zn é o micronutriente que pode causar maior limitação na produção do milho, principalmente em solos de cerrado, devido aos baixos teores presentes na rocha de origem (COELHO; FRANÇA, 1995).

Quando comparado aos híbridos não inoculados, ao final do ciclo (R6), os híbridos inoculados apresentaram incremento no acúmulo de alguns dos micronutrientes avaliados, como o incremento que ocorreu para o B, Mn e Zn (17, 3 e 38% no DKB 390 e 21, 166 e 23% no DKB 350), respectivamente. Tal comportamento pode ter ocorrido devido ao *Azospirillum brasilense* propiciar, também no final do ciclo, um incremento na MS da parte reprodutiva (Figura 3c), que desta forma acumulou mais micronutrientes nesta parte da planta.

Em relação ao acúmulo de micronutrientes na planta inteira (acúmulo total) houve ajuste a funções quadráticas para todos os nutrientes avaliados (Figuras 10d, 11d, 12d, 13d e 14d). Inicialmente o acúmulo ocorreu de forma lenta até os 26 DAE, devido a presença da reserva da semente, se elevando mais ligeiramente após este período.

Os picos máximos de acúmulo de micronutrientes na planta inteira ocorreram a partir do florescimento (R1) e se estenderam até a maturidade fisiológica (R6), sendo que a maioria esteve concentrada de R2 à R4 (65-80 DAE) (Figuras 10d, 11d, 12d, 13d e 14d).

Em alguns casos, como para o B no híbrido DKB 390 e Zn no DKB 350, a inoculação com *Azospirillum brasilense* postergou o pico de acúmulo destes micronutrientes em 15 dias, o que, entretanto, não fez com que estes picos de acúmulo que ocorreram mais tardios fossem mais elevados que nos não inoculados (mais precoces).

O pico de inoculação que Borges (2006) descreveu para o acúmulo de micronutrientes quando estudou dois híbridos simples de milho ocorreu na maioria, na sua maturidade

fisiológica (R6) aos 138 DAE. Por outro lado, Duarte et al. (2003) quando avaliaram genótipos de milho, obtiveram pico máximo de acúmulo de micronutrientes entre 75-90 DAE para a maioria dos genótipos estudados, com exceção apenas para o Fe que o máximo acúmulo aconteceu aos 105 dias após a emergência.

No final do ciclo (R6), a inoculação com *Azospirillum brasilense* proporcionou incremento no acúmulo total de todos os micronutrientes avaliados no milho, e desta maneira, comparando híbrido simples (DKB 390) e híbrido triplo (DKB 350), os acréscimos da inoculação foram de 14 e 12% para B, 47 e 46% para Fe, 32 e 27% para Mn, 42 e 6% para Zn, respectivamente (o Cu teve incremento somente para o DKB 390, o qual foi de 41%).

O híbrido simples DKB 390 inoculado se destacou novamente, com acúmulos totais de 167, 472, 18914, 1634 e 399 g ha⁻¹ de B, Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente, na maturidade fisiológica; enquanto que Borges (2006) relatou acúmulos de 130 g ha⁻¹ de B, 280 g ha⁻¹ de Cu, 640 g ha⁻¹ de Mn e 2050 g ha⁻¹ de Zn, em média para dois híbridos simples de milho precoces.

4.9 EXTRAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE MACRONUTRIENTES

Em relação as quantidades totais de macronutrientes extraídos (Tabela 10), os híbridos de milho diferiram apenas para a extração total de Ca e Mg (kg ha⁻¹) e para o K tanto total quanto em kg t⁻¹ grãos produzido. Isto indica que o híbrido simples DKB 390 é mais exigente em bases trocáveis, uma vez que, o solo apresentava altos teores de K, Ca e Mg de acordo com Raij et al. (2001) e foi adubado com potássio na semeadura.

Tabela 10- Extração de macronutrientes em kg ha⁻¹ e em kg t⁻¹ de grãos produzido de híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.

	N	P	K	Ca	Mg	S
Extração total (kg ha⁻¹)						
Híbridos						
DKB 390	334,74 a	51,85 a	314,30 a	74,44 a	51,57 a	29,83
DKB 350	314,56 a	53,23 a	253,71 b	57,76 b	38,72 b	29,95
DMS (5%)	40,62	15,64	33,75	16,21	7,42	10,49
Inoculação						
Com <i>Azo</i>	356,72 a	57,79 a	305,34 a	75,59 a	51,87 a	30,86
Sem <i>Azo</i>	292,58 b	47,29 a	262,67 b	56,60 b	38,43 b	28,92
DMS (5%)	40,62	15,64	33,75	16,21	7,42	10,49
Teste F						
Híbrido (H)	1,26 ^{ns}	0,04 ^{ns}	16,50**	5,43*	15,37**	0,00 ^{ns}
Inoculação (I)	12,77**	2,31 ^{ns}	8,18*	7,03*	16,80**	0,18 ^{ns}
H x I	3,63 ^{ns}	0,03 ^{ns}	2,94 ^{ns}	0,42 ^{ns}	1,03 ^{ns}	9,11*
Média geral	324,65	52,54	284,01	66,10	45,15	29,89
CV (%)	11,06	26,31	10,51	21,68	14,53	31,03
Extração (kg t⁻¹ grão produzido)						
Híbridos						
DKB 390	50,12 a	7,71 a	46,66 a	10,99 a	7,71 a	4,46
DKB 350	49,74 a	8,56 a	40,04 b	9,26 a	6,22 a	4,60
DMS (5%)	9,97	3,08	6,54	1,92	1,62	1,52
Inoculação						
Com <i>Azo</i>	59,01 a	9,66 a	50,04 a	12,37 a	8,58 a	5,06
Sem <i>Azo</i>	40,85 b	6,61 b	36,66 b	7,89 b	5,36 b	4,01
DMS (5%)	9,97	3,08	6,55	1,92	1,62	1,52
Teste F						
Híbrido (H)	0,01 ^{ns}	0,39 ^{ns}	5,22*	4,18 ^{ns}	4,28 ^{ns}	0,04 ^{ns}
Inoculação (I)	16,97**	5,01*	21,32**	27,95**	20,17**	2,43 ^{ns}
H x I	2,11 ^{ns}	0,20 ^{ns}	3,81 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	6,52*
Média geral	49,93	8,14	43,35	10,13	6,97	4,53
CV (%)	17,66	14,19 [#]	13,37	16,73	20,59	29,71

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**, * e ^{ns}: significativas em p <0,01, 0,01 <p <0,05, e não significativas, respectivamente.

#: dados ajustados pela seguinte equação $(X + 0,5)^{0,5}$.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Houve interação significativa entre os híbridos de milho e inoculação com *Azospirillum brasilense* para a extração de S total e em kg t⁻¹ grãos produzido. Observa-se no desdobramento que com ou sem inoculação (Tabela 11), os híbridos não diferiram quanto à extração de S. Porém, o híbrido DKB 390 extraiu mais S quando inoculado, enquanto que, a extração deste nutriente no híbrido DKB 350 não foi influenciada pela inoculação. Além da provável maior exigência em S do híbrido simples, o maior desenvolvimento do sistema radicular em profundidade com a inoculação com *A. brasilense*, explica a maior extração

deste nutriente que se acumula na camada subsuperficial do solo por efeito de lixiviação do íon SO_4^{2-} .

Tabela 11- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com *A. brasilense* para extração de S em kg ha^{-1} e em kg t^{-1} de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.

Híbridos	Extração total de S (kg ha^{-1})	
	Com <i>Azospirillum</i>	Sem <i>Azospirillum</i>
DKB 390	37,80 aA	21,86 aB
DKB 350	23,92 aA	35,98 aA
DMS (5%)	14,84	
Híbridos	Extração de S (kg t^{-1} de grão produzido)	
	Com <i>Azospirillum</i>	Sem <i>Azospirillum</i>
DKB 390	5,85 aA	3,08 aB
DKB 350	4,26 aA	4,93 aA
DMS (5%)	2,15	

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Verificou-se maior extração de macronutrientes total e em kg t^{-1} grãos produzidos quando as plantas foram inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Tabela 10), alcançando valores de 356,7; 57,8; 305,3; 75,6; 51,9 e 30,9 kg ha^{-1} de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente, correspondendo a incrementos de 22% para N e P, 16% para K, 34% para Ca, 35% para Mg e 7% para S, em relação a ausência de inoculação, devido a eficiência do maior volume radicular na presença da bactéria. Coelho e França (1995), avaliando absorção de nutrientes pela planta de milho constataram que quando cultivado para produtividade esperada de 7,87 t ha^{-1} de grãos, a planta extraí cerca de 167,0; 33,0; 113,0; 27,0 e 25,0 kg ha^{-1} de N, P, K, Ca, e Mg, respectivamente; esses valores são demasiadamente diferentes dos aqui obtidos, o que indica que os híbridos modernos e mais produtivos são mais exigentes em nutrientes. Sá et al. (2010) relataram extrações de N de 239 a 271 kg ha^{-1} , assemelhando-se aos valores do presente trabalho, porém sem contabilizar o acúmulo destes nutrientes no sistema radicular e sem a inoculação com esta bactéria.

Quanto à extração de macronutrientes em kg t^{-1} grãos produzido de milho inoculado (Tabela 10), os valores obtidos de N, P, K, Ca, Mg e S, foram respectivamente, de 59,0; 9,7; 50,0; 12,4; 8,6; e 5,1. Entretanto, Cruz et al. (2012) observaram menores quantidades extraídas, em que para se produzir 1 t de grãos foram necessários 24,9; 4,3; 18,2; 3,9; 4,4 e 2,6 kg de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente. Ressalta-se também que estes autores,

diferentemente, não avaliaram o acúmulo destes nutrientes no sistema radicular e não inocularam o milho com esta bactéria diazotrófica.

Coelho (2006) relatou que a extração de N, P, K, Ca e Mg pela planta de milho aumenta linearmente com o aumento na produtividade, e a maior exigência do milho refere-se ao N e K, seguindo-se Ca, Mg e P. Este autor citou ainda que para produtividade de grãos em torno de 5 a 7 t ha⁻¹, a extração de enxofre é baixa e varia de 15 a 30 kg ha⁻¹, sendo que no presente trabalho variou de 28 a 31 kg ha⁻¹. Broch e Ranno (2009) verificaram extração de N>K>P>Mg>Ca>S para plantas de milho. A ordem decrescente de extração de macronutrientes por plantas de milho em kg ha⁻¹ obtidas nesta pesquisa foi de N>K>Ca>P>S>Mg, ou seja, com exceção de N e K, a extração de macronutrientes foi diferente.

A exportação total de macronutrientes pelos híbridos de milho foi semelhante (Tabela 12). Entretanto, com a inoculação por *Azospirillum brasilense* houve maior exportação de N, P, K e Mg em kg t⁻¹ grãos produzidos e exportação total de P e K em relação a ausência de inoculação. A remoção de macronutrientes em kg t⁻¹ grãos produzidos foi superior em 69% para N, 84% para P, 71% para K e 59% para Mg quando os híbridos foram inoculados; e a remoção por área (kg ha⁻¹) foi maior em 53% para P e 43% para K com a inoculação, independentemente do híbrido.

Embora não haja diferença significativa da inoculação para o N total (kg ha⁻¹), pode-se observar que o *A. brasilense* incrementou em 41% a exportação de N pelos grãos, promovendo possivelmente maior teor de proteínas nos grãos, visto que se trata de um nutriente crucial a síntese de proteínas.

Tabela 12- Exportação de macronutrientes em kg ha⁻¹, em kg t⁻¹ de grão produzido e exportação relativa (%) de híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.

	N	P	K	Ca	Mg	S
Híbridos	Exportação total (kg ha⁻¹)					
DKB 390	99,82 a	18,23 a	40,52 a	3,31 a	11,21 a	9,52 a
DKB 350	107,69 a	20,02 a	45,23 a	3,69 a	11,08 a	9,65 a
DMS (5%)	40,92	8,43	13,42	1,00	3,96	3,53
Inoculação						
Com <i>Azo</i>	121,36 a	23,14 a	50,40 a	3,66 a	12,76 a	10,56 a
Sem <i>Azo</i>	86,15 a	15,10 b	35,36 b	3,33 a	9,54 a	8,61 a
DMS (5%)	40,92	8,43	13,42	1,00	3,96	3,53
Teste F						
Híbrido (H)	0,19 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,63 ^{ns}	0,72 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}
Inoculação (I)	3,79 ^{ns}	4,65*	6,43*	0,56 ^{ns}	3,39 ^{ns}	1,57 ^{ns}
H x I	0,38 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,09 ^{ns}	2,97 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,36 ^{ns}
Média geral	103,76	19,12	42,88	3,50	11,15	9,58
CV (%)	16,30 [#]	17,28 [#]	27,67	25,20	31,38	32,58
Híbridos	Exportação (kg t⁻¹ grão produzido)					
DKB 390	15,00 a	2,76 a	6,10 a	0,49	1,68 a	1,43 a
DKB 350	17,43 a	3,26 a	7,33 a	0,59	1,79 a	1,55 a
DMS (5%)	7,09	1,51	2,46	0,17	0,69	0,63
Inoculação						
Com <i>Azo</i>	20,38 a	3,90 a	8,47 a	0,61	2,13 a	1,77 a
Sem <i>Azo</i>	12,05 b	2,12 b	4,96 b	0,47	1,34 b	1,21 a
DMS (5%)	7,09	1,51	2,46	0,17	0,69	0,63
Teste F						
Híbrido (H)	0,60 ^{ns}	0,57 ^{ns}	1,27 ^{ns}	1,69 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,18 ^{ns}
Inoculação (I)	7,06*	7,12*	10,43*	3,70 ^{ns}	6,77*	4,17 ^{ns}
H x I	1,09 ^{ns}	0,69 ^{ns}	0,74 ^{ns}	4,64*	0,95 ^{ns}	0,89 ^{ns}
Média geral	16,21	3,01	6,72	0,54	1,74	1,49
CV (%)	17,53 [#]	17,14 [#]	32,37	28,12	35,21	13,57 [#]
Tratamentos	Exportação relativa (%)					
DKB 390 Com	27,89	37,29	13,10	3,82	20,47	26,69
DKB 390 Sem	32,52	32,86	12,99	5,83	23,93	41,18
DKB 350 Com	43,18	50,86	22,32	6,53	31,38	47,53
DKB 350 Sem	26,35	31,21	13,96	6,15	26,54	24,82

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**, * e ^{ns}: significativas em p <0,01, 0,01 <p <0,05, e não significativas, respectivamente.

#: dados ajustados pela seguinte equação $(X + 0,5)^{0,5}$.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Observou-se interação significativa para a exportação de Ca em kg t⁻¹ grãos produzidos, entre os híbridos de milho e inoculação com *Azospirillum brasilense*, cujo desdobramento consta na Tabela 13. O híbrido DKB 350 quando inoculado exportou mais Ca, enquanto que o DKB 390 PRO quando inoculado ou não com a bactéria não diferiu quanto à exportação deste nutriente.

Tabela 13- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com *A. brasilense* para extração de Ca em kg t⁻¹ de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.

Híbridos	Exportação de Ca (kg t ⁻¹ de grão produzido)	
	Com <i>Azospirillum</i>	Sem <i>Azospirillum</i>
DKB 390	0,48 bA	0,50 aA
DKB 350	0,75 aA	0,44 aB
DMS (5%)	0,24	

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Elaboração da própria autora.

A sequência decrescente de exportação de macronutrientes por plantas de milho em kg ha⁻¹ foi de N>K>P>Mg>S>Ca. Enquanto, Ueno et al. (2013) observaram quantidades de macronutrientes exportadas também por grãos de milho em kg ha⁻¹ de 154,8 de N; 29,4 de K; 24,2 de P; 10,6 de Ca e 9,1 de Mg. Por sua vez, Cruz et al. (2012) constataram valores de exportação de nutrientes em kg t⁻¹ grãos de milho de 15,8 de N; 4,8 de K; 3,8 de P; 1,5 de Mg; 1,1 de S e 0,5 de Ca.

A exportação relativa de macronutrientes ocorreu com maior intensidade no híbrido triplo DKB 350 inoculado obtendo valores de 43% de N, 51% de P, 22% de K, 7% de Ca, 31% de Mg e 48% de S removido com os grãos da área de cultivo (Tabela 12). Entretanto, o mesmo híbrido não inoculado removeu menores quantidades de nutrientes (26% de N, 31% de P, 14% de K, 6% de Ca, 27% de Mg e 25% de S) com os grãos. Logo, o híbrido triplo inoculado em relação a exportação relativa, foi superior ao mesmo híbrido não inoculado em 64% para N, 63% para P, 60% para K, 6% para Ca, 18% para Mg e 91% para S. O híbrido simples DKB 390 quando inoculado também foi superior na exportação relativa, em 55% para N, 36% para P, 70% para K, 71% para Ca, 53% para Mg e 78% para S.

Estes resultados indicam que a inoculação com *Azospirillum brasilense* interfere não apenas na absorção de nutrientes, mas também na sua redistribuição via floema junto com fotoassimilados, sendo importante para o enchimento de grãos e o incremento na produtividade da cultura do milho. O gênero *Azospirillum* de bactérias pode atuar no crescimento das plantas ao reduzir o nitrato em amônia e esta energia pode ser disponibilizada para outros processos metabólicos vitais (FERREIRA; FERNANDES; DÖBEREINER, 1987). Outras possíveis explicações para tal resultado seria que esta bactéria de vida livre com características endofíticas, estimula o crescimento das plantas por múltiplos mecanismos, incluindo síntese de fitohormônios, melhoria da nutrição nitrogenada, melhoria em parâmetros fotossintéticos das folhas, atenuação/minimização de estresse e controle biológico da microbiota patogênica (BARASSI et al., 2008; BASHAN; BASHAN, 2010). Sendo assim,

como a redistribuição de nutrientes na planta é um processo ativo (demanda ATP) e é controlado pela ação fitohormonal nos pontos de crescimento, tais relatos supracitados explicariam a maior quantidade de nutrientes acumulados nos grãos de milho (maior eficiência de absorção devido ao maior volume de raízes).

Avaliando a cultura do milho, Coelho (2006) observou exportações relativas de 63% para N, 89% para P, 26% para K, 12% para Ca, 36% para Mg e 45% para S, valores estes que são superiores aos do presente trabalho para N e K, demonstrando que diferentes genótipos apresentam exigências nutricionais divergentes e que as condições edafoclimáticas interferem na nutrição de plantas. O autor também destacou que em cultivos onde o milho é destinado a produção de grãos, a maior parte do P absorvido é translocado para os grãos (77 a 86%), seguido pelo N (70 a 77%), S (60%), Mg (47 a 69%), K (26 a 43%) e o Ca (3 a 7%), o que sugere que os restos culturais do milho devolvem ao solo grande parte dos nutrientes contidos, principalmente K e Ca.

Neste sentido, também é possível relatar que a maior parte do Ca, K e Mg (Tabela 12), e cerca de metade do P, S e N poderão ser restituídos ao solo por meio dos restos culturais do híbrido triplo inoculado; e este quando não inoculado poderá restituir até 68% dos macronutrientes ao solo. O híbrido simples DKB 390 quando inoculado e não inoculado restituirá até 63 e 58%, respectivamente, dos macronutrientes ao solo por meio da palhada e raízes.

4.10 EXTRAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES

Com relação as quantidades totais de micronutrientes extraídos (Tabela 14), entre os híbridos, houve diferença significativa para B e Cu em área (g ha^{-1}), e para Fe tanto em área quanto em g t^{-1} grãos produzidos. A inoculação com *Azospirillum brasilense* proporcionou maior extração de Fe e Mn em g t^{-1} de grãos produzidos.

Tabela 14- Extração de micronutrientes em g ha⁻¹ e em g t⁻¹ de grão produzido de híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.

	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Híbridos	Extração total (g ha⁻¹)				
DKB 390	430,63 a	436,91	2735 a	1911 a	486,89
DKB 350	322,02 b	508,65	1656 b	1796 a	758,02
DMS (5%)	74,52	62,80	576,9	321,2	255,13
Inoculação					
Com <i>Azo</i>	342,02	459,41	2606 a	1961 a	582,01
Sem <i>Azo</i>	410,64	486,16	1784 b	1746 a	662,90
DMS (5%)	74,52	62,80	576,9	321,1	255,13
Teste F					
Híbrido (H)	10,87**	6,68*	17,90**	0,65 ^{ns}	5,78*
Inoculação (I)	4,34 ^{ns}	0,93 ^{ns}	10,39*	2,29 ^{ns}	0,51 ^{ns}
H x I	0,03 ^{ns}	123,05**	4,30 ^{ns}	2,03 ^{ns}	6,53*
Média geral	376,33	472,78	2195	1854	622,46
CV (%)	17,51	11,74	23,24	15,32	15,17 [#]
Híbridos	Extração (g t⁻¹ grão produzido)				
DKB 390	63,66 a	65,92	407,30 a	284,89 a	72,37
DKB 350	50,24 a	77,45	263,90 b	283,19 a	116,09
DMS (5%)	14,90	15,73	87,66	56,39	38,39
Inoculação					
Com <i>Azo</i>	56,57 a	75,32	420,55 a	325,23 a	96,61
Sem <i>Azo</i>	57,34 a	68,04	250,66 b	242,85 b	91,85
DMS (5%)	14,90	15,73	87,66	56,39	38,39
Teste F					
Híbrido (H)	4,15 ^{ns}	2,75 ^{ns}	13,69**	0,01 ^{ns}	6,64*
Inoculação (I)	0,01 ^{ns}	1,10 ^{ns}	19,22**	10,92**	0,08 ^{ns}
H x I	0,07 ^{ns}	34,26**	2,58 ^{ns}	0,15 ^{ns}	3,43*
Média geral	56,95	71,68	335,61	284,04	94,23
CV (%)	23,14	19,40	23,09	17,55	15,71

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

** , * e ^{ns}: significativas em p <0,01, 0,01 <p <0,05, e não significativas, respectivamente.

#: dados ajustados pela seguinte equação (X + 0,5)^{0,5}.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Houve interação significativa para a extração de Cu por área e em g t⁻¹ grãos produzidos (Tabela 15). O híbrido DKB 390 inoculado extraiu maior quantidade de Cu que o DKB 350, e na ausência da inoculação ocorreu o inverso. Quando inoculados, o híbrido DKB 350 e o DKB 390 extraíram menor e maior quantidade de Cu, respectivamente, em relação à quando não foram inoculados.

Tabela 15- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com *A. brasilense* para extração de Cu em g ha⁻¹ e em g t⁻¹ de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.

Extração total de Cu (g ha ⁻¹)		
Híbridos	Com <i>Azospirillum</i>	Sem <i>Azospirillum</i>
DKB 390	577,52 aA	296,30 bB
DKB 350	341,29 bB	676,01 aA
DMS (5%)	88,82	
Extração de Cu (g t ⁻¹ de grão produzido)		
Híbridos	Com <i>Azospirillum</i>	Sem <i>Azospirillum</i>
DKB 390	89,90 aA	41,93 bB
DKB 350	60,75 bB	94,16 aA
DMS (5%)	22,24	

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Para a extração de Zn por área e em g t⁻¹ grãos produzidos também se verificou interação significativa (Tabela 16). Quando inoculado, o híbrido DKB 350 extraiu menor quantidade de Zn por área (g ha⁻¹) em relação à quando não inoculado com a bactéria diazotrófica. Porém em g t⁻¹ grão produzido, com ou sem a inoculação foi indiferente para os dois híbridos.

Tabela 16- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com *A. brasilense* para extração de Zn em g ha⁻¹ e em g t⁻¹ de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.

Extração total de Zn (g ha ⁻¹)		
Híbridos	Com inoculação	Sem inoculação
DKB 390	590,56 aA	383,22 bA
DKB 350	573,46 aB	942,59 aA
DMS (5%)	360,80	
Extração de Zn (g t ⁻¹ de grão produzido)		
Híbridos	Com inoculação	Sem inoculação
DKB 390	90,46 aA	54,28 bA
DKB 350	102,77 aA	129,42 aA
DMS (5%)	54,29	

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Elaboração da própria autora.

De modo geral, constatou-se que o híbrido simples DKB 390 foi capaz de absorver maiores quantidades de B, Fe e Mn, enquanto que o híbrido triplo DKB 350 absorveu mais Cu e Zn. Os híbridos inoculados extraíram menor quantidade de B, Cu e Zn por área, e também de B em g t⁻¹ grão produzido. Entretanto, os híbridos quando inoculados extraíram

maior quantidade de Fe e Mn por área, em relação aos não inoculados (46 e 13% superior, respectivamente); e também de Cu, Fe, Mn e Zn em g t⁻¹ grão produzido (11, 68, 34 e 5% superior, respectivamente).

Quanto a extração de micronutrientes por área os valores médios alcançados no final do ciclo (em g ha⁻¹) foram de 376 de B; 473 de Cu; 2195 de Fe; 1854 de Mn e 623 de Zn. Em contrapartida, Borges (2006) obteve menores valores de B (130 g ha⁻¹), Cu (280 g ha⁻¹) e Mn (640 g ha⁻¹) e maior extração de Zn (2.050 g ha⁻¹). Por sua vez, Coelho et al. (2011) relataram que as quantidades de micronutrientes requeridas pela cultura do milho são ínfimas, e obtiveram extrações para uma produtividade de 9 t de grãos ha⁻¹, de 170 g de B, 110 g de Cu, 2.100 g de Fe, 340 g de Mn e 400 g de Zn. Contudo, vale ressaltar que a deficiência de micronutrientes resulta na desordem de processos metabólicos e redução na produtividade da cultura.

Cruz et al. (2012) observaram extração em g t⁻¹ grãos produzidos de 18, 10, 236, 43 e 48 para B, Cu, Fe, Mn e Zn, porém os autores não consideraram o sistema radicular e não realizaram a inoculação com *Azospirillum brasilense*. Provavelmente, por isso, no presente trabalho a extração destes micronutrientes foram muito superiores, sendo de 57, 72, 336, 284 e 94 g t⁻¹ grão produzido, respectivamente. Além disso, vale ressaltar que híbridos mais modernos são mais exigentes nutricionalmente. Dessa forma, nitidamente verificou-se que a bactéria diazotrófica contribuiu para o aumento da extração de micronutrientes por tonelada de grãos, o que explica as maiores produtividades de grãos de milho obtidas tanto para o híbrido triplo como para o simples inoculados.

Constatou-se a seguinte ordem decrescente de acúmulo total de micronutrientes Fe>Mn>Zn>Cu>B. França e Coelho (2001) também estudando a cultura do milho, inferiram que a sequência de extração de micronutrientes foi Fe > Zn = Mn > Cu. Entretanto, Souza (2015) verificou a seguinte ordem decrescente de extração, Mn > Fe > Zn > Cu. Isto se deve tanto as condições edafoclimáticas, como a diferente exigência em micronutrientes dos híbridos de milho.

A exportação total de micronutrientes diferiu significativamente entre os híbridos somente para Zn (Tabela 17), na qual o híbrido DKB 350 exportou maior quantidade deste nutriente tanto por área quanto por t⁻¹ grãos produzidos. Porém, os híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*, exportaram maior quantidade de Fe, Mn e Zn em g t⁻¹ grãos produzidos (81, 94 e 55% superior, respectivamente) e de Mn total (62% a mais). Todavia quando inoculados, exportaram menor quantidade de Cu em g ha⁻¹ (44% a menos).

Tabela 17- Exportação de micronutrientes em g ha⁻¹, em g t⁻¹ de grão produzido e exportação relativa (%) de híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Selvíria – MS, 2015.

	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Híbridos	Exportação total (g ha⁻¹)				
DKB 390	55,91 a	118,27 a	184,06	171,43	157,95 b
DKB 350	51,54 a	142,86 a	168,44	175,84	221,53 a
DMS (5%)	26,04	40,63	145,84	79,89	61,48
Inoculação					
Com <i>Azo</i>	58,29 a	107,10 b	211,99	214,88	213,55 a
Sem <i>Azo</i>	49,16 a	154,02 a	140,52	132,39	165,93 a
DMS (5%)	26,04	40,63	145,84	79,89	61,48
Teste F					
Híbrido (H)	0,14 ^{ns}	1,87 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,02 ^{ns}	5,47*
Inoculação (I)	0,63 ^{ns}	6,82*	1,23 ^{ns}	5,46*	3,07 ^{ns}
H x I	0,00 ^{ns}	0,18 ^{ns}	9,33*	4,78*	0,01 ^{ns}
Média geral	53,72	130,56	176,25	173,63	189,74
CV (%)	20,95 [#]	27,52	32,56 [#]	19,93 [#]	28,65
Híbridos	Exportação (g t⁻¹ grão produzido)				
DKB 390	8,24 a	17,27 a	26,89	25,56	23,80 b
DKB 350	8,27 a	21,84 a	28,79	29,02	35,31 a
DMS (5%)	4,19	5,89	20,70	12,87	10,53
Inoculação					
Com <i>Azo</i>	9,63 a	17,62 a	35,85	35,98	35,94 a
Sem <i>Azo</i>	6,88 a	21,49 a	19,83	18,59	23,18 b
DMS (5%)	4,19	5,89	20,70	12,87	10,53
Teste F					
Híbrido (H)	0,00 ^{ns}	3,08 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,37 ^{ns}	6,11*
Inoculação (I)	2,20 ^{ns}	2,21 ^{ns}	3,06*	9,34*	7,52*
H x I	0,23 ^{ns}	0,04 ^{ns}	12,23**	6,23*	0,34 ^{ns}
Média geral	8,25	19,55	27,84	27,29	29,56
CV (%)	20,66 [#]	26,65	30,41 [#]	20,25 [#]	31,50
Tratamentos	Exportação relativa de micronutrientes (%)				
DKB 390 Com	15,10	17,14	11,03	8,21	32,24
DKB 390 Sem	11,29	49,90	3,74	10,00	34,89
DKB 350 Com	21,40	36,04	2,52	14,21	49,69
DKB 350 Sem	12,77	25,50	16,43	5,29	22,47

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

** , * e ^{ns}: significativas em p <0,01, 0,01 <p <0,05, e não significativas, respectivamente.

#: dados ajustados pela seguinte equação (X + 0,5)^{0,5}.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Houve interação significativa para exportação de Fe (Tabela 18) e Mn (Tabela 19) tanto em g ha⁻¹ quanto em g t⁻¹ de grãos produzidos. Para a exportação de Fe, o híbrido triplo DKB 350 exportou mais quando inoculado do que quando não inoculado com a bactéria diazotrófica, e para o híbrido simples DKB 390 não se constatou diferença significativa, isso tanto em área quanto em g t⁻¹ grão produzido. Quando se comparam os híbridos, ambos

inoculados, na exportação de Fe em g t⁻¹ de grãos produzidos, o híbrido triplo superou o simples mais uma vez na extração de Fe.

Tabela 18- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com *A. brasilense* para exportação de Fe em g ha⁻¹ e em g t⁻¹ de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.

Híbridos	Exportação total de Fe (g ha ⁻¹)	
	Com <i>Azospirillum</i>	Sem <i>Azospirillum</i>
DKB 390	212,33 aA	246,80 aA
DKB 350	302,65 aA	34,23 bB
DMS (5%)	206,25	
Híbridos	Exportação de Fe (g t ⁻¹ de grão produzido)	
	Com <i>Azospirillum</i>	Sem <i>Azospirillum</i>
DKB 390	18,90 bA	34,88 aA
DKB 350	52,80 aA	4,79 bB
DMS (5%)	29,27	

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 19- Desdobramento da interação híbridos e inoculação com *A. brasilense* para exportação de Mn em g ha⁻¹ e em g t⁻¹ de grão produzido de milho. Selvíria – MS, 2015.

Híbridos	Exportação total de Mn (g ha ⁻¹)	
	Com <i>Azospirillum</i>	Sem <i>Azospirillum</i>
DKB 390	174,09 aA	168,78 aA
DKB 350	255,76 aA	96,00 aB
DMS (5%)	112,98	
Híbridos	Exportação de Mn (g t ⁻¹ de grão produzido)	
	Com <i>Azospirillum</i>	Sem <i>Azospirillum</i>
DKB 390	27,15 aA	23,96 aA
DKB 350	44,82 aA	13,22 aB
DMS (5%)	18,21	

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Elaboração da própria autora.

Para a exportação de Mn, em g ha⁻¹ e em g t⁻¹ de grãos produzidos, os resultados foram similares ao da exportação de Fe. O híbrido DKB 350 exportou mais quando inoculado com *A. brasilense* do que quando não inoculado, e para o DKB 390 não houve diferença em relação a inoculação.

Segundo Cruz et al. (2012), na produção de uma tonelada de grãos, a cultura do milho exporta em média 3,2; 1,2; 11,6; 6,1 e 27,6 g de B, Cu, Fe, Mn e Zn, enquanto que no

presente trabalho os valores de exportados de micronutrientes foram de 8,3 g de B; 19,6 g de Cu; 27,8 g de Fe; 27,3 g de Mn e 29,6 g de Zn. Portanto, a exportação de micronutrientes foi superior na presente pesquisa e apresentou a seguinte ordem decrescente, $Zn > Fe > Mn > Cu > B$.

Com relação a exportação relativa de micronutrientes (Tabela 17), esta ocorreu de forma mais acentuada no híbrido triplo DKB 350 inoculado, apresentando valores de 21% de B, 36% de Cu, 2,5% de Fe, 14% de Mn e 50% de Zn. O tratamento que removeu menor quantidade de micronutrientes da área foi o DKB 350 não inoculado, exportando apenas 13% de B, 26% de Cu, 16% de Fe, 5% de Mn e 23% de Zn. Dessa forma, no híbrido DKB 350 inoculado, a exportação relativa de micronutrientes da área foi superior em cerca de 68% para B, 41% para Cu, 169% para Mn e 121% para Zn em relação ao não inoculado, o que significa que, novamente, maiores quantidades de nutrientes estarão presentes nos grãos colhidos, assim enriquecendo-os nutricionalmente. Ou seja, a inoculação com *Azospirillum brasilense* pode contribuir de maneira mais sustentável com a biofortificação agrônômica deste cereal, com destaque para Fe, Mn e Zn.

Vale destacar que a inoculação com esta bactéria diazotrófica no híbrido triplo de milho (DKB 350), resultou na maior exportação total de macronutrientes (Tabela 12) e de micronutrientes (Tabela 17). Estes resultados indicam que a inoculação com *Azospirillum brasilense* interfere não apenas na absorção de nutrientes, mas também na sua redistribuição via floema junto com fotoassimilados, sendo importante para o enchimento de grãos e o incremento na produtividade da cultura do milho. Além disso, com a maior exportação de nutrientes, devido em partes, à maior eficiência de uso de nutrientes, mais pesquisas devem ser realizadas para averiguar se os teores de nutrientes do solo não irão diminuir, a ponto de ser necessária a aplicação de maiores doses de fertilizantes.

5 CONCLUSÕES

A inoculação com *Azospirillum brasilense* proporciona maior acúmulo de matéria seca no milho (incremento de 29% na MS de raízes e 9% na MS total) e maior produtividade de grãos de milho (incremento de 18% na produtividade), independentemente do híbrido.

O acúmulo total máximo em híbridos de milho, de N, P, Ca, Mg, S, Cu e Zn ocorre no estágio R4, de K, B, Fe e Mn entre os estádios R2 e R4 e o pico de ICF no estágio R1. Contudo, dependendo do nutriente e híbrido de milho, a inoculação com *A. brasilense* pode antecipar ou postergar o máximo acúmulo de nutrientes.

Independente do híbrido e da inoculação com *A. brasilense*, a extração de nutrientes por plantas de milho em ordem decrescente foi de N>K>Ca>P>Mg>S>Fe>Mn>Zn>Cu>B, enquanto a exportação foi N>K>P>Mg>S>Ca>Zn>Fe>Mn>Cu>B.

O híbrido simples DKB 390 extraiu maior quantidade de K, Ca, Mg, B e Fe em relação ao híbrido triplo DKB 350, independentemente da inoculação com *A. brasilense*.

As plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* extraíram e exportaram maiores quantidades de macronutrientes (em kg t⁻¹ de grãos produzidos) comparada as não inoculadas, com exceção do S e do Ca. Estas também extraíram maiores quantidades de Fe e Mn, e exportaram maiores quantidades de Fe, Mn e Zn (em g t⁻¹ de grãos produzidos).

O híbrido triplo DKB 350 inoculado com *A. brasilense* se destacou com as maiores exportações relativas de nutrientes. O ICF deste híbrido foi superior com a inoculação.

A inoculação com esta bactéria diazotrófica pode contribuir de maneira mais sustentável para a biofortificação agrônômica deste cereal.

REFERÊNCIAS

- AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 241-248, 2002.
- ARAÚJO, E. O.; MARTINS, M. R.; VITORINO, A. C. T.; MERCANTE, F. M.; URQUIAGA, S. S. Effect of nitrogen fertilization associated with diazotrophic bacteria inoculation on nitrogen use efficiency and its biological fixation by corn determined using N15. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 9, n. 9, p. 643-650, 2015.
- ARNON, I. **Mineral nutrition of maize**. Bern: International Potash Institute, 1975. 452 p.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, 1997.
- BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J.; CREUS, C. M.; CARROZZI, L. E.; CASANOVAS, W. M.; PEREYRA, M. A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 49-59.
- BARILLI, D. R.; TSUTSUMI, C. Y.; MAY, A.; MIRANDA, A. M.; HACHMANN, T. L.; MODOLON, T. A. Eficiência na inoculação do milho com *Azospirillum brasilense* em diferentes períodos antes da semeadura. **Cadernos de Agroecologia**, Fortaleza, v. 6, n. 2, p.1-5, 2011.
- BASHAN Y.; BASHAN L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 108, n. 1, p. 77-136, 2010.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 2, p.103-121, 1997.
- BASI, S. **Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura de milho**. 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.
- BASSOI, L. H.; REICHARDT, K. Acúmulo de matéria seca e de nitrogênio em milho cultivado no período de inverno com aplicação de nitrogênio no solo e via água de irrigação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 12, p.1361-1373, 1995.
- BERGAMASCHI, H. Fenologia. In: DEPARTAMENTO DE PLANTAS FORRAGEIRAS E AGROMETEOROLOGIA. **Relações clima planta**. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Disciplinas de Graduação. Disponível em:
<<http://www.ufrgs.br/agropfagrom/disciplinas/502/fenolog.doc/2006>. Acesso em: 4 de mar. 2016.

BERGAMASCHI, H. **Necessidades e sensibilidade da cultura do milho às condições hídricas e térmicas.** In: DEPARTAMENTO DE PLANTAS FORRAGEIRAS E AGROMETEOROLOGIA. **Relações clima planta.** Porto Alegre: UFRGS, 2008. Palestras. Disponível em: <http://www.abms.org.br/cn_milho/palestras/005.pdf>. Acesso em: 8 de abr. de 2016.

BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. **O milho e o clima.** Porto Alegre: Emater: Ascar, 2014. Disponível em: <http://www.emater.tche.br/site/arquivos/milho/O_Milho_e_o_Clima.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2016.

BERGONCI, J. I.; BERGAMASCHI, H.; SANTOS, A. O.; FRANÇA, S.; RADIN, B. Eficiência da irrigação em rendimento de grãos e matéria seca de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 7, p. 949-956, 2001.

BORGES, I. D. **Marcha de absorção de nutrientes e acúmulo de matéria seca em milho.** 2006. 132 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Fitotecnia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

BORGES, E. A.; FERNADES, M. S.; LOSS, A.; SILVA, E. E.; SOUZA, S. R. Acúmulo e remobilização de nitrogênio em variedades de milho. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 278-286, 2006.

BORGES, J. D.; BARROS, R. G.; SOUZA, E. R. B.; OLIVEIRA JUNIOR, J. P. D.; LEANDRO, W. M.; OLIVEIRA, I. P.; CARNEIRO, M. F.; NAVES, R. V.; SONNENBERG, P. E. Teores de micronutrientes nas folhas de milho fertilizadas com lodo de curtume. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 2, p. 1-6, 2007.

BORRÁS, L.; OTEGUI, M. E. Maize kernel weight response to postflowering source–sink ratio. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 6, p.1816-1822, 2001.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of Gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in Cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 90, n. 1, p.45-47, 1989.

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

BROCH, D. L.; RANNO, S. K. Fertilidade do solo, adubação e nutrição da cultura do milho safrinha, In: BROCH, D. L.; RANNO, S. K. **Tecnologia e produção: milho safrinha e culturas de inverno.** Maracaju: Fundação MS, 2009. p. 5-29.

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

CANTARELLA, H.; RAIJ, B. van; CAMARGO, C. E. O. Cereais. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de calagem e adubação para o Estado de São Paulo.** Campinas: Instituto Agrônomo e Fundação IAC, 1997, 285 p. (Boletim Técnico, 100).

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

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

CENTRO REGIONAL DE INFORMAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS - UNRIC. **For western europe**: relatório das Nações Unidas estima que a população mundial alcance os 9,6 mil milhões em 2050. Brussels: UNRIC Brussels, 2014. Disponível em: <<http://www.unric.org/pt/actualidade/31160-relatorio-das-nacoes-unidas-estima-que-a-populacao-mundial-alcance-os-96-mil-milhoes-em-2050->>. Acesso em: 11 ago. 2016.

COELHO, A. M. **Nutrição e adubação de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. p.1-10. (Circular Técnica, 78).

COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. **Seja o doutor do seu milho**: nutrição e adubação. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1995. p.1-9. (Encarte - Arquivo do Agrônomo, 2).

COELHO, M. A.; FRANÇA, G. E.; PITTA, G. V. E.; ALVES, V. M. C.; HERNANI, L. C. **Nutrição e adubação do milho**. 7. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/feraduba.htm>. Acesso em: 25 jun. 2016.

COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. **Nutrição e adubação do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2014. 17 p. Disponível em: <<http://www.dpv24.iciag.ufu.br/new/dpv24/Apostilas/NUTRICA0%20E%20ADUB.%20MI LHO%20-%20CNPMS.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2016.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato responseto bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.). ***Azospirillum* sp.: cellphysiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 87-95.

COSTA, R. R. G. F.; QUIRINO, G. S. F.; NAVES, D. C. F.; SANTOS, C. B.; ROCHA, A. F. S. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 3, p. 304-311, 2015.

CRUZ, S. C. S.; PEREIRA, F. R. S.; BICUDO, S. J.; ALBUQUERQUE, A. W.; SANTOS, J. R.; MACHADO, C. G. Nutrição do milho e da *Brachiaria decumbens* cultivados em consórcio em diferentes preparos do solo. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 5, p. 733-739, 2008.

CRUZ J. C.; COELHO A. M.; GARCIA J. C.; PEREIRA FILHO, I. A. **Obtenção de altas produtividades de milho em sistema de plantio direto em solos de cerrado**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012. p. 1-11 (Comunicado Técnico, 198).

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; QUEIROZ, L. R. **Milho**: cultivares para 2013/2014. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/index.php>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

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

DELL, B.; HUANG, L. Physiological response of plants to low boron. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 193, n. 1- 2, p. 103-120, 1997.

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, n. 9, p. 645-651, 1996.

DIDONET, A. D.; LIMA, O. S.; CANDATEN, A. A.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido à inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 401-411, 2000.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and A. irakense strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 36, n. 4, p. 284-297, 2002.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J. F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n. 9, p. 871-879, 2001.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 173-180.

DUARTE, A. P.; KIEHL, J. C.; CAMARGO, M. A. F.; RECO, P. C. Acúmulo de matéria seca e nutrientes em cultivares de milho originárias de clima tropical e introduzidas de clima temperado. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 2, n. 3, p. 1-20, 2003.

DUNCAN, W. G.; HATFIELD, A. L.; RAGLAND, J. L. The growth and yield of corn. II. Daily growth of corn kernels. **Agronomy Journal**, Madison, v. 57, n. 2, p. 221-223, 1965.

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

- FANCELLI, A. L. **Boas práticas para o uso eficiente de fertilizantes na cultura do milho**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute Brazil- IPNI, 2010. p. 1-16 (Informações Agronômicas, 131).
- FERREIRA, M. C. B.; FERNANDES, M. S.; DÖBEREINER, J. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 4, n. 1-2, p. 47-53, 1987.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, A. S.; PIRES, R. R.; RABELO, P. G.; OLIVEIRA, R. C.; LUZ, J. M. Q.; BRITO, C. H. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutriente addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 72, p.103-108, 2013.
- FRANÇA, G. E.; COELHO, A. M. Adubação do milho para silagem. In: CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; RODRIGUES, J. A.; FERREIRA, J. J. (Ed.). **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. p. 53-83.
- GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; SANTINI, J. M. K.; ALVES, C. J.; NOGUEIRA, L. M.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; ANDREOTTI, M.; BELLOTTE, J. L. M. Corn Yield and Foliar Diagnosis Affected by Nitrogen Fertilization and Inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 40, n. 1, p. 1-18, 2016.
- GENTER, C. F.; JONES, G. D.; CARTER, M. T. Dry matter accumulation and depletion in leaves, stems, and ears of maturing maize. **Agronomy Journal**, Madison, v. 62, n. 4, p. 535-337, 1970.
- GODOY, J. C.; WATANABE, S. H.; FIORI, C. C. L.; GUARIDO, R. C. Produtividade de milho em resposta a doses de nitrogênio com e sem inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 6, n. 1, p. 26-30, 2011.
- HALL, P. G.; KRIEG, N. R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. **Applied and environmental microbiology**, Washington , v. 47, n. 2, p. 433-435, 1984.
- HIROCE, R.; FURLANI, A. M. C.; LIMA, M. **Extração de nutrientes na colheita por populações e híbridos de milho**. Campinas: Instituto Agronômico, 1989. p. 1-24 (Boletim científico, 17).
- HOFFMANN, L. V. Biologia molecular da fixação biológica do nitrogênio. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. cap. 9, p. 153-164.
- 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. (Ed.). ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 17-35.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 331, n. 1, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: EMBRAPA SOJA, 2011. p.1-137. (Documentos, 325).

IKEDA, A. C. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Genética)– Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

JORDÃO, L. T.; LIMA, F. F.; LIMA, R. S.; MORETTI, P. A. E.; PEREIRA, H. V.; MUNIZ, A. S.; OLIVEIRA, M. C. N. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum braziliense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária. In: FERTBIO, 2010, Guarapari. **Anais...** Viçosa: SBCS, 2010.

KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; BEM, E. A. D.; PORTUGAL, J. R.; VILELA, R. G. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 527-538, 2013.

KLOPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 39-44, 1989.

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

LUTZ, J. A.; GENTER, C. F.; HAWKINS, G. W. Effect of Soil pH on Element Concentration and Uptake by Maize: I. P, K, Mg, and Na. **Agronomy Journal**, Madison, v. 64, n. 5, p.581-583, 1972.

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

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. p. 1-23 (Circular Técnica, 22).

MAGGIO, M. A. **Acúmulo de massa seca e extração de nutrientes por plantas de milho doce híbrido Tropical**. 2006. 47 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)- Instituto Agrônomo, Campinas, 2006.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251 p.

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

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ceres, 2006. 631 p.

MALAVOLTA, E.; MORAES, M. F. Fundamentos do nitrogênio e do enxofre na nutrição mineral de plantas cultivadas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITTI, G. C. (Org). **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI, 2007. p. 189-238.

MARSCHNER, P. **Mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. Austrália: Elsevier, 2012. 651 p.

MAZZUCHELLI, R. C. L.; SOSSAI, B. F.; ARAUJO, F. F. Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 10, n. 2, p. 40-47, 2014.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, n. 3, p. 326-335, 2006.

MELLO, N. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho e trigo**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)– Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

MOZAFAR, A. Effect of boron on ear formation and yield components of two maize (*Zea mays* L.) hybrids. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 10, n. 3, p.319-332, 1987.

MULLER, T. M. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* associada a níveis crescentes de adubação nitrogenada e o uso de bioestimulante vegetal na cultura do milho**. 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Estadual do Centro-Oeste- UNICENTRO, Guarapuava, 2013.

MUÑOZ-GARCIA, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; VALDÉS, M. Promoción del crecimiento del maíz por cepas productoras de siderófos de *Azospirillum* y *Pseudomonas fluorescentes*. In: CONGRESO NACIONAL DE LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO YI ENCUENTRO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO, 3., 1991. Cuernavaca. **Anais...** Cuernavaca: México, 1991. p.61.

NEHL, D. B.; ALLEN, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p.1-20, 1997.

NHEMI, I. M. D.; FERRAZ, J. V.; NHEMI FILHO, V. A., SILVA, M. L. M. Milho: a diferença aparece no manejo. In: _____. **Agrianual 2004**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Argos, 2004. p. 377 – 378.

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A.; NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p.1687-1698, 2011.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT- OECD; - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION- FAO. **OECD-FAO agricultural outlook 2016-2025**. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development, 2016. Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org>>. Acesso em: 21 jul. 2016.

OHLAND, R. A. A.; SOUZA, L. C. F.; HERNANI, L. C.; MARCHETTI, M. E.; GOÇALVES, M. C. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 538-544, 2005.

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

PANDOLFO, C. M.; VOGT, G. A.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; GALLOTTI, G. J. M.; ZOLDAN, S. R. Performance of maize inoculated with *Azospirillum brasilense* associated with doses of nitrogen. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 27, n. 3, p. 94-99, 2015.

PIEKIELEK, W. P.; FOX, R. H.; TOTH, J. D.; MACNEAL, K. E. Use of a chlorophyll meter at the early dent stage of corn to evaluate nitrogen sufficiency. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 3, p. 403-408, 1995.

PORTUGAL, J. R.; ARF, O.; LONGUI, W. V.; GITTI, D. C.; BARBIERI, M. K. F.; GONZAGA, A. R.; TEIXEIRA, D. S. Inoculação com *Azospirillum brasilense* via foliar associada à doses de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29., 2012, Águas de Lindóia. **Anais...** Campinas: IAC-ABMS, 2012. p. 1413-1419.

PORTUGAL, J. R. **Coberturas vegetais e doses de nitrogênio, associadas à inoculação com *Azospirillum brasilense*, no cultivo do milho na região de Cerrado**. 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Sistemas de Produção)- Faculdade de Engenharia- FE, Universidade Estadual Paulista- UNESP, Ilha Solteira, 2015.

PRADO, R. M. **Nutrição de plantas**. São Paulo: Editora Unesp, 2008. 407 p.

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

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

RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para Avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2001. 285 p.

RAMBO, L.; SILVA, P. R. F.; STRIEDER, M. L.; SANGOI, L.; BAYER, C.; ARGENTA, G. Monitoramento do nitrogênio na planta e no solo para predição da adubação nitrogenada em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 407-417, 2007.

REIS, V.M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. p. 1-22 (Documentos, 232).

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. 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, 2008.

- REPKE, R. A.; CRUZ, S. J. S.; SILVA, C. J.; FIGUEIREDO, P. G.; BICUDO, S. J. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 3, p. 214-226, 2013.
- RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **Como a planta de milho se desenvolve**. Piracicaba: Informações Agronômicas, 2003. 20 p.
- SÁ, J. C. M.; FERREIRA, A. O.; BRIEDIS, C.; VIEIRA, A. M.; FIGUEIREDO, A. G. Crescimento radicular, extração de nutrientes e produção de grãos de genótipos de milho em diferentes quantidades de palha de aveia-preta em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1207-1216, 2010.
- SANGOI, L.; SILVA, L. M. M.; MOTA, M. R.; PANISON, F.; SCHMITT, A.; SOUZA, N. M.; GIORDANI, W.; SCHENATTO, D. E. Desempenho Agronômico do Milho em Razão do Tratamento de Sementes com *Azospirillum* sp. e da Aplicação de Doses de Nitrogênio Mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 1141-1150, 2015.
- SANTOS, K. C.; NOVAKOWISKI, J. H.; BAZZANEZI, A. N.; NOVAKOWISKI, J. H.; PECENTCHUK, F.; SANDINI, I. E. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* sobre a produtividade e massa de mil grãos de diferentes híbridos de milho. In: SEMANA DE INTEGRAÇÃO, ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2., 2011, Guarapuava. **Anais...** Guarapuava: UNICENTRO, 2011. p. 1-4.
- SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013.
- SCHRODER, J. J.; NEETESON, J. J.; OENEMA, O.; STRUIK, P. C. Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production? Reviewing o state of art. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 66, p. 151-164, 2000.
- SOARES, F. N. **Leguminosas forrageiras**. 2009. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária)– Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará – UFPA, Castanhal, 2009.
- SOUZA, J. C. **Resíduos orgânicos para melhoria de solo degradado por processos associados à desertificação**. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Solos e Nutrição de Plantas)– Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- SOUZA, L. C. F.; GONÇALVES, M. C.; SOBRINHO, T. A.; FEDATTO, E.; ZANON, G. D.; HASEGAWA, E. K. B. Culturas antecessoras e adubação nitrogenada na produtividade de milho em plantio direto irrigado. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 2, n. 3, p. 55-62, 2003.
- STRZELCZYK, E.; KAMPERT, M.; LI, C. Y. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, Jena, v. 149, n. 1, p. 55-60, 1994.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant physiology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999. 792 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Nutrição Mineral. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 96-101.

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

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 37, n. 5, p. 1016-1024, 1979.

UENO, R. K.; NEUMANN, M.; MARAFON, F.; REINEHR, L. L.; POCZYNEK, M.; MICHALOVICZ, L. Exportação de macronutrientes do solo em área cultivada com milho para alimentação de bovinos confinados. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 3001-3018, 2013.

VARVEL, G. E.; SCHEPERS, J. S.; FRANCIS, D. D. Ability for in-season correction of nitrogen deficiency in corn using chlorophyll meters. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, n. 4, p. 1233-1239, 1997.

VASCONCELLOS, C. A.; BARBOSA, J. V. A.; SANTOS, H. L.; FRANCA, G. E. Acumulação de massa seca e nutrientes por híbridos de milho cultivados com e sem irrigação suplementar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 8, p. 887-901, 1983.

VASCONCELLOS, C. A.; VIANA, M. C. M.; FERREIRA, J. J. Acúmulo de matéria seca e de nutrientes em milho cultivado no período inverno-primavera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 11, p. 1835-1845, 1998.

VASCONCELLOS, C. A.; PEREIRA FILHO, I. A.; CRUZ, J. C. **Adubação para o milho verde**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. p. 1-65 (Circular Técnica, 17).

VINHAL-FREITAS, I. C.; RODRIGUES, M. B. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. **Agropecuária Técnica**, Areia, v. 31, n. 2, p. 143-154, 2010.

VON PINHO, R. G.; BORGES, I. D.; PEREIRA, J. L. A. R.; REIS, M. C. Marcha de absorção de macronutrientes e acúmulo de matéria seca em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 8, n. 2, p.157-173, 2009.

WAGNER, M. V.; JADOSKI, S. O.; LIMA, A. S.; MAGGI, M. F.; POTT, C. A.; SUCHORONCZEK, A. Avaliação do ciclo fenológico da cultura do milho em função da soma térmica em Guarapuava, Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Guarapuava, v. 4, n. 1, p.135-149, 2011.

WARNOCK, R. E. Micronutrient uptake and mobility within corn plants (*Zea mays* L.) in relation to phosphorus-induced zinc deficiency. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 34, n. 5, p.765-769, 1970.

APÊNDICE – FOTOS DO EXPERIMENTO

Figura 15- Momento da sementeira mecânica dos híbridos de milho (esquerda) e área após a sementeira (direita).



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 16- Cultura do milho no estágio V4/V5.



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 17- Plantas de milho em estágio V6 (esquerda) e momento avaliação do índice de clorofila foliar no estágio V4 (direita).



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 18- Cultura do milho no estágio V8.



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 19- Plantas de milho em pleno florescimento masculino (pendoamento) (esquerda) e espiga de uma planta de milho no estágio R1/R2 (direita).



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 20- Plantas de milho em estágio R2 – grãos leitosos (esquerda) e espiga em estágio R4 – grão farináceo (80 DAE) (direita).



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 21- Plantas em estágio R5 (esquerda) e espigas de milho em estágio R6 (maturidade fisiológica/colheita) (direita).



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 22- Preparação do sistema radicular das plantas de milho (esquerda) e sua lavagem (direita).



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 23- Sistema radicular de plantas de milho (esquerda) e realização das análises das amostras das diferentes partes das plantas em laboratório (direita).



Fonte: Elaboração da própria autora.