

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

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E ESTIRPES DA BACTÉRIA
Azospirillum brasilense NOS COMPONENTES DE PRODUÇÃO EM PLANTAS DE
TRIGO**

RODRIGO ALBERTO REPKE

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

BOTUCATU – SP
Setembro 2016

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

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E ESTIRPES DA BACTÉRIA
Azospirillum brasilense NOS COMPONENTES DE PRODUÇÃO EM PLANTAS DE
TRIGO**

RODRIGO ALBERTO REPKE

Orientador: Prof. Dr. Silvio José Bicudo

Co-Orientador: Prof. Dr. Rogério Peres Soratto

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

BOTUCATU – SP
Setembro 2016

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

R425e Repke, Rodrigo Alberto, 1988-
Efeito de diferentes concentrações e estirpes da bactéria *Azospirillum brasilense* nos componentes de produção em plantas de trigo / Rodrigo Alberto Repke. - Botucatu : [s.n.], 2016
xii, 87 f. : grafs. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016

Orientador: Silvio José Bicudo

Coorientador: Rogério Peres Soratto

Inclui bibliografia

1. Trigo. 2. Bactérias nitrificantes. 3. Nitrogênio - Fixação. 4. Sustentabilidade. I. Bicudo, Silvio José. II. Soratto, Rogério Peres. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

A Deus pelo dom da vida,

Aos meus pais Helio e Rita, irmãos Luiz Fernando e Juliana.

Aos meus avós Aparecida e Thereza, João e Alberto (*in memoriam*).

A Mahyara pelo afeto e companheirismo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A meu Orientador Silvio José Bicudo pela valiosa orientação pessoal e profissional.

A meu Co-orientador Rogério Peres Soratto pela ajuda com o intercambio e orientação pessoal e profissional.

A todos os mestres que contribuíram com minha formação desde a infância.

Aos funcionários do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal.

Aos meus amigos funcionários da Fazenda experimental da FCA.

Aos meus amigos e funcionários da Iowa State University: Louis Thompson, Ryan Oltmans, Sam Groenenboom, John Jones, Mazhar, Pablo, Cecilia Crespo, Joanna Courteau e Antonio Mallarino, pela amizade e ajuda durante o intercâmbio.

Aos meus amigos: Mário, Marcio, Priscila, Sihelio, Carlos, Pedro, Breno.

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

A Capes pela concessão de bolsa de estudo.

A Dra. Mariangela Hungria da Embrapa Soja pelo fornecimento de informações e materiais.

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

SUMÁRIO

Lista De Tabelas.....	VIII
Lista de Figuras.....	XII
1. RESUMO.....	01
2. SUMMARY.....	03
3. INTRODUÇÃO.....	05
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	07
4.1. A cultura do trigo.....	07
4.2 O elemento nitrogênio.....	08
4.3 Adubação nitrogenada na cultura do trigo.....	09
4.4 Fixação biológica do nitrogênio.....	10
4.5 Gênero <i>Azospirillum</i>	12
4.6 Modo de ação da bactéria <i>Azospirillum brasilense</i>	13
4.7 Fatores a serem considerados na inoculação.....	14
4.8 Associação de <i>Azospirillum</i> com a planta.....	16
4.9 Potencial de inoculação de <i>Azospirillum</i> em plantas de trigo.....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5.1. Experimento em Ambiente protegido.....	20
5.1.1. Delineamento experimental.....	20
5.1.2. Parcela experimental.....	22
5.1.3. Dados climatológicos do ano agrícola 2013.....	23
5.1.4. Irrigação.....	23
5.1.5. Solo da área experimental.....	24
5.1.6. Preparo do solo da área experimental.....	24
5.1.7. Adubação de semeadura.....	24
5.1.8. Inoculação das sementes de trigo com as bactérias <i>Azospirillum</i> <i>brasilense</i>	25
5.1.9. Semeadura.....	26
5.1.10. Controle de plantas daninhas.....	26
5.2. Experimento em Ambiente não protegido.....	26

5.2.1. Delineamento experimental.....	26
5.2.2. Parcela experimental.....	27
5.2.3. Dados climatológicos do ano agrícola 2013.....	28
5.2.4. Irrigação.....	29
5.2.5. Solo da área experimental.....	29
5.2.6. Preparo do solo da área experimental.....	30
5.2.7. Adubação de semeadura.....	30
5.2.8. Inoculação das sementes de trigo com as bactérias <i>Azospirillum</i> <i>brasilense</i>	31
5.2.9. Semeadura.....	31
3.2.10. Controle de plantas daninhas.....	31
5.3. Avaliações.....	31
5.3.1. Avaliações periódicas.....	31
5.3.1.1. Número de perfilhos.....	32
5.3.1.2. Altura de planta.....	32
5.3.1.2.1. Altura da última folha totalmente estendida (AB).....	32
5.3.1.2.2. Altura inserção da espiga (AE).....	32
5.3.1.2.3. Altura do ápice da espiga (AP).....	32
5.3.1.3 Florescimento.....	32
5.3.2. Avaliações destrutivas.....	33
5.3.2.1 Área foliar fotossinteticamente ativa.....	33
5.3.2.2 Massa de matéria seca folha.....	33
5.3.2.3 Massa de matéria seca de raiz.....	33
5.3.2.4 Massa de matéria seca caule.....	34
5.3.2.5. Análise das espigas.....	34
5.3.2.6. Massa de mil grãos.....	34
5.3.2.6. Produtividade de grãos.....	34
5.3.3. Análise estatística.....	35
6. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	36
6.1. Experimento em Ambiente protegido.....	36

6.2. Experimento em Ambiente não protegido.....	49
6.3. Correlações.....	62
6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS:.....	66
7. CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Tratamentos aplicados no experimento realizado no campo experimental do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP. Experimento em Ambiente protegido conduzido no ano agrícola 2013, município de Botucatu, SP.....	21
2. Tratamentos aplicados no experimento realizado no campo experimental do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP. Experimento em Ambiente não protegido conduzido no ano agrícola 2013, município de Botucatu, SP.....	27
3. Resultados da análise química do solo da área experimental, na camada de 0 - 20 cm e 20 a 40 cm de profundidade, amostrado antes da instalação do experimento. Ano agrícola 2013.....	30
4. Altura média em cm da última folha totalmente estendida de plantas de trigo aos 20 e 40 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, Ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	36
5. Altura média em cm da última folha totalmente estendida de plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	37
6. Altura média em cm da inserção de espigas das plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu, SP.....	38
7. Altura média em cm do ápice das espigas de plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	39
8. Área foliar (cm ²) de plantas de trigo aos 40, 60 e 80 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	40
9. Massa de matéria seca das folhas (g m ⁻²) de plantas de trigo aos 40, 60 e 80 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente protegido na	

Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	42
10. Massa de matéria seca das raízes (g dm^3) de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	43
11. Massa de matéria seca do colmo (g m^{-2}) aos 40, 60 e 80 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	45
12. Número médio de perfilhos m^{-2} por plantas de trigo aos 20, 40 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	46
13. Número de dias até o florescimento de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	47
14. Número de espigas m^2 , número de espiguetas por espiga e número de grãos por espigas em plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	48
15. Massa de mil grãos (g) e produtividade de grãos (kg ha^{-1}) de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	49
16. Altura média em cm da última folha totalmente estendida de plantas de trigo aos 20 e 40 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido, do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	50
17. Altura média em cm da última folha totalmente estendida de plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido, do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	51
18. Altura média em cm da inserção de espigas das plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido, do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas	

– FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	51
19. Altura média em cm do ápice das espigas de plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido, do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	52
20. Área foliar (cm ²) de plantas de trigo aos 40, 60 e 80 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido, do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	53
21. Massa de matéria seca das folhas (g m ⁻²) de plantas de trigo aos 40, 60 e 80 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido, do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	54
22. Massa de matéria seca das raízes (g dm ³) de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	56
23. Massa de matéria seca do colmo (g m ⁻²) aos 40 e 60 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	57
24. Número médio de perfilhos m ⁻² de plantas de trigo aos 20 e 40 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido, do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	58
25. Número de dias até o florescimento de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido, do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	59
26. Número de espigas m ² , número de espiguetas por espiga e número de grãos por espigas em plantas de trigo aos 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero <i>Azospirillum brasilense</i> via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido, do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.....	60
27. Massa de mil grãos (g) e produtividade de grãos (kg ha ⁻¹) de plantas de	

- trigo, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em Ambiente não protegido, do campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP..... 61
28. Correlações simples de Pearson para produtividade versus altura de plantas, área foliar, matéria seca da planta, florescimento, número de perfilhos e componentes da espiga de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, **em Ambiente protegido** na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP..... 63
29. Correlações simples de Pearson para produtividade versus altura de plantas, área foliar, matéria seca da planta, florescimento, número de perfilhos e componentes da espiga de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, **em Ambiente não protegido** da Faculdade Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP..... 64

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
<p>1. A parcela experimental em ambiente protegido: plantas coletadas para análise destrutiva de crescimento - AD (■), plantas avaliadas periodicamente durante o ciclo da cultura (■) e plantas coletadas para determinação da produtividade de grãos (■)</p>	22
<p>2. Dados climatológicos coletados dentro do Ambiente protegido no período de 16 de julho de 2013 a 03 de novembro de 2013, município de Botucatu-SP.....</p>	23
<p>3. A parcela experimental em ambiente não protegido: plantas coletadas para análise destrutiva de crescimento - AD (■), plantas avaliadas periodicamente durante o ciclo da cultura (■) e plantas coletadas para determinação da produtividade de grãos (■).....</p>	28
<p>4. Dados climatológicos no período de 16 de julho de 2013 a 03 de novembro de 2013, município de Botucatu-SP.....</p>	29

1 RESUMO

O *triticum aestivum* é uma espécie de ciclo anual, pertencente à família *Poaceae*. Cultivado em regiões de climas subtropical e temperado, ocupa a segunda maior área plantada no mundo. Para obtenção de altas produtividade dentre outros cuidados, é essencial o fornecimento de nutrientes na quantidade demandada pelas cultivares de alto potencial produtivo, com destaque para o nitrogênio (N). A fixação biológica de nitrogênio é realizada por microrganismos simbióticos associados com raízes das plantas. Entre os microrganismos simbióticos que fixam nitrogênio associados com raízes de plantas, destacam-se os do gênero *Azospirillum brasilense*. O objetivo no presente trabalho foi avaliar a eficiência do uso da inoculação *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e componentes produtivos da cultura do trigo. O estudo foi dividido em dois experimentos sendo o primeiro em ambiente protegido e o segundo em ambiente não protegido, ambos na Faculdade de Ciências Agronômicas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, SP, no ano agrícola 2013. O delineamento utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados para ambiente protegido e blocos casualizados para ambiente não protegido, com 10 tratamentos em esquema fatorial 3x3+1. Sendo os tratamentos compostos pelo uso de duas estirpes (Ab-V5 e Ab-V6) isoladamente e em combinação das mesmas (Ab-V5+Ab-V6), todos aplicados em três concentrações 65, 130 e 195 milhões de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias. Mais a testemunha, sem inoculação de bactérias. Para o experimento em ambiente protegido, cada parcela experimental foi constituída por plantas cultivadas em um

recipiente de amianto com capacidade para 0,462 m³ de solo. Foram 7 linhas de 0,88 m cada, espaçadas em 0,15 m, com 40 sementes por metro. Já no experimento em ambiente não protegido, a parcela experimental foi composta por 10 linhas de 2,0 m cada, espaçadas em 0,17 m, e 45 sementes por metro, onde ambos os experimentos teve uma densidade de semeadura em 266 sementes m² almejando uma densidade de 250 plantas m². Para atender a necessidade de água da cultura durante todo o ciclo, adotou-se o sistema de irrigação localizada por gotejamento, monitorada por tensiômetros de mercúrio. Após a emergência das plântulas até a colheita, foram realizadas avaliações de crescimento em diversos componentes morfológicos e de produtividade das plantas de trigo. Os dados obtidos foram submetidas à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade, sendo os dados quantitativos submetidos a análise de regressão em função das doses de *A.brasiliense* os dados qualitativos em função das estirpes pelo teste de Tukey. Em ambiente protegido, a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* promove maior crescimento das plantas de trigo, sem influencia na produção de grãos. Em condições de ambiente não protegido o crescimento das plantas é influenciado pela inoculação de *Azospirillum brasilense*. O uso de bactérias promotoras de crescimento em plantas aumentam o desenvolvimento das plantas de trigo, o que representa uma estratégia viável, além dos benefícios ambientais associados à redução no uso de fertilizantes nitrogenados.

Palavras-chave: *Triticum aestivum* spp.; bactérias diazotróficas; fixação biológica de nitrogênio; sustentabilidade.

EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS AND STRAINS OF *Azospirillum brasilense* ON WHEAT PLANT PRODUCTION COMPONENTS. Botucatu, 2016. 87 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: RODRIGO ALBERTO REPKE

Adviser: SILVIO JOSÉ BICUDO

Co-adviser: ROGÉRIO PEREZ SORATTO

2 SUMMARY

Triticum aestivum is a yearly crop species belonging to the *Poaceae* family. It is cultivated in regions with subtropical and temperate climate, and takes up the second largest planted area in the world. Nutrient provision in the demanded amount by high productive potential cultivars, mainly nitrogen (N), is essential to obtain high productivity. The biological fixation of nitrogen is done by symbiotic microorganisms associated with plant roots. *Azospirillum brasilense* is one of the genera in which the symbiotic microorganisms fixate nitrogen associated with plant roots. This study aimed to evaluate the agronomical efficiency of *Azospirillum brasilense* inoculation on the growth and productive components of wheat cultivation. The study was divided into two experiments: the first protected environment, and the second non-protected environment conditions, both in the School of Agriculture - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus of Botucatu, SP, Brazil, during 2013 crop year. The experiment had completely randomized block design for the first experiment in protected environment, and random blocks for the second experiment in non-protected environment, with 10 treatments in 3x3+1 factorial scheme. The treatments consisted of two separate (V5 and V6) and combined (V5+V6) stocks and three concentrations (65, 130 and 195 million UFC of bacteria) were applied. The control treatment had no bacterial inoculation. For the protected environment, each experimental plot consisted of plants cultivated in an asbestos recipient with the following dimensions: 0.50 m of height, 0.88 m of width and 1.05 m of length, and 0.462 m³ of soil. Seven 0.88-m rows with 0.15 m spacing and 40 seeds per meter were utilized. In the field experiment, the experimental plot

consisted of ten 2.0-m rows with 0.17 m spacing and 45 seeds per meter. For both experiments, the seeding density was 266 seeds m², aiming a density of 250 plants m². To meet water cultivation requirements throughout the cycle, dripping irrigation was used and monitored by mercury tensiometers. After seedling emergence until harvest, growth evaluations of several morphological and productivity components of wheat plants were carried out. The obtained data were submitted to analysis of variance by F test at 5% probability and quantitative data were submitted to regression analysis in function of *A.brasiliense* doses whereas qualitative data in function of stocks were submitted to Tukey's test. In protected environment, the inoculation of *Azospirillum brasilense* seeds provides greater growth of wheat plants, without influencing grain production. Under non-protected environment conditions, the plant growth is influenced by the inoculation of *Azospirillum brasilense*. The use of growth-promoting bacteria in plants increase the development of wheat plants, which represents a viable strategy, besides the environmental benefits related to the reduced utilization of nitrogen fertilizers.

Keywords: *Triticum aestivum* spp.; diazotrophic bacteria; biological nitrogen fixation; sustainability.

3 INTRODUÇÃO

O *triticum aestivum* é uma espécie de ciclo anual, pertencente à família *Poaceae*. Cultivado em regiões de climas subtropical e temperado, ocupa a segunda maior área plantada no mundo. O grão é utilizado na alimentação humana e também na composição de ração animal. O Brasil, semeou 3 milhões de hectares na safra 2014/15, no entanto, o país não é alto suficiente, destacando-se no mundo como um dos maiores importadores desse grão.

Para obtenção de altas produtividade dentre outros cuidados, é essencial o fornecimento de nutrientes na quantidade demandada pelas cultivares de alto potencial produtivo, com destaque para o nitrogênio (N). O nitrogênio é o nutriente absorvido em maior quantidade, razão pelo qual sua falta constitui fator limitante ao pleno desenvolvimento e produção das plantas de trigo. No caso do trigo, a disponibilidade de N influencia diretamente o número de perfilhos, número de espigas, desenvolvimento de espiguetas e massa de grãos, comprometendo a sua produtividade.

Nos sistemas de cultivo, a demanda por nitrogênio é suprida comumente com o fornecimento de nitrogênio via adubações com fertilizantes químicos, em sua maioria uréia e sulfato de amônio, aumentando significativamente os custos de produção. Na natureza, alguns organismos procariotos conseguem assimilar o N atmosférico e transformá-lo em NH_3 , processo chamado de fixação biológica do nitrogênio.

A fixação biológica de nitrogênio é realizada por microrganismos simbióticos associados com raízes das plantas. Esses microrganismos também promovem interessantes mecanismos que influenciam no desenvolvimento das plantas além da fixação

biológica, tais como um maior desenvolvimento radicular proveniente da produção de hormônios pela planta. Entre os microrganismos simbióticos que fixam nitrogênio associados com raízes de plantas, destacam-se os do gênero *Azospirillum brasilense*.

A busca de bactérias que realizam a fixação de N em gramíneas tem sido o foco principal de muitas pesquisas. Resultados positivos foram demonstrados em estudos realizados em culturas, como arroz, milho, cana-de-açúcar, sorgo e até mesmo com trigo. Estima-se que a adoção dessa tecnologia gere uma economia de 3,0 bilhões de dólares (EMBRAPA, 2015) a cada safra no Brasil.

O manejo correto dessa associação *Azospirillum brasilense* com a cultura do trigo poderá resultar em incrementos de produtividade e em diminuição dos custos de produção, principalmente redução da aquisição e uso de fertilizantes nitrogenados.

Considerando a hipótese que *Azospirillum brasilense* tem efetividade na fixação de nitrogênio, quando associado a planta de trigo e que variadas estirpes ou suas combinações promovem diferentes eficiências no fenômeno de associação com plantas de trigo na fixação do nitrogênio, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência agrônômica da inoculação *Azospirillum brasilense* em diferentes concentrações no desenvolvimento e componentes de rendimento na cultura do trigo.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. A cultura do trigo

O trigo foi o primeiro produto agrícola utilizado no processamento de alimentos. O grão transformado em farinha, é consumido na forma de pão, massa alimentícia, bolo e biscoito. É usado também como ração animal, quando não atinge a qualidade exigida para consumo humano (EMBRAPA, 2009). É uma planta de ciclo anual, pertence à família *Poaceae* e ao gênero *Triticum* (POSNER, 2000). Cultivado em todos os continentes durante o inverno e ou primavera, fica atrás somente do milho em área plantada (FAOSTAT, 2010).

Em todo o Mundo, a área plantada na safra 2014/15 foi de 221 milhões hectares, com uma produção de 720 milhões de toneladas (USDA, 2015). A América do Sul contribuiu com cerca de 5% desse montante, com 8 milhões de hectares plantados e uma produção de 24 milhões de toneladas. O Brasil, semeou 3 milhões de hectares, colhendo 7 milhões de toneladas de grãos, gerando 1,0 milhão de empregos diretos considerando o segmento agroindustrial de trigo (CONAB, 2015). No entanto, o país não é alto suficiente, figurando no mundo como um dos maiores importadores desse grão (SANTOS, 2008).

No cultivo do trigo, rendimentos da ordem de 4.000 kg ha⁻¹ podem ser obtidos quando são aplicadas tecnologias próprias e as condições climáticas são favoráveis. O trigo é uma planta de clima temperado, podendo ser cultivada também nas regiões subtropicais (LANTMANN et al., 2005). Outra variável determinante na obtenção de altas produtividade é o fornecimento de nutrientes, dentre os quais se destaca o nitrogênio (N).

No Brasil, em cultivos comerciais as densidades de plantas trigo variam de 200 a 450 sementes viáveis m^{-2} , sendo alterado em função do ciclo, porte dos genótipos e, algumas vezes, quanto aos tipos de clima e solo. O espaçamento de preferência, não devem ultrapassar 20 cm. A profundidade de semeadura deve ficar em torno de 2 a 5 cm, devendo-se dar preferência à semeadura em linha (IAPAR, 2014).

Uns dos principais problemas da cadeia produtiva do trigo no Brasil é a logística de distribuição e o armazenamento. Sendo a Região Sul do país a maior produtora. Já o consumo é distribuído ao longo do ano em todo território nacional (AGRIANUAL, 2014).

4.2 O elemento nitrogênio

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

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

Segundo Huergo (2006), a mais importante fonte de N é a atmosfera. No entanto, é indisponível para mais de 99% dos organismos vivos (GALLOWAY et al., 2003). A reação de redução de N atmosférico a amônia (NH_3) exige uma carga energética muito alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados (KIM; REES, 1994).

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

Na natureza, alguns organismos procariotos conseguem assimilar o N atmosférico e transformá-lo em NH₃, processo chamado de fixação biológica realizado através do complexo enzimático nitrogenase (CANTARELLA, 2007).

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

4.3 Adubação nitrogenada na cultura do trigo

No caso do trigo, a disponibilidade de N influencia diretamente o número de perfilhos, número de espigas, formação de espiguetas e massa de grãos, correlacionando-se a sua produtividade (IAPAR, 2014).

Neste sentido, o nitrogênio deve ser fornecido às plantas de trigo entre os estádios emergência e sete folhas totalmente expandidas (V7). Entre esses estádios, o N é fundamental na determinação do número de perfilhos, e durante o V7, a planta de trigo demanda mais N para estabelecer o número de espiguetas e conseqüentemente o número de grãos por planta (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2001).

Essa demanda é suprida comumente com o fornecimento de nitrogênio via adubações com fertilizantes químicos, em sua maioria uréia e sulfato de amônio (CAMPOS et al., 1999).

No que diz respeito as dosagens, estudos relatam diferentes doses ótimas, o que é definido, principalmente, à cultura anterior, teor de matéria orgânica do solo, condições climáticas, cultivar, dentre outros. No estudo de Berti et al. (2007), estes autores verificaram que a dose de 50 kg ha⁻¹ de N foi suficiente para suprir as exigências nutricionais na cultura. Por outro lado, Pinnow et al. (2009) na região sul do Paraná, obtiveram o maior rendimento de grãos utilizando a dose de N de 180 kg ha⁻¹.

Outro fator importante relacionado a adubação nitrogenada é que pesquisas realizadas com a cultura, mostram que as plantas de trigo conseguem utilizar apenas 50% do fertilizante nitrogenado aplicado, pois metade é perdido via lixiviação e desnitrificação (DOBBELAERE e CROONENBORGHES, 2002). Isto se torna um dado importante já que o N fertilizante apresenta um alto custo para sua obtenção, isto ocorre pela necessidade de fixar industrialmente o N₂ atmosférico (MENDES et al., 2011).

Devido ao alto custo dos fertilizantes nitrogenados e o fato do Brasil importar, atualmente, 73% do N utilizado (HUNGRIA, 2011), a fixação biológica de N₂ atmosférico que disponibiliza NH₃ e ou aminoácidos para as plantas, constitui uma importante ferramenta para suprir à necessidade total ou parcial de N, aumentando assim a eficiência do sistema (CANTARELLA; DUARTE, 2004; CONCEIÇÃO et al., 2009). A agricultura tropical não só é sujeita à erosão e, portanto, menos apropriada para sistemas agrícolas baseados em uso intensivo de fertilizantes; ela ainda oferece umidade e temperaturas ótimas durante todo o ano para a atividade microbiológica (DÖBEREINER, 1989 citado por MENDES et al., 2011).

4.4 Fixação biológica do nitrogênio

O solo está repleto de formas de vida microscópicas, incluindo bactérias, fungos, actinomicetos, protozoários e algas. Destes diferentes microrganismos, as bactérias são, de longe, o mais comum (isto é, 95%). Segundo Schoenborn et al. (2004), o solo apresenta um grande número de bactérias (muitas vezes cerca de 100-110 células por grama de solo). Tanto o número e o tipo de bactérias que são encontrados em diferentes solos são influenciados pelas condições do solo, incluindo a temperatura, pH, umidade, presença de sal e de outros produtos químicos, bem como por a quantidade e os tipos de plantas encontradas nesses solos (BADRI et al., 2009). Além disso, as bactérias geralmente não são uniformemente distribuídas no solo. Isto é, a concentração de bactérias que se encontra em torno das raízes das plantas, na rizosfera, é comumente muito maior do que no resto do solo, devido à presença de nutrientes, incluindo açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, e outras pequenas moléculas de exsudados de raízes (WHIPPS, 1990 citado por BADRI et al., 2009).

Independentemente do número de bactérias numa amostra de solo em particular, as bactérias podem afetar as plantas de diversas maneiras. A interação entre as

bactérias do solo e das plantas podem ser, a partir da perspectiva da planta, benéfico, prejudicial, ou neutra (GLICK, 2012). No entanto, o efeito que uma bactéria em particular tem em uma planta pode mudar à medida que há mudança de condições. Por exemplo, uma bactéria que facilita o crescimento das plantas, proporcionando fixação biológica de N_2 , elemento que é muitas vezes presente em quantidades muito limitadas em muitos solos, é pouco provável que esta proporcione qualquer benefício para as plantas quando quantidades significativas de fertilizante químico são adicionadas ao solo.

A fixação biológica do N_2 é um processo de quebra do gás N_2 por meio de um complexo enzimático, denominado nitrogenase (HUNGRIA et al., 1997). Ela pode ser responsável por aproximadamente 65% do total de N fixado na Terra (AZEVEDO, 2010) sendo assim o segundo processo biológico mais importante depois da fotossíntese (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Entre os microrganismos simbióticos que fixam nitrogênio associados com raízes de plantas, podem ser citados os do gênero *Rhizobium* (que coloniza nódulos de raízes de leguminosas), do gênero *Frankia* (presente nos nódulos de raízes de não leguminosas) e a espécie *Azotobacter paspali* (na gramínea *Paspalum notatum*). Além destes, Radwan et al. (2004) destacam as espécies do gênero *Azospirillum*, com destaque para *A. brasilense* e o *A. lipoferum*.

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

A contribuição da fixação biológica de N ao desenvolvimento de espécies gramíneas foi demonstrada para arroz irrigado (BODDEY; DOBEREINER, 1995), para cana-de-açúcar (JAMES, 2000), para o sorgo (RONCATO-MACCARI et al., 2003) e para o trigo (KENNEDY; ISLAM, 2001; MENDES et al., 2011). Estima-se que a adoção dessa tecnologia nos cultivos de leguminosas e também gramíneas, gere uma economia de 3,0 bilhões de dólares a cada safra no Brasil (EMBRAPA, 2009).

Apesar do conhecimento limitado das interações entre as bactérias promotoras de crescimento e as plantas, inúmeras destas bactérias são, no entanto, utilizadas

comercialmente como adjuntas de práticas agrícolas (LUCY; REED e GLICK, 2004; BANERJEE; YESMIN e VESSEY, 2006). Dentre as bactérias comercializadas podemos incluir *Agrobacterium*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus mus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mucilaginoso*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *acidovorans Eltia*, *macerans Paenobacillus Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *uorescens Pseudomonas*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas syringae*, *Serratia entomophilia*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces* spp., *Lydicus Streptomyces* e vários *Rhizobia* spp. No entanto, a inoculação de culturas com essas bactérias representa apenas uma pequena fração das práticas agrícolas em todo o mundo.

Segundo Fages (1994), estas bactérias, em especial do gênero *Azospirillum*, apresentam também interessantes mecanismos que influenciam no desenvolvimento da planta além da fixação biológica, tais como um maior desenvolvimento radicular proveniente da produção de hormônios pela planta.

4.5 Gênero *Azospirillum*

Dentre os microorganismos fixadores de N encontrados em associações com poaceas, as espécies do gênero *Azospirillum* constituem um dos grupos mais estudados (BALDANI et al., 1997; BASHAN; HOLGUIN, 1997; HARTMANN; BALDINI, 2006). Esses microorganismos pertencem à subclasse α das proteobactérias, a qual comporta um grande número de bactérias simbióticas e associativas a plantas, tais como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Gluconacetobacter* (HARTMANN; BALDINI, 2006).

Espécies do gênero *Azospirillum* foram isoladas em todo o mundo e de uma diversidade de ambientes e rizosfera de plantas (LIN et al., 2011). Cada cepa do gênero *Azospirillum* interage com a raiz da planta hospedeira de forma diferente, algumas predominantemente colonizam a superfície da raiz, enquanto outras podem infectar o interior da raiz e, assim, atuar como endófitos, vivendo no interior de uma planta pelo menos durante parte da sua vida sem aparentemente causar doença a esta (MISRA, 2012).

O gênero *Azospirillum* engloba várias espécies. As primeiras a serem descritas foram *A. lipoferum* e *A. brasilense*, na década de 1970 (TARRAND et al., 1978). Nos anos seguintes, foram descobertas as espécies *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. largimobile* (SLY; STACKEBRANDT, 1999), *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001), *A. otyzae* (XIE; YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007a), *A. zea* (MEHNAZ et al., 2007b), *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008) e *A. fonnosense* (LIN et al., 2011).

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

As espécies de *Azospirillum* desenvolvem associações com várias espécies vegetais, muito embora fosse imaginado anteriormente que habitavam somente a rizosfera (BASHAN; HOLGUIN, 1997; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Porém, alguns estudos mostraram que elas podem ser também endofíticas facultativas (SCHLOTTER et al., 1994; HUERGO et al., 2008), capazes, portanto de colonizar internamente os tecidos das raízes e da parte aérea das plantas sem causar danos (TERYER; HOLLIS, 2002).

Até o momento, sabe-se que os *Azospirillum* possuem capacidade de fixar N₂ atmosférico quando associadas com gramíneas (ELMERIC; NEWTON, 2007), podendo atuar na solubilização do fosfato inorgânico (VERMA et al., 2001). No entanto, a associação com a planta depende do genótipo do vegetal e de condições específicas do solo (INIGUEZ et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

4.6 Modo de ação da bactéria *Azospirillum brasilense*

Azospirillum como muitas outras bactérias podem detectar sinais ambientais no solo por um traço chamado quimiotaxia. Quimiotaxia fornece uma vantagem às

bactérias contra outros micróbios coexistentes na comunidade mista do solo, permitindo aos *Azospirillum* mover-se em direção as raízes ou um meio que é rico em nutrientes. O estudo de campo de Basã e Holguin (1997) mostrou que o *Azospirillum brasilense* pode mover-se até 30 cm a partir do local da inoculação a superfície da raiz.

As bactérias da espécie *Azospirillum* auxiliam, por diversos mecanismos, na nutrição nitrogenada das culturas. Dentre esses mecanismos, destacam-se a produção de hormônios, que interferem no crescimento das plantas e podem alterar a morfologia das raízes, possibilitando a exploração de maior volume de solo (ZAIED et al., 2003), o aumento do processo da redução assimilatória de nitrato disponível no solo (BODDEY et al., 1986) e a fixação biológica do N_2 atmosférico (INIGUEZ et al., 2004).

A fixação biológica do N_2 atmosférico pela *Azospirillum* pode acontecer em condições microaeróbias com níveis baixos de N_2 , através da ação do complexo da nitrogenase. Esta enzima é constituída a partir de dois componentes: a proteína dinitrogenase (proteína MoFe, NifDK), que contém um cofator de ferro e molibdênio, é o sítio de redução de N_2 ; a proteína dinitrogenase redutase (proteína Fe, NifH) transfere elétrons de um doador de elétrons para a proteína nitrogenase (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

Diferentemente das bactérias simbióticas, bactérias associativas como os *Azospirillum* excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada; posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas, contudo, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas. Desse modo, deve-se lembrar de que, ao contrário das leguminosas, a inoculação de não-leguminosas com bactérias endofíticas ou associativas, ainda que essas consigam fixar nitrogênio, não consegue suprir totalmente as necessidades das plantas em nitrogênio (HUNGRIA, 2011).

4.7 Fatores a serem considerados na inoculação

Durante o processo de inoculação de sementes, há alguns fatores importantes para o estabelecimento das bactérias sob condições de ambiente não protegido.

Essa importância se dá em função à competição com bactérias diazotróficas nativas e com a microflora do solo, sendo necessário o uso de estirpes que consigam competir satisfatoriamente e estabelecer-se tanto na rizosfera quanto no interior das raízes (REIS et al., 2000).

Para Mendes et al. (2011), antes da inoculação deve-se observar se existe uma relação entre a bactéria e a planta, além das condições ambientais como disponibilidade de nitrogênio, oxigênio e outros microrganismos.

No que diz respeito à inoculação de trigo por bactérias diazotróficas, existem muitos relatos de respostas positivas e relatos em que não houve efeito da inoculação. Alguns autores descrevem que esta inconsistência de resultados é principalmente atribuída a técnicas de inoculação, ao genótipo da planta hospedeira (INIGUEZ et al., 2004), às características do solo, como teor de matéria orgânica e a comunidade nativa de microrganismos (DOBBELAERE e CROONENBORGHS, 2002). Estudos demonstram que estirpes isoladas de uma espécie vegetal são mais aptas a se restabelecer nas raízes, quando inoculadas na mesma espécie vegetal, sendo denominadas estirpes homólogas (BALDANI e BALDANI, 2005).

Para Rosário (2013), a interação entre o manejo do solo e a cobertura vegetal com as variações climáticas durante as diferentes épocas do ano, principalmente em regiões subtropicais, onde as estações são bem definidas, acarreta uma flutuação sazonal no desenvolvimento microbiano, a qual é maior nas camadas superiores do solo, onde existem as maiores oscilações na umidade e temperatura.

Neste sentido, Pittner et al. (2007) comparando um campo nativo à um campo cultivado com milho, observaram que as concentrações médias de *Azospirillum brasilense* não diferiram e que o aumento da população de bactérias foi atribuído à elevação da temperatura durante o período de desenvolvimento do milho, fator este que eleva a atividade metabólica e, conseqüentemente, a multiplicação dos microrganismos.

Na prática a inoculação com *Azospirillum* é realizada de maneira similar a inoculação de sementes de soja com *Bradyrhizobium*. O produto pode ser aplicado na forma sólida, como turfa, ou na forma líquida. Também, é necessário ser cauteloso com às condições de temperatura e aplicações conjuntas com agroquímicos, já que se trata de

microrganismos vivos (HUNGRIA et al., 2010). Dentre o processo de inoculação o método mais comum de aplicação do inoculante é via sementes.

Porém, a seleção de estirpes para produção de inoculantes ainda necessita de muitos estudos. Sendo que em 2008 já existiam pacotes tecnológicos utilizando variedades de plantas e estirpes bacterianas eficientes, que supriam mais de 50% do N necessário à planta (BÁRBARO et al., 2008).

4.8 Associação de *Azospirillum* com a planta

Para uma compreensão mais profunda sobre a associação bactéria-planta, é essencial compreender os mecanismos moleculares, celulares e comportamentais em *Azospirillum* que promove a interação na raiz célula-célula, a colonização e, portanto, promove o crescimento vegetal (DARDORA et al., 2013).

Dentre esses processos e fatores têm-se:

(i) **Mobilidade** - o *Azospirillum* pode mover-se até 30 cm a partir do local da inoculação a superfície da raiz, seguindo um meio que é rico em nutrientes (BASÃ e HOLGUIN, 1997).

(ii) presença de **Lectinas** - são proteínas de ligação de açúcar presentes na parede celular que podem especificamente reconhecer e se ligar aos carboidratos presentes na superfície da raiz. Alternativamente, os receptores específicos estão presentes na superfície celular das bactérias que podem se ligar às lectinas presentes na superfície da raiz (CASTELLANOS et al., 1998). A maioria das espécies do gênero de *Azospirillum* pode se ligar a lectina, embrião de trigo e glutinina, enquanto alguns são obrigados a ligarem especificamente as lectinas de lentilha e ou de soja, sugerindo diferentes receptores expostos na superfície de diferentes espécie de *Azospirilluns* (DEL GALLO et al., 1989).

Diferentes fatores como a fixação de N₂ e produção de hormônios estão relacionados à eficácia de cada uma das estirpes na relação bactéria-planta (MASSEINA REIS et al., 2011). As principais substâncias promotoras de crescimento, nesse caso hormônios, produzidas são o ácido indolacético (AIA), as giberelinas e as citocininas, todas atuando na morfologia e fisiologia de raízes das plantas, promovendo aumento da massa

radicular e conseqüentemente uma maior superfície específica, auxiliando na melhor exploração do solo e na captação de água e nutrientes (PERIN et al., 2003).

Bactérias do gênero *Azospirillum* têm estimulado o crescimento vegetal e o aumento da produção, também através do aumentando da concentração de N em plantas de diversas culturas como algodão, tomate, cana-de-açúcar e *Brachiaria* sp (REIS et al., 2000). Barassi et al. (2008) observaram aumento da eficiência fotossintética das folhas e condutância estomática, incremento na produção de matéria seca e maior altura em várias espécies de vegetais.

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

Em ensaio com *Sorghum bicolor* L. Moench cultivado em hidroponia, a senescência foliar foi retardada nas plantas inoculadas com *A. brasiliense* favorecendo, assim, o acúmulo de matéria seca e a produção de grãos (SARIG et al., 1990). Para Döbbelaere et al. (2003), essa contribuição das bactérias é maior quando as plantas recebem doses variáveis de fertilizante nitrogenado.

Didonet et al. (1996) já chamavam a atenção para a maior eficiência na relação bactéria-planta em razão da adição de fertilizante nitrogenado, quando comparado ao uso isolado da bactéria. Esses autores observaram que a produção de grãos de trigo por plantas oriundas de sementes inoculadas com *A. brasiliense*, e complementado com 15 kg de N ha⁻¹, não diferiu do tratamento que recebeu na adubação de cobertura, mais 45 kg de N ha⁻¹.

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

minerais pelas raízes (LAMBRECHT et al., 2000) e suprimir doenças pela competição com microorganismos fitopatogênicos (BERG, 2009) tem sido levados em consideração.

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

Outro fator também importante, uma vez que as bactérias estão na proximidade das raízes das plantas, a sua fixação à raiz é essencial para a eficiente associação com plantas hospedeiras e subsequente colonização. Quando as bactérias não se encontram aderidas às raízes das plantas, as substâncias excretadas por estas difundem-se para o ambiente e são rapidamente consumidas por outros microrganismos concorrentes (BASAN E HOLGUIN, 1997).

4.9 Potencial de inoculação de *Azospirillum* em plantas de trigo

Vários autores obtiveram resultados positivos com bactérias do gênero *Azospirillum*, as quais promoveram o crescimento e o acúmulo de N em plantas de trigo (SALA et al., 2005), trouxe benefícios na manutenção dos perfilhos férteis, maior extração de N e acúmulo nos grãos (JEZEWSKI et al., 2010), aumento de produção (SALA et al., 2007), translocação mais eficiente do N para os grãos, grãos mais pesados e mais cheios, melhor realocamento do N presente na biomassa para os grãos (DIDONET et al., 2000) e maior desenvolvimento radicular (SILVA et al., 2004).

Mendes et al. (2011) observaram a máxima eficiência agronômica no uso da bactéria *Azospirillum brasilense*, quando aplicada via tratamento de sementes, para a cultura do trigo. No qual o peso hectolitro foi influenciado positivamente pelo uso de *Azospirillum brasilense*, independentemente da dose utilizada. Estes autores observaram ainda o aumento na produtividade de grãos de trigo quando associado ao uso de *Azospirillum brasilense*, com e sem a redução na adubação de cobertura com nitrogênio.

A inoculação em sementes de trigo, cevada e aveia-branca aumentou significativamente a produtividade, com variações entre estes cereais de inverno (DIDONET, 1996; DALLA SANTA et al., 2004). Para o trigo, as estirpes estudadas mais eficazes propiciaram incremento na produção de 312 a 423 kg ha⁻¹, o que correspondeu 13-18% em relação à não inoculação (HUNGRIA et al., 2010).

Milléo et al., (2012) trabalharam com trigo associando a bactéria *Azospirillum brasilense* e a redução da adubação de base e cobertura. Estes autores trabalharam com 300 kg ha⁻¹ e 150 kg ha⁻¹ do formulado 04-20-20 na semeadura e 100 kg ha⁻¹ e 200 kg ha⁻¹ de uréia em cobertura, associado a uma única dose de *Azospirillum brasilense*, de 3,0 mL do kg⁻¹ de sementes, utilizando-se o produto comercial Masterfix Gramíneas[®] (concentração: 2x10⁸ UFC – cepas da bactéria: Ab-V5 e Ab-V6). Os resultados obtidos demonstram eficiência da bactéria, onde os autores não obtiveram diferença significativa para todas as variáveis estudadas quando reduzido a adubação.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em dois experimentos, sendo o primeiro conduzido em ambiente protegido e o segundo em ambiente não protegido, ambos na Faculdade de Ciências Agrônômicas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, SP, no ano agrícola 2013.

A localização geográfica desta área está definida pelas seguintes coordenadas: latitude 22°50'60"S, longitude 48°25'56"W e altitude de 807 m em ambiente protegido e 22°50'31"S, 48°25'29"W e altitude de 795m. O clima de Botucatu-SP, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cwb, que significa clima mesotérmico com inverno seco.

5.1. Experimento em ambiente protegido:

Foram avaliados os efeitos da inoculação de sementes com duas estirpes de *Azospirillum brasilense*, separadas e em combinação em diferentes concentrações, sobre o crescimento e produtividade da cultivar de trigo IAC – 370 cultivada em ambiente protegido da Faculdade de Ciências Agrônômicas - FCA/UNESP/*Campus* Botucatu.

5.1.1. Delineamento experimental.

O delineamento utilizado foi em blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições e 10 tratamentos em esquema fatorial 3x3+1, sendo três concentrações

de *Azospirillum brasilense* (65, 130 e 195 milhões de unidades formadoras de colônia (UFC) por ml⁻¹ da solução de bactérias do gênero *Azospirillum brasilense*); três combinações de estirpes: (Ab-V5), (Ab-V6) e (Ab-V5+Ab-V6); e tratamento controle: com zero aplicação de *Azospirillum brasilense* (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos aplicados no experimento realizado no campo experimental do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP. Experimento conduzido em ambiente protegido no ano agrícola 2013, município de Botucatu, SP.

Tratamentos	<i>A. brasilense</i>	
	*UFC ml ⁻¹	Estirpes
1	0	0
2	65 milhões	Ab – V5
3	130 milhões	Ab – V5
4	195 milhões	Ab – V5
5	65 milhões	Ab – V6
6	130 milhões	Ab – V6
7	195 milhões	Ab – V6
8	65 milhões	Ab – V5 + V6
9	130 milhões	Ab – V5 + V6
10	195 milhões	Ab – V5 + V6

* Unidades formadoras de colônia (UFC ml⁻¹) de *Azospirillum brasilense*

5.1.2. Parcela experimental.

Cada parcela experimental foi constituída por plantas cultivadas em um recipiente de amianto com as seguintes dimensões: 0,70 m de altura, 0,88 m de largura e 1,05 m de comprimento e capacidade para 0,647 m³ de solo. Foram 7 linhas de 0,88 m cada, espaçadas em 0,15 m, com 40 sementes viáveis por metro, constituindo uma densidade de semeadura de 266,66 sementes m² visando densidade de 250 plantas m². A área útil da parcela, com exclusão das bordaduras, foi de 0,66 m² (Figura 1).

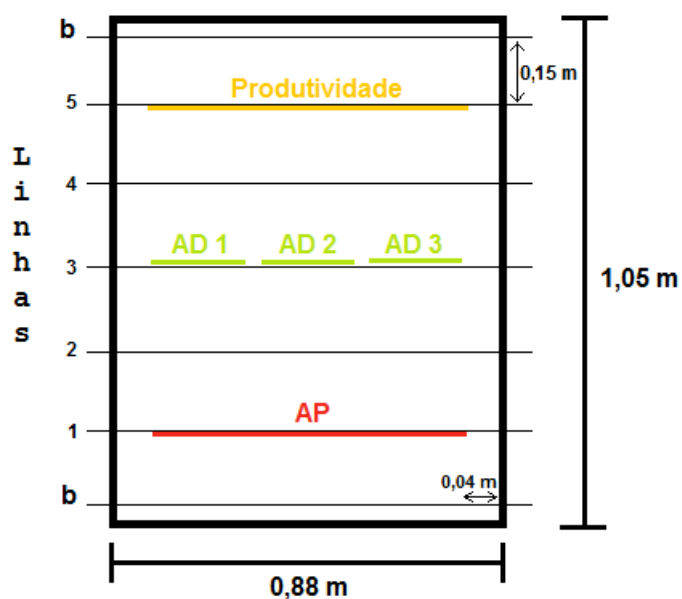


Figura 1. A parcela experimental em ambiente protegido: plantas coletadas para análise destrutiva de crescimento – AD (■), plantas avaliadas periodicamente durante o ciclo da cultura - AP (■) e plantas coletadas para determinação da produtividade de grãos (■).

5.1.3. Dados climatológicos do ano agrícola 2013.

A figura 2 contém os dados climatológicos referentes ao período experimental 16 de julho de 2013 a 03 de novembro de 2013, coletados no interior do ambiente protegido da FCA/UNESP, Campus de Botucatu, SP.

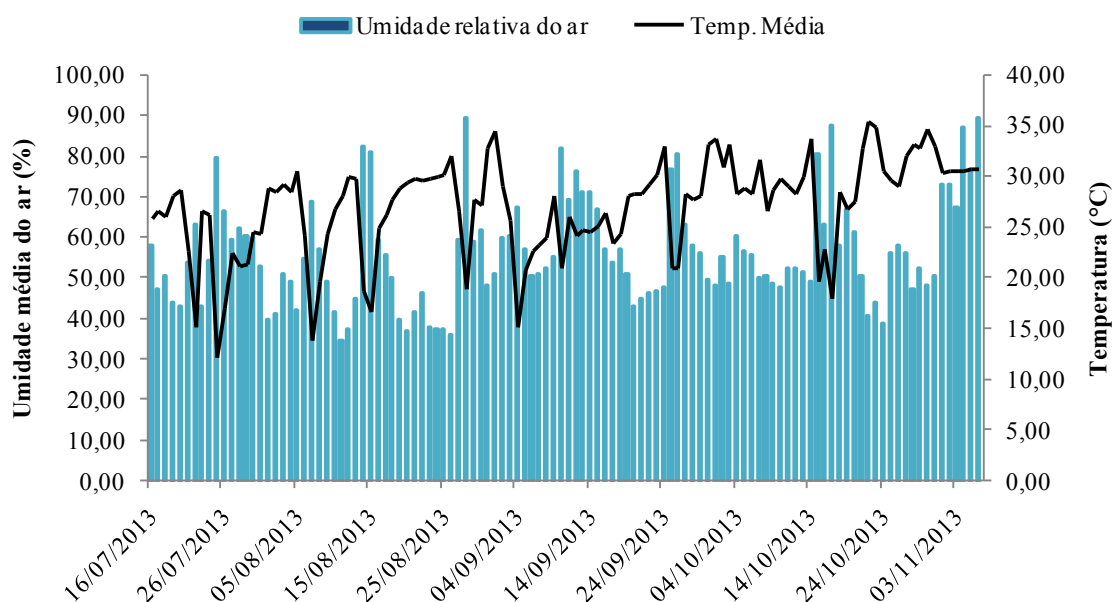


Figura 2. Dados climatológicos coletados no interior do ambiente protegido no período de 16 de julho de 2013 a 03 de novembro de 2013, município de Botucatu-SP.

5.1.4. Irrigação

Para atender a necessidade de água da cultura durante todo o ciclo, adotou-se o sistema de irrigação localizada por rega. As irrigações foram realizadas utilizando como critério a manutenção da tensão de água no solo entre 25 e 40 kPa (SCALOPI et al., 1975, 1978), na profundidade de 0,20 m. Os tensiômetros de mercúrio instalados a 0,20 e 0,40 m de profundidade serviram com indicador para monitorar o volume de bulbo molhado, auxiliando nos ajustes necessários de lâminas de irrigação durante o ciclo da cultura (PIRES et

al., 2001). Foram instalados 20 tensiômetros aleatoriamente, como indicador para realização a suplementação de água.

5.1.5. Solo da área experimental

O solo utilizado no experimento está classificado como Latossolo Vermelho distroférico de textura arenosa (CARVALHO; ESPÍNDOLA; PACCOLA, 1983; EMBRAPA, 1999). Foram coletadas amostras de solo em cada um dos recipientes utilizados para o cultivo das plantas e estabelecimento das parcelas experimentais. Para análise da fertilidade química do solo, foram coletadas 3 amostras por recipiente, na camada de 0 – 60 cm para formar as amostras compostas por recipiente (parcela).

Em seguida, as amostras foram secas em estufa com ventilação forçada a 60°C por 48 horas, destoroadas e passadas em peneira com 2 mm de malha para serem analisadas de acordo com as metodologias de Embrapa (2009). De posse dos resultados, calculou-se as doses de fósforo e potássio para cada recipiente (parcela) segundo Raij et al., (1996).

5.1.6. Preparo do solo da área experimental

Antes da semeadura o solo de todos os recipientes foram esterilizados. Para isso, utilizou-se 3 pastilhas de fosfeto de alumínio “Gastoxin” por vaso, onde os mesmos permaneceram cobertos com plástico por 25 dias e 5 dias sem as coberturas plástica antes da semeadura para eliminação total dos gases produzidos pelo produto.

5.1.7. Adubação de semeadura

Os fertilizantes utilizados para a adubação de semeadura foram cloreto de potássio (41% K₂O) e superfosfato-tríplo (60% de P₂O₅). Os fertilizantes foram distribuídos linha por linha no fundo sulco de semeadura, sendo corrigida as doses para cada recipiente, objetivando produtividades entre 3,5 a 5,0 toneladas de grãos ha⁻¹ conforme preconiza Raij et al., (1996).

5.1.8. Inoculação das sementes de trigo com a bactéria *Azospirillum brasilense*

As soluções concentradas de 200 milhões UFC ml⁻¹ de bactérias do gênero *Azospirillum brasilense*, estirpes Ab-V5 e Ab-V6, fornecidas pela Dr^a. Mariangela Hungria da Embrapa Soja de Londrina/PR foram diluídas em água deionizada da seguinte forma:

- (1) Diluição para os tratamentos T2 e T5 ambos com 65 milhões UFC ml⁻¹ de *A.brasiliense*: 0,325 ml da solução concentrada + 0,675 ml de H₂O.
- (2) Diluição para o tratamento T3 e T6 com 130 milhões UFC ml⁻¹ de *A.brasiliense*: 0,650 ml da solução concentrada + 0,350 ml de H₂O.
- (3) Diluição para o tratamento T8 com 65 milhões UFC ml⁻¹ de *A.brasiliense*: 0,163 ml da solução concentrada com a “estirpe Ab-V5” + 0,163 ml da solução concentrada com a “estirpe Ab-V6” + 0,675 ml de H₂O.
- (4) Diluição para o tratamento T9 com 130 milhões UFC ml⁻¹ de *A.brasiliense*: 0,163 ml da solução concentrada com a “estirpe Ab-V5” + 0,325 ml da solução concentrada com a “estirpe Ab-V6” + 0,325 ml de H₂O.
- (5) Diluição para o tratamento T10 com 195 milhões UFC ml⁻¹ de *A.brasiliense*: 0,163 ml da solução concentrada com a “estirpe Ab-V5” + 0,500 ml da solução concentrada com a “estirpe Ab-V6” + 0,500 ml de H₂O.

As soluções aplicadas nos tratamentos T4 e T7 não sofreram diluição, visto que as doses nestes tratamentos são de 195 milhões UFC ml⁻¹ cada uma.

Em seguida, 1,0 ml de cada solução foi diluído em 5,0 ml de água deionizada, visando o melhor recobrimento das sementes. Em todos os tratamentos foram inoculadas 500 g de sementes. Para isso utilizou-se sacos plásticos e as sementes juntamente com a solução foram agitadas por 7 minutos.

A escolha das concentrações foram feitas segundo é preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA e estudos anteriores.

5.1.9. Semeadura

A semeadura foi realizada de forma manual, onde a cada 2,5 cm foi depositada uma semente em profundidade média de 4 cm, no dia 16 de julho de 2013.

5.1.10. Controle de plantas daninhas

Para o controle de plantas daninhas realizou-se a retirada das plantas infestantes manualmente durante todo o ciclo de desenvolvimento da cultura.

5.2. Experimento em ambiente não protegido

Nesse experimento, também foi avaliado o efeito da inoculação de sementes com as mesmas estirpes de *Azospirillum brasilense*, separadas e em combinação em diferentes concentrações, sobre o crescimento e produtividades da cultivar de trigo IAC – 370 cultivada em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agrônômicas - FCA/UNESP/Campus Botucatu.

5.2.1. Delineamento experimental.

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições e 10 tratamentos em esquema fatorial 3x3+1, três concentrações de *Azospirillum brasilense* (65, 130 e 195 milhões de unidades formadoras de colônia (UFC) por ml⁻¹ da solução de bactérias do gênero *Azospirillum brasilense*); três combinações de estirpes: (Ab-V5), (Ab-V6) e (Ab-V5+Ab-V6); e um tratamentos controle: com zero aplicação de *Azospirillum brasilense* (tabela 2).

Tabela 2. Tratamentos aplicados no experimento realizado no campo experimental do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP. Experimento conduzido em ambiente não protegido no ano agrícola 2013, município de Botucatu, SP.

Tratamentos	<i>A. brasilense</i>	
	*UFC ml ⁻¹	Estirpes
1	0	0
2	65 milhões	Ab – V5
3	130 milhões	Ab – V5
4	195 milhões	Ab – V5
5	65 milhões	Ab – V6
6	130 milhões	Ab – V6
7	195 milhões	Ab – V6
8	65 milhões	Ab – V5 + V6
9	130 milhões	Ab – V5 + V6
10	195 milhões	Ab – V5 + V6

* Unidades formadoras de colônia (UFC ml⁻¹) de *Azospirillum brasilense*

5.2.2. Parcela experimental.

A parcela experimental foi composta por 10 linhas de 2,0 m, espaçadas em 0,17 m, com 45 sementes por metro, constituindo uma densidade de semeadura de 266,66 sementes m² visando densidade de 250 plantas m². A área útil da parcela, com exclusão das bordaduras, foi de 2,31 m² (Figura 3).

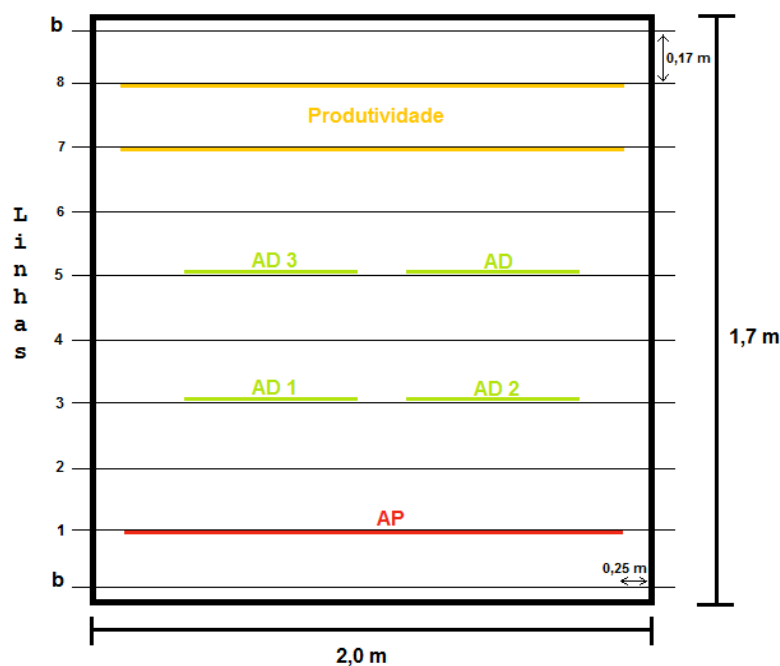


Figura 3. A parcela experimental em ambiente não protegido: plantas coletadas para análise destrutiva de crescimento - AD (■), plantas avaliadas periodicamente durante o ciclo da cultura - AP (■) e plantas coletadas para determinação da produtividade de grãos (■).

5.2.3. Dados climatológicos do ano agrícola 2013.

A figura 4 contém os dados climatológicos referentes ao período experimental 16 de julho de 2013 a 03 de novembro de 2013, coletados no posto meteorológico pertencente ao Departamento de Recursos Naturais da FCA/UNESP, Campus de Botucatu, SP.

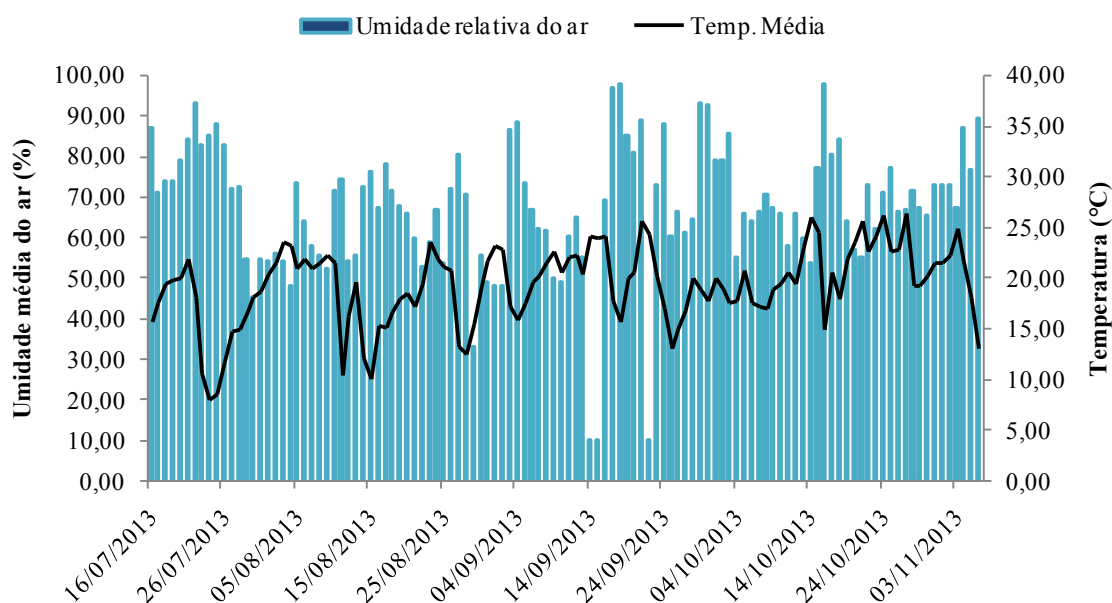


Figura 4. Dados climatológicos no período de 16 de julho de 2013 a 03 de novembro de 2013, município de Botucatu-SP.

5.2.4. Irrigação

Para atender a necessidade de água da cultura durante todo o ciclo, adotou-se o sistema de irrigação localizada por gotejamento. As irrigações foram realizadas utilizando como critério a manutenção da tensão de água no solo entre 25 e 40 kPa (SCALOPI et al., 1975), na profundidade de 0,20 m. Os tensiômetros de mercúrio instalados a 0,20 e 0,40 m de profundidade serviram como indicador para monitorar o volume de bulbo molhado, auxiliando nos ajustes necessários de lâminas de irrigação durante o ciclo da cultura (PIRES et al., 2001; MOREIRA et. al., 2004).

5.2.5. Solo da área experimental

O solo é classificado como Latossolo Vermelho distroférico de textura argilosa (CARVALHO; ESPÍNDOLA; PACCOLA, 1983; EMBRAPA, 1999), com

relevo suave ondulado e com boa drenagem. A área possui um histórico de cultivos de milho no verão e aveia no inverno.

Para análise da fertilidade química do solo, foram coletadas amostras em 10 pontos, na camada de 0 – 0,20 m e 0,20 a 0,40 m de profundidade para formar duas amostras compostas. A amostra foi seca em estufa com ventilação forçada a 60°C por 48 horas, desboroadada e passada em peneira com 2 mm de malha para ser analisada de acordo com as metodologias de Embrapa (2009), cujos resultados encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Resultados da análise química do solo da área experimental, na camada de 0 - 20 cm e 20 a 40 cm de profundidade, amostrado antes da instalação do experimento. Ano agrícola 2013.

Profundidade cm	pH CaCl ₂	M. O g dm ³	P _{resina} mg dm ³	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S mg dm ³
-----mmol _c dm ³ -----												
0 - 20	5.1	43	31	2	31	4.7	46	20	71	101	70	17
20 - 40	5.1	36	16	2	34	2.8	41	19	63	97	65	17

Análises realizadas pelo Laboratório de fertilidade do solo FCA/UNESP – Campus de Botucatu-SP

5.2.6. Preparo do solo da área experimental

O preparo convencional do solo foi realizado através de uma aração e duas gradagens. Os implementos agrícolas utilizados foram: grade aradora com 10 discos de 26 polegadas e grade niveladora com 32 discos de 18 polegadas.

5.2.7. Adubação de semeadura

Consistiu da aplicação de 200 kg ha⁻¹ do fertilizante formulado 0-20-20, sendo as fontes de P₂O₅ e K₂O, superfosfato-tríplo e cloreto de potássio respectivamente. O fósforo e o potássio foram distribuídos igualmente para todos os tratamentos. Os fertilizantes foram distribuídos no fundo do sulco de semeadura objetivando produtividades entre 3,5 a 5,0 t de grãos ha⁻¹ conforme preconiza Rajj et al., (1996).

5.2.8. Inoculação das sementes de trigo com as bactérias *Azospirillum brasilense*

A metodologia seguida para inoculação de sementes e semeadura foi a mesma utilizada no experimento em ambiente protegido, (item 3.1.8.).

5.2.9. Semeadura

A semeadura foi realizada de forma manual, onde a cada 2,5 cm foi depositada uma semente em profundidade média de 4 cm, no dia 17 de julho de 2013.

5.2.10. Controle de plantas daninhas

Para o controle de plantas daninhas utilizou-se o método de capina manual durante todo o ciclo de desenvolvimento da cultura.

5.3. Avaliações

Em ambos experimentos realizou-se o levantamento de densidade de plantas por m² aos 10 DAE.

5.3.1. Avaliações periódicas

Dentre as avaliações periódicas, ou seja, não destrutivas foram realizadas em plantas contíguas, sempre nas mesmas plantas demarcadas no início do ciclo, sendo 20 plantas no experimento em ambiente protegido (Figura 1) e 50 planta no experimento em ambiente não protegido (Figura 3), em suas respectivas datas.

5.3.1.1. Número de perfilhos

A determinação do número de perfilhos por planta foi realizada aos 20 e 40 (DAE), através da contagem dos perfilhos formados e desenvolvidos.

5.3.1.2. Altura de planta

5.3.1.2.1. Altura da última folha totalmente estendida (AB)

A altura média da planta foi mensurada em centímetros, iniciando ao nível do solo a inserção da última folha totalmente estendida, aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a emergência das plântulas (DAE).

5.3.1.2.2. Altura inserção da espiga (AE)

A altura média da espiga foi mensurada em centímetros, iniciando ao nível do solo à altura inserção da espiga, aos 60, 80 e 100 dias após a emergência das plântulas (DAE).

5.3.1.2.3. Altura do ápice da espiga (AP)

A altura média do ápice da espiga foi mensurada em centímetros, iniciando no nível do solo ao ápice da espiga, excluindo-se as aristas, aos 60, 80 e 100 dias após a emergência das plântulas (DAE).

5.3.1.3 Florescimento

Para determinação do período necessário para o florescimento em dias, foi realizada a contagem de dias da emergência até quando 50% + 1 das plantas da área útil da parcela apresentaram mais da metade das anteras abertas durante o processo da antese.

5.3.2. Avaliações destrutivas

Para as avaliações destrutivas, foram coletas plantas de forma contiguas na linha de semeadura, considerado área de coleta, 0,038 m² no experimento conduzido em ambiente protegido (Figura 1) e 0,085 m² no experimento conduzido em ambiente não protegido (Figura 3), em suas respectivas datas.

5.3.2.1 Área foliar fotossinteticamente ativa

Aos 40, 60 e 80 DAE foram coletas plantas para determinação da área foliar em centímetros, todas as folhas com pelo menos 20% de área verde. As folhas amostradas passaram pelo integrador de área foliar, modelo LI 3100 da LI-COR.

5.3.2.2 Massa de matéria seca folha

Para determinação da massa de matéria seca das folhas, aos 40, 60 e 80 (DAE) foram coletadas plantas onde foram cortadas rente ao solo. A seguir o material vegetal foi separado em caule + folhas fotossinteticamente ativas. Após o material passar pelo integrador de área foliar, o mesmo foi seco em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingir massa constante. No final, a massa de matéria seca obtidas foi extrapolada em g m⁻².

5.3.2.3 Massa de matéria seca de raiz

O método seguido para a avaliação da matéria seca do sistema radicular foi o descrito em Corrêa (1982). Para isso, foi utilizado um trado tipo caneca, com 0,10 m de diâmetro por 0,20 m de altura, para amostragem de solo e raízes. As amostragens foram realizadas nas entrelinhas de trigo.

Em cada área útil das parcelas, foi retirada 1 amostras de solo e raízes nas profundidades de 0,0 a 0,40 m.

Após a retirada das amostras, as mesmas foram armazenadas em freezer para serem lavadas em peneira *mesh* 14, malha de 1,41 mm de diâmetro, separando-se

as raízes, que posteriormente foram armazenadas em sacos de papel. Em seguida as raízes foram secas em estufa a temperatura de 65°C até atingirem peso constante, sendo pesadas em balança analítica.

Através dos resultados das pesagens, foi calculada a matéria seca das raízes no volume de solo de cada amostra. O volume de cada amostra é conhecido através do volume do trado e da massa das raízes retiradas.

5.3.2.4 Massa de matéria seca caule

Para determinação da massa de matéria seca do caule, aos 40, 60 e 80 (DAE) foram coletadas plantas onde foram cortadas rente ao solo. A seguir o material vegetal foi separado em caule + folhas fotossinteticamente ativas. O material foi pesado e sub-amostrado onde em seguida foi seco em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingir massa constante. No final, a massa de matéria seca obtidas foi extrapolada em g m^{-2} .

5.3.2.5. Análise das espigas

Foram coletadas espigas das plantas, onde realizou as contagens do número de espigas por planta, número de espiguetas por espiga e número de grãos por espiga.

5.3.2.6. Massa de mil grãos

Após a debulha das espigas colhidas, determinou-se a massa de mil grãos, mediante coleta ao acaso e pesagem de oito amostras de 100 grãos por tratamento (BRASIL, 2009), que tiveram suas massas determinadas considerando-se teor de água de 13%.

5.3.2.6. Produtividade de grãos

A produtividade de grãos foi obtida a partir da debulha e pesagem dos grãos oriundos de espigas colhidas de forma contíguas em duas linhas, perfazendo uma área

de 0,120 m² (ambiente protegido) e 0,340 m² (ambiente não protegido), sendo os dados extrapolados para quilos por hectare, considerando-se teor de água nos grãos de 13%, com base nas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

5.3.3. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade, sendo os dados quantitativos submetidos a análise de regressão em função das concentrações de *A. brasiliense* os dados qualitativos em função das estirpes pelo teste de Tukey ambos realizados com o uso do programa GENES (CRUZ, 2011).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Experimento conduzido em ambiente protegido

De acordo com os resultados da análise de variância apresentados na tabela 4, foram observados efeitos positivos ($P < 0,01$) para concentração de UFC das bactérias *Azospirillum brasilense* na altura média de plantas de trigo aos 20 e 40 dias após a emergência (DAE). Para essa característica morfológica a interação estirpes x doses não foi significativa.

Tabela 4. Altura média em cm da última folha totalmente estendida de plantas de trigo aos 20 e 40 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Altura da última folha totalmente estendida (cm)							
	20 DAE				40 DAE			
	UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹			
	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	20,8	24,7	23,2	23,5	21,9	25,3	24,0	24,1
V6	20,8	22,3	22,2	22,7	21,9	23,6	22,6	23,3
V5+v6	20,8	22,3	23,7	20,6	21,9	24,0	24,7	21,6
P Estirpes = 0,1168				P Estirpes = 0,2538				
P Doses = 0,0074				P Doses = 0,0100				
P E x D = 0,2413				P E x D = 0,3788				
CV (%) = 7,63				CV (%) = 7,55				

Essas bactérias podem auxiliar por diversos mecanismos na nutrição nitrogenada das plantas, contribuindo para o aumento do seu crescimento. Dentre esses mecanismos, destacam-se a produção de fito-hormônios, que interferem no crescimento das plantas e podem alterar a morfologia das raízes, possibilitando a exploração de maior volume de solo, além do processo de fixação biológica do N_2 (ZAIED et al., 2003; INIGUEZ et al., 2004). Segundo Sala et al. (2005), as bactérias do gênero *Azospirillum* promoveram o crescimento e o acúmulo de N em plantas de trigo, maior desenvolvimento radicular (SILVA et al., 2004). Contudo, em trabalho anterior a esses, outros autores não encontraram diferença entre tratamentos com e sem a inoculação (CAMPOS et al., 1999).

A tendência das maiores médias de alturas de plantas observada na tabela 4 podem estar relacionadas com as maiores médias de área foliar produzidas pelas plantas inoculadas com doses de *Azospirillum brasilense* na tabela 8.

Para altura média da última folha totalmente estendida nas avaliações realizadas aos 60, 80 e 100 (DAE), não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre as plantas cultivadas com e sem a bactéria *Azospirillum brasilense*. Do mesmo modo, também não ocorreu interação entre estirpes x doses (tabela 5).

Tabela 5. Altura média em cm da última folha totalmente estendida de plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Altura da última folha totalmente estendida (cm)											
	60 DAE				80 DAE				100 DAE			
	UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	32,9	37,2	34,1	36,1	34,2	37,8	35,6	37,5	35,0	37,6	35,6	36,6
V6	32,9	36,0	33,6	36,9	34,2	37,6	37,2	37,6	35,0	37,8	36,6	37,2
V5+v6	32,9	35,9	36,9	33,6	34,2	37,2	37,8	34,4	35,0	37,0	37,3	34,4
	P Estirpes = 0,9619				P Estirpes = 0,7480				P Estirpes = 0,7436			
	P Doses = 0,0341				P Doses = 0,0238				P Doses = 0,1747			
	P E x D = 0,3886				P E x D = 0,5806				P E x D = 0,8232			
	CV (%) = 8,05				CV (%) = 7,33				CV (%) = 7,42			

Nesse caso, o início da fase de alongamento da cultura (60 DAE), marcada por um pico de crescimento em altura como resposta ao aumento da atividade

biológica de giberelinas nos meristemas intercalares do colmo que confere o aumento da divisão e expansão celular dos entrenós (TAIZ; ZEIGER, 2009), pode ser a causa da igualdade de alturas médias de plantas entre os tratamentos aos 60, 80 e 100 DAE (tabela 5).

A falta de diferença significativa das alturas da última folha totalmente estendida pode ser explicado pelo florescimento precoce, aos 60 DAE. A mudança da fase vegetativa para a reprodutiva, muda o processo de alocação de matéria seca nas plantas, transferindo o crescimento para os órgãos reprodutivos.

No entanto, essa uniformidade das alturas de plantas entre os 60 e 100 DAE, não neutraliza a importância do maior crescimento das plantas inoculadas com as bactérias, entre os 20 e 40 DAE (tabela 4). Com o maior desenvolvimento das plantas, o contato é maximizado pelo crescimento do sistema radicular proporcional ao desenvolvimento da parte aérea, com conseqüente aumento na área superficial e na capacidade de absorção de água, favorecendo as plantas inoculadas no caso de estresse hídrico e/ou tornando estas plantas mais eficientes na exploração e uso da água em sistemas de cultivos irrigados.

No caso da altura média da inserção de espigas, essa aumentou com a aplicação da concentração de 65 milhões UFC de bactérias independente das estirpes utilizadas ou da combinação entre elas (tabela 6).

Tabela 6. Altura média em cm da inserção de espigas das plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Altura da inserção da espiga (cm)											
	60 DAE				80 DAE				100 DAE			
	UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	32,9	37,2	34,1	36,1	45,3	51,2	47,6	50,4	46,1	50,9	47,6	48,5
V6	32,9	36,0	33,6	36,9	45,3	50,4	49,0	50,1	46,1	51,2	48,4	49,6
V5+v6	32,9	35,9	36,9	33,6	45,3	50,6	50,6	46,2	46,1	50,7	50,6	46,6
	P Estirpes = 0,9514				P Estirpes = 0,9013				P Estirpes = 0,9128			
	P Doses = 0,0131				P Doses = 0,0040				P Doses = 0,0165			
	P E x D = 0,2445				P E x D = 0,5303				P E x D = 0,7943			
	CV (%) = 7,12				CV (%) = 7,05				CV (%) = 7,18			

Como não ocorreram diferenças entre as alturas médias de inserção de folhas bandeiras entre os tratamentos (tabela 5), supõe-se que a distância entre a fonte (folha bandeira) e dreno (espiga) das plantas de trigo foi afetada pela inoculação de bactérias *Azospirillum brasilense*.

Segundo Pimentel (1998), o transporte de açúcares pelo floema pode ocorrer entre órgãos distantes, mas normalmente um dreno é suprido de fotoassimilados pelas fontes próximas e, as relações fonte/dreno da planta, são continuamente modificadas com o desenvolvimento do vegetal.

Considerando-se que o transporte de carboidratos entre a fonte e o dreno envolve uma série de processos metabólicos ativos e passivos, o encurtamento da distância entre a folha e a espiga em plantas de trigo pode resultar em aumento da taxa de translocação de assimilados, com reflexos significativos na produtividade de grãos (FIOREZE, 2011).

Na contramão da teoria de Fioreze (2011), analisando os resultados obtidos com a medição da altura do ápice da espiga (tabela 7). Para facilitar o entendimento, pode-se observar que os comprimentos das espigas nas plantas cujas sementes foram inoculadas com *Azospirillum brasilense* foram maiores em valores absolutos em todas as três épocas de avaliação, conforme as médias a seguir.

Tabela 7. Altura média em cm do ápice das espigas de plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Altura do ápice da espiga (cm)											
	60 DAE				80 DAE				100 DAE			
	UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	46,1	54,5	45,5	50,5	49,3	56,3	52,4	54,4	50,2	55,9	52,8	53,4
V6	46,1	52,4	56,3	51,7	49,3	54,3	53,8	54,6	50,2	56,3	53,1	54,4
V5+v6	46,1	50,4	52,2	50,9	49,3	55,8	55,8	54,1	50,2	55,7	55,6	51,7
	P Estirpes = 0,2609				P Estirpes = 0,9700				P Estirpes = 0,9483			
	P Doses = 0,0465				P Doses = 0,0185				P Doses = 0,0103			
	P E x D = 0,0817				P E x D = 0,7021				P E x D = 0,8814			
	CV (%) = 8,50				CV (%) = 7,86				CV (%) = 7,13			

Quando ocorre um aumento da disponibilidade de N para as plantas de trigo, principalmente nos estádios fenológicos compreendidos entre a emergência e sete folhas totalmente expandidas (V7), essas produzem um maior número de espiguetas e conseqüentemente espigas maiores (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2001).

Segundo Simmons (1987), o nitrogênio tem papel essencial nas duas fontes principais de fotoassimilados para os grãos em crescimento: uma originada diretamente da fotossíntese atual e outra a partir da remobilização de fotoassimilados armazenados temporariamente em outros órgãos da planta, sendo o colmo o principal.

Assim, de acordo com os autores citados acima, a maior área foliar e a maior altura dos colmos ou plantas (tabelas 8 e 5) submetidas aos tratamentos com as bactérias *Azospirillum brasilense*, podem apresentar uma relação direta como o maior comprimento de espigas das mesmas.

Tabela 8. Área foliar (cm²) de plantas de trigo aos 40, 60 e 80 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Área foliar (cm ² x 1000)											
	40 DAE				60 DAE				80 DAE			
	UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	111 aC	153 aA	126 aB	116 bC	65 aB	78 aA	73 aAB	70 aAB	7 aB	6 cBC	10 aA	5 aC
V6	111 aB	142 bA	111 bB	118 bB	65 aB	74 aA	70 aA	72 aA	7 aB	9 bA	5 cC	5 aC
V5+v6	111 aB	143 bA	114 bB	121 aB	65 aB	77 aA	58 bC	76 aAB	7 aC	10 aA	9 bB	5 aD
	P Estirpes = 0,0003				P Estirpes = 0,2940				P Estirpes < 0,001			
	P Doses < 0,001				P Doses < 0,001				P Doses < 0,001			
	P E x D < 0,001				P E x D = 0,0010				P E x D < 0,001			
	CV (%) = 4,19				CV (%) = 6,43				CV (%) = 7,39			

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Aos 40 DAE as plantas inoculadas com a concentração de 65 milhões UFC por ml⁻¹ apresentaram as maiores médias de área foliar, independente da estirpe utilizada. Comparando as estirpes na concentração de 65 milhões UFC, as plantas inoculadas com a estirpe Ab-V5 apresentaram a maior média de área foliar.

Aos 60 DAE as médias de área foliar das plantas inoculadas continuaram em sua maioria superior quando comparada as plantas sem inoculação, ocorrendo redução da área foliar apenas na concentração de 130 milhões UFC ml⁻¹ com solução compostas pela mistura das estirpes Ab-V5+Ab-V6, podendo também observar a diferença entre estirpes nessa mesma condição.

Aos 80 DAE nota-se redução acentuada da área foliar, causada pela senescência natural das folhas. Nessa época, a área fotossinteticamente ativa das plantas inoculadas com a concentração de 65 milhões UFC foi maior nas plantas inoculadas com as estirpes Ab-V6 e mistura das estirpes Ab-V5+Ab-V6. Nas plantas inoculadas com a concentração de 130 milhões UFC ml⁻¹ a área foliar foi maior com o uso da estirpe Ab-V5. Já as plantas submetidas aos tratamentos com a concentração 195 milhões UFC de bactérias apresentaram as menores áreas foliares, independente da estirpe utilizada.

As maiores médias de área foliar das plantas inoculadas podem ser características morfológicas de plantas bem nutridas por nitrogênio. Nesse sentido, pode-se tomar como referência o estudo de Sala et al. 2005, onde os autores obtiveram resultados positivos com a inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* em plantas de trigo, as quais promoveram um maior acúmulo de N nas plantas, seguido de maior crescimento da parte aérea. O nitrogênio é essencial para o crescimento e o desenvolvimento de folhas, como também do caule e das raízes (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Com relação à massa de matéria seca das folhas (Tabela 9), essa também foi influenciada pelos tratamentos, sendo as maiores médias observadas na concentração de 65 milhões UFC de bactérias por ml⁻¹ em todas as épocas de avaliação (Tabela 6). Para a concentração de 65 milhões UFC só ocorreu interação entre dose x estirpes aos 80 DAE, onde a mistura com estirpes Ab-V5 + Ab-V6 apresentou médias superiores ao uso de cada estirpe individualmente.

Tabela 9. Massa de matéria seca das folhas (g m^{-2}) de plantas de trigo aos 40, 60 e 80 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Massa de matéria seca da folha (g m^{-2})											
	40 DAE				60 DAE				80 DAE			
	UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	48 aB	57 aA	50 aB	42 bC	22 aB	26 aA	22 abB	23 bB	3 aB	4 bA	3 bB	3 aB
V6	44 aB	51 aA	39 bB	39 bB	22 aB	25 aA	23 aAB	21 bB	3 aB	4 bA	2 cC	2 bB
V5+v6	45 aB	55 aA	41 bB	49 aB	22 aB	24 aA	20 bB	20 aB	3 aB	6 aA	4 aB	2 bC
	P ESTIRPES < 0,001				P ESTIRPES = 0,4712				P ESTIRPES < 0,001			
	P DOSES = 0,0005				P DOSES < 0,001				P DOSES < 0,001			
	P E x D < 0,001				P E x D = 0,0005				P E x D < 0,001			
	CV (%) = 6,62				CV (%) = 5,51				CV (%) = 10,67			

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

No estudo de Rodrigues et al. (2014), a inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* também aumentou o desenvolvimento da parte aérea de plantas em relação ao controle, promovendo maior acúmulo de matéria seca das folhas (RODRIGUES et al., 2014). Neste sentido, Sala et al. (2007) verificaram que a produção de matéria seca pela parte aérea de plantas de trigo duplicou nos tratamentos que receberam a inoculação com bactérias diazotróficas, em relação à testemunha. Georgin et al., (2014), com o uso de *A. brasilense*, registraram pequeno acréscimo de matéria seca total nas plantas de trigo, quando comparados à testemunha.

Uma explicação para os benefícios causados por essas bactérias pode ser sua capacidade de síntese de fitormônios. As auxinas são os fitormônios mais comumente sintetizados por diversos grupos de microrganismos, dos quais o principal é o ácido indolacético (AIA), o que, inclusive, já foi observado em cultura pura de células de isolados de bactérias, pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Achromobacter* e *Zoogloea* (TSAVKELOVA et al., 2006).

Porém, também já foi observado que na ausência de fertilizante nitrogenado a inoculação pode causar decréscimo na massa de matéria seca da parte aérea de plantas de trigo (DIDONET et al., 2000). O mesmo autor atribuiu esse efeito ao possível

aumento no crescimento das raízes, em relação à parte aérea. Outra explicação é a de que as bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas não contribuem com quantidades suficientes de N_2 fixado para garantir produtividade máxima (BALDANI; BALDANI, 2005), e que a ausência de N pode representar alto custo da associação para a planta, em condição de baixo nível de N no solo.

Ressalta-se a explicação de Kerbauy (2008), onde a associação entre as bactérias fixadoras de N e a rizosfera leva certo tempo para ser verificada com seus benefícios de forma efetiva. Porém, uma vez estabelecida à associação, essa permanece até o final do ciclo de cultivo.

Para a massa de matéria seca de raízes, não foi observada interação significativa entre as estirpes e as concentrações de bactérias, onde os tratamentos inoculados apresentaram média semelhante aos não inoculados (Tabela 10).

Tabela 10. Massa de matéria seca das raízes ($g\ dm^3$) de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Massa de matéria seca das raízes ($g\ dm^3$ de solo)			
	UFC ml^{-1}			
	0	65	130	195
V5	0,245	0,242	0,222	0,258
V6	0,245	0,195	0,280	0,240
V5+v6	0,245	0,240	0,280	0,178
P Estirpes = 0,9491				
P Doses = 0,2161				
P E x D = 0,2051				
CV (%) = 23,08				

Em relação as médias de matéria seca de raízes, não foi observado interação entre doses e estirpes, esse fato pode ter ocorrido devido à área limitada para exploração das raízes nos vasos, limitando o desenvolvimento das raízes, já que o solo apresentava condições ótimas de textura e fertilidade para o pleno desenvolvimento e aprofundamento das raízes.

Diferentemente do que aconteceu no estudo de Cato (2006), onde esse autor cultivou quatro plantas por vaso de 10 litros e observou resultados significativos no desenvolvimento radicular de plantas de trigo, quando as sementes foram tratadas com *Azospirillum brasilense*. Nesse sentido, Nozake; Lorenzato; Mancini (2015), cultivando sete plantas por vaso de oito litros, também observaram aumento da matéria seca das raízes de plantas de trigo quando houve inoculação das sementes. O mesmo foi relatado por Alarim e Mostafa (2009), cultivando três plantas de trigo por vasos de 3,5 litros cada.

Segundo Ali et al., (2002), a transferência de N atmosférico para as plantas através da fixação biológica de N² e o crescimento promovido pelas substâncias produzidas por rizobactérias melhoram o desenvolvimento radicular e, posteriormente, aumentam a absorção de nutrientes pelas plantas de trigo.

Aos 40 DAE a concentração de 65 milhões UFC de bactérias proporcionou maior acúmulo de matéria seca no colmo em relação aos demais tratamentos, independente da estirpe inoculada. Aos 60 DAE, todos os tratamentos com o uso da bactéria foram superiores quando comparados com a testemunha (Tabela 11). Na concentração de 65 milhões UFC de bactérias, as maiores médias foram obtidas com a inoculação da estirpe Ab-V6. Para as concentrações de 130 e 195 milhões UFC, as maiores médias foram obtidas com a inoculação da mistura das duas estirpes Ab-V5+Ab-V6.

Tabela 11. Massa de matéria seca do colmo (g m^{-2}) aos 40, 60 e 80 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Massa de matéria seca do colmo (g m^{-2})							
	40 DAE				60 DAE			
	UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}			
	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	22 aC	28 aA	24 aB	21 cC	106 aB	144 bA	135 bA	134 bA
V6	22 aBC	29 aA	20 bC	24 bB	106 aB	157 aA	138 bA	135 bA
V5+v6	22 aB	26 aA	22 bB	23 aB	106 aB	146 bA	144 aA	150 aA
P ESTIRPES = 0,0364				P ESTIRPES = 0,06834				
P DOSES < 0,001				P DOSES < 0,001				
P E x D < 0,001				P E x D = 0,0048				
CV (%) = 6,71				CV (%) = 9,04				

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

Não foram encontrados na literatura estudos com avaliações de matéria seca especificamente para colmo de plantas de trigo. No entanto, existem resultados com plantas de milho onde a altura de planta foi influenciada positivamente pelo uso de *A. brasilense* (BASI, 2013). A inoculação do milho com *A. brasilense* proporcionou plantas maiores e mais vigorosas (PEDRINHO, 2009; BRACCINI et al., 2012; BARASSI et al., 2008). Verona et al. (2010) observaram que a inoculação proporcionou maior diâmetro de caule e maior peso em relação à massa seca de parte aérea mesmo em estresse hídrico. Nesse sentido, características morfológicas das plantas de trigo, como o diâmetro do caule pode ter sido influenciado pela inoculação das bactérias, produzindo um maior acúmulo de matéria seca.

Ao contrário, Cavallet et al. (2000) observaram que o uso de produtos inoculantes a base *Azospirillum* spp. não provocou alterações na altura da planta, assim como Francisco et al. (2012) também não observaram diferenças na altura de planta quando da inoculação de sementes com *A. brasilense*.

Sabe-se que além das folhas, grande parte das reservas produzidas pela planta são armazenadas nos colmos, fazendo com que esta relação de maior massa de parte aérea e maior diâmetro de caule produzam melhores condições de armazenagem e uma

possível maior produção final, já que essas reservas são indispensáveis para o bom desenvolvimento da planta, principalmente na fase reprodutiva, para suprir os drenos representados pelas espigas.

A emissão de perfilhos também foi afetada significativamente em função da aplicação dos tratamentos com bactérias *A. brasilense*, tanto para doses quanto para estirpes (Tabela 12). Nas duas épocas de avaliação, as plantas inoculadas com a estirpe Ab-V5 e a mistura das estirpes Ab-V5+Ab-V6 produziram os maiores números de perfilhos nas concentrações de 65 e 195 milhões UFC de bactérias.

Tabela 12. Número médio de perfilhos m^{-2} por plantas de trigo aos 20, 40 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agrônomicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Número de perfilhos (m^2)							
	20 DAE				40 DAE			
	UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}			
	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	329 aB	430 aA	342 aB	457 aA	302 aB	437 aA	338 aB	447 aA
V6	329 aB	417 aA	381 aB	315 bC	302 aB	434 aA	376 aB	305 bC
V5+v6	329 aC	460 aA	394 aB	480 aA	302 aC	490 aA	394 abB	496 aA
P ESTIRPES = 0,0001				P ESTIRPES = 0,0008				
P DOSES < 0,001				P DOSES < 0,001				
P E x D = 0,0002				P E x D < 0,001				
CV (%) = 8,85				CV (%) = 10,20				

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

Em valores absolutos, os números de perfilhos praticamente não mudaram de uma época de avaliação para outra. Isso mostra que, nesse estudo a estabilidade no número de perfilhos ocorreu aos 20 DAE. Outro dado importante, é o fato das plantas de trigo, nesse caso, terem sido cultivadas em ambiente protegido, e isto pode ter influenciado o número de perfilhos por m^2 , já que a presença de maior ou menor número de perfilhos esta sob efeito de alguns fatores. Por exemplo, a qualidade e intensidade da luz que incide sobre o dossel em função do tipo de material que compõem a cobertura do ambiente no qual foi

realizado o cultivo, isso pode suprimir o desenvolvimento de perfilhos em trigo, estimulando a dominância apical (ALMEIDA et al., 2002).

De acordo com Destro (2001), plantas de trigo em baixas populações produzem mais perfilhos do que em condições de alta densidade de semeadura, apresentando, ao final do ciclo, números similares de espigas por metro quadrado. Sabe-se também que o N é o macroelemento mais limitante do rendimento de grãos de trigo, visto que dentre outros fatores, determina o número de perfilhos (SALA et al., 2005).

O florescimento das plantas aconteceu entre 54 a 57 DAE. As plantas tratadas com as concentrações de 65 e 195 milhões UFC com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 floresceram mais cedo, aproximadamente aos 54 DAE. Já as plantas testemunhas e as tratadas com a mistura de estirpes Ab-V5+AbV6 floresceram ao mesmo tempo, aos 56 DAE (Tabela 13). Na literatura não há relatos do efeito da inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* sobre o florescimento de gramíneas

Tabela 13. Número de dias até o florescimento de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Florescimento (DAE)			
	UFC ml ⁻¹			
	0	65	130	195
V5	57,0 aA	54,0 bB	57,0 aA	55,0 abB
V6	57,0 aA	54,8 abB	55,8 aAB	54,5 bB
V5+v6	57,0 aA	56,0 aA	56,0 aA	56,0 aA

P Estirpes = 0,0339

P Doses < 0,001

P E x D = 0,0154

CV (%) = 1,41

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

A inoculação das sementes de trigo com *Azospirillum brasilense* também aumentou o número de espiguetas por espiga e o número de grãos por espiga. Não promovendo efeito sobre o número de espigas por m² (Tabela 14).

Tabela 14. Número de espigas m², número de espiguetas por espiga e número de grãos por espigas em plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Nº de Espigas (m ²)				Nº de Espiguetas/Espiga				Nº de Grãos/Espiga			
	UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	276,7	255,6	266,6	265,6	28,2	34,2	33,0	33,5	11,5	15,0	14,5	13,0
V6	276,7	266,7	252,2	256,7	28,2	33,2	33,0	32,2	11,5	15,2	13,2	12,5
V5+v6	276,7	247,8	266,7	263,4	28,2	34,0	33,8	34,2	11,5	14,8	11,8	14,5
	P Estirpes = 0,8945				P Estirpes = 0,6840				P Estirpes = 0,6713			
	P Doses = 0,0863				P Doses < 0,001				P Doses < 0,001			
	P E x D = 0,7254				P E x D = 0,9943				P E x D = 0,0848			
	CV (%) = 7,34				CV (%) = 8,90				CV (%) = 10,90			

Os resultados da tabela 14 corroboram com os encontrados nas tabelas 6 e 7. Observa-se que existe relação direta entre o maior comprimento de espigas, esse causado por maior número de espiguetas e conseqüentemente número maior de grãos por espiga. Provavelmente, este acréscimo pode estar diretamente relacionado à produção de substâncias como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno pelas plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* (CASSÁN et al., 2009) minimizando o abortamento das flores.

No estudo de Piccinin et al. (2013), os componentes de produção, número de espiguetas por espiga e número de grãos por espiga, na concentração de 200 mL de inoculante conjugado com meia dose de nitrogênio (50 kg ha⁻¹) apresentaram as maiores médias, quando comparado com os demais tratamentos. Para esses autores, as plantas cultivadas após inoculação das sementes com *Azospirillum ssp* aumentam significativamente o rendimento, especialmente quando o fornecimento de nitrogênio é limitado.

Segundo Coelho (2006) o nitrogênio é fundamental para a síntese de proteínas, enzimas, co-enzimas, ácidos nucleicos e fitocromos, que são integrantes da molécula de clorofila. No entanto, com aportes adicionais de nitrogênio assume grande

importância na fotossíntese devido ao aumento substancial pigmentos responsáveis de captar a energia solar por meio das antenas dos tilacóide proporcionando o processo de carboxilação (TAIZ; ZEIGER, 2009)

Ao analisar o efeito da inoculação sobre a massa de mil grãos e a produtividade (Tabela 15), verificou-se que a inoculação de *Azospirillum brasilense* proporcionou incrementos na produtividade de grãos de trigo ($P < 0,01$ para doses). Com média de incrementos independente da estirpe utilizada nos tratamentos.

Tabela 15. Massa de mil grãos (g) e produtividade de grãos (kg ha^{-1}) de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente protegido na Faculdade de Ciências Agrônomicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Massa de mil grãos (g)				Produtividade (kg ha^{-1})			
	UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}			
	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	38,8	43,3	41,2	40,4	907	1367	1078	1187
V6	38,8	43,6	40,4	41,7	907	1351	1053	1146
V5+v6	38,8	44,4	42,3	39,2	907	1375	1099	1196
P Estirpes = 0,3474				P Estirpes = 0,148				
P Doses = 0,0137				P Doses = 0,001				
P E x D = 0,3878				P E x D = 0,3150				
CV (%) = 7,05				CV (%) = 7,29				

6.2. Experimento conduzido em ambiente não protegido

De acordo com os resultados da análise de variância apresentados na tabela 16, não foram observados efeitos para doses das bactérias *Azospirillum brasilense* na altura média de plantas de trigo aos 20 e 40 dias após a emergência (DAE). Para essa característica morfológica a interação estirpes x doses também não foi significativa (Tabela 16).

Tabela 16. Altura média em cm da última folha totalmente estendida de plantas de trigo aos 20 e 40 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Altura da última folha totalmente estendida (cm)							
	20 DAE				40 DAE			
	UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹			
	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	16,6	16,3	17,0	16,6	27,3	24,9	27,6	25,5
V6	16,6	16,3	16,7	17,0	27,3	26,8	28,9	27,8
V5+V6	16,6	15,6	15,4	16,5	27,3	26,3	25,6	27,9
P Estirpes = 0,1405				P Estirpes = 0,2355				
P Doses = 0,4121				P Doses = 0,4273				
P E x D = 0,6926				P E x D = 0,4967				
CV (%) = 5,79				CV (%) = 8,52				

Segundo Zaied et al. (2003) e Iniguez et al. (2004), essas bactérias podem auxiliar por diversos mecanismos na nutrição nitrogenada das plantas, contribuindo para o aumento do seu crescimento. No entanto, esse efeito parece ser verificado na maioria das vezes somente em experimentos realizados em ambiente protegido. Corroborando com esta teoria, no ano de 2007, Sala et al. (2005) verificaram que as bactérias do gênero *Azospirillum* promoveram o crescimento e o acúmulo de N em plantas de trigo em experimento realizado em ambiente protegido. Contudo, em trabalho anterior a esse, outros autores não encontraram diferença entre tratamentos com e sem a inoculação quando o experimento foi realizado no em ambiente não protegido (CAMPOS et al., 1999). E agora, os resultados obtidos nesse trabalho, apresentam os mesmos resultados, efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na altura de plantas, quando do experimento realizado em ambiente protegido (Tabela 4) e o mesmo não observado quando realizado no em ambiente não protegido.

Para altura média de inserção da folha bandeira nas avaliações realizadas aos 60, 80 e 100 (DAE), não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre as plantas cultivadas com e sem a bactéria *Azospirillum brasilense*. Do mesmo modo, também não ocorreu interação entre estirpes x doses (tabela 17).

Tabela 17. Altura média em cm da última folha totalmente estendida de plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Altura da última folha totalmente estendida (cm)											
	60 DAE				80 DAE				100 DAE			
	UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	35,5	32,8	36,8	33,6	37,8	37,7	38,7	34,8	39,6	37,1	39,6	38,3
V6	35,5	36,3	37,7	35,9	37,8	37,0	38,7	38,7	39,6	36,9	39,3	39,2
V5+v6	35,5	32,2	33,4	36,0	37,8	35,4	35,8	38,5	39,6	36,4	37,5	38,7
P Estirpes = 0,1355				P Estirpes = 0,5018				P Estirpes = 0,7675				
P Doses = 0,3281				P Doses = 0,7708				P Doses = 0,1312				
P E x D = 0,4388				P E x D = 0,3004				P E x D = 0,9836				
CV (%) = 8,65				CV (%) = 7,59				CV (%) = 7,62				

No caso da altura média da inserção de espigas, essa também não aumentou com a aplicação das doses de bactérias independente das estirpes utilizadas ou da combinação entre elas (tabela 18).

Tabela 18. Altura média em cm da inserção de espigas das plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Altura da inserção espiga (cm)											
	60 DAE				80 DAE				100 DAE			
	UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	37,0	32,9	39,6	34,9	51,3	49,6	53,3	47,3	53,6	49,9	54,1	51,9
V6	37,0	38,3	40,3	37,0	51,3	49,8	51,0	51,7	53,6	49,5	52,7	52,8
V5+V6	37,0	33,1	34,9	37,2	51,3	47,8	49,0	50,9	53,6	49,4	51,0	52,3
P Estirpes = 0,0994				P Estirpes = 0,7150				P Estirpes = 0,8371				
P Doses = 0,1292				P Doses = 0,5474				P Doses = 0,0943				
P E x D = 0,2723				P E x D = 0,5989				P E x D = 0,9820				
CV (%) = 9,52				CV (%) = 8,23				CV (%) = 7,48				

As médias de altura de inserção da espiga no experimento em ambiente não protegido foram superiores numericamente as obtidas em ambiente protegido. É natural

que plantas cultivadas em um ambiente sem fatores limitantes, como por exemplo, área de exploração das raízes e maior disponibilidade de luz, se desenvolvam mais.

No entanto, mesmo com uma área foliar maior, promovida pela inoculação das bactérias (tabela 20) e uma maior capacidade de armazenamento de fotoassimilados (Tabela 23), não foi observado o mesmo para os órgãos de reprodução da planta (tabela 19).

Tabela 19. Altura média em cm do ápice das espigas de plantas de trigo aos 60, 80 e 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agrônomicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Altura do ápice da espiga (cm)											
	60 DAE				80 DAE				100 DAE			
	UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹				UFC ml ⁻¹			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	40,8	35,2	43,5	38,0	58,9	57,6	61,3	54,4	61,0	57,2	61,9	57,8
V6	40,8	41,2	45,4	40,2	58,9	57,6	59,2	60,1	61,0	56,7	60,5	60,7
V5+V6	40,8	36,8	38,9	41,1	58,9	55,3	55,6	58,6	61,0	57,1	58,4	58,4
	P Estirpes = 0,0736				P Estirpes = 0,6346				P Estirpes = 0,8419			
	P Doses = 0,0132				P Doses = 0,7758				P Doses = 0,2628			
	P E x D = 0,1596				P E x D = 0,6486				P E x D = 0,9667			
	CV (%) = 8,55				CV (%) = 9,29				CV (%) = 8,67			

Na literatura existem trabalhos onde plantas de trigo foram somente inoculadas com *Azospirillum brasilense*; e/ou adubadas com nitrogênio + inoculação com *Azospirillum brasilense* (CAMPOS et al., 1999; TEIXEIRA FILHO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2014). Porém, em nenhum deles ocorreu acréscimo na altura da espiga.

Aos 40 DAE as plantas inoculadas com a concentração de 195 milhões UFC de bactérias da apresentaram as maiores médias de área foliar, quando utilizado a mistura entre estirpes Ab-V5+Ab-V6 (Tabela 20).

Tabela 20. Área foliar (cm^2) de plantas de trigo aos 40, 60 e 80 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Área Foliar ($\text{cm}^2 \times 1000$)											
	40 DAE				60 DAE				80 DAE			
	UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	15aA	15aA	13aA	15bA	11aB	12aB	16aA	14bAB	40aB	35aBC	30bC	51bA
V6	15aA	14aA	13aA	13bA	11aB	12aB	11bB	16aA	40aB	38aB	28bC	55aA
V5+V6	15aB	13aB	14aB	19aA	11aC	13aBC	17aA	15abAB	40aB	37aB	47aB	63aA
	P Estirpes = 0,0186				P Estirpes = 0,0165				P Estirpes <0,001			
	P Doses = 0,0060				P Doses <0,001				P Doses <0,001			
	P E x D = 0,0019				P E x D = < 0,001				P E x D <0,001			
	CV (%) = 11,18				CV (%) = 9,58				CV (%) = 10,28			

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

Aos 60 DAE as médias de área foliar das plantas inoculadas continuaram em sua maioria superiores quando comparadas as plantas sem inoculação (Tabela 20). Nesse caso, diferente do ocorrido em ambiente protegido, a concentração de 130 milhões UFC juntamente com a concentração de 195 milhões UFC de bactérias promoveu as maiores médias de área foliar, com destaque para os tratamentos com a estirpe Ab-V5 e mistura da estirpe Ab-V5+Ab-V6.

Aos 80 DAE ao invés de redução acentuada da área foliar observado em experimento conduzido em ambiente protegido, nessa época foram observados os maiores valores para as médias de área foliar. Nessa época, a área fotossinteticamente ativa das plantas inoculadas com a concentração de 195 milhões UFC foi maior nas plantas inoculadas com as estirpes Ab-V6 e mistura das estirpes Ab-V5 + Ab-V6. Já as plantas submetidas aos tratamentos com a concentração 130 milhões UFC com o uso isolado das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 apresentaram as menores áreas foliares.

Com relação à massa de matéria seca das folhas (Tabela 21), essa também foi influenciada pelos tratamentos, sendo as maiores médias observadas na concentração 195 milhões UFC de bactérias em todas as épocas de avaliação. Para a concentração de 195 milhões UFC só ocorreu interação entre dose x estirpes aos 40 e 80 DAE,

onde a mistura com estirpes Ab-V5 + Ab-V6 apresentou médias superiores ao uso de cada estirpe individualmente.

Tabela 21. Massa de matéria seca das folhas (g m^{-2}) de plantas de trigo aos 40, 60 e 80 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Massa de matéria seca da folha (g m^{-2})											
	40 DAE				60 DAE				80 DAE			
	UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	44aC	50bB	53bB	67bA	56aB	56aB	55aB	67aA	24aB	26aB	19bC	35bA
V6	44aC	52abB	51bB	56cA	56aB	54aB	49bB	66aA	24aB	20bC	17bC	34bA
V5+V6	44aD	55aC	65aB	85aA	56aB	55aB	52abA	66aA	24aB	25aB	32aA	38aA
	P Estirpes = 0,003				P Estirpes = 0,010				P Estirpes < 0,001			
	P Doses < 0,001				P Doses < 0,001				P Doses < 0,001			
	P E x D < 0,001				P E x D < 0,001				P E x D < 0,001			
	CV (%) = 8,21				CV (%) = 7,58				CV (%) = 9,28			

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

Comparando os resultados aqui obtidos com outros estudos também realizados em ambientes não protegido, Lana et al. (2012) também verificaram incremento na massa de matéria seca das folhas do trigo, com a inoculação com *Azospirillum brasilense*. Já Rodrigues (2014), observou incrementos significativos de matéria seca nas folhas de trigo utilizando a estirpe Ab-V5 em experimento conduzido em ambiente protegido, já para o experimento realizado em ambiente não protegido, não foram observadas diferenças. Nunes et al. (2014), conduzindo seu experimento em ambiente não protegido, também registrou que massa de matéria das folhas do trigo não foi influenciada pela inoculação de *Azospirillum brasilense*. No estudo de Didonet et al. (2000), foi observado que na ausência de adubo nitrogenado a inoculação pode causar decréscimo na massa de matéria seca da parte aérea de plantas de trigo.

Para Baldani e Baldani (2005), as bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas não contribuem com quantidades suficientes de N_2 fixado para garantir produtividade máxima, e a ausência de N pode representar alto custo da associação para a

planta, em condição de baixo nível de N no solo. Ressalta-se também a explicação de Kerbauy (2008), onde a associação entre as bactérias fixadoras de N e a rizosfera leva certo tempo para ser verificada com seus benefícios de forma efetiva. Porém, uma vez estabelecida à associação, essa permanece até o final do ciclo de cultivo.

Em estudos realizados em ambiente protegido, Rodrigues et al. (2014) observaram que a inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* também aumentou o desenvolvimento da parte aérea de plantas em relação ao controle, promovendo maior acúmulo de matéria seca das folhas. Sala et al. (2007) verificaram que a produção de matéria seca pela parte aérea de plantas de trigo duplicou nos tratamentos que receberam a inoculação com bactérias diazotróficas, em relação à testemunha. Já Georgin et al., (2014), com o uso de *A. brasilense*, registraram um pequeno acréscimo de matéria seca total nas plantas de trigo, quando comparados à testemunha.

Bactérias do gênero *Azospirillum* têm estimulado o crescimento vegetal, também através do aumentando da concentração de N em plantas de diversas culturas como algodão, tomate, cana-de-açúcar e *Brachiaria* sp (REIS Jr. et al., 2000). Barassi et al. (2008) observaram aumento da eficiência fotossintética das folhas e condutância estomática, incremento na produção de matéria seca e maior matéria seca das folhas em várias espécies de vegetais. Em ensaio com *Sorghum bicolor* L. Moench cultivado em hidroponia, a senescência foliar foi retardada nas plantas inoculadas com *Azospirillum brasiliense* favorecendo, assim, o acúmulo de matéria seca não só nas folhas, mais em toda a planta também (SARIG et al., 1990).

Para a matéria seca de raízes, esperava-se maior área de exploração as raízes das plantas submetidas aos tratamentos com *Azospirillum brasiliense* apresentassem um maior crescimento, no entanto, não foi observada interação significativa entre as estirpes e as concentrações de bactérias, onde os tratamentos inoculados apresentaram média semelhante aos não inoculados (Tabela 22).

Tabela 22. Massa de matéria seca das raízes (g dm^3) de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Massa de matéria seca das raízes (g dm^3 de solo)			
	UFC ml^{-1}			
	0	65	130	195
V5	0,162	0,141	0,140	0,166
V6	0,162	0,233	0,164	0,178
V5+v6	0,162	0,196	0,192	0,143
P ESTIRPES = 0,0737				
P DOSES = 0,2410				
P E x D = 0,1250				
CV (%) = 22,68				

Com relação ao acúmulo de massa de matéria seca no colmo aos 40 DAE as estirpes de *Azospirillum* V5 e Ab-V6 proporcionaram as maiores médias nas doses 65 e 130 milhões de bactérias (Tabela 23). Na concentração de 195 milhões UFC de bactérias, a estirpe V6 foi mais eficiente quando comparada com a estirpe Ab-V5 e a mistura entre Ab-V5+Ab-V6. Aos 60 DAE, o tratamento com o uso da concentração de 195 milhões UFC bactérias foi superior quando comparado aos demais (Tabela 23). Nessa época, para a concentração de 195 milhões UFC de bactérias, as maiores médias foram obtidas com a inoculação da estirpe Ab-V6 e sua mistura com a estirpe Ab-V5.

Tabela 23. Massa de matéria seca do colmo (g m^{-2}) aos 40 e 60 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Massa de matéria seca do colmo (g m^{-2})							
	40 DAE				60 DAE			
	UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}			
	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	27,2 aB	42,6 aA	40,0 aA	44,3 bA	143,0 aC	150,6 aBC	162,5 aB	188,2 bA
V6	27,2 aB	41,6 aA	38,1 aA	52,82 aA	143,0 aB	151,7 aB	148,0 bB	192,4 aA
V5+V6	27,2 aD	35,4 aC	43,7 aB	37,2 cA	143,0 aB	142,4 bB	158,8 aB	191,3 aA
P Estirpes = 0,0128				P Estirpes = 0,1008				
P Doses < 0,001				P Doses < 0,001				
P E x D < 0,001				P E x D < 0,001				
CV (%) = 11,00				CV (%) = 11,10				

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

Comparado os resultados obtidos em ambiente não protegido (Tabela 23) com os em ambiente protegido (Tabela 11), observa-se que aos 60 DAE o acréscimo de matéria seca foi realmente significativo quando aplicado a concentração máxima de 195 milhões UFC de bactérias por ml^{-1} .

Mais uma vez resultados podem estar relacionados com à competição com bactérias diazotróficas nativas e com a microflora do solo, sendo necessário de grandes quantidades de bactérias que consigam competir satisfatoriamente e estabelecer-se tanto na rizosfera quanto no interior das raízes (REIS Jr. et al., 2000).

Não foram encontrados na literatura estudos com avaliações de matéria seca especificamente para colmo de plantas de trigo. No entanto, existem resultados com plantas de milho. A altura de planta foi influenciada pelo uso de *A. brasilense* (BASI, 2013). A inoculação do milho com *A. brasilense* proporcionou plantas maiores e mais vigorosas (PEDRINHO, 2009; BRACCINI et al., 2012; BARASSI et al., 2008). Verona et al. (2010) observaram que a inoculação proporcionou maior diâmetro de caule e maior peso em relação à massa seca de parte aérea mesmo em estresse hídrico.

Ao contrário, Cavallet et al. (2000) observaram que o uso de produtos inoculantes a base *Azospirillum* spp. não provocou alterações na altura da planta, assim como Francisco et al. (2012) não observaram diferenças na altura de planta quando da inoculação de sementes com *A. brasilense*.

Sabe-se que além das folhas, grande parte das reservas produzidas pela planta são armazenadas nos colmos (TAIZ e ZEIGER, 2009), fazendo com que esta relação de maior massa de parte aérea e maior diâmetro de caule produzam melhores condições de armazenagem e uma possível maior produção final, já que essas reservas são indispensáveis para o bom desenvolvimento da planta, principalmente na fase reprodutiva, para suprir os drenos representados pelas espigas.

A emissão de perfilhos também foi afetada significativamente em função da aplicação dos tratamentos com bactérias *A. brasilense*, tanto para concentração quanto para estirpes aos 40 DAE (Tabela 24). Nessa época de avaliação, as plantas inoculadas com a estirpe Ab-V6 produziram os maiores números de perfilhos nas concentrações 130 e 195 milhões UFC de bactérias.

Tabela 24. Número médio de perfilhos m^{-2} de plantas de trigo aos 20 e 40 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Número de perfilhos (m^2)							
	20 DAE				40 DAE			
	UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}			
	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	411,2	417,8	407,9	391,5	506,6 aAB	503,3 aAB	546,0 aA	537,5 bB
V6	411,2	414,5	463,8	463,8	506,6 aB	493,4 aB	598,7 aA	608,5 aA
V5+V6	411,2	375,0	401,3	391,4	506,6 aA	509,9 aA	430,9 bA	506,6 bA
	P Estirpes = 0,0025				P Estirpes = 0,0006			
	P Doses = 0,4545				P Doses = 0,0005			
	P E x D = 0,1393				P E x D = 0,0001			
	CV (%) = 8,09				CV (%) = 8,72			

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

No experimento em ambiente não protegido a estabilidade do número de perfilho não aconteceu aos 20 DAE como em ambiente protegido. Isso mostra que o cultivo das plantas de trigo em ambiente protegido pode ter influenciado o número de perfilhos por m², já que a presença de maior ou menor número de perfilhos está sob efeito de alguns fatores. Por exemplo, a qualidade da luz que incide sobre o dossel vegetativo (ALMEIDA et al., 2002). Em ambiente não protegido a quantidade de luz que incide sobre o dossel em campo aberto é muito superior a que incide sobre as plantas em ambiente protegido que não apresente uma fonte luminosa artificial.

O florescimento das plantas aconteceu entre 59 a 61 DAE, enquanto as plantas testemunhas floresceram mais cedo, aos 59 DAE, as plantas inoculadas com as estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V5+Ab-V6 retardaram o florescimento em pelo menos um dia (Tabela 25). Na literatura não há relatos do efeito da inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* sobre o florescimento de gramíneas.

Tabela 25. Número de dias até o florescimento de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agrônomicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Florescimento – DAE			
	UFC ml ⁻¹	UFC ml ⁻¹	UFC ml ⁻¹	UFC ml ⁻¹
	0	65	130	195
V5	59,5	60,5	60,0	61,0
V6	59,5	60,0	61,0	60,5
V5+v6	59,5	60,5	59,5	60,0

P Estirpes = 1,00
P Doses = 0,0375
P E x D = 0,0703
CV (%) = 1,69

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

A inoculação das sementes de trigo com *Azospirillum brasilense* não promoveu alterações significativas nos componentes de produção: número de espiga, número de espiguetas por espiga e número de grãos por espiga (tabela 26).

Tabela 26. Número de espigas m², número de espiguetas por espiga e número de grãos por espigas em plantas de trigo aos 100 dias após a emergência, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Nº de espigas (m ²)				Nº de Espiguetas/Espiga				Nº de Grãos/Espiga			
	UFC/ml ⁻¹				UFC/ml ⁻¹				UFC/ml ⁻¹			
	0	65	130	195	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	286 aA	254 aA	282 aA	294 aA	44,2	42,8	42,4	43,5	30	33	34	37
V6	286 aA	288 aA	226 bB	283 aA	44,2	42,4	41,6	43,1	30	33	35	35
V5+V6	286 aA	278 aA	301 aA	279 aA	44,2	40,5	41,2	39,4	30	31	31	32
	P Estirpes = 0,1072				P Estirpes = 0,1116				P Estirpes = 0,029			
	P Doses = 0,4525				P Doses = 0,0734				P Doses = 0,0050			
	P E x D = 0,0163				P E x D = 0,7244				P E x D = 0,5784			
	CV (%) = 9,57				CV (%) = 6,10				CV (%) = 8,44			

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Alguns estudos em ambiente não protegido mostram a ocorrência de aumentos significativos desses componentes produtivos, somente quando existiu a combinação de *Azospirillum brasilense* + adubação nitrogenada (Piccinin et al., 2013), onde as variáveis número de espiguetas por espiga e número de grãos por espiga, na dose de 200 mL do inoculante conjugado com meia dose de nitrogênio (50 kg ha⁻¹) apresentaram as maiores médias, quando comparado com os demais tratamentos. Rodrigues et al. (2014), constataram que o uso isolado da estirpe Ab-V5 promoveu efeito não significativo, enquanto foram observados efeitos lineares para os demais tratamentos em função das doses de nitrogênio aplicadas combinadas com a estirpe Ab-V5. Didonet et al. (1996) já chamavam a atenção para a maior eficiência bactéria-planta em razão da adição de fertilizante nitrogenado, quando comparado ao uso isolado da bactéria. Esses autores observaram que a produção de grãos de trigo por plantas oriundas de sementes inoculadas com *A. brasiliense*, e complementado com 15 kg de N ha⁻¹, não diferiu do tratamento que recebeu mais 45 kg de N ha⁻¹ na adubação de cobertura.

Ao analisar o efeito das estirpes sem apresentar diferença significativa da inoculação sobre a massa de mil grãos e a produtividade (Tabela 27), verificou-se que a

inoculação de *Azospirillum brasilense* não proporcionou incrementos na produtividade de grãos de trigo. Ao contrario com o aumento das doses foi observado um decréscimo na produtividade ($P < 0,001$), independente da estirpe utilizada nos tratamentos.

Os fatores que interferem nas respostas das culturas à inoculação de *Azospirillum* ainda não estão totalmente esclarecidos. Os resultados de sucesso encontrados na literatura da associação planta-*Azospirillum* estão relacionados, na maioria das vezes, a fatores da própria bactéria, como a escolha da estirpe, o número ideal de células por sementes e sua viabilidade (MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006). Arsac et al. (1990) comentaram que a concentração da bactéria na solução do inoculante é mais importante que a dose. Para os autores, a concentração bacteriana ótima que promove o crescimento de plantas de milho é de 10 milhões de células viáveis ml^{-1} , ou seja, aproximadamente 17 mil unidades formadoras de colônia semente⁻¹. Níveis acima do ótimo apresentam efeito inibitório do crescimento das plantas inoculadas, enquanto concentrações baixas simplesmente não têm efeito algum na fase vegetativa.

Tabela 27. Massa de mil grãos (g) e produtividade de grãos (kg ha^{-1}) de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, em ambiente não protegido, no campo experimental da Faculdade de Ciências Agrônomicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Estirpes	Massa de mil grãos (g)				Produtividade de grãos (kg ha^{-1})			
	UFC ml^{-1}				UFC ml^{-1}			
	0	65	130	195	0	65	130	195
V5	44,8 aA	44,0 aA	45,9 aA	44,5 aA	2383,5	1878,7	2113,4	1952,8
V6	44,8 aA	36,5 bB	44,6 aA	46,3 aA	2383,5	1842,4	2076,0	2384,0
V5+V6	44,8 aA	44,2 aA	44,9 aA	44,9 aA	2383,5	1915,1	2188,0	2077,2
P Estirpes = 0,0849					P Estirpes = 0,4907			
P Doses = 0,0017					P Doses < 0,001			
P E x D = 0,0059					P E x D = 0,2682			
CV (%) = 5,50					CV (%) = 9,99			

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

Nesse estudo em ambiente não protegido, ao contrário do que aconteceu em ambiente protegido, maior crescimento de várias estruturas morfológicas da

planta não se refletiu em aumento de produtividade. A partição da matéria seca na planta pode ter sido prejudicada ou alterada por fatores abióticos, como altas temperaturas e umidade do ar, mesmo sendo feita suplementação de água via sistema de irrigação. Ou até mesmo falta de nitrogênio, elemento essencial para o crescimento de novos tecidos e estruturas na planta.

Neste sentido, Borrás et al. (2004) relataram que em ambientes um pouco desfavoráveis a massa de matéria seca de grãos de trigo não muda na mesma magnitude que as mudanças impostas na área foliar, como a diminuição da fotossíntese durante o enchimento dos grãos. Heinemann et al. (2006) também constataram este efeito de particionamento pois no solo com baixa quantidade de N aplicado a produção dos grãos apresentou maior correlação com a biomassa acumulada na antese do que com a acumulada na maturação fisiológica, diferente do que ocorre sob condições suficientes de N em que a correlação é significativa, mas igual para ambos os estádios fisiológicos.

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

Outro fator importante é o controle do ambiente de estudo, como visto aqui, quando do experimento em ambiente protegido foram obtidos incrementos na produtividade de grãos, diferentemente do experimento realizado em ambiente não protegido. Tudo isso mostra, que o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas como trigo, é um manejo agrícola com alto potencial, desde que, se consiga o máximo de controle dos fatores climáticos e nutricionais nas áreas de cultivo.

6.3. Correlações

Além dos componentes da espiga, outros componentes também exercem influência sobre a produtividade. Analisando as tabelas 28 e 29, observa-se que

houve maior crescimento de várias estruturas morfológicas da planta onde reflete-se em aumento de produtividade.

Tabela 28. Correlações simples de Pearson para produtividade versus altura de plantas, área foliar, matéria seca da planta, florescimento, número de perfilhos e componentes da espiga de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, **em ambiente protegido** na Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Variáveis	X	Produtividade
Altura 60 (F.B.)		0,691 P<0,001
Altura 60 (I.E.)		0,719 P<0,001
Altura 60 (A.E.)		0,633 P<0,001
Área foliar 60 (DAE)		0,966 P<0,001
Matéria seca folha 60 (DAE)		0,977 P<0,001
Matéria seca colmo 60 (DAE)		0,949 P<0,001
Florescimento		-0,732 P<0,001
Número de perfilhos		0,274 P=0,072
Número de espigas		0,341 P=0,023
Número de espiguetas		0,568 P<0,001
Número de Grãos/Espigas		0,921 P<0,001
Massa de mil grãos		0,801 P<0,001

O primeiro valor é o coeficiente de correlação e o segundo é o P – nível de significância.

Tabela 29. Correlações simples de Pearson para produtividade versus altura de plantas, área foliar, matéria seca da planta, florescimento, número de perfilhos e componentes da espiga de plantas de trigo, inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* via tratamento de sementes, **em ambiente não protegido** da Faculdade Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, município de Botucatu – SP.

Variáveis	X	Produtividade
Altura 60 (F.B.)		0,717 P<0,001
Altura 60 (I.E.)		0,646 P<0,001
Altura 60 (A.E.)		0,650 P<0,001
Área foliar 60 (DAE)		0,756 P<0,001
Matéria seca folha 60 (DAE)		0,819 P<0,001
Matéria seca colmo 60 (DAE)		0,803 P<0,001
Florescimento		-0,743 P<0,001
Número de perfilhos		0,488 P<0,001
Número de espigas		0,569 P<0,001
Número de espiguetas		0,372 P=0,013
Número de Grãos/Espigas		0,593 P<0,001
Massa de mil grãos		0,462 P<0,001

O primeiro valor é o coeficiente de correlação e o segundo é o P – nível de significância.

Quanto maior a área foliar, maior será a capacidade de produção de fotoassimilados; quanto maior a altura do colmo, maior será a capacidade de armazenamento de fotoassimilados e estes serão utilizados no crescimento da planta e no enchimento de grãos; para cada perfilho temos uma espiga e quanto maior o número de espiguetas maior será o número de grãos.

Sala et al. (2007), verificaram com diferentes estirpes de bactérias promotoras do crescimento vegetal, que qualquer uma das estirpes utilizadas aumentam a massa de mil grãos em trigo, e que a estirpe Ab-V5 foi superior as demais estirpes utilizadas. Em trabalho de Hungria et al. (2010) foram verificados incrementos significativos na produtividade de grãos de trigo de até 31% quando inocularam as sementes com diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense*.

De acordo com Dalla Santa et al. (2004) a inoculação das sementes de trigo com *Azospirillum* sp. aumentou a produtividade de forma significativa somente quando associada a 100% do N recomendado, ao passo que, o tratamento que recebeu somente inoculação produziu 7,4% acima do controle, porém, esta diferença não foi significativa.

Zorita et al. (2008) após avaliar a eficiência de *Azospirillum brasilense* nas sementes de trigo, reportam que as plantas inoculadas apresentaram crescimento mais vigoroso com maior expansão da área radicular (12,9%) e maior acúmulo de matéria seca (22%). A inoculação também aumentou o número de grãos colhidos e o rendimento em 6,1 e 8,0%, respectivamente. Com isso, comprovam a hipótese de que as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 são eficazes disponibilizando aportes de nitrogênio para a cultura.

Braccini et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes para a cultura do milho, constatando que a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* na formula líquida promoveu aumento na altura de plantas e no rendimento de grãos, em comparação com o tratamento controle.

Segundo Lambers et al. (2008), gramíneas, em especial o trigo, produzem moléculas orgânicas como ácidos dicarboxílicos, que proporcionam aumentos na disponibilidade do nitrogênio, promovido pela fixação biológica do nitrogênio.

Campos et al. (1999), entretanto, não verificaram resposta agrônômica favorável para a cultura do trigo com a inoculação de *Azospirillum*, o que possivelmente seja decorrente da não especificidade da estirpe bacteriana testada. O efeito não significativo na produção por planta pela inoculação com *Azospirillum brasilense* também foi observado por Rodrigues et al. (2000; 2014) e Cantarella (2007).

Já Piccinin et al. (2013), observaram diferenças significativas no rendimento da cultura do trigo, quando inocularam sementes com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 conjugadas com a metade da dose de nitrogênio necessária para o desenvolvimento da cultura. Quando o tratamento onde ocorreu a inoculação das sementes é comparado com o tratamento testemunha ou seja, a metade do N necessário, o rendimento médio apresenta um incremento de 559 kg ha⁻¹. Resultados como esses comprovam a eficiência de bactérias diazotróficas em relação a redução da aplicação de fertilizantes nitrogenados na cultura de trigo.

6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum brasiliense*, que podem se associar endofiticamente a várias espécies de gramíneas e são capazes de auxiliar no seu crescimento e desenvolvimento pela disponibilização de nutrientes, tem sido proposta como uma estratégia para auxiliar e atender a demanda nitrogenada do trigo.

O presente trabalho foi proposto com base nas hipóteses de que a inoculação com *Azospirillum brasiliense* pode ser uma forma viável de substituição de toda ou parte da adubação nitrogenada; e de que a inoculação com *Azospirillum brasiliense* pode ser uma ferramenta útil para o aumento de produtividade, complementando ou substituindo a fertilização nitrogenada mineral, nos sistemas de manejo da cultura.

Os resultados obtidos no experimento conduzido em ambiente protegido confirmam esta hipótese, nesse trabalho, como no em ambiente não protegido, especulava-se que a inoculação com *Azospirillum brasiliense* aumentaria o desenvolvimento das plantas de trigo, culminando com uma melhora nas características dos componentes morfológicos da planta, que contribuem para o aumento dos componentes de produtividade como o número de espiguetas por espiga e o número de grãos por espiga, refletindo na produtividade da cultura do trigo, isso aconteceu, com destaque para concentração de 65 milhões UFC de bactérias.

No experimento em ambiente não protegido, houve incrementos no desenvolvimento de plantas quando inoculadas. Em relação às não inoculadas, principalmente

na concentração de 195 milhões UFC de bactérias. Porém, esse crescimento verificado nos componentes morfológicos não apresentou correlação positiva com os componentes de produção, com isso, não foram observados incrementos significativos na produção de grãos.

Deve-se destacar que o uso de *Azospirillum brasilense* inoculado à cultura do trigo apresenta resultados promissores em relação ao meio de produção sustentável, destacando uma contribuição em relação ao aspecto morfológico da planta e no aumento da produtividade de grãos. No entanto, são necessários estudos detalhados relacionados aos mecanismos que possam resultar em melhorias na produtividade final, em cultivos realizados em ambiente não protegido.

7 CONCLUSÕES

Em ambiente protegido, a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* promove maior crescimento das plantas de trigo, sem influencia na produção de grãos.

Em condições de ambiente não protegido o crescimento das plantas é influenciado pela inoculação de *Azospirillum brasilense*.

O uso de bactérias promotoras do crescimento de plantas que aumentem o crescimento das plantas de trigo, o que representa uma estratégia viável, além dos benefícios ambientais associados à redução no uso de fertilizantes nitrogenados.

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP consultoria e comércio. 2014. p. 497-501.

ALARIM, S. A.; MOSTAFA, Y, S. Effect of nitrogen supply and *Azospirillum brasilense* Sp-248 on the response of wheat to seawater irrigation. Saudi Journal of Biological Sciences, Riyadh, n.16, p.101–107, 2009.

ALI, N. A.; DARWISH, S. D.; MANSOUR, S. M. Effect of *Azotobacterchroococcum* and *Azospirillum brasilense* inoculation an anhydrous ammonia on root colonization, plant growth and yield of wheat plant under saline alkaline cognition. Journal of Agricultural Science, Cambridge, n.27, p.5575–5591, 2002.

ALMEIDA, M. L.; SANGOI, L.; TRENTIN, P. S.; GALIO, J. Cultivares de trigo respondem diferentemente à qualidade da luz quanto à emissão de afixos e acumulação de massa seca. Ciência Rural, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 377-383, 2002.

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

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

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

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.77, p.549-579, 2005.

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

BANERJEE, M.R.; YESMIN, L.; VESSEY, J.K. Plant-growthpromoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides, in *Handbook of Microbial Biofertilizers*, M. K. Rai, Ed., pp. 137–181, Food Products Press, Binghamton, NY, USA, 2006.

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, p.49-59, 2008.

BÁRBARO, I.M; BRANCALIÃO, S.R.; TICELLI, M. É possível a fixação biológica de nitrogênio no milho?. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: . Acesso em: 4 de setembro de 2009.

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

BASI, S. Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. 2013. 63p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

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

BERTI, M.; ZAGONEL, J.; FERNANDES, E. C. Produtividade de cultivares de trigo em função do trinexapac-ethyl e doses de nitrogênio. *Scientia agraria*, Curitiba v. 8, n. 2, p.127-134, 2007.

BADRI, D.V; WEIR, T.L; VAN DER LELIE, D; VIVANCO, J.M. “Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 20, no. 6, pp. 642–650, 2009.

BORRÁS, L.; SLAFER, G.A.; OTEGUI, M.E. Seed dry weight response to source-sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal. *Field Crops Research*, v.86, p.131- 146, 2004.

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

BODDEY, R.M., BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I. e DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum*spp on the nitrogen assimilation of field grown wheat. *Plant and Soil*, v.95:109-121. 1986.

BRACCINI, L.A.; DAN, L.G.M.; PICCININ, G.G.; ALBRECHT, L.P.; BARBOSA, M.C.; ORTIZ, A.H.T. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associate with the use of

bioregulators in maize. *Revista Caatinga*, v. 25, n. 2, p. 58-64, mar.-jun., 2012. ISSN-0100316X (impresso), ISSN 1983-2125 (online).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análises de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Estádios fenológicos do trigo para a adubação nitrogenada em cobertura. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 25, n. 2, p. 317-323, 2001.

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

CAMPOS, B.C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Inoculante “graminante” nas culturas de trigo e aveia. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 401-407, 1999.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L., eds. *Fertilidade do solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.375-470.

CARVALHO, W. A.; ESPÍNDOLA, C. R.; PACCOLA, A. A. Levantamento de solos da Fazenda Lageado. *Boletim Científico da Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP*, Botucatu, n. 1, 1983. 95 p.

CASSÁN F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, Montrouge, v.45, n.1, p.28-35, 2009.

CASSAN, F. et al. *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of Rice dwarf mutants. *Plant Physiology*. Washington. v.125, n.4, p.2053-2058, 2001.

CASTELLANOS T, ASCENCIO F, BASHANY. Cell-Surface Lectins of *Azospirillum* spp. *CURRENT MICROBIOLOGY* 36:241–244, 1998.

CATO, S.C. Ação de bioestimulante nas culturas do amendoineiro, sorgo, trigo e interação hormonais entre auxinas, citocininas e giberelenias. 2006, 74 f. Tese (Doutor em Agronomia: fitotecnia) - Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2006.

CAVALLET, L.H.; PESSOA, A.C. DOS 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.

COELHO, A.M. Nutrição e Adubação do Milho. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Circular Técnico n.78. Sete Lagoas, MG. 2006.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Terceiro levantamento. Brasília: Conab, 2015. 39p.

CONCEIÇÃO, P.M.; VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; CONCEIÇÃO, O.S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. *Ciência Rural*, v.39, p.1880-1883, 2009.

CORRÊA, L. S. Distribuição do sistema radicular de cultivares de abacateiro (*Persea* spp.) num solo Podzólico Vermelho amarelo. 1982. 45f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1982.

CRUZ, C.D. Programa Genes - aplicativo computacional em genética e estatística. Versão 2011. Disponível em: www.ufv.br/dbg/biodata.htm.

DALLA SANTA, O.R.; HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; RONZELLI JUNIOR, P.; SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, n. 6, p. 843-850, 2004.

DARDORA, J.; GUIMARÃES, V.F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental*, v.17, n.10, p.1023–1029, 2013.

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

DEL GALLO, M.; NEGI, M.; NEYRA, C. A. Calcofluor-and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, v.171, p.3504-3510. 1989.

DESTRO, D. Main Stem and Tiller Contribution to Wheat Cultivars Yield Under Different Irrigation Regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 44, n. 4, p. 325-330, 2001.

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

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

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in The rhizosphere. *CRC Criticai Review in Plant Science*. Boca Raton. v.22, p.107-149, 2003.

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

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil, IEA/USP, São Paulo, p. 23, 1989.

DOMMELEN, V.A. (Methyl) ammonium transpoit in the nitrogen-fixing bacterixim *Azospirillum brasiliense*. *Journal of Bacteriologv*. Washington, v.180, p.2652-2659, 1998.

ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen- fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, v.51, p.17–26, 2001.

ELMERICH. C: NEWTON, W.E; Associative and eudoplrytic nitrogen-fixing bactéria and cyauobacterial associatious. Netherlands: Springer, 2007. 321p.

EMBRAPA (2009). Um pouco de história e política do trigo e Triticultura no Brasil. Disponível em <<http://www.cnpt.embrapa.br>>. Acesso em março 2015.

EMBRAPA (2015). Fixação Biológica de Nitrogênio. Disponível em <<https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/perguntas-e-respostas>>. Acesso em janeiro 2016.

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

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

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

FAOSTAT, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Production of Wheat. FAO Statistics Division, out, 2010.

FIGUEIREDO, S.L. Comportamento produtivo do trigo em função da densidade de semeadura e da aplicação de reguladores vegetais. 2011. 86p. Tese (Doutorado em Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Botucatu, SP, 2011.

FRANCISCO, E.A.B.; KAPPES, C.; DOMINGUES, L.; FELIPPI, C.L. Inoculação de Sementes de Milho Com *Azospirillum brasilense* e Aplicação de Nitrogênio em Cobertura. In.: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 29, Águas de Lindóia. Resumos... In.: Anais do Congresso Nacional de milho e Sorgo, Águas de Lindóia, p. 1285-1291, 2012.

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

GEORGIN, J.; LAZZARI, L.; LAMEGO, F.P.; CAMPONOGARA, A. Desenvolvimento inicial de trigo (*Triticum aestivum*) com uso de fitohormônios, zinco e inoculante no tratamento de sementes. REGET, v.18 n.4, p.1318-1325, 2014.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica, v. 2012.

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

HEINEMANN, A.B.; STONE, L. F.; DIDONET, A.D.; TRINDADE, M. DA G.; SOARES, B.B.; MOREIRA, J.A.A.; CÁNOVAS, A.D. Eficiência de uso da radiação solar na produtividade do trigo decorrente da adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.10, p.352-356, 2006.

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

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

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 Soil*, v. 331, p. 413–425, 2010.

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

IAPAR (2014). Técnicas para produção de trigo no Paraná. Disponível em <[http://www.fiepr.org.br/sindicatos/sinditrigo/uploadAddress/Cartilha-Trigo\[31702\].pdf](http://www.fiepr.org.br/sindicatos/sinditrigo/uploadAddress/Cartilha-Trigo[31702].pdf)>. Acesso em junho 2014.

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

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

JEZEWSKI, T. J.; SILVA, J. A. G.; FERNANDES, S. B. V. Efeito da inoculação de *Azospirillum* em trigo, isolado e associado a estimulante de crescimento no noroeste do RS. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPEL, 2010, PELOTAS/RS. XIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E II MOSTRA CIENTÍFICA DA UFPEL. *Anais...Pelotas*, 2010. v. 1, p. 568-571.

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

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

KERBAUY, G. B. *Fisiologia Vegetal*. Guanabara: Rio de Janeiro, 2008. 431 p.

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

LAMBERS, H.; CHAPLIM, F.S.; PONS, T.L. *Plant Physiological Ecology*. 2. Ed. Springer Science: New York, 2008, p. 623.

LAMBRECHT, M. et al. Indole 3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacterioplant interactions. *Trends in Microbiology*. Cambridge. v.8, n.7, p.298-300, 2000.

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

LANTMANN, A.F.; CASTRO, C; WIETHOLTER, S. O potássio na cultura do trigo. In: YAMADA, T.; ROBERTS, TL. (Ed.). Potássio na agricultura brasileira. Piracicaba: Instituto da Potassa e do Fosfato; Instituto Internacional da Potassa, 2005. p. 723-742.

LIN. S.Y. et al. *Azospirillum formosense* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from agricultural soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Publicado online em 8 jul. 2011.

LUCY, M; REED, E; GLICK, B.R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 86, no. 1, pp. 1–25, 2004.

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

MASSENA REIS V, REGINA DOS SANTOS K, TEIXEIRA, AND PEDRAZA RO. Chapter 6 What Is Expected from the Genus *Azospirillum* as a Plant Growth-Promoting Bacteria? *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*, 2011.

McSHAFFREY, D. *Environmental Biology: ecosystems. The nitrogen cycle*, 2006. Disponível em: . Acesso em: 02 nov. 2012.

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

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

MENDES, M. C.; ROSÁRIO, J. G. DO; FARIA, M. V.; ZOCHE, J. C.; WALTER, A. L. Avaliação da eficiência agrônômica de *Azospirillum brasilense* na cultura do trigo e os efeitos na qualidade de farinha. *Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, v.4, p.95-102, 2011.

MILLÉO, M.V. CORREA, W. GOLTZ, M.E. Avaliação da inoculação com *Azospirillum brasilense* em trigo frente à redução da adubação nitrogenada. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 6., 2012, Londrina. Resumos. Londrina: Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, 2012.

MISHRA, P.S. Genetic Basis of Flocculation in *Azospirillum brasilense*. Master's Thesis, University of Tennessee, 2012. Disponível em: http://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/1186

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

NOZAKI, M.H.; LORENZATTO, R.; MANCINI, M. Efeito do *Azospirillum* spp. em associação com diferentes doses de adubação mineral na cultura do trigo. Acesso em: fev. 2015. Disponível em: <http://sare.anhanguera.com/index.php/renc/article/view/7224>

NUNES, P.H.M.P.; AQUINO, L.A.; SANTOS, L.P.D.; XAVIER, F.O.; DEZORDI, L.R.; ASSUNÇÃO, N.S. produtividade do trigo irrigado submetido à aplicação de nitrogênio e à inoculação com *Azospirillum brasilense*. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* vol.39 no.1, 2015.

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

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

PEDRINHO, E.A.N. Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.). 2009. 87p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, 2009.

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

PERIN, A.; GUERRA, J.G.M.; TEIXEIRA, M.G. Cobertura do solo e acumulação de nutrientes pelo amendoim forrageiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, p.791-796, 2003.

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

PIMENTEL, C. Metabolismo de carbono na agricultura tropical. Seropédica: Edur, 1998. 150p.

PINNOW, C.; BENIN, G.; PAGLIOSA, E. S.; SIGNORINI, A. A.; LEMES, C.; BECHE, E. ; FRANKE, J. Rendimento de diferentes genótipos de trigo em resposta a diferentes doses de nitrogênio. In: XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

(SICITE) 2009, Pato Branco. XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA (SICITE), Anais... 2009.

PIRES, R.C.M.; SAKAI, E.; ARRUDA, F.B.; FOLEGATTI, M.V. Necessidades hídricas das culturas e manejo da irrigação. In: MIRANDA, J.H.; PIRES, R.C.M. Irrigação. Jaboticabal: SBEA, 2001. v.1, p.121-94. (Série Engenharia Agrícola).

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

POSNER, E.S. Wheat In: KULP, K; PONTE JR.; J.G. Handobook of cereal science and technology. 2^a ed. New York: Marcel Dekker, 2000, p.1-30.

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

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M. C. (Ed.). Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2a. ed. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundação IAC, 1996. p. 237-239. (Boletim Técnico, 100)

RADWAN, T.EL-S.EL-D; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.39 (10) p.987-994, 2004.

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

REIS Jr., F.B.; SANTOS, S.R.; TEXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. N₂- fixing bactéria associated with Bacchiaria pastures. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E., eds. Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 432.

RODRIGUES, L.F.O.S.; GUIMARÃES, V.F.; DA SILVA, M.B.; PINTO JUNIOR, A.S.; JEFERSON KLEIN, J.; DA COSTA, A.C.P.R. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental, v.18, n.1, p.31-37, 2014.

RODRIGUES, L.F.O.S.; GUIMARÃES, V.F.; SILVA, M.B. DA.; PINTO JUNIOR, A.S.; KLEIN, J.; COSTA, A.C.P.R. DA. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. Rev. bras. eng. agríc. ambient., Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 31-37, jan. 2014.

RODRIGUES, O.; DIDONET, A. D.; GOUVEIA, J. A.; SOARES, R. DE C. Nitrogen translocation in wheat inoculated with *Azospirillum* and fertilized with nitrogen. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v.35, p.1473-1481, 2000.

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

ROSÁRIO, J.G. Inoculação com *Azospirillum brasilense* associada à redução na adubação nitrogenada de cobertura em cultivares de trigo. 2013. 85p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. DOS S.; SILVEIRA, A. P. D. DA. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, p.1593-1600, 2007.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. DOS S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.29, p.345-352, 2005.

SANTOS, L. S. Perfil proteico e qualidade de panificação em linhagens de trigo desenvolvidas para a região do cerrado brasileiro. Viçosa, 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.

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

SCALOPI, E.J.; FERRAZ, E.C. Dependência do crescimento das plantas ao regime de umidade do solo. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, v.35, p.169-84, 1978.

SCALOPI, E.J.; SCARDUA, R.; KLAR, A.E. A influência da irrigação e adubação no rendimento, tamanho e número de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.). *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, v.32, p.385-94, 1975.

SILVA, A. A. O.; FELIPE, A. F.; BACH, E. E. Ação do *Azospirillum brasiliense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). Tese (mestrado). *ConScientiae Saúde*, v.3, p.29-35. São Paulo: Uninove, 2004.

SIMMONS, R. S. Growth, development, and physiology. In: HEYNE, E.G. (Ed.). *Wheat and heat improvement*. Madison: Wisconsin, p.77-113, 1987.

SCHOENBORN, L; YATES, P.S; GRINTON, B.E; HUGENHOLTZ, P; JANSSEN, P.H. "Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 7, pp. 4363–4366, 2004.

SCHLOTTER, M. et al. Immunological studies of The wheat-root colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 using strain specific monoclonal antibodies 1994. In: SILVA, A. A. O.; FELIPE, A. F.; BACH, E. E. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). Tese (mestrado). ConScientiae Saúde, v.3, p.29-35. São Paulo: Uninove, 2004.

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

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

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

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

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

TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; ALVAREZ, R. DE C. F.; FREITAS, J. G. DE; ARF, O.; SÁ, M. E. DE. Desempenho agrônômico de cultivares de trigo em resposta a população de plantas e a adubação nitrogenada. Científica, v.36, p.97-106, 2008.

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

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

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.42, p.117-126, 2006.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World Trigo production, consumption. and stocks. 2014. Disponível em: Acesso em: 24 mar. 2015.

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

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

WHIPPS, J.M. Carbon utilization, in *The Rhizosphere*, J. M. Lynch, Ed., pp. 59–97, Wiley-Interscience, Chichester, UK, 1990.

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

ZAIED, K.A.; EL-HADY, A.H.; AFIFY, A.H.; NASSEF, M.A. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. Pakistan. Journal of Biological Sciences, v.4, p.344-358. 2003.

ZORITA, M.D.; CANIGGIA, M.V.G. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. European Journal of Soil Biology, p.1010-1016, 2008.

YOUNG, C.C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M.J.; ARUN, A. B.; LAI, W.A.; REKHA, P. D.; SHEN, F.T.; HUNG, M.H.; OTHER AUTHORS (2008). *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. Int J Syst Evol Microbiol. v.58, p.959–963, 2008.