

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ASSOCIAÇÃO ENTRE *Azospirillum brasilense* E
ADUBAÇÃO NITROGENADA EM HÍBRIDOS DE MILHO

Rafael Cadore
Engenheiro Agrônomo

JATAÍ – GOIÁS - BRASIL
Agosto de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ASSOCIAÇÃO ENTRE *Azospirillum brasilense* E
ADUBAÇÃO NITROGENADA EM HÍBRIDOS DE MILHO

Rafael Cadore

Orientador: Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto

Co-orientador: Prof. Dr. Edésio Fialho dos Reis

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás – UFG, Regional Jataí, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

Agosto de 2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

C125a Cadore, Rafael.
Associação entre *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada em híbridos de milho [manuscrito] / Rafael Cadore. - 2014.
73 f. : figs, tabs.

Orientador: Profº. Drº. Antônio Paulino da Costa Netto;
Co-orientador: Edésio Fialho dos Reis.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, 2014.

Bibliografia.

1. Milho – Adubação nitrogenada 2. Adubação 3. Milho
4. *Azospirillum brasilense*. I. Título.

CDU 633.15:631.8

RAFAEL CADORE

TÍTULO: “ASSOCIAÇÃO ENTRE *Azospirillum brasilense* E ADUBAÇÃO NITROGENADA EM HÍBRIDOS DE MILHO”,

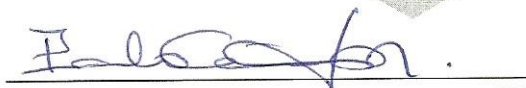
Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 21 de agosto de 2014, pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto
Presidente – CAJ/UFG



Prof. Dr. Sinério Carlos Silva Cruz
Membro – CAJ/UFG



Prof. Dr. Paulo César Magalhães
Membro – EMBRAPA/CNPMS

Jataí – Goiás

Brasil

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Rafael Cadore - nasceu em 04 de maio de 1989 em Jataí - GO. Em 2007 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí, na qual em 2012 recebeu o título de Engenheiro Agrônomo. Em Agosto de 2012 iniciou o curso de Pós-graduação *strictu-senso* em nível de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal na Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás – UFG.

Aos meus pais Gilberto Cadore e Ivonete Fátima Cadore, pelo amor, apoio e incentivo nos estudos, e por todos os ensinamentos a mim passados no decorrer de toda minha vida

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida, iluminando meus passos e me protegendo nos momentos difíceis.

À toda minha família pela união e amor em todas as ações e conquistas realizadas, mesmo perante às dificuldades.

Agradeço em especial a minha amiga e namorada Taynara Peres de Lima, pela confiança, paciência e companheirismo ao longo da minha vida acadêmica. E aos meus amigos Douglas Siqueira Freitas, Paulino Taveira e Nélcio Castro Lima pela dedicação e ajuda nesta pesquisa.

Aos Professores Antônio Paulino da Costa Netto, Edésio Fialho dos Reis e Vilmar Antônio Ragagnin pela orientação, confiança, e empenho na condução e realização deste trabalho, pelos seus ensinamentos e incentivos contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos alunos de graduação em agronomia Bruno Katzer, Leandro Assunção e Rodrigo Pinheiro pela ajuda em vários momentos nesta pesquisa.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de fisiologia vegetal Marieli Rossato, Geiciane Cintra, Ana Claudia D'abadia, Pedro Schumacher e aos demais alunos da graduação que fazem parte deste grupo.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí pela oportunidade.

Aos funcionários e técnicos administrativo da Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí em especial o Senhor Gilmar e a Lucielle Januário, pela ajuda e ensinamentos na condução da pesquisa.

Aos colegas e professores do curso de pós-graduação em agronomia (Produção Vegetal), pelos ensinamentos, pelo convívio, dividindo dificuldades, experiências e momentos de descontração.

À todos, muito obrigado

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY	ix
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	10
1. Cultura do Milho.....	10
2. Adubação e Assimilação do Nitrogênio na cultura do milho	12
3. Microrganismos de vida livre fixadores de nitrogênio	17
4. Gênero <i>Azospirillum</i>	20
5. Referências bibliográficas.....	22
CAPÍTULO II - HÍBRIDOS DE MILHO INOCULADOS COM <i>Azospirillum brasilense</i> SUBMETIDO A DOSES DE NITROGÊNIO EM SEGUNDA SAFRA.....	28
Resumo	28
Introdução.....	29
Material e Métodos	30
Conclusões.....	44
Referências	44
CAPÍTULO III – MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> E DOSES DE NITROGÊNIO EM COBERTURA PARA CULTURA DO MILHO.....	48
Resumo	49
Introdução.....	50
Material e Métodos	51
Resultados e Discussão	57
Conclusões.....	69
Referências	69

ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E ADUBAÇÃO NITROGENADA EM HÍBRIDOS DE MILHO

RESUMO - Bactérias do gênero *Azospirillum* são fixadoras de nitrogênio (N) atmosférico e consideradas promotoras de crescimento vegetal, em plantas não leguminosas. O uso de inoculantes contendo estas bactérias principalmente na cultura do milho, na tentativa de reduzir a utilização de fertilizantes nitrogenados, melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas e incrementar a produtividade de grãos é uma boa alternativa para uma agricultura sustentável, porém vários fatores podem interferir na obtenção destes benefícios, como o híbrido utilizado, condições edafoclimáticas e o manejo adotado. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* associado a adubação nitrogenada em cobertura em híbridos de milho recomendados para o sudoeste goiano por meio de dois experimentos. No primeiro experimento a campo em segunda safra com dez híbridos submetidos à inoculação com *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio em cobertura consistindo nos tratamentos: sem inoculação e sem adubação de cobertura, sem adubação de cobertura e inoculação, 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura e inoculação, e 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura e inoculação formando assim um arranjo fatorial 10 x 4. Avaliou-se as variáveis relacionadas ao crescimento e desenvolvimento, análise da atividade da enzima redutase do nitrato e variáveis do rendimento e seus componentes no qual concluiu-se que a inoculação em si não foi capaz de gerar incrementos significativos nas variáveis analisadas, porém com a aplicação de adubação nitrogenada em cobertura foi possível detectar o efeito positivo das doses testadas em algumas variáveis, sendo assim nas condições em estudo os híbridos mais produtivos foram o BioGene 7046®, Dekalb 310® e Agroeste 1596®. No segundo experimento a campo em primeira safra objetivou-se avaliar métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense* (sem aplicação, aplicação nas sementes, aplicação foliar e a combinação da aplicação nas sementes e foliar) associado com doses de nitrogênio em cobertura (0, 35 e 70 kg ha⁻¹ de N) em dois híbridos que obtiveram maior amplitude na produtividade de grãos no experimento anterior (BioGene 7046® e Dekalb 310®). Avaliou-se as variáveis relacionadas ao crescimento e desenvolvimento, análise da atividade da enzima redutase do nitrato e variáveis do rendimento e seus componentes. A inoculação com *Azospirillum brasilense* independentemente do método de aplicação não teve efeito nas variáveis relacionadas ao crescimento e desenvolvimento e não gerou incremento na produção de grãos. Apenas houve efeito da inoculação com *A. brasilense* nas sementes na atividade da redutase do nitrato, de forma específica para um dos híbridos associado com uma das doses de nitrogênio em cobertura. A adubação nitrogenada em cobertura é prática indispensável, proporcionando incremento no crescimento e desenvolvimento das plantas de milho.

Palavras-chave: bactérias diazotróficas, caracteres agronômicos, fixação biológica de nitrogênio, redutase do nitrato, *Zea mays* L.

ASSOCIATION OF *Azospirillum brasilense* AND NITROGEN FERTILIZATION IN CORN HYBRIDS

SUMMARY - Bacteria of the genus *Azospirillum* are atmospheric nitrogen (N) fixers and might promote the plant growth in non-leguminous plants. The use of inoculants containing these bacteria, mainly in corn culture, in an attempt to reduce the use of nitrogen fertilizers, improve the growth and development of plants and increase the productivity of grains is a good alternative for sustainable agriculture, however several factors may interfere in getting those benefits, such as the choice of the hybrid to be used, soil and climate conditions and management adopted. Thus, the objective was to evaluate the effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen fertilization in corn hybrids coverage that has been recommended for Southwest Goiás, through two experiments. In the first field experiment conducted at second harvest with ten hybrids submitted to the inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen topdressing doses, consisting in the following treatments: no inoculation and no topdressing fertilization, no topdressing fertilization and inoculation, 35 kg ha⁻¹ of N topdressing and inoculation; and 70 kg ha⁻¹ of N topdressing and inoculation, thus forming a 10 x 4 factorial arrangement. Variables related to growth and development have been evaluated, analysis of the enzyme nitrate reductase activity and productivity variables and its components ended up in a conclusion that the inoculation itself was not able to generate significant increments in the variables analyzed, however with the application of nitrogen fertilizer in coverage it was possible to detect the positive effect of the doses tested in some variables. Therefore, under the conditions of this study, the most productive hybrids were the BioGene 7046®, Dekalb 310® and Agroeste 1596®. In the second field experiment, at first crop, we aimed to evaluate methods of application of *Azospirillum brasilense* (no application, application in seeds, foliar application and combination of application in seed and leaf) associated with nitrogen topdressing doses (0, 35 and 70 kg ha⁻¹ of N) in two hybrids who achieved greater magnitude in productivity of grains in the previous experiment (BioGene 7046® and Dekalb 310®). Variables, related to growth and development, have been evaluated, analysis of the enzyme nitrate reductase activity and productivity variables and its components have been too. Inoculation with *Azospirillum brasilense*, regardless of the method of application had no effect on the variables related to growth and development and did not generate any increase in grain production. There has been effect due the inoculation with *A. brasilense* only in seeds during the activity of nitrate reductase in a specific way for one of the hybrids associated with one of the doses of nitrogen topdressing. The nitrogen topdressing fertilization is an essential practice, providing an increase in the growth and development of corn.

Keywords: diazotrophic bacterial, agronomic characters, biological nitrogen fixation, nitrate reductase, *Zea mays* L.

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família Poaceae, é planta monóica e tem uma flor masculina (pendão) e uma feminina (espiga), que após a fecundação irão originar grãos classificados como fruto-semente (cariopse); possui metabolismo C4 e é uma das mais eficientes plantas armazenadoras de energia existentes na natureza. A partir da seleção natural e da domesticação, chegou-se a uma planta anual, robusta e ereta, com um a quatro metros de altura, voltada para a produção de grãos (Magalhães et al., 2002).

Sendo uma das culturas mais antigas do mundo, acredita-se que o milho tenha se originado a cerca de 7.000 anos (5.000 a.C.) no Sul da América do Norte, em uma área hoje localizada ao sul da Cidade do México. Há hipótese de que o milho seja descendente de um ancestral comum, o teosinto (*Zea luxurians*), hipótese postulada por Beadle (1939), com base em evidências experimentais, antropológicas, arqueológicas, geográficas e antigos relatos, que apesar das discrepantes diferenças morfológicas entre plantas de milho e teosinto, geneticamente essas duas espécies são muito próximas.

Por meio de um famoso experimento realizado por esse pesquisador, com cruzamentos entre plantas de milho e teosinto, obteve-se híbridos viáveis e totalmente férteis, o que evidencia que são de mesma espécie biológica e que quatro ou cinco genes são responsáveis por tamanha diferença morfológica entre milho e teosinto, concluindo que o milho surgiu a partir do teosinto pelo processo de domesticação (Matsuoka, 2005).

Acredita-se que o processo de domesticação do milho aconteceu no vale do Tehuacan e em vários outros sítios (Tamaulipas, Oaxaca etc.) no México, apenas no sexto milênio antes da presente Era; difundindo-se para os continentes sul-americano e norte-americano. Após sua adaptação a estas regiões e com a chegada dos europeus à América central e do norte, o milho foi levado para a Europa e por volta do século XVI teve início seu cultivo em escala comercial, disseminando-se para outros continentes (Mazoyer e Roudart, 2010).

O milho atualmente é o cereal mais cultivado no mundo, com produção no ano de 2012, superior a 870 milhões de toneladas e produtividade média de 4.916 kg ha⁻¹ de grãos, sendo o Brasil o terceiro produtor mundial depois dos Estados Unidos e China (FAO, 2014). Em 2012, a produção brasileira de milho foi de 71,1 milhões de toneladas e cresceu 27,7% em relação à safra passada, superando a da soja com 65,9 milhões de toneladas, que era líder desde 2002.

No mesmo ano agrícola de 2011/2012, pela primeira vez, a segunda safra do milho com 38,3 milhões de toneladas superou a primeira safra que obteve produção de 32,8 milhões de toneladas e no ano subsequente (2012/2013) este cenário foi semelhante, sendo a primeira safra com 32,6 milhões de toneladas e a segunda safra com 42,8 milhões de toneladas.

Apesar desses bons números, ainda há espaço para melhorar, pois a produtividade média brasileira está próxima de 5.000 kg ha⁻¹, produtividade que pode ser melhorada, visto que produtores que adotam alta tecnologia chegam a atingir 12.000 kg ha⁻¹ (IBGE, 2014; CONAB, 2014).

Dentre os municípios brasileiros com as maiores produções, destaca-se o município de Sorriso, em Mato Grosso, como o maior produtor nacional de milho; seguido pelos municípios de Jataí – GO, Lucas do Rio Verde – MT, Rio Verde – GO e Maracaju – MS, desta forma percebe-se o quão é importante a cultura do milho para o Sudoeste Goiano, que possui dois municípios no ranking dos cinco maiores produtores de milho do Brasil (IBGE, 2014).

As principais utilizações do milho no mundo são nas atividades de criação de aves e suínos e para a produção de óleo comestível. Na última edição do Agriflex publicado pela FAO em 2013, com base na economia mundial de 2009, 75% da produção mundial de milho foi destinada a alimentação, cerca de 10% para compósitos e materiais industriais e, por fim, um setor que vem ganhando destaque, a produção de bioenergia a partir dos grãos de milho com aproximadamente 15% da produção mundial.

Os sistemas de produção de milho no Brasil são diversos, desde a agricultura tipicamente de subsistência sem utilização de insumos modernos (onde se observa baixas produtividades, produção voltada para consumo na propriedade e eventual excedente comercializado) até lavouras que utilizam o mais alto nível tecnológico,

alcançando produtividades equivalentes às obtidas em países de agricultura avançada.

Na região do Sudoeste Goiano, o foco é a produção comercial de grãos. O milho entra no processo de sucessão com a soja, podendo também envolver outras culturas. Há a utilização do sistema de plantio direto, as áreas ocupadas pelo cultivo de grãos são extensas, todos os tratos culturais são mecanizados, os agricultores utilizam as melhores tecnologias disponíveis, são especializados na produção de grãos e têm por objetivo a comercialização da produção (Miranda et al., 2012).

Nos últimos anos o Sudoeste Goiano obteve expressivos ganhos de produtividade, principalmente na cultura do milho, fruto de pesquisas no desenvolvimento de genótipos adaptados para a região e de práticas de manejo da cultura, que são bem empregados pelos agricultores. Porém, o sistema aplicado é dependente, principalmente de fontes nitrogenadas que são obtidas por meio de processos os quais utilizam fontes energéticas não renováveis.

O milho é extremamente exigente no que diz respeito a este macro nutriente, utilizando cerca de 20 kg ha⁻¹ de N para cada tonelada de grão produzido. (Coelho et al., 2010).

Considerando que, de maneira geral as espécies cultivadas são capazes de aproveitar somente 50% do fertilizante nitrogenado aplicado devido às perdas principalmente por volatilização, lixiviação e desnitrificação, entre outros fatores, torna-se necessária a realização de estudos para obtenção de genótipos eficientes na utilização de N e com capacidade de interação com bactérias diazotróficas para a maximização na assimilação e utilização desse nutriente, buscando cultivo mais sustentável; de forma que reduza a dependência de fertilizantes nitrogenados, mantendo boas produtividades e consequentemente reduzindo os custos de produção da lavoura e a poluição ambiental (Reis Júnior et al., 2008; Saikia e Jain, 2007).

2. Adubação e Assimilação do Nitrogênio na cultura do milho

O nitrogênio está presente em cada etapa de desenvolvimento da planta – da germinação da semente até a maturação e senescência. Em tudo e de tudo participam os compostos nitrogenados: da NH₃⁺ às mais complicadas enzimas,

passando dos hormônios a compostos de metabolismo secundário. Segue-se uma tabela com os principais compostos e funções do nitrogênio (Tabela 1).

Tabela 1. Principais compostos e funções do nitrogênio

Compostos	Função
Aminoácidos	Parte das proteínas
Amidas	Entrada do N reduzido
Ureídeos	Transporte
Poliaminas	Fonte endógena de NH_3^+
Proteínas	Reserva, enzimas
Ácido indolilacético	Hormônio
Clorofila	Fotossíntese
Leghemoglobina	Fixação biológica de nitrogênio (FBN)
Coenzimas	Absorção iônica, vários processos
Nucleotídeos	RNA e DNA
Pigmentos	Várias funções

Fonte: Yamada et al. (2007)

A absorção de nitrogênio é definida como a entrada do elemento em uma parte qualquer da célula, tanto as raízes quanto as folhas são capazes de absorver N. Nas condições de campo da solução do solo ou do adubo fornecido, o nitrato (N-NO_3^-) é a forma predominantemente absorvida pelas raízes devido ao processo de nitrificação no solo; há também absorção de amônio (N-NH_4^+) da solução do solo ou do adubo aplicado, porém em menores quantidades.

Desta forma sabe-se, em relação às formas dos adubos, que o milho prefere os fertilizantes hidrossolúveis; sendo o íon amônio utilizado preferencialmente nos primeiros estádios de desenvolvimento e o íon nitrato nos estádios finais (Warncke e Barber, 1973). A matéria orgânica é outra fonte de fornecimento de nitrogênio ao solo por meio do processo de mineralização (Moreira e Siqueira, 2006).

A absorção de N se dá por duas formas nas condições de solo, o NO_3^- entra em contato com a raiz e é absorvido quase exclusivamente por fluxo de massa, ou seja, graças ao caminhamento da solução do solo a favor do gradiente de umidade (Barber, 1984). As folhas são capazes de absorver nitrogênio nas formas gasosas

NH_3^+ (Ping et al., 2000), dióxido de nitrogênio (NO_2) (Sparks et al., 2001), NH_4^+ , NO_3^- , ureia e aminoácidos (Furuya e Umemiya, 2002).

Outro processo de absorção de nitrogênio pelas plantas é por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN), tendo como fonte o nitrogênio gasoso (N_2) que constitui cerca de 78% dos gases atmosféricos. Os gases atmosféricos possuem a capacidade de se difundirem para o espaço poroso do solo e o N_2 consegue ser aproveitado por alguns microrganismos que ali habitam graças à ação da enzima nitrogenase, que tem como função romper a tripla ligação do N_2 e reduzi-lo a amônia.

Esses microrganismos, principalmente formados por bactérias, são denominados diazotróficos ou fixadores de N e podem se associar a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade, sendo classificadas de três maneiras: bactérias associativas, endofíticas ou simbióticas (Hungria et al., 2007).

O transporte do nitrogênio (ou movimentação do nitrogênio na planta) pode ser definido simplesmente como o movimento deste elemento do órgão de absorção, raiz ou folha, geralmente para qualquer outro órgão (Wolswinkel, 1999). O nitrogênio caminha da raiz para a parte aérea via xilema na corrente transpiratória, nas formas que foram absorvidos (NH_4^+ , NO_3^- , ureia, aminoácidos) para o local onde serão assimilados.

O nitrogênio é um elemento extremamente móvel na planta e passa pelo processo de redistribuição, que é o movimento do elemento de órgão de “reserva” (folha, raiz, fruto, lenho, colmo) para outro qualquer da planta, predominantemente no floema, embora o xilema possa participar também dessa ação (Wolswinkel, 1999).

No processo de redistribuição ou a falta dela, ficam evidentes os sintomas de deficiência de N. No milho, o amarelecimento da ponta para a base ocorre em formato de “V”; posteriormente ocorre o secamento na ponta das folhas mais velhas, progredindo ao longo da nervura central, apresentando necroses, dilaceramentos e colmos finos (Coelho e França, 1995).

Após absorção e transporte, o nitrogênio será assimilado pela planta, que nada mais é que a entrada do N em compostos orgânicos. Como já visto, o

nitrogênio é preferencialmente absorvido na forma oxidada NO_3^- , e para sua utilização pelas plantas é necessário que este seja reduzido a amônio, e então incorporado em compostos orgânicos (Campbell, 1999).

A primeira etapa do processo de redução do nitrato em nitrito é catalisada pela enzima nitrato redutase, que está localizada no citosol; posteriormente o nitrito é reduzido a amônio pela enzima nitrito redutase, nos plastídios da raiz ou nos cloroplastídios das folhas, dependendo da espécie vegetal. Em geral, espécies nativas de regiões de clima temperado dependem mais intensamente da assimilação do nitrato pelas raízes que as espécies das regiões tropicais e subtropicais (Tischner, 2000; Taiz e Zeiger, 2008).

Após a redução do amônio, as células vegetais evitam sua toxicidade pela rápida conversão do amônio, seja ele gerado a partir da assimilação do nitrato, absorção da raiz ou oriundo da fotorrespiração, por meio de uma sequência de reações catalisadas pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintase (GOGAT), ocorrendo assim a assimilação do amônio em um cetoácido, formando os principais aminoácidos transportadores de nitrogênio: glutamina e glutamato (Lea et al., 1996).

Posterior a formação destes aminoácidos por meio de reações de transaminação, que nada mais é que a transferência do grupamento amino de um aminoácido para um cetoácido, forma-se outro aminoácido. Após todos esses processos são desenvolvidos os vários aminoácidos, necessários à síntese de proteínas (Taiz e Zeiger, 2008).

Sabendo-se das principais formas de absorção, transporte e dos processos de assimilação do nitrogênio, fica evidente a alta exigência do milho neste macronutriente e a grande importância do entendimento do sistema solo-planta-atmosfera, para recomendação de programas de manejo deste nutriente, principalmente quanto ao uso eficiente e racional de fertilizantes nitrogenados.

De acordo com vários boletins e circulares para a cultura do milho, a recomendação atual da adubação nitrogenada refere-se ao fornecimento de 30 a 50 kg ha^{-1} de nitrogênio na semeadura, garantindo a demanda inicial de nitrogênio de acordo com o número e atividade das raízes (Fancelli, 2010).

Além da alta demanda de nitrogênio pela cultura, o nitrogênio está propenso às perdas ocorridas através dos processos de volatilização, lixiviação, desnitrificação, imobilização biológica entre outros, que exigem o parcelamento da adubação para o melhor aproveitamento e uso do N aplicado pela cultura.

A adubação de cobertura, que pode ser parcelada ou não, dependendo da fonte, dose, textura do solo e sistema de produção, deve ser iniciada quando as plantas de milho apresentem de três a quatro folhas plenamente expandidas, e finalizadas impreterivelmente, por ocasião da emissão da sexta/sétima folha. Entre esses estádios está envolvido o início da definição do potencial produtivo do milho (Fancelli 2010; Yamada e Abdalla, 2000).

Outro ponto chave na recomendação de adubação nitrogenada é o tipo de fertilizante nitrogenado a ser empregado, atualmente a ureia é o fertilizante nitrogenado mais utilizado no mundo, por apresentar elevado conteúdo de N em menor custo por unidade do nutriente aplicado ao solo (Cunha et al., 2011). Porém, a ureia quando aplicada superficialmente no solo, fica suscetível as perdas de N por volatilização, principalmente se o solo estiver coberto com resíduos de outras plantas, sendo a incorporação uma forma de se reduzir as perdas (Sangoi et al., 2003).

Com o objetivo de reduzir as perdas de nitrogênio em sistemas de produção adota-se principalmente a incorporação da ureia a uma profundidade mínima de três centímetros, ou a utilização de outras fontes. Fontes convencionais como nitrato de amônio e sulfato de amônio (fontes amoniacais) são utilizadas devido à redução de perdas de N por volatilização, no entanto suas concentrações de N são menores e consequentemente seu custo por unidade é mais oneroso.

Segundo Below (1995), a utilização de fertilizantes de formas amoniacais comparado com o uso apenas de ureia, proporciona aumentos de produtividade na cultura do milho, por contribuir no aumento da taxa de fertilização de óvulos, culminando no maior número de grãos por espiga.

Outras fontes de liberação lenta ou controlada, ureias protegidas por polímeros, com inibidores de uréase entre outras também podem ser utilizadas para se evitar perdas de nitrogênio, porém a viabilidade técnica e econômica destas fontes necessita de maiores estudos, de acordo com os vários sistemas de produção

adotados, nível tecnológico do produtor e valor estimado do milho por ocasião da colheita (Fancelli, 2010).

Além do aporte de nitrogênio ao sistema, representado pela adubação de semeadura e cobertura, outra forma de aquisição deste nutriente anteriormente descrita é pela fixação biológica do nitrogênio (FBN). No caso do milho, há bactérias associativas que possuem a capacidade de fornecer N para as plantas, mesmo que de forma parcial, podendo assim gerar grande economia na utilização de adubos nitrogenados.

O sistema de FBN quando comparado com outros não há perdas, o nitrogênio fixado pode ser incorporado diretamente pelas plantas (fato comprovado principalmente pela simbiose rizóbio/leguminosa) ou passando pelo solo em formas facilmente utilizáveis pelas plantas (Döbereiner, 1992).

3. Microrganismos de vida livre fixadores de nitrogênio

A maioria das espécies de fixadores de N_2 é de vida livre, ocorrendo em todos os tipos de solo, na rizosfera e filosfera de plantas, podendo ser encontrados em simbiose com várias espécies vegetais. Quando as relações entre microrganismos e plantas são menos especializadas os mesmos recebem denominação de associativos (Moreira e Siqueira, 2006).

Segundo Lopes (2007), os microrganismos fixadores de N mais estudados podem ser agrupados resumidamente para melhor entendimento sob as seguintes designações: Rizóbios, Cianobactérias, *Frankia* e bactérias diazotróficas associativas.

Rizóbios – São denominadas de bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas. São conhecidas coletivamente como rizóbios devido ao fato que a primeira espécie descrita foi *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889). Incluem-se nesse grupo às bactérias de diversos gêneros (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*) e outras espécies que estabelecem associação simbiótica com a maioria das leguminosas.

Este grupo caracteriza-se como o mais eficiente decorrente de uma parceria vegetal e microrganismo, considerado o processo de simbiose muito evoluído. A simbiose de leguminosas com esse grupo caracteriza-se pela formação de nódulos

nas raízes e caules (Moreira e Siqueira, 2006). Plantas que apresentam quantidades significativas de nódulos nas raízes e/ou caule têm suprida toda sua demanda por nitrogênio.

As pesquisas com esse grupo de bactérias são avançadas, há estirpes específicas de alta eficiência, selecionadas para várias culturas; com a produção comercial de inoculantes com elevada concentração de bactérias, para que o processo de inoculação seja o mais eficiente e produtivo. No Brasil, o sistema de inoculação com bactérias dos gêneros rizóbios, principalmente para a cultura da soja, é considerado o sistema mais viável economicamente e ecologicamente como fonte de nitrogênio (Hungria et al., 2001).

Cianobactérias – são microrganismos fotossintéticos que normalmente se encontram associados em simbiose com pteridófitas aquáticas do gênero *Azolla* (Lopes, 2007). Os principais gêneros de cianobactérias que formam simbioses com plantas são *Rhizelia* e *Nostoc* e são encontrados em raízes diferenciadas, glândulas axilares, cavidade das folhas de forma intercelular e intracelular (Moreira e Siqueira, 2006).

Essas cianobactérias possuem grande importância no manejo do nitrogênio na cultura do arroz inundado, antes do cultivo do arroz cultiva-se *Azolla* que fixa nitrogênio pela simbiose com *Nostoc* (cianobactéria), ela é manejada como uma adubação verde, que pela decomposição de sua biomassa retorna quantidades significativas de nitrogênio para o sistema (Lumpkin, 1982).

Frankia - actinomicetos do gênero *Frankia* são capazes de simbioses actinorrízicas. Espécies actinorrízicas compreendem desde arbustos muito pequenos, até arbustos maiores e árvores.

Este gênero pode estabelecer simbiose radiculares com formação de nódulos em plantas de 8 famílias pertencentes a 3 ordens (Moreira e Siqueira, 2006). Os gêneros de árvores economicamente importantes e mais estudados, que formam simbiose com *Frankia* são *Casuarina* e *Alnus*; estima-se que a fixação biológica de nitrogênio nesses gêneros situa-se entre 40 e 300 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N (Becking, 1973).

Bactérias Diazotróficas Associativas - são microrganismos capazes de associar-se com espécies vegetais e são encontrados principalmente na rizosfera de gramíneas, podendo também ser encontrados na parte aérea.

As principais atribuições de importância agrícola referenciadas destes microrganismos são a fixação biológica de nitrogênio, a produção de substâncias que auxiliam no crescimento radicular, aumento da colonização micorrizica, e aumento na eficiência de absorção de nutrientes e, conseqüentemente, na produtividade. Devido a isto, também são consideradas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) assumindo papel importante no que diz respeito à interação com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes, entre outros (Moreira et al., 2010).

As espécies mais comumente encontradas são: *Azospirillum* spp. (*A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraefans*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*) entre outras pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum*, *Paenabacillus*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Derxia*, *Pantoea* e *Serratia* (Moreira e Siqueira, 2006).

As bactérias diazotróficas associativas podem ser agrupadas em três categorias de acordo com a sua localização na planta, que pode ser ao redor das raízes, formando assim o primeiro grupo de organismos rizosféricos (colonizam principalmente a rizosfera), ou dentro das raízes formando assim o segundo grupo dos endofíticos facultativos (colonizam tanto a parte interna, quanto a externa das raízes) e por final o terceiro grupo de endofíticos obrigatórios, considerado o mais importante por colonizar o interior de raízes e parte aérea (Baladani et al., 1997).

Uma das pioneiras no estudo com bactérias diazotróficas associativas foi a pesquisadora da Embrapa, Dra. Joana Döbereiner, através de seus estudos nas décadas de 50 e de 60 e a descoberta de novas espécies, dos gêneros *Beijerinckia* e *Azotobacter* associadas à rizosfera de cana-de-açúcar e grama batatais, respectivamente com capacidade de FBN (Döbereiner e Ruschell, 1958; Döbereiner, 1966).

Por meio de técnicas de isolamento de diazotróficos e caracterização de microrganismos fixadores de N associados a diferentes plantas e condições de clima

e solo, e a descoberta que bactérias diazotróficas ocupam preferencialmente sítios onde a concentração de oxigênio é limitada, todas essas realizações obtidas pela Dra. Döbereiner e seus colaboradores (Döbereiner e Day 1976; Döbereiner et al. 1995) foram revolucionárias e resultou numa grande ampliação das pesquisas sobre todos os aspectos da FBN nas associações entre diazotróficos e plantas não leguminosas (Baldani et al., 1997).

4. Gênero *Azospirillum*

Com o passar dos anos e a contínua pesquisa da Dra. Döbereiner no âmbito dos diazotróficos e com a colaboração do Dr. Day em 1976, foi possível o relato da grande capacidade de fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas por uma espécie de bactéria *Spirillum lipoferum*, considerada a principal fixadora de nitrogênio em gramíneas.

Com o avanço dos estudos e com bases nas características fisiológicas, bioquímicas e por homologia de DNA, foi descoberto o gênero *Azospirillum*, sendo representado principalmente pelas espécies *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Döbereiner, 1978). Posteriormente foram identificadas outras espécies do gênero, descritas anteriormente nesta revisão.

Segundo Tarrand et al. (1978), os microrganismos pertencentes ao gênero *Azospirillum* estão situados no Domínio Bactéria, na subdivisão α -proteobactéria, na qual se encontram a maioria das bactérias gram-negativas, em forma de bastonete, podendo ser uniflageladas (flagelo polar) com um movimento vibratório característico, quando crescidas em meio líquido e, quando crescidas em meio sólido, além do flagelo polar desenvolvem flagelos laterais adicionais. São bactérias diazotróficas associativas endofíticas facultativas, mas que podem sobreviver no solo na forma de cistos (Moreira et al., 2010).

O processo de interação dos microrganismos pertencentes a este grupo com as plantas se dá primeiramente pela disponibilização de substratos pela planta, que nada mais são que as rizodeposições, como exsudatos e lisados, que são utilizados como fonte de energia para as rizobactérias, as quais irão multiplicar-se e se estabelecer na rizosfera de forma que se associem às plantas não leguminosas.

Após um bom estabelecimento na rizosfera, algumas espécies do gênero *Azospirillum* possuem a capacidade de penetrar os espaços intercelulares das raízes e lá se alojar (Bashan e Levanony, 1990). Essas espécies que possuem essa capacidade são favorecidas devido à menor competição com outros microrganismos, pois dentro da planta trata-se de um habitat protegido, além do maior acesso aos nutrientes disponibilizados pelas plantas (Baldani e Baldani, 2005).

Posterior a todo o processo de interação planta-bactéria, poderá vir a ocorrer o processo de fixação biológica de nitrogênio de acordo com as condições bióticas e abióticas a que estarão submetidos.

A fixação biológica de nitrogênio é um processo regulado, pois para ocorrer a fixação de N_2 há um grande dispêndio de energia, e se há nitrogênio suficiente no sistema, possivelmente a FBN será inibida (Rudnick et al., 1997). A principal enzima no processo de FBN é a enzima nitrogenase que é composta por duas metaloproteínas que contém ferro e molibdênio em sua estrutura, é ela uma das principais responsáveis pela regulação da fixação (Rees e Howard, 2000).

A principal característica regulatória da enzima nitrogenase é sua sensibilidade à presença de O_2 . Desta forma, o processo de fixação de N_2 é anaeróbico, gerando assim uma incompatibilidade entre os diazotróficos que na sua maioria são aeróbios, de modo que estes microrganismos desenvolvessem mecanismos para proteger o sítio da nitrogenase da interferência do oxigênio.

No caso do *Azospirillum*, os mecanismos de proteção para evitar a interferência de oxigênio não são muito eficazes, desse modo, microrganismos pertencentes a este gênero possuem movimento ondulatório rápido e característico que lhes permitem locomover-se até sítios onde a concentração de O_2 é baixa, de forma que seja adequado para a respiração e sem quantidades excessivas que venham a inibir a nitrogenase (Moreira e Siqueira, 2006).

A espécie *Azospirillum brasilense* é uma das mais estudadas, com diversas pesquisas por todo Brasil e no mundo (Bashan et al., 2004).

Em 1996, a Embrapa Soja e o grupo da Universidade Federal do Paraná Departamento de Bioquímica Molecular se uniram na realização de ensaios laboratoriais e testes agronômicos a campo com *Azospirillum*. De acordo com os

critérios da legislação brasileira para inoculantes estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foram testadas e selecionadas estirpes de *Azospirillum* que apresentavam maior promoção de crescimento das plantas, maior sobrevivência no solo e maior adaptação às técnicas utilizadas na cultura do milho.

Foram realizados vários experimentos a campo em diversas safras, no qual surtiu a seleção de estirpes de *Azospirillum brasilense* (AbV4, AbV5, AbV6 e AbV7), autorizadas pelo MAPA para a produção de inoculantes para a cultura do milho (Hungria, 2011).

Atualmente, as indústrias produtoras de inoculantes preferem produzi-los com a combinação de estirpes AbV5 + AbV6 de *Azospirillum brasilense* devido à eficácia dos mesmos nas culturas do milho e do trigo (Hungria, 2011).

5. Referências bibliográficas

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.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.922-928, 1997.

BARBER, S. A. **Soil nutriente bioavailability a mechanistic approach**. New York: John Wiley e Sons, 1984. 398p.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, p.521-577, 2004.

BASHAN, Y., LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36 p.591-608, 1990.

BEADLE, G. W. **Teosinte and the origin of maize**. In " Maize Breeding and Genetics" Walden, D.B. (ed). Wiley, New York. p.113-128, 1939.

BECKING, J. H. Global impacts of applied microbiology. In: **Giam IV. Fourth international conference**. São Paulo, p.40, 1973.

BELOW, F.E. Nitrogen metabolism and crop productivity. In: PESSARAKLI, M. **Handbook of plant and crop physiology**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.275-301.

CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure function and regulation on bridging to gap between biochemistry and physiology. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Dordrecht, v.50, p.277-303, 1999.

COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. Seja o doutor do seu milho: nutrição e adubação. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.71, p.1-9, 1995.

COELHO, A. M. Nutrição e adubação do milho. In: CRUZ, J. C. (eds) **Sistema de Produção**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010. Versão eletrônica. (Documentos EMBRAPA-CNPMS) Disponível em:

<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/ferraduba.htm>. Acesso em: 8 mar. 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Conab). **Levantamento da produção de grãos: safra 2011/12; 2012/2013. 2014**. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 26 fev. 2014.

CUNHA, P. C. R.; SILVEIRA, P. M.; XIMENES, P. A.; SOUZA, R. F.; ALVES JÚNIOR, J.; NASCIMENTO, J. L. Fontes, formas de aplicações e doses de nitrogênio em feijoeiro irrigado sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.41, n.1, p.80-86, 2011.

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. Uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.1, p.357-365, 1966.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. **Metodologias Embrapa**, Brasília, p.60, 1995.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associate symbioses in tropical grasses: characterization of microorganism and nitrogen fixen sites. In: **International**

symposium on nitrogen fixation, Washington, Washington State University, 1976. p.518-538.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio e, associação com gramíneas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas, 1992. p.173-190.

DÖBEREINER, J. Influence of environmental factors on the occurrence of *Spirillum lipoferum* in soils and roots. In: Environmental role of nitrogen-fixing blue green algae and as symbiotic bacteria. **Ecological Bulletin**, Copenhagen, v.26, p.343-352, 1978.

DÖBEREINER, J.; RUSCHELL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, v.1, p.261-272, 1958.

FANCELLI, A. L. Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes na cultura de milho. **Informações Agrômicas**, POTAFOS, Piracicaba, n.131, p.1-10, 2010.

FRANK, B. Ueber die peilzsymbiose der leguminosen. **Ber Deut. Bot. Ges.** v.37, p.376-387, 1889.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Production: crops. 2012. and Agrianual 2013**. Disponível em: <www.faostat.fao.org>. Acesso em: 26 fev. 2014.

FURUYA, S.; UMEMIYA, Y. The influence of chemical forms on foliar nitrogen absorption of peach tress. **Acta Horticulturae**, v.594, p.97-103, 2002.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: **Embrapa Soja (Documentos, 283)**, p.80, 2007.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. **Embrapa Soja. Circular Técnica, 35**. Londrina, p.48, 2001.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação e rendimento a baixo custo. Londrina: **Embrapa Soja (Documentos, 325)**, p.21-25, 2011.

IBGE-Instituto brasileiro de geografia e estatística. Grupo de coordenação de estatísticas agropecuárias (GCEA/IBGE, DPE, COAGRO). **Levantamento sistemático da Produção Agrícola 2013/2014**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 26 fev. 2014.

LEA, P. J.; BLACWELL, R. D.; JOY, K. W. Ammonia assimilation in higher plants. In: Nitrogen Metabolism of plants. **Proceeding of The Phytochemical Society of Europe**. Oxford v.33, p.153-186, 1996.

LOPES, E. S. Fixação biológica do nitrogênio no sistema solo-planta. In: Yamada, T.; Abdalla, S. R. S.; Vitti, G. C. **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba, 2007. p.47-67.

LUMPKIN, T. A. Chinese technology for the cultivation of *Azolla*. In: **Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture**. Cali, p. 537-548, 1982.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; PAIVA, E.; CARNEIRO, N. P. **Fisiologia do milho**. Sete lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. p. 23 (EMBRAPA-CNPMS. Circular técnica, 22).

MATSUOKA, Y.; Origin matters: lessons from the search for the wild ancestor of maize. **Breeding Science**, v.55, p.383-390, 2005.

MAZOYER, M.; ROUDART, L.; **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. Tradução de CLÁUDIA F. FALLUH BALDUINO FERREIRA 1 ed. São Paulo: Fundação Editora da UNESP (FEU), 2010. p. 104 – 118.

MIRANDA, R. A.; DUARTE, J. O.; GARCIA, J. C. Cultivo do milho: economia da produção. **Embrapa Milho e Sorgo**, Versão Eletrônica 8 ed. 2012. Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/economia.htm Acesso em: 26 fev. 2014.

MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scietiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; MOREIRA, SIQUEIRA, J, O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras, 2006. p.459-542.

PING, J.; BREMMER, E.; JANZEN, H. H. Foliar uptake of volatilized ammonia from surface-applied urea by spring wheat. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.32, n.1-2, p.165-172, 2000.

REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Current Opinion Chemical Biology**, v.4, p.559-566, 2000.

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

RUDNICK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; KENNEDY, C.; Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5/6, p.831-841, 1997.

SAIKIA, S. P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma? **Current Science**, Bangalore, v.92, p.1309-1315, 2002.

SANGOI, L.; ERNANI, P. R.; LECH, V. A.; RAMPAZZO, C. Volatilização de N-NH₃ em decorrência da forma de aplicação de ureia, manejo de resíduos e tipo de solo, em laboratório. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.4, p.687-692, 2003.

SPARKS, J. P.; MONSON, R. K.; SPARKS, K. L.; LERDAU, M. Leaf uptake of nitrogen dioxide (NO₂) in a tropical wet forest: implications for tropospheric chemistry. **O Ecology**, v.127, p.214-221, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 292 p.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal Microbiology** v.24 p.976-980, 1978.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**. v.23, p.1005-1024, 2000.

WARNCKE, D.; BARBER, S. Ammonium and nitrate uptake by corn (*Zea mays* L.) as influenced by nitrogen concentrations and $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio. **Agronomy journal**, v.65, p.950-954, 1973.

WOLWINKEL, P. Long-distance nutrient transport in plants and movement into developing grains. In: Rengel, Z. (Ed.). **Mineral Nutrition of Crops**: fundamental mechanisms and implications. New York: Food Products Press, p.91-113, 1999.

YAMADA, T.; ABADALLA, S. R. S. Como melhorar a eficiência da adubação nitrogenada do milho? **Informações Agronômicas**, POTAFOS, Piracicaba, n.91, p.1-5, set. 2000.

YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITII, G. C. **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**, Piracicaba, International Plant Nutrition Institute – Brasil, p. 218, 2007.

CAPÍTULO II - HÍBRIDOS DE MILHO INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense* SUBMETIDOS A DOSES DE NITROGÊNIO EM SEGUNDA SAFRA

RESUMO – A inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* no cultivo do milho apresenta-se como uma opção para potencializar o crescimento e o desenvolvimento da cultura e conseqüentemente incrementar a produtividade de grãos, principalmente pelos processos de fixação biológica de nitrogênio e produção de fitohormônios. No entanto vários fatores podem interferir na expressão dos efeitos benéficos destes microrganismos, principalmente em condições de campo. Desta forma, objetivou-se com este trabalho avaliar fatores que possam a vir influenciar no sucesso da inoculação, como o genótipo da planta e o manejo da adubação nitrogenada. Por meio de um experimento a campo em segunda safra com dez híbridos submetidos à inoculação com *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio em cobertura consistindo nos tratamentos: sem inoculação e sem adubação de cobertura, sem adubação de cobertura e inoculação, 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura e inoculação, e 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura e inoculação formando assim um arranjo fatorial 10 x 4. Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso com 4 repetições, avaliando-se, as variáveis relacionadas ao crescimento e desenvolvimento, análise fisiológica da atividade da enzima redutase do nitrato e variáveis do rendimento e seus componentes. A inoculação em si não foi capaz de gerar incrementos significativos nas variáveis analisadas, porém com a aplicação de adubação nitrogenada em cobertura foi possível detectar o efeito positivo das doses testadas em algumas variáveis, sendo assim nas condições em estudo os híbridos mais produtivos foram o Biogene 7046®, Dekalb 310® e Agroeste 1596®.

Palavras-chave: adubação nitrogenada, bactérias diazotróficas, safrinha

Introdução

O Brasil é pioneiro no que diz respeito à inoculação de sementes com organismos envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio, prova disto é o uso massivo de inoculantes do gênero *Rhizobium* na cultura da soja. A partir daí, surge o interesse na obtenção dos benefícios proporcionados pelos microrganismos do solo perante os demais cultivos e o Brasil evoluiu bastante neste sentido. Hoje, é possível encontrar comercialmente inoculantes do gênero *Azospirillum* recomendado para as mais diversas espécies pertencentes à família Poaceae, sendo amplamente utilizados no cultivo de milho.

A bactéria *Azospirillum brasilense* é uma bactéria de vida livre no solo, apresenta mecanismo de fixação de nitrogênio através da simbiose associativa, pois formam um sistema associativo com as plantas, mas sem a complexidade da formação de nódulos. Este processo de fixação biológica de nitrogênio consiste em reduzir o N_2 atmosférico ao amônio por meio do complexo da enzima nitrogenase (Taiz e Zeiger, 2008).

Devido à alta demanda que a cultura do milho tem em nitrogênio e à importância deste nutriente para se atingir bons patamares de produção, torna-se importante a busca de mecanismos que possam maximizar o uso e a assimilação de N pelas plantas. Neste sentido, a inoculação com microrganismos capazes de fixar nitrogênio atmosférico pode ser uma boa alternativa, apesar de não substituir por completo a aplicação de N via fertilizantes. Há trabalhos que demonstram a redução significativa das doses de N via fertilizantes com o uso da inoculação, sem comprometer a produtividade (Hungria et al., 2010).

Visando a viabilidade técnica e econômica da segunda safra, o uso de inoculantes pode ser vantajoso não apenas pela fixação de N, mas também pela produção de fitohormônios que estimulam o crescimento das raízes, implicando assim em vários outros efeitos que podem incrementar a absorção de água e sais minerais e uma maior tolerância a estresses como salinidade e seca (Bashan et al., 2004).

Desta forma, a avaliação e identificação de genótipos de milho com maior capacidade de aquisição e assimilação de N, juntamente com maior eficiência na associação com bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal,

possibilitam maximizar a produção em condições adversas, que podem implicar em redução na aplicação de fertilizantes nitrogenados. Acredita-se que a população de *Azospirillum brasilense* pode variar de híbrido para híbrido em função das diferentes características qualitativas e quantitativas dos exsudatos radiculares. Os produtos depositados pelas plantas na rizosfera não constituem apenas fonte de carbono para o crescimento bacteriano, mas também servem para promover a quimiotaxia, que melhora a interação microrganismo/rizosfera, como é o caso dos flavonoides (Rengel, 2002).

Com o avanço e evolução do nível tecnológico da segunda safra, o número de híbridos disponíveis no mercado para o produtor é cada vez maior e em se tratando dos inoculantes torna-se necessário o conhecimento do comportamento destes híbridos frente à inoculação, visando maior resposta e capacidade de assimilação e utilização de N. Assim, com este trabalho, objetivou-se avaliar o desenvolvimento e a produtividade de dez híbridos a fim de indicar entre esses os mais responsivos quando submetidos à inoculação de *Azospirillum brasilense* e a diferentes doses de nitrogênio em cobertura.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no ano agrícola de 2013, segunda safra, no campo experimental da Universidade Federal de Goiás, em Jataí – GO, localizado a 17° 66' S e 51° 33' W com altitude média de 700 m. O município de Jataí está situado no Sudoeste Goiano, com temperatura e precipitação média anual de 22 °C e 1.800 mm, respectivamente. Os dados de precipitação pluviométrica e as temperaturas mínimas e máximas registradas durante a realização do experimento são apresentados na Figura 1. Durante a condução do experimento, a precipitação total foi de 627,40 mm e a temperatura variou de 6 a 34,9 °C.

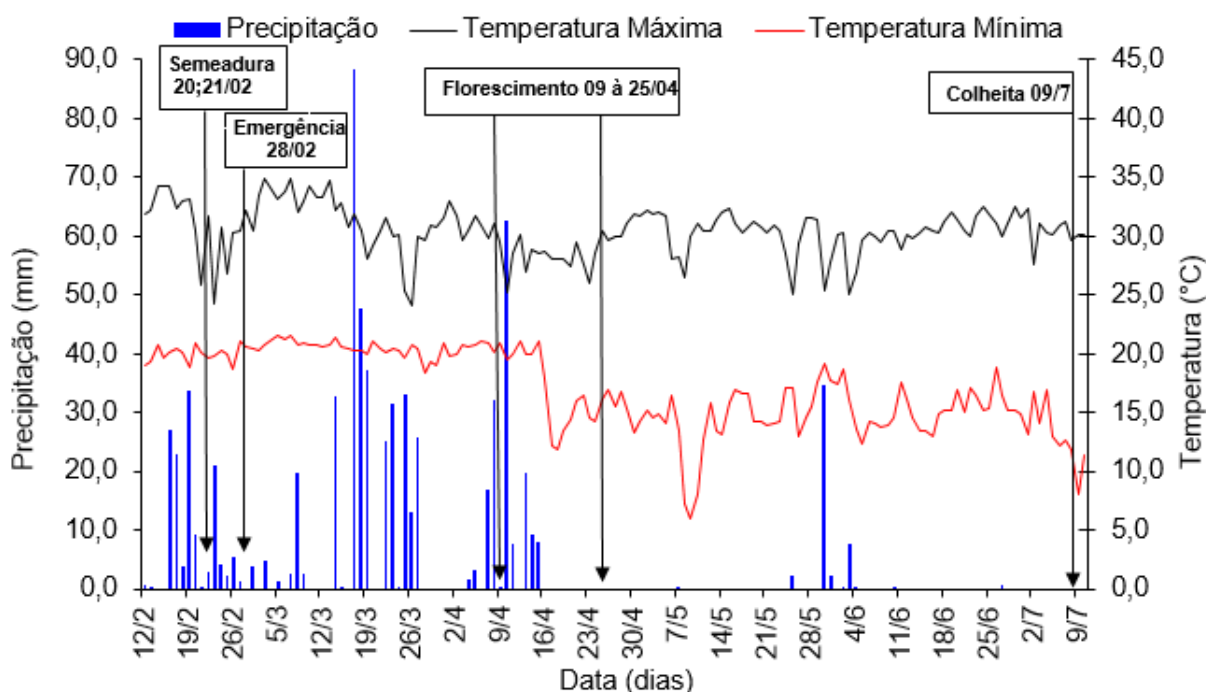


Figura 1. Precipitação pluviométrica (mm) e temperaturas máximas e mínimas (°C) registradas no período de fevereiro de 2013 a julho 2013

O solo foi classificado como Latossolo Vermelho Distroférrico, com textura argilosa cujas características químicas na camada de 0-20 cm foram: pH (H₂O): 5,1; Ca: 1,55 cmol_c dm⁻³; Mg: 0,58 cmol_c dm⁻³; Al: 0,13 cmol_c dm⁻³; H+Al: 6,5 cmol_c dm⁻³; K: 0,10 cmol_c dm⁻³; extrator Melich 1= P: 5,3 mg dm⁻³; Cu: 12,1 mg dm⁻³; Fe: 41 mg dm⁻³; Mn: 52,1 mg dm⁻³; Zn: 2,0 mg dm⁻³; Na: 11,9 mg dm⁻³; CTC a pH 7,0: 8,7 cmol_c dm⁻³; V%: 25,5. A área onde foi conduzido o experimento estava em pousio (safra 2012/2013) sob vegetação espontânea, sendo que nos últimos quatro anos o local foi ocupado por sucessão soja/milho, no sistema de plantio direto.

O experimento foi instalado em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições, no esquema fatorial 10x4, sendo o primeiro fator referente a híbridos comerciais, recomendados para segunda safra na região do Sudoeste Goiano, totalizando dez híbridos Dekalb 390[®] (DKB 390), Dekalb 310[®] (DKB 310), Biogene 7046[®] (BG 7046), Biogene 7049[®] (BG 7049), Biogene 7061[®] (BG7061), Biogene 7037[®] (BG 7037), Agroeste 1581[®] (AS 1581), Agroeste 1596[®] (AS 1596) Riber 9005[®] (RB 9005), Riber 9006[®] (RB 9006) e no segundo fator, os tratamentos correspondem a T1: sem cobertura, sem inoculação; T2: sem cobertura e com inoculação; T3: aplicação de 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura 15 dias após a

emergência (V4) com inoculação e T4: aplicação de 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura 15 dias após a emergência (V4) com inoculação.

Os híbridos de milho utilizados nesta pesquisa, em sua maioria são geneticamente modificados com tecnologia *Bt*. Esta tecnologia consiste na expressão de proteínas do *Bacillus thuringiensis* que possui ação inseticida principalmente para lagartas da ordem Lepidóptera, como a *Spodoptera frugiperda*.

Cada marca de híbrido utilizado nesta pesquisa possui sua tecnologia *Bt*, os híbridos da marca Monsanto® que são os Dekalb®, Agroeste® e Riber® possuem a tecnologia YieldGard VT PRO™ e os híbridos pertencentes à marca Du Pont® que são os BioGene® possuem a tecnologia Herculex®; apenas o híbrido BG 7046 não é geneticamente modificado.

Em todos os tratamentos, foram aplicados 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura e o inoculante utilizado foi com a espécie *Azospirillum brasilense* estirpes AbV5 + AbV6, concentração bacteriana de 2,0 x 10⁸ UFC por mL, inoculado nas sementes minutos antes da semeadura na dose de 100 mL para cada 25 kg de sementes (Fancelli, 2010; Hungria, 2011).

A aplicação de nitrogênio em cobertura foi feita a lanço, manualmente, e a fonte utilizada foi o sulfato de amônio (20% N). Cada parcela recebeu a quantidade de acordo com o seu tratamento. Também foi realizada, juntamente com adubação de cobertura nitrogenada, a adubação com cloreto de potássio (60% K₂O) na dose de 80 kg ha⁻¹ de K₂O em área total.

Foi utilizado o sistema de plantio direto com dessecação utilizando o herbicida glyphosate 360 g L⁻¹ de ingrediente ativo (i. a.) na dose de 4 L ha⁻¹ para controle da vegetação espontânea, antes da semeadura, que foi realizada nos dias 20 e 21 de fevereiro. Não foi realizada adição de nenhum ingrediente ativo às sementes, as quais continham apenas o tratamento de sementes padrão disponibilizadas pelas empresas, que consiste no tratamento industrial com fungicida a base de Fludioxonil 25 g L⁻¹ (i. a.) + Metalaxil-M 100 g L⁻¹ (i. a.) e inseticidas a base de Deltametrina 25 g L⁻¹ (i. a.) + Pirimifos Metílico 500 g L⁻¹ (i. a.) + Tiametoxan 35% 0,12 L 60000 sementes⁻¹.

A semeadura foi realizada manualmente utilizando marcações nas linhas de semeadura para que todos os híbridos tivessem uma população final de plantas de

57.777,8 plantas ha⁻¹. Na adubação de semeadura utilizou-se a dose de 30 kg ha⁻¹ de N, 98,4 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 52,5 kg ha⁻¹ de K₂O (fonte formulado 04-30-16 e sulfato de amônio) de acordo com os resultados da análise de solo e a expectativa de rendimento da cultura do milho conforme Souza e Lobato (2004).

Para o controle de pragas foram realizadas aplicações com pulverizador costal, dotado de cilindro de CO₂ e barra de quatro bicos espaçados a 50 cm, utilizando-se volume de calda de 200 L ha⁻¹. O controle de plantas daninhas foi realizado no estágio V3 da cultura do milho utilizando-se mistura de herbicidas Atrazine (1,5 L ha⁻¹) + Tembotriona (0,24 L ha⁻¹).

No estágio V9 procedeu-se a aplicação de fungicida a base de Piraclostrobina + Epoxiconazol (0,75 L ha⁻¹), e foram realizadas aplicações de inseticidas visando o controle de *Spodoptera frugiperda*, *Diabrotica speciosa* e *Rhopalosiphum maidis* nos estádios iniciais da cultura e no estágio V12.

As parcelas foram constituídas de 5 linhas espaçadas de 0,45 m com 5 m de comprimento (sendo as 3 linhas centrais consideradas como área útil).

A primeira variável dependente analisada foi a quantificação da atividade da enzima redutase do nitrato aos 21 dias após a emergência (DAE) entre os estádios V4 – V6, período este posterior à aplicação da adubação de cobertura e aos 44 DAE (super precoce BG 7061), 48 DAE (DKB 390, BG 7046, BG 7049, BG 7037, RB 9006 precoce) e 50 DAE (DKB 310, AS1581, AS1596, RB 9005 precoce à semi-precoce) estágio V16 – V18, de acordo com a precocidade de cada híbrido para que as coletas fossem sempre realizadas em pré-pendoamento.

A metodologia de quantificação da atividade da enzima nitrato redutase utilizada foi adaptada de Klepper et al. (1971). Foi coletada a última folha completamente expandida de três plantas diferentes dentro de cada área útil em apenas três blocos, sendo desconsiderado um bloco devido ao grande número de amostras geradas no laboratório.

O horário de coleta foi no intervalo das 10:00 às 12:00 horas, garantindo assim o período de luz e calor adequado para que a atividade enzimática estivesse no seu funcionamento máximo. Essas folhas foram levadas para o laboratório onde foram lavadas com água destilada, as três folhas eram representativas de cada parcela, gerando assim triplicatas por parcela.

As folhas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 0,2 mm de espessura, sendo utilizados 0,2 mg de matéria fresca para análise, posteriormente colocados no meio de incubação com a seguinte composição: 5 mL de solução tampão fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 mol L^{-1}), pH 7,5; adicionando-se 1 mL de nitrato de potássio (KNO_3 0,25 mol L^{-1}) e 1 mL de N-propanol (1% v/v), agitou-se os frascos de vidro em vortex e com papel alumínio foram isolados da luz e colocados para incubar em B.O.D por 1 hora a 30 graus Celsius.

Após o tempo, filtrou-se o meio de incubação e com uma pipeta foram retiradas alíquotas de 1 mL de solução de incubação e transferidos para tubos de ensaio com 1,0 mL de sulfanilamida 0,1% em HCl (3,0 mol L^{-1}) agitou-se em vortex e após 30 minutos foram adicionados 1,0 mL de N-naftil etileno diamina 0,01% agitou-se novamente em vortex e após 15 minutos realizou-se a leitura em espectrômetro a 540 nm em absorbância.

Em geral, a determinação da atividade da enzima redutase do nitrato é feita com o fornecimento do substrato KNO_3 como fonte de nitrato, para que ocorra o processo de redução do nitrato a nitrito após o período de 60 minutos. Após este período adiciona-se a sulfanilamida em meio ácido que reage com o nitrito formado, paralisando a reação, e com a adição de N-naftil ocorrerá formação de um diazo composto, gerando assim uma coloração avermelhada com máximo de absorção em 540 nm (Ramos et al., 2006).

As absorbâncias obtidas foram comparadas com uma curva padrão de nitrito, gerada a partir de quantidades conhecidas de nitrito, sendo expressa a atividade da enzima redutase do nitrato em micromoles de nitrito por hora por grama de matéria fresca ($\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ H}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$).

No período posterior a polinização (76 DAE), iniciou-se as avaliações a campo das características agrônômicas. Foram tomadas 5 plantas ao acaso na área útil de cada parcela, e mensurada a altura da planta em metros, da superfície do solo até a folha bandeira e a altura da inserção da primeira espiga, o diâmetro do colmo mensurado com um paquímetro digital graduado em milímetros pegando-se o segundo internódio acima do colo da planta e por fim a quantificação do teor de clorofila total com o aparelho clorofiLOG CFL 1030 da Falker. Em cada uma das 5

plantas realizou-se a leitura no terço basal da folha oposta e abaixo da espiga (Argenta et al., 2001).

Ao final do ciclo da cultura foram colhidas todas as espigas da área útil das três linhas centrais, excluindo-se 0,5 m em cada extremidade da parcela. Para a amostragem foram utilizadas 10 espigas de plantas presentes na área útil da parcela para determinações de comprimento, número de grãos por fileira e número de fileiras por espiga.

O comprimento médio em centímetros de espiga foi determinado através de medidas da base até o ápice da espiga com auxílio de régua, o número de grãos por fileira foi obtido contando-se o número de grãos de uma fileira de cada uma das 10 espigas amostradas e para o número de fileiras foram contadas todas as fileiras do material amostrado. Para a massa de 100 grãos foram contados 100 grãos de cada parcela com oito repetições e, em seguida, pesados.

A produtividade de grãos foi obtida através da colheita das espigas na parcela útil, onde essas espigas foram debulhadas e os grãos foram pesados, e posteriormente foi realizado o teor de água nos grãos por meio de medidor de umidade de grãos portátil G600, sendo os dados corrigidos para 13% de teor de água.

Também foi necessário realizar a correção de estande em virtude de apresentar diferença significativa para essa característica, por meio da equação de correção pela análise de covariância com estande ideal (Schmildt, 2000), objetivando uma população final de 57.777,8 plantas ha⁻¹ e finalmente os dados de produção foram extrapolados para área de um hectare e expressos em Mg ha⁻¹.

Os efeitos das doses de nitrogênio combinadas com *Azospirillum brasilense* sobre os dez híbridos foram analisados por meio de análise de variância, as médias das variáveis dependentes estudadas foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (5%). As análises foram realizadas por meio do programa SISVAR (Ferreira, 2011).

Resultados e Discussão

O milho é cultura de clima quente e requer calor e umidade elevados, desde o plantio até o final da floração (Dourado Neto e Fancelli, 2000).

No cultivo em segunda safra, a cultura do milho tem o potencial produtivo comprometido devido às limitações climáticas nos estádios avançados de desenvolvimento, principalmente pela disponibilidade hídrica, radiação solar e temperatura (Shioga et al., 2012); percebe-se tal assertiva ao analisar a Figura 1.

Apesar de a distribuição pluviométrica ser suficiente nos estádios vegetativos, garantindo o desenvolvimento da cultura em segunda safra, nota-se na Figura 1 principalmente a ausência de ocorrência de chuvas logo após o florescimento por um longo período de tempo coincidindo com os estádios de florescimento e enchimento de grãos. Heinemann et al. (2009), relataram a alta probabilidade de ocorrência de déficit hídrico neste período para o estado de Goiás, e ressaltaram o uso de variedades que minimizem o efeito da seca nesta fase.

No presente estudo foram utilizados híbridos com elevado potencial genético, e foi empregado os manejos adequados para a região, obtendo-se valores de produtividade satisfatórios, ficando dentro da faixa de produção de lavouras com alta tecnologia 5,0 a 7,0 Mg ha⁻¹ de grãos de milho, mesmo diante das restrições impostas pelo ambiente (CONAB, 2013).

Não houve interação entre os híbridos de milho e as doses de nitrogênio combinadas com a inoculação de *Azospirillum brasilense* para todas as variáveis em estudo (Tabela 1). Em virtude da ausência de interação, o estudo será feito em cada fator isoladamente.

Os quadrados médios obtidos na análise de variância encontram-se na Tabela 1. Percebe-se a diferença entre os híbridos estudados pela significância de todas as variáveis avaliadas para o fator híbridos (H). Para o fator, doses de nitrogênio em cobertura associado à inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* houve diferença entre os níveis de N para altura de planta, diâmetro do colmo, teor de clorofila total, comprimento de espiga, grãos por fileira e produtividade de grãos (Tabela 1).

Os coeficientes de variação expressos no resumo da análise de variância (Tabela 1) são importantes para determinar a precisão experimental, para que o trabalho realizado possa ser comparado com outros semelhantes. Scapim et al. (1995), propuseram uma classificação para a cultura do milho, para as variáveis mais comumente estudadas. Segundo estes autores, os coeficientes de variação

para altura de planta, quando inferiores a 4,5% são considerados baixos, entre 4,5-9% médios e acima de 9%, altos. Para altura de inserção da primeira espiga, quando inferiores a 6,5% são considerados baixos, entre 6,5-13% médios e acima de 13%, altos. Para massa de 100 grãos, quando inferiores a 4,5% são considerados baixos, entre 4,5-11% médios e acima de 11%, altos e, por fim, na produção de grãos, os valores são considerados baixos quando inferiores a 10%, entre 10-22% médios e acima de 22%, altos.

Tabela 1. Resumo da análise de variância da cultura do milho em função dos híbridos (H) e adubação nitrogenada em cobertura com *A. brasilense* (DI) para atividade da enzima redutase do nitrato (ARN), altura de plantas (ALTP), altura de inserção da primeira espiga (ALTIES), diâmetro do colmo (DCOL), clorofila total (CLOR), comprimento de espiga (CESP), fileiras de grãos por espiga (FILESP), grãos por fileira (GRAFIL), massa de 100 grãos (M100) e produtividade de grãos (PROD)

Fonte de Variação	¹ GL	Quadrados Médios										
		ARN		ALTP	ALTIES	DCOL	CLOR	CESP	FILESP	GRAFIL	M100	PROD
		V4-V6	Vt									
Bloco	3	7,01	6,15	0,1792**	0,1338	30,30**	55,28*	3,30**	1,5100*	23,92**	11,43**	3,09**
Híbrido(H)	9	5,23**	6,03**	0,3622**	0,1769**	10,90**	196,60**	16,08**	22,57**	83,17**	94,60**	4,31**
Dn+Ino(DI)	3	0,83	2,67	0,0608**	0,1818	22,21**	644,48**	12,70**	0,8217	82,60**	5,2700	19,05**
H X DI	27	2,61	2,09	0,0070	0,5785	1,5177	11,929	0,5912	0,5117	5,8073	3,3950	0,423
Resíduo	117	1,95	2,11	0,0109	0,7193	1,5216	15,5405	0,6116	0,3910	3,8889	2,2353	0,321
² CV (%)	-	31,50	53,48	4,59	7,24	6,09	7,57	5,52	3,95	6,96	5,76	8,20

*, **: Significativos a 5 e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

²GL: graus de liberdade; ³CV: coeficiente de variação.

De acordo com a classificação citada percebe-se que as variáveis avaliadas estão dentro dos padrões normais de experimentação a campo para a cultura do milho, indicando boa precisão experimental dos dados.

Os coeficientes de variação (CV) obtidos na atividade da enzima redutase do nitrato são considerados altos, porém estão de acordo com os encontrados na literatura. Machado et al. (1998), Machado et al. (2001) e Reis Júnior et al. (2008) que quantificaram a atividade desta mesma enzima na cultura do milho obtiveram CV's em seus estudos de 39,01; 48,26 e 27,79 respectivamente. Apesar das particularidades em que cada estudo foi conduzido, percebe-se a grande variação e os altos valores de CV para tal variável.

A análise das variáveis significativas pelo teste F foi por meio do teste de comparação de médias Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. O primeiro fator analisado separadamente foi o híbrido (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito dos híbridos sobre as variáveis analisadas altura da planta (ALTP), altura de inserção da primeira espiga (ALTIES), diâmetro do colmo (DCOL), clorofila total (ISPAD), atividade da enzima redutase do nitrato nos estádios entre V4 – V6 e entre V16 – V18 (ARN), comprimento de espiga (CESP), fileiras de grãos por espiga (FILESP), grãos por fileira (GRAFIL), massa de 100 grãos (M100) e produtividade de grãos (PROD)

¹ Híbridos	ALTP	ALTIES	DCOLM	CLOR	ARN		CESP	FILESP	GRAFIL	M100	PROD
	(m)	(m)	(mm)	(SPAD)	(μmoles NO ₃ ⁻ h ⁻¹ g ⁻¹ mf)		(cm)	(un)	(un)	(g)	(Mg ha ⁻¹)
					V4-V6	V16-V18					
DKB390	2,21 c	1,25 a	20,88 a	56,24 a	4,04 a	3,87 a	13,81 d	16,44 c	25,50 d	26,73 c	6,67 c
DKB310	2,26 c	1,25 a	20,21 b	51,44 c	5,58 a	2,62 b	14,94 b	16,44 c	27,51 c	26,87 c	7,45 a
BG7046	2,48 a	1,22 b	20,39 b	53,33 b	4,28 a	1,82 b	14,23 c	16,71 b	30,11 b	23,75 d	7,56 a
BG7049	2,26 c	1,18 b	20,85 a	50,49 c	2,98 b	2,15 b	12,46 d	14,71 e	28,36 c	25,74 c	6,35 c
BG7061	1,93 d	0,95 d	21,35 a	55,96 a	4,22 a	3,32 a	14,98 b	14,13 f	33,52 a	24,35 d	5,92 d
BG7037	2,33 b	1,16 b	19,96 b	51,64 c	4,72 a	2,21 b	14,09 c	15,38 d	28,09 c	24,81 d	6,60 c
AS1581	2,46 a	1,29 a	20,04 b	49,21 c	4,50 a	3,26 a	14,28 c	17,78 a	28,95 c	21,75 e	7,19 b
AS1596	2,30 b	1,19 b	21,02 a	45,53 d	4,55 a	2,42 b	13,81 c	16,98 b	27,33 c	26,45 c	7,32 a
RB9005	2,26 c	1,04 c	19,25 c	50,34 c	4,71 a	3,26 a	15,58 a	14,71 e	27,97 c	28,39 b	7,01 b
RB9006	2,31 b	1,14 b	18,69 c	56,48 a	4,76 a	2,02 b	14,73 b	15,15 d	25,80 d	30,33 a	7,02 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5%).
¹Híbridos Dekalb (DKB), Agroeste (AS) e Riber (RB) evento transgênico YieldGard VT PRO™ Biogene (BG) evento transgênico Herculex® e Biogene 7046 convencional.

Nos componentes morfológicos dos híbridos percebe-se, para altura de planta, que os híbridos BG 7046 e AS 1581 apresentaram a maior altura de planta em relação aos demais (Tabela 2). Para altura de inserção da primeira espiga, os maiores valores foram encontrados nos híbridos DKB 390, DKB 310 e AS 1581. A análise dessas duas variáveis é considerada importante, pois segundo Li et al. (2007), plantas mais altas e com maior altura de inserção de espiga são mais suscetíveis ao acamamento, porém neste estudo não foi observado acamamento de plantas, mesmo nos híbridos de grande porte, concluindo que outros fatores que contribuem para a predisposição ao acamamento não se manifestaram.

Ao avaliar o colmo, que além de suportar as folhas e partes florais é considerado órgão de reserva da planta de milho, os híbridos que se destacaram entre os dez avaliados com os maiores diâmetros do colmo foram BG 7061, AS 1596, DKB 390 e BG 7049; resultado semelhante foi encontrado por Dotto et al. (2010), que citaram o efeito apenas dos híbridos quando submetidos à inoculação e doses de nitrogênio em cobertura.

Para o teor de clorofila total, os dados obtidos nesta pesquisa concordam com Hurtado et al. (2010), os quais relataram que os híbridos podem afetar as leituras do clorofilômetro. Nota-se, na Tabela 2, que os híbridos que proporcionaram leituras superiores aos demais foram o RB 9006, DKB 390 e BG 7061, demonstrando a eficiência destes híbridos na assimilação de nitrogênio. De acordo com Chapman e Barreto (1997), mais de 50% do total de nitrogênio nas folhas encontram-se nos compostos do cloroplastídio e da clorofila, sendo esta análise um bom parâmetro para avaliar o estado nutricional da planta quanto ao nitrogênio.

As atividades da enzima redutase do nitrato dosadas nas folhas foram afetadas apenas pelo fator híbridos (Tabela 2). Na primeira época em estudo, no estádio entre V4 – V6, apenas o híbrido BG 7049 diferenciou-se dos demais com a menor média; os demais híbridos foram superiores e não diferiram entre si. Na época em pré-pendoamento estádio entre V16 – V18, os híbridos que possuíam médias superiores, diferindo significativamente dos demais analisados foram DKB 390, BG 7061, AS 1581 e RB 9005. Esses dados ratificam Purcino et al. (1994) que ao estudarem 15 genótipos de milho encontraram diferença significativa entre os mesmos, mas não verificaram o efeito das doses de nitrogênio testadas por eles na atividade desta enzima.

Apesar de outros trabalhos citarem o efeito da inoculação com *Azospirillum* na atividade da enzima redutase do nitrato (El-Kommy et al., 2003; Sala, 2007), no presente estudo possivelmente não houve o efeito da inoculação com *A. brasilense*. A ausência de efeito da inoculação com *Azospirillum* também foi citado por Reis Júnior et al. (2008), que relataram que a variabilidade dos resultados em trabalhos de inoculação com *Azospirillum* é bastante conhecida, devido possivelmente a inconsistência da colonização radicular, problemas de sobrevivência do inoculo ou por condições ambientais desfavoráveis à bactéria.

Os componentes de produção de milho relacionados às espigas encontram-se na Tabela 2, que pelo teste de média mostrou o efeito de cada híbrido nas variáveis estudadas. O híbrido RB 9005 teve espigas com maior comprimento médio, destacando-se dos demais híbridos. Já para a variável do número de fileiras de grãos por espiga, o híbrido AS 1581 deteve a maior média, diferenciando-se dos demais híbridos.

Essas duas variáveis também foram analisadas por Cruz et al. (2008) em cinco cultivares de milho, sob diferentes doses de nitrogênio e relataram o efeito significativo das mesmas. Segundo esses autores, tais componentes são determinados na segunda semana após a emergência, quando se inicia a formação dos primórdios da espiga. A falta de água e nutrientes nesta fase pode afetar esses componentes, porém, como as condições experimentais foram as mesmas para todas as cultivares, as diferenças obtidas provieram da influência genética de cada cultivar, o mesmo ocorrendo no presente trabalho.

Os valores médios da massa de 100 grãos indicaram variações significativas apenas entre os híbridos (Tabela 2), sendo o híbrido RB 9006 superior aos demais híbridos estudados. Segundo Ohland et al. (2005), a massa de 100 grãos é uma característica influenciada pelo genótipo, pela disponibilidade de nutrientes e pelas condições climáticas durante o enchimento de grãos. No presente trabalho foi possível perceber o efeito significativo dos genótipos (híbridos) para tal variável.

A produção de grãos variou significativamente entre os híbridos, sendo o grupo dos híbridos com produção superior aos demais, composto pelos materiais BG 7046, DKB 310 e AS 1596 (Tabela 2). Esses materiais foram os mais responsivos nas condições em estudo, porém não foi possível encontrar quais dos híbridos responderam a inoculação por ocasião da não interação entre os fatores.

Em experimento com dois híbridos, ausência e presença de inoculação e três doses de nitrogênio em cobertura Dotto et al. (2010) também não encontraram efeito significativo da inoculação com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, porém evidenciaram o efeito dos híbridos frente a inoculação, devido a interação entre esses fatores, sendo que um dos híbridos teve um incremento de 8,6% na produção de grãos em relação ao outro, quando os mesmos foram inoculados.

O estudo do fator adubação nitrogenada em cobertura e inoculação se encontra na Tabela 3. A ausência de efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* pode ser notado, por não haver diferença significativa entre os tratamentos T1 e T2, não confirmando o que foi relatado por Dobbelaere et al. (2001), que verificaram que os efeitos positivos da inoculação são mais consistentes em baixos níveis de adubação nitrogenada. Já para os tratamentos T3 e T4 acredita-se que os incrementos obtidos provieram da aplicação de adubação nitrogenada em

cobertura. Apesar desses tratamentos também estarem inoculados não se pode afirmar se houve ou não o efeito do *A. brasilense*, devido à ausência dos tratamentos sem inoculação nas doses de 35 e 70 kg ha⁻¹ de nitrogênio em cobertura para a comparação.

Tabela 3. Efeito da adubação nitrogenada em cobertura e inoculação para altura da planta (ALTP), diâmetro do colmo (DCOL), clorofila total (CLOR), comprimento de espiga (CESP), grãos por fileira (GRAFIL) e produtividade de grãos (PROD)

Tratamentos	ALTP (m)	DCOL (mm)	CLOR (SPAD)	CESP (cm)	GRAFIL (un)	PROD (Mg ha ⁻¹)
T1	2,27 b	19,76 b	49,33 c	13,71 c	26,98 b	6,42 c
T2	2,24 b	19,51 b	48,07 c	13,69 c	27,23 b	6,28 c
T3	2,32 a	20,74 a	54,43 b	14,46 b	29,16 a	7,16 b
T4	2,32 a	21,05 a	56,46 a	14,83 a	29,90 a	7,77 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5%).

T1: sem cobertura e sem inoculação; T2: sem cobertura e com inoculação; T3: 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura e com inoculação; T4: 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura e com inoculação.

Embora vários trabalhos tenham observado as inúmeras atuações do gênero *Azospirillum* sobre as plantas, a inconsistência dos resultados com rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV), principalmente em condições de campo, é um frequente problema (Leben et al. 1987). As possíveis causas dos resultados inconsistentes são, segundo Antoun et al. (1998), a complexidade das interações envolvidas entre a planta, a bactéria introduzida e o resto da microbiota rizosférica, entre outros fatores anteriormente citados neste texto.

Quanto ao efeito das doses de nitrogênio em cobertura, a altura da planta e o diâmetro basal do colmo foram incrementados com a aplicação da adubação nitrogenada em cobertura, mas sem ocorrer a diferenciação significativa entre as duas doses testadas (T3 e T4) para tais variáveis (Tabela 3). Segundo Castro et al. (2008), o nitrogênio influencia diretamente na divisão e expansão celular e no processo fotossintético; desta forma, plantas bem nutridas em nitrogênio tendem a um maior desenvolvimento vegetativo.

Os dados de altura da planta reforçam os de Dartora et al. (2013), que não verificaram o efeito da inoculação com *A. brasilense* e *H. seropedicae* para esta variável. Esses autores também verificaram o efeito da adubação nitrogenada e descreveram um modelo polinomial quadrático na fase vegetativa e um modelo linear crescente na fase reprodutiva no intervalo de 0 a 160 kg ha⁻¹ de N.

Entretanto, Dartora et al. (2013) verificaram o efeito da inoculação sobre o diâmetro do colmo na fase vegetativa, quando combinaram estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae*. Quando testadas de forma isolada, não geraram incrementos significativos nesta variável, o que pode justificar a ausência de efeito da inoculação no diâmetro do colmo no presente estudo, pois o inoculante utilizado foi à base apenas de *Azospirillum brasilense*. Esses autores verificaram também a influência positiva da adubação nitrogenada no diâmetro do colmo e descreveram um modelo linear crescente para tal variável. O mesmo não foi verificado por Dotto et al. (2010), que ao testarem doses de nitrogênio em cobertura não constataram diferença significativa no diâmetro basal do colmo nos híbridos de milho por eles estudados.

As doses de nitrogênio em cobertura proporcionaram maior índice de clorofila total Soil Plant Analysis Development (SPAD) (Tabela 3), sendo que a dose de 70 kg ha⁻¹ de nitrogênio em cobertura foi significativamente superior à dose de 35 kg ha⁻¹ de nitrogênio em cobertura, sendo essas duas doses superiores significativamente a não aplicação de nitrogênio em cobertura. Esses dados harmonizam-se com os de Kappes et al. (2013), que verificaram efeito da aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura quando comparado à não aplicação do nutriente em cobertura. Além do efeito do nitrogênio em cobertura, Kappes et al. (2013), ao realizarem três leituras nos estádios V5, V8 e pleno florescimento, verificaram o efeito da inoculação com *A. brasilense* na primeira leitura, porém este resultado não se manteve para as demais leituras. No presente estudo, a leitura foi realizada no período reprodutivo e não foi observado o efeito da inoculação.

Para os componentes da produção relacionados à espiga com o aumento das doses de N via adubação de cobertura, obteve-se espigas mais compridas, sendo que a adubação nitrogenada em cobertura gerou incrementos significativos quando comparados a não aplicação de N em cobertura (Tabela 3), de forma que a maior dose testada proporcionou espigas mais compridas que a dose de 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura. Já para o componente de produção grãos por fileira, as doses de nitrogênio em cobertura também geraram incrementos significativos em relação a não aplicação de N em cobertura, porém não houve diferença significativa no número de grãos por fileira entre as doses de 70 e 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura (Tabela 3).

Esses dados relacionados à espiga apoiam-se em Carmo et al. (2012), que descreveram equações lineares positivas em resposta ao aumento das doses de nitrogênio e verificaram o aumento no comprimento das espigas e no número de grãos por fileira. De acordo com Ritchie et al. (2003) no momento da definição do número de óvulos e o tamanho da espiga (estádio V12) as deficiências de umidade e nutrientes podem reduzir seriamente o número potencial de sementes e o tamanho das espigas colhidas, o que explica o menor comprimento de espigas e o número de grãos por fileira nos tratamentos T1 e T2 que receberam apenas 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura.

Para a produção de grãos, o tratamento T1 sem inoculação e T2 com inoculação, ambos com adubação nitrogenada apenas em semeadura, não diferiram significativamente entre si, demonstrando a ausência de influência da inoculação com *A. brasilense*. Esses dados são ratificados por Repke et al. (2013), que citaram a ausência de interferência da aplicação de *Azospirillum brasilense* na produção de grãos, via tratamento de sementes, acompanhada ou não de doses de nitrogênio sintético. Resultado divergente foi obtido por Braccini et al. (2012), que verificaram que com a redução da adubação nitrogenada a inoculação com *A. brasilense* proporcionou incremento da produção de grãos de milho.

No presente estudo percebe-se incremento significativo na produção nos tratamentos que receberam adubação nitrogenada em cobertura, quando comparados aos que não receberam (Tabela 3), sendo que a maior dose proporcionou a maior produção de grãos, diferindo significativamente da dose de 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura, concordando com Repke et al. (2013), que teve a produção de grãos aumentada conforme foram elevadas as doses de N em cobertura.

Com o substancial incremento nas características morfológicas e nos componentes de produção relacionados à espiga pela aplicação de nitrogênio em cobertura, percebe-se a importância deste nutriente no crescimento e desenvolvimento da planta de milho, resultando assim em maiores produtividades de grãos.

Conclusões

A inoculação com *Azospirillum brasilense* possivelmente não gerou incrementos nas variáveis analisadas.

A adubação nitrogenada em cobertura influencia significativamente o desenvolvimento das plantas de milho, resultando em aumento na produtividade de grãos.

Os híbridos BioGene 7046®, Dekalb 310® e Agroeste 1596® foram os mais produtivos nas condições em estudo.

Referências

- ANTOUN, H.; BEACUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raohnus sativus* L.). **Plant Soil**, v.204, p.57-67, 1998.
- ARGENTA, G.; DA SILVA, P. R. F.; BORTOLINI, C. G.; FORSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.158-167, 2001.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.
- BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; PICCININ, G. G.; ALBRECHT, L. P.; BARBOSA, M. C.; ORTIZ, A. H. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with the use of bio regulators in maize. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.25, n.2, p.58–64, 2012.
- CARMO, M. S.; CRUZ, S. C. S.; SOUZA, E. J.; CAMPOS, L. F. C.; MACHADA, C. G. Doses e fontes de nitrogênio no desenvolvimento e produtividade da cultura do milho doce (*Zea mays* convar. *saccharata* var. *rugosa*). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.1, p.223–231, 2012.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2008. 864 p.

CHAMPMAM, S. C.; BARRETO, H. J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf of nitrogen of tropical maize during vegetative growth, *Agronomic Journal*, v.89, p.557-562, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Conab). **Levantamento da produção de grãos: safra 2011/12; 2012/2013. 2013**. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 26 fev. 2014.

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

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

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

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.5, n.3, p.376–382, 2010.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L. **Produção de milho**– Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.

EL-KOMY, H. M.; HAMDIA, M. A.; ABD EL-BAKI, G. K. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. **Biologia Plantarum**, v.46, p.281-287, 2003.

FANCELLI, A. L. Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes na cultura de milho. **Informações Agrômicas**, POTAFOS, Piracicaba, n.131, p.1-10, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, (UFLA), v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

HEINEMANN, A. B.; ANDRADE, C. L. T.; GOMIDE, R. L.; AMORIN, A. O.; DA PAZ, R. L. Padrões de deficiência hídrica para a cultura de milho (safra normal e safrinha) no estado de Goiás e suas consequências para o melhoramento genético. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.4, p.1026-1033, 2009.

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.33, n.1, p.413–425, 2010.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação e rendimento a baixo custo. Londrina: **Embrapa Soja (Documentos, 325)**, p.21-25, 2011.

HURTADO, S. M. C.; SILVA, C. A.; RESENDE, A. V.; CORAZZA, E. J.; SHIRATSUCHI, L. S.; HIGASHIKAWA, F. S. Sensitivity of the chlorophyll meter for nutritional diagnostic of nitrogen in corn (*Zea mays* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.3, p.688-697, 2010.

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

KLEPPER, L.; FLESCER, D.; HAGEMAN, R. D. Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves, **Plant Physiol**, v.48, p.580-590, 1971.

LEBEN, S. D.; WADI, J. A.; EASTON, G. D. Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato growth and control of *Verticillium dahlia* **Phytopathology**, v. 77, n.11, p.1592-1595, 1987.

LI, Y.; DONG, Y.; NIU, S.; CUI, D. The genetics relationships among plant-height traits found using multiple trait QTL mapping of a dent corn and popcorn cross. **Genome**, Toronto, v.50, n.4, p.357-364, 2007.

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

MACHADO, A. T.; SODEK, L.; FERNANDES, M. S. N-partitioning, nitrate reductive and glutamine synthetizes activities in two contrasting varieties of maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p.249-256, 2001.

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

PURCINO, A. A. C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, A. T.; MARRIEL, I. E. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.6, n.1, p.41-46, 1994.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v.29, n.5, p.1114-1120, 2006.

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

RENGEL, Z. Genetic control of root exudation. **Plant Soil**, v. 245, p.59-70, 2002.

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

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **Como a planta de milho se desenvolve.** Disponível em: <[http://brasil.ipni.net/ipniweb/region/brasil.nsf/0/DE02520B8765B8D683257AA0003C46A6/\\$FILE/Encarte103.pdf](http://brasil.ipni.net/ipniweb/region/brasil.nsf/0/DE02520B8765B8D683257AA0003C46A6/$FILE/Encarte103.pdf)> Acesso em: 27 de janeiro de 2014.

SALA, V. N. R.; BRAN, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.6, p.883-842, 2007.

SCAPIM, C. A.; CARVALHO, C. G. P.; CRUZ, C. D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para cultura do milho. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, DF, v.30, p. 683-686, 1995.

SCHMILDT, E. R. **Correção de rendimento de parcelas, estratificação ambiental e adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho.** Viçosa: UFV, 2000. 110p. Tese de Doutorado.

SHIOGA, P.S.; GERAGE, A. C.; ARAÚJO, P.M. de; BIANCO, R. Avaliação estadual de cultivares de milho segunda safra 2012. **(IAPAR Boletim Técnico 78)** 1 Ed. Londrina: IAPAR, 2012. 114p.

SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação.** 2 ed. Brasília: Embrapa Cerrados, 2004. 416p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 292p.

CAPÍTULO III - MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DOSES DE NITROGÊNIO EM COBERTURA PARA CULTURA DO MILHO

RESUMO - O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado no mundo, sendo utilizado principalmente na alimentação de aves e suínos, refletindo assim direta e/ou indiretamente na alimentação humana. Sua produção está ligada principalmente às exigências que esta cultura tem por nitrogênio. A adubação nitrogenada é advinda principalmente de fontes as quais utilizam de fontes energéticas não renováveis, e tem expressivo valor no custo de produção. Tecnologias que visam a redução dos custos com menor impacto ao meio ambiente como a utilização de bactérias diazotróficas devem ser considerados. Objetivou-se com este trabalho avaliar dois híbridos de milho BioGene 7046® e Dekalb 310® com 3 doses de nitrogênio em cobertura (0, 35 e 70 kg ha⁻¹ de N) associado com 4 métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense* (sem inoculação, inoculação nas sementes, inoculação foliar e a combinação de inoculação nas sementes e folhas), a campo safra 2013/2014. Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso com 4 repetições com arranjo fatorial 2x3x4 avaliando-se, as variáveis relacionadas ao crescimento e desenvolvimento, análise fisiológica da atividade da enzima redutase do nitrato e variáveis do rendimento e seus componentes. Os dados foram submetidos à análise de variância e constatado significância procedeu-se a aplicação do teste de média Tukey (5%). Independentemente do método de aplicação a inoculação com *Azospirillum brasilense* não teve efeito no desenvolvimento das plantas de milho e não incrementou a produtividade de grãos. A adubação nitrogenada em cobertura é prática indispensável, proporcionando incremento no desenvolvimento das plantas de milho.

Palavras-chave: bactérias diazotróficas, redutase do nitrato, bactérias promotoras de crescimento

Introdução

A cultura do milho é amplamente difundida em todo o território nacional, sendo o cereal mais cultivado nos últimos anos e seu cultivo vai desde a agricultura de subsistência até a agricultura de mais alto nível tecnológico. Uma alternativa que todos os sistemas de cultivo de milho buscam é a aquisição de nitrogênio pelas plantas, de forma mais sustentável. Atualmente, a maioria dos sistemas é muito dependente da adubação nitrogenada proveniente de fontes que são obtidas por meio de processos os quais utilizam fontes energéticas não renováveis, principalmente na agricultura de mais alto nível tecnológico, dependência que faz do Brasil um dos países que mais importam fertilizantes no mundo, e dentre os nutrientes mais importados o nitrogênio é o segundo, perdendo apenas para o potássio (ANDA, 2014).

Para se obter bons patamares produtivos no cultivo do milho é indispensável a adubação nitrogenada, pois esta cultura é extremamente exigente neste macro nutriente. Segundo Coelho (2010), para cada tonelada de grão produzido necessita-se em torno de 20 a 30 kg ha⁻¹ de N. Como a adubação nitrogenada é indispensável, devem ser estudadas alternativas que possam reduzir a aplicação de nitrogênio. Uma das alternativas que já vem sendo estudada há algum tempo é a capacidade de fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas.

A Embrapa Soja e a Universidade Federal do Paraná se uniram e durante alguns anos desenvolveram pesquisas laboratoriais e testes a campo com bactérias do gênero *Azospirillum*. De acordo com os critérios da legislação brasileira para inoculantes, estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), foram testadas e selecionadas estirpes de *Azospirillum* que apresentavam maior promoção de crescimento das plantas, maior sobrevivência no solo e maior adaptação as técnicas utilizadas na cultura do milho. As estirpes selecionadas e autorizadas pelo MAPA são da espécie *Azospirillum brasilense* e são elas AbV4, AbV5, AbV6 e AbV7 (Hungria et al., 2011).

O principal método de aplicação (inoculação) de *Azospirillum* é via tratamento de sementes, com a finalidade de facilitar a multiplicação e estabelecimento na rizosfera, pois essas duas características são imprescindíveis para uma boa

interação planta-bactéria a fim da aquisição dos benefícios proporcionados por bactérias diazotróficas (Baldani et al., 1986). Porém, como no tratamento de sementes não há apenas a adição do inoculante, e sim também de inseticidas, fungicidas entre outros produtos fitossanitários, muitos são incompatíveis com esses microrganismos, podendo reduzir o número de células viáveis comprometendo assim a inoculação. Como as bactérias do gênero *Azospirillum* são diazotróficas endofíticas facultativas, a aplicação foliar torna-se uma alternativa e faz parte dos métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense*, visando um melhor estabelecimento destas bactérias e melhor aquisição dos seus benefícios. Isto é possível devido ao fato de que quando essas bactérias são aplicadas nas folhas elas ficam alojadas na bainha e posteriormente com as chuvas podem ser carregadas para o colmo e solo, entrando em contato com as raízes.

Desta forma, objetivou-se com este trabalho avaliar o comportamento de dois híbridos de milho com doses de nitrogênio aplicadas em cobertura e métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e na produção de grãos para a cultura do milho.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido na safra verão, referente ao ano agrícola 2013/2014, no município de Jataí, localizado na região do Sudoeste Goiano (S 17° 55' 797" e W 51° 42' 864"), com altitude média de 700 m. O clima da região, segundo a classificação de Koopen, é do tipo Cw, mesotérmico, com estações bem definidas de seca (abril-setembro) e chuva (outubro-março) com temperatura e precipitação média anual de 22 °C e 1.800 mm. Os dados climáticos no local do experimento encontram-se na Figura 1. Durante a condução do experimento a precipitação total foi de 887,4 mm e a temperatura variou de 16,7 a 35,7 °C.

As condições climáticas foram favoráveis ao cultivo do milho (Figura 1), com volume de precipitações pluviais e temperaturas adequadas durante o desenvolvimento dos híbridos, principalmente nas fases fenológicas consideradas críticas (florescimento e enchimento de grãos) preservando assim o potencial produtivo (Ritchie et al., 2003).

O solo da área experimental foi classificado como um Latossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 1999), textura média com teores de 49%, 10% e 41% de argila, silte e areia, respectivamente.

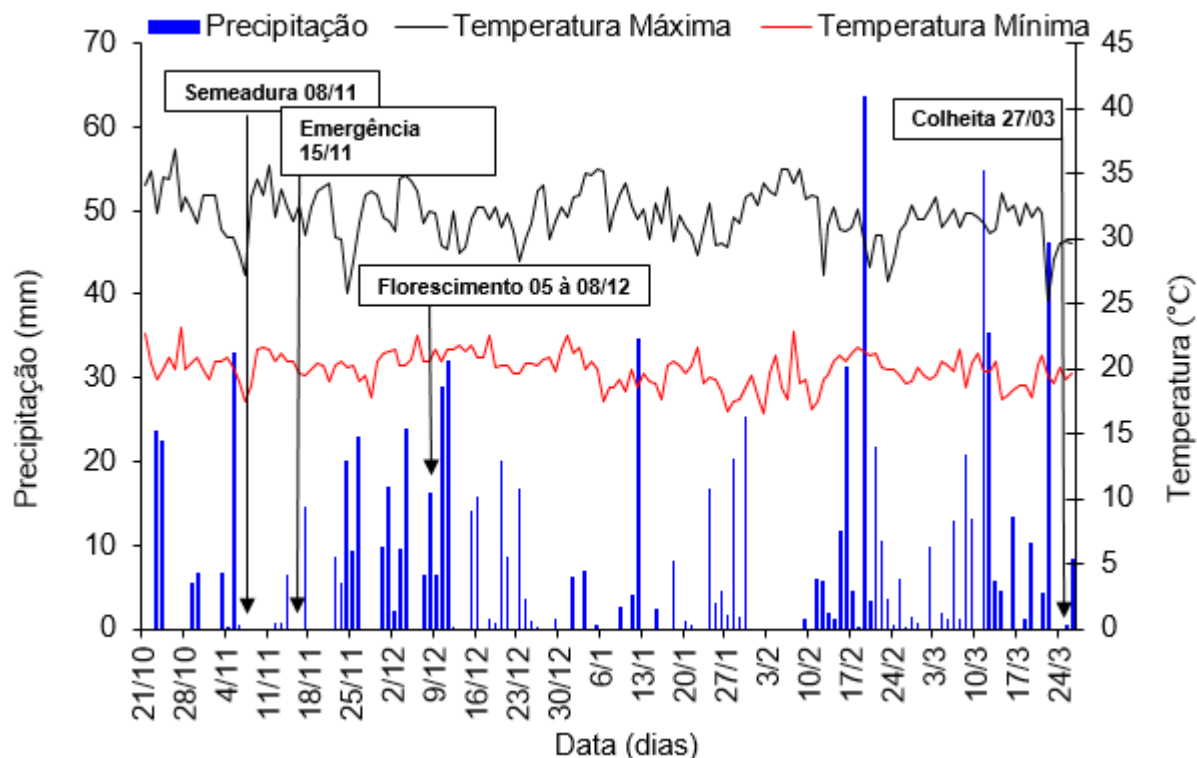


Figura 1. Precipitação pluviométrica (mm) e temperaturas máximas e mínimas (°C) registradas no período de outubro de 2013 a março de 2014

Os atributos químicos do solo na camada de 0 – 20 cm foram: pH (CaCl_2): 5,3; Ca: $1,22 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Mg: $0,68 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Al: $0,07 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; H+Al: $5,3 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; K: $0,13 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Melich 1= P: $1,9 \text{ mg dm}^{-3}$; Cu: $9,6 \text{ mg dm}^{-3}$; Fe: 28 mg dm^{-3} ; Mn: $34,4 \text{ mg dm}^{-3}$; Zn: $0,4 \text{ mg dm}^{-3}$; Na: $1,6 \text{ mg dm}^{-3}$; M.O $34,2 \text{ g dm}^{-3}$; CTC pH 7,0: $7,3 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ e V (%): 27,8. A área estava sendo cultivada em plantio direto (sucessão primeira safra soja/ segunda safra sorgo) nos anos agrícolas de 2008/2009, 2009/2010, 2010/2011, 2011/2012; no ano agrícola de 2012/2013 a área ficou em pousio e foi manejada com grade leve para incorporação de $2,73 \text{ Mg ha}^{-1}$ de calcário dolomítico com PRNT de 86%.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com quatro repetições, no arranjo fatorial $2 \times 3 \times 4$, sendo o primeiro fator dois híbridos H1: Dekalb 310® YieldGard VT PRO™ (DKB 310) e H2: BioGene 7046® (BG 7046), que foram selecionados por terem se destacado pela produção de grãos em um experimento

com dez híbridos conduzido em segunda safra no ano de 2013 sob diferentes doses de nitrogênio em cobertura e inoculação com *Azospirillum brasilense* nas sementes. No segundo fator, os tratamentos corresponderam ao D1: sem aplicação de nitrogênio em cobertura, D2: aplicação 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura 21 dias após a emergência (V4 – V6) e D3: 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura em cobertura 21 dias após a emergência (V4 – V6) e o terceiro fator, que corresponde aos quatro métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense* (M1: sem aplicação *Azospirillum brasilense*, M2: inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes, na dose de 100 mL de inoculante para cada 25 kg de sementes, M3: inoculação de *Azospirillum brasilense* via aplicação foliar na dose de 200 mL ha⁻¹ 19 dias após a emergência (V4 – V6) e M4: combinação dos dois métodos anteriores: inoculação nas sementes mais inoculação via aplicação foliar de *Azospirillum brasilense*.

Em todos os tratamentos foram aplicados 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura e o inoculante utilizado foi com a espécie *Azospirillum brasilense* estirpes AbV5 + AbV6 concentração bacteriana de $2,0 \times 10^8$ UFC por mL (Fancelli, 2010; Hungria, 2011). A aplicação de nitrogênio em cobertura foi feita a lanço, manualmente, e a fonte utilizada foi o sulfato de amônio (20% N), onde cada parcela recebeu a quantidade de acordo com o seu tratamento.

Para a implantação do experimento, 10 dias antes da semeadura foi realizada a aplicação do herbicida glifosato (360 g L⁻¹ i. a.) na dose de 5 L ha⁻¹ para controle da vegetação espontânea. A adubação de semeadura foi realizada um dia antes da semeadura, de acordo com os resultados da análise de solo e a expectativa de rendimento da cultura do milho, segundo a recomendação de Souza e Lobato (2004). Foram aplicados 30 kg ha⁻¹ de N, 180 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 80 kg ha⁻¹ de K₂O (fonte 04-30-16, sulfato de amônio e cloreto de potássio) com semeadora adubadora de arrasto.

Após a adubação, foi realizada a semeadura no dia 08 de novembro de 2013, manualmente com o auxílio de matracas, colocando-se duas sementes a cada 0,33 m, com espaçamento entre linhas 0,45 m e não foi realizada adição de nenhum ingrediente ativo às sementes, as mesmas continham apenas o tratamento de sementes padrão disponibilizadas pelas empresas, que consiste no tratamento industrial com fungicida a base de Fludioxonil 25 g L⁻¹ de i. a. + Metalaxil-M 100 g L⁻¹

de i. a. e inseticidas a base de Deltametrina 25 g L⁻¹ de i. a. + Pirimifos Metílico 500 g L⁻¹ i. a. + Tiametoxan 35% de i. a. 0,12 L 60.000 sementes⁻¹.

Após o dia 15/11/2013 estágio de emergência (Ve) procedeu-se o desbaste das plântulas, deixando apenas uma plântula por cova, a fim de atender a população final de 66.666 plantas ha⁻¹. As parcelas foram constituídas de quatro linhas de 6 m de comprimento. Foram utilizadas para a coleta dos dados duas linhas centrais de cada parcela, desprezando-se 0,66 m nas extremidades.

Os tratos culturais tiveram início 12 dias após a emergência, visando o controle de percevejos (*Dichelops melacanthus*), e lagartas (*Spodoptera frugiperda*). Os inseticidas utilizados foram à base de Imidacloprido (100 g L⁻¹ de i. a.) + Beta-ciflutrina (12,5 g L⁻¹ de i. a.) na dose de 0,75 L ha⁻¹ + Metoxifenoazida (240 g L⁻¹ de i. a.) na dose de 0,18 L ha⁻¹. O controle de plantas daninhas em pós-emergência ocorreu no estágio entre V3 – V4; como a infestação de plantas daninhas dicotiledôneas foi baixa, foi aplicado apenas o herbicida a base de Tembotriona (420 g L⁻¹ i.a.) na dose de 0,24 L ha⁻¹ visando o maior controle de plantas daninhas monocotiledôneas. Aos 27 dias após a emergência, novamente foi feito o controle de inseto praga (*Spodoptera frugiperda*) com inseticida a base de Flubendiamida (480 g L⁻¹ de i. a.) na dose de 0,5 L ha⁻¹. E por final a aplicação de fungicida no estágio V9 (37 DAE) a base de Azoxistrobina (200 g L⁻¹ de i. a.) + Ciproconazol (80 g L⁻¹ i. a.) na dose de 0,3 L ha⁻¹, mais adjuvante específico de acordo com a recomendação.

Todas as aplicações de produtos fitossanitários foram com bomba costal jacto 20 L, com volume de calda de aproximadamente 200 L ha⁻¹. A inoculação via foliar foi por meio de pulverizador de pesquisa costal, dotado de cilindro de CO₂ e barra de quatro bicos espaçadas a 0,5 m, pontas DG 110 02 jato planto TJeet®, com volume de calda de 200 L ha⁻¹, pressão de 2 bar.

As análises das variáveis dependentes em estudo iniciaram-se pela quantificação da atividade da enzima redutase do nitrato (ARN) aos 28 DAE no estágio fenológico entre V6 – V8, período este posterior à aplicação da adubação de cobertura e aos 45 DAE estágio entre V16 – V18 (pré-pendoamento) foi novamente quantificado a ARN.

A metodologia de quantificação da atividade da enzima redutase do nitrato utilizada foi adaptada de Klepper et al. (1971) baseando-se também nas conclusões

de Jaworski (1971). Para a mensuração da atividade da enzima ARN foram coletadas a última folha completamente expandida de três plantas diferentes dentro de cada área útil, em apenas três blocos, sendo desconsiderado um bloco devido ao grande número de amostras geradas no laboratório, no intervalo das 10:00 às 12:00 horas, garantindo assim o período de luz e calor adequado para que a atividade enzimática estivesse no seu funcionamento máximo.

Rapidamente essas folhas foram levadas para o laboratório onde foram lavadas com água destilada, as três folhas eram representativas de cada parcela, gerando assim triplicatas por parcela. As folhas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 0,2 mm de espessura, sendo utilizados 0,2 mg de matéria fresca para análise, posteriormente colocados no meio de incubação com a seguinte composição: 5 mL de solução tampão fosfato ($K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ 0,1 mol L⁻¹), pH 7,5; adicionando-se 1 mL de nitrato de potássio (KNO_3 0,25 mol L⁻¹) e 1 mL de N-propanol (1% v/v). Agitou-se os frascos de vidro em vortex e depois os mesmos foram submetidos a vácuo por três ciclos de um minuto com intervalo de 15 segundos e então isolados da luz com papel alumínio, sendo colocados para incubar em B.O.D por 1 hora a 30 graus Celsius.

Após o tempo, filtrou-se o meio de incubação e com uma pipeta foram retiradas alíquotas de 0,2 mL de solução de incubação que foram transferidas para tubos de ensaio com 1,0 mL de sulfanilamida 0,1% em HCl (3,0 mols L⁻¹). Agitou-se em vortex e após 30 minutos foram adicionados 1,0 mL de N-naftil etileno diamina 0,01%; agitou-se novamente em vortex e após 15 minutos realizou-se a leitura em espectrômetro a 540 nm em absorbância.

Em geral, a determinação da atividade da enzima redutase do nitrato é feita com o fornecimento do substrato KNO_3 como fonte de nitrato para que ocorra o processo de redução do nitrato a nitrito após o período de 60 minutos. Com a formação de nitrito, a adição da sulfanilamida em meio ácido reage com o nitrito formado, paralisando a reação; e após a adição de N-naftil irá ocorrer formação de um diazo composto, gerando assim uma coloração vermelha com máximo de absorção em 540 nm (Ramos et al., 2006).

As absorbâncias obtidas foram comparadas com uma curva padrão, gerada a partir de quantidades conhecidas de nitrito, sendo expressa a atividade da enzima

reduzase do nitrato em micromoles de nitrito por hora por grama de matéria fresca ($\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ H}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$).

No período de florescimento foram iniciadas as avaliações a campo das características agronômicas. Foram tomadas 5 plantas ao acaso na área útil de cada parcela e mensurada a altura da planta em metros, da superfície do solo até a folha bandeira e a altura da inserção da primeira espiga, o diâmetro do colmo mensurado com um paquímetro digital graduado em milímetros pegando-se o segundo internódio acima do colo da planta e por final a quantificação do teor de clorofila total com o aparelho clorofiLOG CFL 1030 da Falker, onde em cada planta realizou-se a leitura no terço basal da folha oposta e abaixo da espiga (Argenta et al., 2001).

Ao final do ciclo da cultura, a população final de plantas foi quantificada, contando-se todas as plantas, inclusive as plantas acamadas e quebradas e foram colhidas todas as espigas, sendo consideradas como área útil as duas linhas centrais, excluindo-se 0,66 m em cada extremidade da parcela.

Para a amostragem foram utilizadas 8 espigas de plantas presentes na área útil da parcela para determinações de comprimento, diâmetro, número de grãos por fileira e número de fileiras da espiga.

O comprimento médio em centímetros de espiga foi determinado por meio de medidas da base até o ápice, com auxílio de régua. O diâmetro médio das espigas foi determinado por meio de paquímetro graduado e expresso em centímetros e o número de grãos por fileira foi obtido contando-se o número de grãos de uma fileira de cada uma das 8 espigas amostradas e para o número de fileiras foram contadas todas as fileiras do material amostrado.

Para a massa de mil grãos, a metodologia utilizada foi de acordo com Brasil, (2009). A produtividade de grãos foi obtida através da colheita das espigas na área útil, onde as mesmas foram debulhadas e os grãos foram pesados, e posteriormente foi realizado o teor de água nos grãos por meio de medidor de umidade de grãos portátil G600, sendo os dados corrigidos para 13% de teor de água, os dados foram extrapolados para área de um hectare e expressos em Mg ha^{-1} de grãos.

Os efeitos dos fatores dos híbridos, doses de nitrogênio em cobertura e métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense* foram analisados por meio de análise de variância pelo teste F, dos fatores em estudo para os caracteres

avaliados foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). As análises foram realizadas por meio do programa SISVAR (Ferreira, 2011).

Resultados e Discussão

Os resumos das análises de variância estão apresentados nas tabelas 1 e 2, para todas as variáveis em estudo no presente trabalho.

Para a atividade da enzima redutase do nitrato, verificou-se que os fatores em estudo não mostraram dependência para a avaliação no estágio V6 – V8, sendo detectada a diferença significativa apenas para os híbridos, indicando que para esta variável os híbridos comportaram-se de forma diferenciada. Para a avaliação no estágio entre V16 – V18 detectou-se interação entre os três fatores em estudo, indicando que os mesmos não atuam de forma independente, logo se deve efetuar o estudo de cada fator dentro dos níveis dos demais.

Outras variáveis que também apresentaram interação entre os fatores foram a análise do diâmetro de espigas que apresentou interação entre híbridos e doses de nitrogênio em cobertura e produtividade de grãos que apresentou interação entre doses de nitrogênio em cobertura e métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense* (Tabela 2), sendo necessário o desdobramento de cada fator nos diferentes níveis.

Tabela 1. Resumo da análise de variância da cultura do milho em função dos híbridos, doses de nitrogênio em cobertura e métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense* para atividade da enzima redutase do nitrato estágio V6 - V8 e V16 – V18 (ARN), clorofila total (CLOR), diâmetro do colmo (DCOL), altura de inserção da primeira espiga (ALTE), altura de plantas (ALTP) e população final de plantas (STAND)

Fonte de Variação	^{1/} GL	Quadrados Médios						
		ARN (V6 – V8)	ARN (V16 – V18)	CLOR	DCOL	ALTE	ALTP	STAND
Híbrido (H)	1	9,9487*	3,7387	679,47**	0,2138	0,6905**	0,4702**	236215,0
Dose (D)	2	2,2637	2,1457	69,307**	16,415**	0,0010	0,0021	14231956,3
Métodos (M)	3	0,7675	1,1687	9,0537	0,6982	0,0075	0,0105	6771497,9
Blocos	3	38,219**	2,0673	38,487*	1,8017	0,0558**	0,0707**	17794866,5
H x D	2	0,2045	0,1814	0,6079	0,9279	0,0121	0,0044	5373892,2
H x M	3	3,3259	2,2527	1,0370	1,7095	0,0063	0,0143	19605848,4
D x M	6	1,4889	0,9821	3,6829	2,5914	0,0031	0,0034	4704616,2
H x D x M	6	1,8978	2,5228*	6,6829	0,9343	0,0021	0,0029	4192816,9
Erro	69	1,7894	0,9681	7,5465	1,1615	0,0047	0,0052	9825176,3
^{2/} CV (%)		46,14	42,87	5,03	4,80	4,96	2,99	4,77

*, **: Significativos a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

^{1/}GL: Graus de liberdade; ^{2/}CV: Coeficiente de variação.

Além da ARN no estágio fenológico entre V6 – V8, outras variáveis também apresentaram apenas diferença entre os híbridos, sendo necessário estudar

isoladamente os híbridos; essas variáveis são: clorofila total, altura de inserção de espiga, altura de plantas, plantas acamadas, comprimento de espigas, número de grãos por fileira, número de fileiras por espiga, massa de mil grãos e produtividade de grãos (Tabelas 1 e 2).

Outro fator que apontou diferenças significativas foi doses de nitrogênio em cobertura para as variáveis: clorofila total, diâmetro basal do colmo, plantas acamadas, comprimento de espigas e número de grãos por fileira (Tabelas 1 e 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância da cultura do milho em função dos híbridos, doses de nitrogênio em cobertura e métodos de aplicação de *A. brasilense* para plantas acamadas (PA), comprimento de espigas (CESP), diâmetro de espigas (DESP), número de grãos por fileira (GRAFIL), número de fileiras por espigas (FILESP), massa de 1000 grãos (M1000) e produtividade (PROD)

Fonte de Variação	¹ GL	Quadrados Médios						
		PA	CESP	DESP	GRAFIL	FILESP	M1000	PROD
Híbrido (H)	1	1962,04*	6,92**	0,45**	135,4**	15,84**	3060,04**	8,53**
Dose (D)	2	1439,3*	6,36**	0,01	20,38**	0,510	476,13	7,35**
Métodos (M)	3	1052,8	0,82	0,027	6,24	0,122	100,03	0,05
Blocos	3	2770,1**	5,60**	0,28**	6,95	0,205	316,19	0,94
H x D	2	238,01	0,11	0,059*	1,53	0,593	553,63	0,40
H x M	3	638,62	0,72	0,022	3,18	0,316	172,45	1,088
D x M	6	525,72	0,71	0,007	1,50	0,205	233,20	2,71*
H x D x M	6	233,21	0,50	0,017	1,50	0,149	190,59	0,46
Erro	69	410,11	0,76	0,021	3,30	0,328	275,70	1,03
² /CV (%)		83,8	5,48	2,88	5,48	3,38	5,85	14,43

*, **: Significativos a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

¹/GL: Graus de liberdade; ²/CV: Coeficiente de Variação.

Analisando os dados do desdobramento da interação tripla da ARN (V16 – V18) para a interação que possui diferença significativa (Tabela 3), tem-se o resultado que o híbrido DKB 310, quando submetido a uma quantidade de 70 kg ha⁻¹ de N (Dose 3) e inoculação com *Azospirillum brasilense* nas sementes (Método 2), apresentou a maior atividade enzimática 4,16 µmoles de NO₂⁻ H⁻¹ g⁻¹ MF em relação ao híbrido BG 7046 com 0,824 µmoles de NO₂⁻ H⁻¹ g⁻¹ MF.

Tabela 3. Resumo da análise de variância, quadrados médios do desdobramento de híbridos dentro de cada combinação dos níveis doses de nitrogênio em cobertura e métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense*, para atividade da enzima redutase do nitrato no estádio V16 – V18

Fonte de Variação	Dose	Método	Graus de Liberdade	Quadrados Médios
Híbridos	1	1	1	0,017
Híbridos	1	2	1	0,059
Híbridos	1	3	1	1,401
Híbridos	1	4	1	2,333
Híbridos	2	1	1	0,059
Híbridos	2	2	1	0,104
Híbridos	2	3	1	0,373
Híbridos	2	4	1	3,668
Híbridos	3	1	1	0,390
Híbridos	3	2	1	16,72**
Híbridos	3	3	1	0,692
Híbridos	3	4	1	0,166
Erro	-	-	46	0,968

*, **: Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

García de Salamone e Döbereiner (1996), ao estudarem genótipos de milho e diferentes espécies de *Azospirillum*, notaram tanto o aumento como a queda de atividade da redutase do nitrato, e atribuíram tais respostas à dependência da inoculação em relação ao genótipo da planta e das espécies e estirpes bacterianas empregadas e a interação entre eles. As maiores atividades da ARN podem ser consideradas tanto pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), quanto pelo estímulo de maior absorção de nitrato pelas bactérias do gênero *Azospirillum* (Bashan e Levanony, 1990).

No desdobramento de doses dentro dos níveis de híbridos e métodos, percebe-se a significância para o híbrido DKB 310 com inoculação de *A. brasilense* nas sementes e para o híbrido BG 7046 com inoculação de *A. brasilense* nas folhas para ARN no estádio entre V16 – V18 (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância, quadrados médios, do desdobramento de doses dentro de cada combinação dos níveis de híbridos e métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense*, para atividade da enzima redutase do nitrato no estádio (V16 – V18)

Fonte de Variação	Híbrido	Método	Graus de Liberdade	Quadrados Médios
Doses	1	1	2	0,017
Doses	1	2	2	3,480*
Doses	1	3	2	0,377
Doses	1	4	2	0,332
Doses	2	1	2	0,418
Doses	2	2	2	1,848
Doses	2	3	2	4,659*
Doses	2	4	2	1,709
Erro	-	-	46	0,968

*, **: Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Estudando-se os desdobramentos significativos, nota-se o efeito da dose de 70 kg ha⁻¹ de nitrogênio em cobertura, que proporcionou incremento na ARN (V16 – V18) em relação à não aplicação de nitrogênio em cobertura, na combinação do híbrido DKB 310 e inoculação de *A. brasilense* nas sementes. Na combinação do híbrido BG 7046 e inoculação de *A. brasilense* nas folhas, as doses de 35 e 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura proporcionaram incremento na ARN em relação à não aplicação de N em cobertura (Tabela 5).

Tabela 5. Desdobramento da interação de doses de nitrogênio em cobertura dentro dos níveis de híbrido e métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense* para ARN (V16 – V18) em $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ H}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$

Doses	DKB 310 e inoculação nas sementes	BG 7046 e inoculação nas folhas
0 kg ha ⁻¹ de N	2,114 b	0,902 b
35 kg ha ⁻¹ de N	2,564 ab	3,045 a
70 kg ha ⁻¹ de N	4,164 a	3,076 a
¹ /DMS	1,946	1,946

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5% de probabilidade. ¹/DMS: Diferença mínima significativa.

As doses de nitrogênio também podem ter efeitos diretos na atividade da enzima redutase do nitrato, pois esta enzima é fortemente induzida pela presença do substrato nitrato, e quanto maior disponibilidade de nitrato no meio de crescimento há tendência de obter maiores valores de ARN (Araújo e Machado, 2006). Esta tendência foi observada no presente estudo de acordo com a significância das doses utilizadas em cobertura em relação à não aplicação de adubação de cobertura (Tabela 5).

No entanto alguns autores não encontram indução da ARN ao fornecer maiores quantidades de adubação nitrogenada. Foi o caso de Purcino et al. (1994), que ao estudarem 15 genótipos de milho separados em antigos e modernos, não constataram aumento de ARN com o incremento da dose de nitrogênio de 20 kg ha⁻¹ de N para 60 kg ha⁻¹ de N. Os mesmos autores também relataram que os ganhos de produtividade não foram acompanhados de aumentos na atividade da ARN.

Segundo Machado et al. (2013), a análise desta enzima é realizada pontualmente refletindo sua atividade metabólica e a condição ambiental a que ela esteja submetida naquele determinado momento; já a produtividade é influenciada por diversos fatores, incluindo aqueles que ocorrem depois das épocas de mensuração da ARN.

No desdobramento de métodos de aplicação de *A. brasilense* dentro de cada combinação dos níveis de híbridos e doses de nitrogênio em cobertura, percebe-se a significância para o híbrido DKB 310 e 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura e para o híbrido BG 7046 e 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância, quadrados médios do desdobramento de métodos de aplicação de *A. brasilense* dentro de cada combinação dos níveis de híbridos e doses de nitrogênio em cobertura, para atividade da enzima redutase do nitrato no estágio V16 – V18

Fonte de Variação	Híbrido	Dose	Graus de Liberdade	Quadrados Médios
Métodos	1	1	3	0,87
Métodos	1	2	3	1,36
Métodos	1	3	3	2,74*
Métodos	2	1	3	1,08
Métodos	2	2	3	1,02
Métodos	2	3	3	3,35*
Erro	-	-	46	0,97

*, **: Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Estudando-se os desdobramentos significativos, pode-se identificar o incremento da inoculação com *A. brasilense* na ARN V16 – V18 no método de inoculação nas sementes, para o híbrido DKB 310 e 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura, diferindo estatisticamente do tratamento sem inoculação com *A. brasilense* (Tabela 7).

Já na combinação do híbrido BG 7046 e 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura, não se constatou o efeito da inoculação com *A. brasilense* para ARN V16 – V18, visto que nenhum dos métodos de aplicação de *A. brasilense* diferiu significativamente do tratamento que não recebeu a inoculação com o microrganismo. Apesar da ausência de efeito da inoculação nestas condições, quando se compara os métodos, os que incrementaram a ARN V16 – V18 foram: inoculação nas folhas e inoculação nas sementes e nas folhas, em relação à inoculação deste microrganismo apenas nas sementes (Tabela 7).

Tabela 7. Desdobramento da interação de métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense* dentro dos níveis de híbrido e dose de nitrogênio em cobertura para ARN em $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ H}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$

Métodos	DKB 310 e 70 kg ha ⁻¹ de N	BG 7046 e 70 kg ha ⁻¹ de N
Sem inoculação	1,956 b	2,466 ab
Com inoculação nas sementes	4,164 a	0,824 b
Com inoculação nas folhas	2,397 ab	3,076 a
Com inoculação S+F ^{1/}	2,715 ab	3,048 a
^{2/} DMS	2,142	2,142

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5% de probabilidade. ^{1/}S+F= sementes e folhas. ^{2/}DMS: Diferença mínima significativa

Os dados da atividade da enzima redutase do nitrato no estágio V16 – V18 concordam com Antonyuk e Evseeva (2006), quando eles demonstraram que o genótipo da planta é um fator determinante para obtenção dos benefícios da inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum*. Outra interação que também já foi descrita por Dobbelaere et al. (2001) é a relação da inoculação com as doses de nitrogênio utilizadas; todas essas interações foram evidentes para esta variável, no presente trabalho, além de ter sido notado também a interação da forma de aplicação do microrganismo com estes fatores.

Outra variável em que foi necessário proceder ao desdobramento foi o diâmetro de espigas, que apresentou interação entre os fatores híbridos e doses de nitrogênio em cobertura (Tabela 8).

Tabela 8. Resumo da análise de variância, quadrados médios do desdobramento de híbridos dentro dos níveis doses de nitrogênio em cobertura, e desdobramento de doses de nitrogênio em cobertura dentro dos níveis de híbridos para a variável diâmetro de espigas

Fonte de Variação	Dose	Graus de Liberdade	Quadrados Médios
Híbridos	1	1	0,495**
Híbridos	2	1	0,018
Híbridos	3	1	0,193**
Erro	-	69	0,019
Fonte de Variação	Híbrido	Graus de Liberdade	Quadrados Médios
Doses	1	2	0,092*
Doses	2	2	0,019
Erro	-	69	0,019

*, **: Significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Analisando o desdobramento do fator híbridos dentro de cada nível de doses de nitrogênio em cobertura percebe-se que o híbrido BG 7046 apresentou maior diâmetro de espigas nas doses de 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura e sem aplicação de nitrogênio em cobertura em relação ao híbrido DKB 310 (Tabela 9). Procedendo ao desdobramento de doses de nitrogênio em cobertura dentro de cada nível de híbrido, para o híbrido DKB 310 a dose de 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura proporcionou maior diâmetro de espigas em relação à não aplicação de nitrogênio em cobertura, a dose de 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura não diferiu significativamente das demais (Tabela 9).

Tabela 9. Desdobramento da interação para a variável diâmetro de espigas em centímetros

Doses	DKB 310	BG 7046	DMS
0 kg ha ⁻¹ de N	4,78 b B	5,03 a A	0,098
35 kg ha ⁻¹ de N	4,93 a A	4,97 a A	0,098
70 kg ha ⁻¹ de N	4,88 b AB	5,04 a A	0,098
¹ /DMS	0,118	0,118	

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5% de probabilidade. ¹/DMS: Diferença mínima significativa

Estes dados estão de acordo com de Souza et al. (2003), que ao avaliarem três híbridos, encontraram diferença significativa entre o diâmetro médio de espigas, relatando que essa característica é determinada geneticamente e pode ser influenciada pelo ambiente; o que foi evidente no presente trabalho devido à interação para esta variável.

As variáveis que apresentaram significância apenas para híbridos e doses de nitrogênio em cobertura, de forma isolada, são apresentadas nas tabelas 10 e 11, respectivamente, demonstrando que a inoculação com *Azospirillum brasilense* não promoveu efeitos significativos sobre essas variáveis analisadas.

Encontra-se na Tabela 10 as principais variações entre esses dois híbridos, de forma que o híbrido que apresenta maior média para qualquer uma dessas variáveis citadas difere significativamente da menor média. Sendo assim, para as variáveis ARN (V6-V8), ALTE, PA, CESP, M1000, o híbrido DKB 310 mostrou-se superior em relação ao BG 7046. Já para as variáveis ALTP, ISPAD, FILESP, GRAFIL e PROD, o híbrido BG 7046 mostrou-se superior em relação ao DKB 310.

Tabela 10. Efeito do fator híbridos para atividade da enzima redutase do nitrato (ARN), altura de plantas (ALTP), altura de inserção da primeira espiga (ALTE), clorofila total (CLOR) plantas acamadas (PA), comprimento de espigas (CESP), número de fileiras de grãos (FILESP), número de grãos por fileira (GRAFIL), massa de 1000 grãos (M1000) e produtividade de grãos (PROD)

Híbridos	¹ ARN (V6 – V8)	ALTP (m)	ALTE (m)	CLOR (SPAD)	PA (%)	CESP (cm)	FILESP (un)	GRAFIL (un)	M1000 (g)	PROD (Mg ha ⁻¹)
DKB 310	3,27	2,35	1,47	51,99	28,69	16,31	16,54	31,96	289,44	6,75
BG 7046	2,52	2,49	1,30	57,31	19,64	15,56	17,35	34,33	278,14	7,35

Maior média na coluna difere significativamente da menor média na coluna pelo teste F.

¹ em $\mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

Todas essas diferenças entre os híbridos são devido às variações genéticas entre eles.

Para altura de inserção da primeira espiga, os dados corroboram Dotto et al. (2010), que ao estudarem dois híbridos sob inoculação e não inoculação nas sementes de milho com *H. seropedicae* em três doses de nitrogênio em cobertura, também não encontraram efeitos significativos para fator inoculação e doses de

nitrogênio em cobertura, mas encontraram diferença para esta variável entre os híbridos.

Para massa de 1000 grãos, Braccini et al. (2012) estudaram a inoculação nas sementes com *A. brasilense* sob diferentes doses recomendadas de nitrogênio em associação ou não com um bioestimulante, também não encontraram diferença significativa para nenhum dos tratamentos testados, estando de acordo com este trabalho. Dotto et al. (2010), também não encontraram efeito da inoculação de *A. brasilense* na massa de 1000 grãos, havendo diferença significativa nesta variável nos híbridos por eles estudados, o mesmo foi observado no presente estudo.

Para todas as variáveis que foram significativas em doses de N em cobertura, as maiores médias foram obtidas nos tratamentos de 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura e 70 kg ha⁻¹ de N, não diferindo significativamente entre si pelo teste de Tukey 5%, sendo os menores valores médios obtidos sem aplicação de N em cobertura (Tabela 11). A maior percentagem de plantas acamadas foi obtida no tratamento sem adubação em cobertura, e a menor percentagem na dose de 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura; já a dose de 35 kg ha⁻¹ de N teve comportamento intermediário, não diferindo significativamente nem do maior e nem do menor valor percentual de acamamento (Tabela 11).

Tabela 11. Efeito do fator doses de nitrogênio em cobertura para clorofila total (CLOR), diâmetro do colmo (DCOL), plantas acamadas (PA), comprimento de espigas (CESP) e número de grãos por fileira (GRAFIL)

Doses	CLOR (SPAD)	DCOL (mm)	CESP (cm)	GRAFIL (un)	PA (%)
0 kg ha ⁻¹ de N	53,019 b	21,692 b	15,50 b	32, 25 b	31,71 a
35 kg ha ⁻¹ de N	55,062 a	22,484 a	16,06 a	33,41 a	21, 87 ab
70 kg ha ⁻¹ de N	55,875 a	23,121 a	16,25 a	33, 78 a	18, 91 b
¹ /DMS	1,645	0,645	0,44	1,087	12,13

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

¹/DMS: Diferença mínima significativa.

Para teor de clorofila total observa-se a diferença significativa entre híbridos e entre doses de N em cobertura (Tabelas 10 e 11), o teor de clorofila total pelo método indireto de leitura Soil Plant Analysis Development (SPAD) tem boa correlação com teor de nitrogênio na folha e é um bom recurso para o diagnóstico rápido e ágil do estado nutricional das plantas.

Segundo Hurtado et al. (2010), além das doses de nitrogênio aplicadas, fatores como híbrido utilizado, estágio fenológico, folha avaliada, tipo de solo e

variáveis climáticas podem afetar as leituras do clorofilômetro. Como a maioria dessas condições foi equivalente para todos os tratamentos no presente trabalho, atribui-se as diferenças significativas das leituras encontradas à variação genotípica (híbridos) e às diferentes doses de nitrogênio em cobertura, estando de acordo com o que foi relatado por esses autores.

Granados et al. (2012) realizaram experimento em casa de vegetação, com duas variedades de trigo, testando a inoculação de *Azospirillum zae* e *Sinorhizobium meliloti* de forma separada e de forma conjunta misturando esses dois microrganismos, comparando-os a outros dois tratamentos: com adubação nitrogenada e sem adubação nitrogenada. Quando esses microrganismos foram inoculados separadamente, não houve efeito no teor de clorofila total (SPAD). O mesmo foi observado no presente estudo, pois foi utilizada uma única espécie de microrganismo.

Entretanto, quando a inoculação dessas duas bactérias foi feita de forma conjunta, houve efeito positivo no teor de clorofila total (SPAD) em relação ao tratamento sem adubação nitrogenada, tal efeito foi atribuído por esses autores pelo aumento na atividade da enzima nitrogenase provocado pela inoculação conjunta.

Para o diâmetro de colmo, apenas as doses de nitrogênio em cobertura geraram diferença significativa, o mesmo foi encontrado por Repke et al. (2013) que ao estudaram a inoculação de *A. brasilense* nas sementes em milho sob seis doses de nitrogênio, não constatarem influência da bactéria diazotrófica no diâmetro do colmo nos estádios vegetativos e reprodutivos. No entanto, descreveram equações quadráticas para as doses de nitrogênio em um intervalo de 0 a 180 kg ha⁻¹ de N. O mesmo não foi relatado por Dartora et al. (2013), que descrevem diferenças significativas tanto no estágio vegetativo como no reprodutivo para as estirpes SmR1 + AbV5 de *H. seropedicae* e *A. brasilense* respectivamente no diâmetro basal do colmo, que atribuíram tal feito pela capacidade de promoção de crescimento que as bactérias diazotróficas proporcionam às plantas.

Nos componentes de produção, comprimento de espiga e grãos por fileira não demonstraram efeito às inoculações com *A. brasilense*; houve efeito para híbridos e doses de N em cobertura, corroborando Dotto et al. (2010), que constatarem diferença apenas entre híbridos para comprimento de espigas, e Novakowski et al.

(2011), que relataram diferença para a variável grãos por fileira, quando usaram adubação com 75 kg ha⁻¹ de N e 150 kg ha⁻¹ de N.

Segundo Ritchie et al. (2003), no estágio V12 há a definição do tamanho da espiga e número de óvulos (grãos potenciais), e deficiências de nutrientes e de umidade podem diminuir seriamente o número de grãos e o tamanho das espigas colhidas, sendo assim os tratamentos com *A. brasilense* não tiveram a capacidade de aumentar a absorção de nutrientes de forma significativa que pudessem gerar incrementos nessas variáveis.

A percentagem de acamamento no presente trabalho foi maior quando comparada com outros trabalhos. Segundo Cruz et al. (2003), a percentagem de acamamento é um fenômeno complexo e sua manifestação está ligada a fatores genéticos, inter-relacionados com fatores do clima, solo, manejo cultural adotado, relação fonte e dreno, equilíbrio em relação potássio e nitrogênio e danos gerados por pragas e doenças. Apesar da variável acamamento ocorrer de forma aleatória, foi possível identificar, dentre esses dois híbridos, o mais tolerante ao acamamento (BG 7046); e que o aumento das doses de N em cobertura auxiliaram na maior tolerância ao acamamento.

Na produção de grãos de milho percebe-se a interação entre doses de nitrogênio em cobertura e entre métodos de aplicação de *Azospirillum brasilense*, o desdobramento desta interação encontra-se na Tabela 12.

Tabela 12. Resumo da análise de variância, quadrados médios do desdobramento de doses de nitrogênio em cobertura dentro dos níveis de métodos de aplicação de *A. brasilense*, e desdobramento de métodos de aplicação de *A. brasilense* dentro dos níveis de doses de nitrogênio em cobertura para produção de grãos de milho

Fonte de Variação	Método	Graus de Liberdade	Quadrados Médios
Doses	1	2	4,91*
Doses	2	2	4,38*
Doses	3	2	4,51*
Doses	4	2	1,65
Erro	-	69	1,03
Fonte de Variação	Dose	Graus de Liberdade	Quadrados Médios
Métodos	1	3	1,13
Métodos	2	3	3,28*
Métodos	3	3	1,06
Erro	-	69	1,03

*, **: Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Analisando o desdobramento de métodos de aplicação de *A. brasilense* dentro de cada nível de doses de N em cobertura não foi constatado o efeito da

inoculação para a produção de grãos, embora na dose de 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura a inoculação com *A. brasilense* nas sementes diferiu significativamente da inoculação com *A. brasilense* nas folhas, nenhum dos métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense* diferiram estatisticamente do tratamento testemunha sem inoculação (Tabela 13).

Tabela 13. Desdobramento da produção de grãos em Mg ha⁻¹

Métodos	0 kg ha ⁻¹ de N	35 kg ha ⁻¹ de N	70 kg ha ⁻¹ de N	DMS
Sem Inoculação	6,11 b A	7,63 a AB	7,18 ab A	1,22
Com inoculação nas Sementes	6,32 b A	7,80 a A	7,08 ab A	1,22
Com inoculação nas folhas	6,97 ab A	6,39 b B	7,88 a A	1,22
Com inoculação S+F*	6,64 a A	7,02 a AB	7,54 a A	1,22
¹ /DMS	1,34	1,34	1,34	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5% de probabilidade; Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5% de probabilidade; *S+F= sementes + folhas.

¹/DMS: Diferença mínima significativa.

A inoculação de microrganismos por pulverização nas folhas outrora foi testada por Zilli et al. (2008), quando relataram o efeito positivo da inoculação com *Bradyrhizobium* na soja, independentemente do método utilizado, porém relataram que a inoculação por pulverização não deve ser uma prática que substitua a inoculação tradicional nas sementes, visto que o melhor resultado ocorreu com a segunda ação. Apesar da ausência de efeito da inoculação no presente estudo, comparando-se os métodos de aplicação de *A. brasilense*, também se conclui que a aplicação nas folhas não deve substituir o método de aplicação nas sementes (Tabela 13).

A despeito de todas as vantagens que as bactérias diazotróficas - como as do gênero *Azospirillum* - proporcionam às plantas, no presente estudo foi possível perceber que a única variável em estudo que respondeu a inoculação com essas bactérias foi a atividade da enzima redutase do nitrato no estágio V16 – V18, e apenas para um dos híbridos e mesmo com este incremento de atividade enzimática isto não resultou em maiores produtividades de grãos, como já foi explicado anteriormente.

Vários outros trabalhos com inoculação de *Azospirillum brasilense* relataram a ineficiência da inoculação na produção de grãos. Repke et al. (2013) citaram o não efeito da inoculação em nenhuma das variáveis por eles analisadas e atribuíram como possível causa da ineficiência da inoculação o inoculante que possuía um

valor de células viáveis bem acima do preconizado na literatura, causando assim efeito inibitório nos possíveis benefícios que essas bactérias poderiam proporcionar às plantas de milho; o mesmo pode ter ocorrido no presente trabalho visto que o inoculante utilizado foi semelhante ao utilizado por eles.

Outro trabalho que referenciou a ausência de efeito da inoculação com bactérias diazotróficas foi o de Dotto et al. (2010), que também não encontraram efeito da inoculação na produção de grãos, mas observaram o efeito dos genótipos de milho, demonstrando que híbridos apresentam comportamento diferenciado quando inoculados; o mesmo não ocorreu no presente trabalho visto que não houve a interação entre híbridos e inoculações.

As características do solo e estresses ambientais também podem levar ao insucesso da inoculação, como foi relatada por Dartora et al. (2013), que não encontraram efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, relatando que valores de pH de solo têm efeito direto na atividade microbiana do solo, sendo que níveis de pH em torno de 6,0 e 6,5 são considerados adequados para a máxima atividade microbiana no solo, já níveis de pH abaixo ou acima desses valores podem prejudicar o crescimento e o estabelecimento de microrganismos no solo.

No presente estudo procedeu-se a calagem a fim de atenuar este efeito e estimular a atividade microbiana do solo, mesmo assim não foi possível constatar o efeito da inoculação com *A. brasilense*.

No desdobramento de doses de nitrogênio em cobertura dentro de métodos de aplicação de *A. brasilense* verifica-se que no método de inoculação nas sementes e na testemunha sem inoculação, a dose de 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura proporcionou incremento significativo na produção de grãos de milho em relação a não aplicação de nitrogênio em cobertura, e a dose de 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura não diferiu estatisticamente dessas duas doses (Tabela 13). No desdobramento do fator doses de N em cobertura dentro do nível de método de inoculação de *Azospirillum brasilense* nas folhas, a dose de 70 kg ha⁻¹ de N em cobertura incrementou significativamente a produção de grãos em relação à dose de 35 kg ha⁻¹ de N em cobertura, e a não aplicação de nitrogênio em cobertura não diferiu estatisticamente dessas duas doses (Tabela 13).

Como já relatado na literatura, acerca das interações entre bactérias diazotróficas, genótipos, doses de nitrogênio, manejo e ambiente, o presente trabalho demonstra também a interação com o modo de aplicação de *A. brasilense*; visto principalmente as diferentes respostas para esses modos de aplicação na ARN e na produção de grãos.

Segundo Dobbelaere et al. (2001), as respostas de inoculação com *Azospirillum brasilense* têm relação com as doses de nitrogênio utilizadas, com o teor de matéria orgânica do solo e a parte física do solo, relatando que as respostas mais significativas de *A. brasilense* são obtidas em condições de utilização de doses baixas e intermediárias de nitrogênio, solos com menor teor de matéria orgânica e solos mais leves. Há respostas de *A. brasilense* em doses mais altas de nitrogênio, solos pesados e maior teor de matéria orgânica, no entanto essas respostas são mais discretas, e muita das vezes não geram diferença significativa.

Segundo Atkison e Watson (2000) é importante o estudo dos vários fatores que interagem com os microrganismos para a definição de sistemas de manejo que possam auxiliar as bactérias diazotróficas, de forma que se consiga maximizar os efeitos benéficos que esses microrganismos possam oferecer.

Conclusões

Independentemente do método de aplicação, a inoculação com *Azospirillum brasilense* não teve efeito no desenvolvimento das plantas de milho e não incrementou a produtividade de grãos.

A adubação nitrogenada em cobertura é prática indispensável, proporcionando incremento no desenvolvimento das plantas de milho.

Referências

- ANDA, Associação nacional para difusão de adubos em: <http://www.anda.org.br/estatistica/comentarios.pdf> Acesso em: 14 de maio de 2014.
- ANTONYUK, L. P.; EVSEEVA, N. V. Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. **Microbiology**, v.75, p.470-475, 2006.

ARAÚJO, A. P.; MACHADO, C. T. T. In: Fernandes, M. S. Nutrição Mineral de Plantas. **Sociedade Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, 2006. 59-78p.

ARGENTA, G.; DA SILVA, P. R. F.; BORTOLINI, C. G.; FORSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.158-167, 2001.

ATKINSON, D. C. E WATSON, A. The beneficial rhizosphere: a dynamic entity. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.99-104, 2000.

BALDANI, V.L.D.; ALVARES, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v.90, p.35-46, 1986.

BASHAN, Y. E LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canada Journal of Microbiology**, v.36 p.593-596, 1990.

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

BRASIL. Regras para análise de sementes, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 1 ed. Brasília: Secretaria de Defesa Sanitária, 2009. 345-346 p.

COELHO, A. M. Nutrição e adubação do milho. In: CRUZ, J. C. (eds) **Sistema de Produção**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010. Versão eletrônica. (Documentos EMBRAPA-CNPMS) Disponível em:

http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/ferraduba.htm>. Acesso em: 8 mar. 2014.

CRUZ, P. J.; CARVALHO, F. I. F.; SILVA, S. A.; KUREK, A. J.; BARBIERI, R. L.; CARGNIN, A. Influência do acamamento sobre o rendimento de grãos e outros caracteres em trigo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.1, p.05-08, 2003.

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

DE SOUZA, L. C. F.; FEDATTO, E.; GONÇALVES, M. G.; SOBRINHO, T. A.; HOOGERHEIDE, H. C.; VIEIRA, V. V. Produtividade de grãos de milho irrigado em função da cultura antecessora e de doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v 2, n.2, p.44-51, 2003.

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

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.5, n.3, p.376–382, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999.

FANCELLI, A. L. Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes na cultura de milho. **Informações Agrômicas**, POTAFOS, Piracicaba, n.131, p.1-10, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, (UFLA), v.35 n.6, p.1039-1042, 2011.

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

GRANADOS, C. J. B.; LAZAROVITS, G.; NIELSEN, L.; QUINTAN, M.; ADESINA, M.; QUIGLEY, L.; LALIN, I.; IBBOTSON, C. Effect of inoculation with rizospheric bactéria in two varieties of wheat phase II: greenhouse. **Revista Mexicana de Ciências Agrícolas**, v.3, n.5, p.985-997, 2012.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação e rendimento a baixo custo. Londrina: **Embrapa Soja (Documentos, 325)**, p 21-25, 2011.

HURTADO, S. M. C.; SILVA, C. A.; RESENDE, A. V.; CORAZZA, E. J.; SHIRATSUCHI, L. S.; HIGASHIKAWA, F. S. Sensitivity of the chlorophyll meter for nutritional diagnostic nitrogen in corn (*Zea mays* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.3, p.688-697, 2010.

JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Londres, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.

KLEPPER, L.; FLESCER, D.; HAGEMAN, R. D. Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves, **Plant Physiol**, v.48, p.580-590, 1971.

MACHADO, V. J.; DE SOUZA, C. H. E.; RIBEIRO, V. J.; CAIXETA, C. G. Atividade da redutase do nitrato e desenvolvimento de milho irrigado adubado com fosfato monoamômico polimerizado. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.12, n.3, p.203-213, 2013.

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

PURCINO, A. A. C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, A. T.; MARRIEL, I. E. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.6, n.1, p.41-46, 1994.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S., CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v.29, n.5, p.1114-1120, 2006.

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

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. Como planta de milho se desenvolve. POTAFOS. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.103, p.1-11, 2003.

SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2 ed. Brasília: Embrapa Cerrados, 2004. 416p.

ZILLI, J. D.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.4, p.541-544, 2008.