

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**QUANTIFICAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA ABSORÇÃO DE
NITROGÊNIO PELA CULTURA DO MILHO**

ÉRICA DE OLIVEIRA ARAÚJO

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2014**

**QUANTIFICAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS NA ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO PELA
CULTURA DO MILHO**

ÉRICA DE OLIVEIRA ARAÚJO

Engenheira Agrônoma

Orientador: Dr. ANTONIO CARLOS TADEU VITORINO

Co-Orientador: Dr. FÁBIO MARTINS MERCANTE

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A663q	Araújo, Érica de Oliveira Quantificação da contribuição de bactérias diazotróficas na absorção de nitrogênio pela cultura do milho. / Érica de Oliveira Araújo – Dourados, MS: UFGD, 2014. 147f. il. Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Tadeu Vitorino. Tese (Doutorado em Agronomia) FCA - (Faculdade de Ciências Agrárias) – Universidade Federal da Grande Dourados. 1. <i>Zea mays</i>. 2. <i>Azospirillum brasilense</i>. 3. <i>Herbaspirillum seropedicae</i>. 4. Adubação nitrogenada. 5. ¹⁵N. 6. Fixação biológica de nitrogênio. I. Título. CDD – 631.86
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte

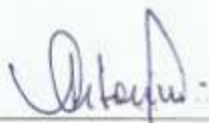
**QUANTIFICAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS NA ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO PELA CULTURA
DO MILHO**

por

ÉRICA DE OLIVEIRA ARAÚJO

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTOR EM AGRONOMIA

Aprovado em 28/03/2014



Dr. Antonio Carlos Tadeu Vitorino
Orientador – UFGD/FCA



Dr. Fábio Martins Mercante
Co-Orientador - EMBRAPA/CPAO



Dra. Marlene Estevão Marchetti
UFGD/FCA



Dr. Alessandra Mayumi Tokura
Alovise
UFGD/FCA



Fábio Lopes Olivares
UENF

DEDICO.

Aos meus pais Antonio Alves de Araújo e Maria Alice de Oliveira Araújo, a minha irmã Ednéia de Oliveira Araújo e ao meu esposo Wendell Rodrigues de Oliveira Lima por todo amor, confiança, apoio e por serem exemplos de vida. Muitas vezes, abdicando de seus próprios desejos e sonhos para garantir que eu os tivesse. Eternamente grata pela força e inspiração. Amo todos vocês!

OFEREÇO.

À meu Tio Celestino de Oliveira
À meu Orientador Antonio Carlos Tadeu Vitorino e meu Co-orientador Fabio Martins Mercante.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por conceder-me força, coragem e sabedoria para vencer mais um desafio.

Aos meus pais Antonio Alves de Araújo e Maria Alice de Oliveira Araújo que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com respeito e dignidade.

Ao meu esposo Wendell Rodrigues de Oliveira Lima, por todo amor, amizade, dedicação, companheirismo, por sempre me acalmar nos momentos difíceis e por seus conselhos e preocupações.

Ao meu Tio Celestino de Oliveira que me incentivou a buscar novos conhecimentos por meio da Pós-graduação.

Ao meu orientador Dr. Antonio Carlos Tadeu Vitorino e Co-orientador Dr. Fábio Martins Mercante, não somente pelas orientações, mas por todos os ensinamentos, pelo exemplo profissional, pela confiança em mim depositada, pelo incentivo e apoio durante a execução desta pesquisa.

À Universidade Federal da Grande Dourados e ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade da formação concedida.

À banca examinadora de Qualificação Dra. Marlene Estevão Marchetti, Dra. Cácia Leila Tigre Pereira Viana e Dr. Munir Mauad e a banca de Defesa Dra. Marlene Estevão Marchetti, Dra. Alessandra Mayumi Tokura Alovisei, Dr. Fábio Lopes Olivares, Dr. Antonio Carlos Tadeu Vitorino e Dr. Fábio Martins Mercante pelas valiosas sugestões e correções.

A CAPES, pela concessão de Bolsa de Doutorado.

À Embrapa Agropecuária Oeste, pelo apoio logístico para realização dos trabalhos e orientação, incluindo todos os funcionários, principalmente os do campo experimental.

À Embrapa Agrobiologia pelo apoio estrutural e pessoal para a realização de algumas etapas desta pesquisa.

Ao Dr. Segundo Sacramento Urquiaga Caballero e Dr. Márcio Reis Martins pelo acompanhamento e orientação na execução de parte desta pesquisa.

Ao técnico do Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição Mineral de Plantas, João Augusto Machado da Silva pelo valoroso auxílio.

Aos amigos de Pós-graduação e graduação, Danieli Pieretti Nunes, Carla Gordin, Gabriel Queiroz de Oliveira, Leandro Ramão Paim, Maira Rejane Costa e Diego Augusto Espindola Mendes pela amizade e apoio na condução desta pesquisa.

A todos os funcionários da Fazenda Experimental, em especial ao “Seu Jesus” e “Seu Milton” pelos inúmeros esclarecimentos e auxílios.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte deste caminho e contribuíram para a realização desta pesquisa.

Muito obrigada!

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ÉRICA DE OLIVEIRA ARAÚJO nascida em Jaciara – MT, no dia 25 de outubro de 1986, filha de Antonio Alves de Araújo e Maria Alice de Oliveira Araújo. Conclui o ensino médio e obteve o título de Técnico Agrícola com habilitação em Zootecnia pela Escola Agrotécnica Federal de Colorado do Oeste- RO, em 2003. Em agosto de 2008 graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), em Cáceres - MT, sendo bolsista de Iniciação Científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Em março de 2009, ingressou no programa de pós-graduação, em nível de Mestrado, em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), em Aquidauana – MS. Durante o mestrado, foi bolsista da CAPES. Em março de 2011 ingressou-se no programa de pós-graduação, em nível de Doutorado, em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados - MS, sendo bolsista de doutorado pela CAPES. Em Maio de 2013, concluiu a pós-graduação em nível de especialização em Docência e Gestão do Ensino Superior. Em setembro de 2013, iniciou o curso de pós-graduação em nível de especialização em Geoprocessamento Ambiental, pelo Instituto Federal de Rondônia (IFRO).

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA.....	6
A cultura do Milho.....	6
Bactérias diazotróficas.....	7
Gênero <i>Azospirillum</i>	9
Gênero <i>Herbaspirillum</i>	11
Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas.....	13
Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura do milho	14
Conclusões.....	17
Referências Bibliográficas.....	18
CAPÍTULO II - EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA ASSOCIADA À INOCULAÇÃO COM <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> NA CULTURA DO MILHO	27
Resumo.....	27
Abstract.....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	31
Resultados e Discussão.....	35
Conclusões	45
Referências Bibliográficas.....	46
CAPÍTULO III - EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA ASSOCIADA À INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SOBRE A EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N ₂ NA CULTURA DO MILHO DETERMINADA COM USO DE ¹⁵ N.....	51
Resumo.....	51
Abstract.....	52
Introdução.....	53
Material e Métodos.....	55

Resultados e Discussão.....	60
Conclusões	69
Referências Bibliográficas.....	70
CAPÍTULO IV - INOCULAÇÃO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> EM TRÊS GENÓTIPOS DE MILHO SOB DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO	76
Resumo.....	76
Abstract.....	77
Introdução.....	78
Material e Métodos.....	80
Resultados e Discussão.....	83
Conclusões	95
Referências Bibliográficas.....	96
CAPÍTULO V – INOCULAÇÃO COM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> E FERTILIZAÇÃO NITROGENADA SOBRE A EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DO N POR DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO....	101
Resumo.....	101
Abstract.....	102
Introdução.....	103
Material e Métodos.....	105
Resultados e Discussão.....	108
Conclusões	118
Referências Bibliográficas.....	119
CAPÍTULO VI – NITROGÊNIO E INOCULAÇÃO COM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> NA CULTURA DO MILHO EM CONDIÇÕES DE SOLO FÉRTIL.....	123
Resumo.....	123
Abstract.....	124
Introdução.....	125
Material e Métodos	127
Resultados e Discussão.....	130
Conclusões	139
Referências Bibliográficas.....	140
CONCLUSÕES GERAIS.....	145
CONSIDERAÇÕES FINAIS	147

QUANTIFICAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO PELA CULTURA DO MILHO

RESUMO

As bactérias diazotróficas endofíticas associadas a gramíneas apresentam grande potencial para o uso como biofertilizantes, sendo, que o aproveitamento eficiente do nitrogênio é um fator essencial para uma agricultura sustentável e para o agronegócio mundial. Diante do exposto, o objetivo desta tese foi quantificar a contribuição de bactérias diazotróficas na absorção de nitrogênio pela cultura do milho em um Latossolo Vermelho distroférrico, avaliando os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas associada à adubação nitrogenada sobre a produtividade de grãos de milho, a absorção de nitrogênio pelo milho, o acúmulo de nutrientes pela cultura, a eficiência de utilização do nitrogênio e a contribuição da fixação biológica de nitrogênio. O primeiro estudo foi realizado no campo experimental da Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados-MS. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com nove tratamentos e seis repetições. Os parâmetros avaliados foram: altura das plantas, diâmetro do colmo, altura de inserção de espiga, massa de espiga, comprimento de espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por espiga, diâmetro da base da espiga, massa de mil grãos, massa seca da parte aérea, produtividade, teor de clorofila, teor de nutrientes nas folhas e nos grãos de milho, quantidade de N acumulada na planta, porcentagem de N na planta proveniente do fertilizante, quantidade de N na planta proveniente do fertilizante, eficiência de utilização do N aplicado como fertilizante e a porcentagem de fixação biológica de N. O segundo estudo foi realizado em casa de vegetação, na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados-MS. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial $3 \times 2 \times 2$, sendo, três híbridos de milho: Maximus, P3646H e BRS3035; plantas inoculadas e não inoculadas e duas doses de nitrogênio: 0,0 e 80 kg ha⁻¹, com quatro repetições. Aos 35 dias após a emergência, foi determinada a altura de plantas, o diâmetro do colmo, o teor de clorofila, o comprimento de raiz, o volume de raiz, o teor de N na parte aérea e na raiz, bem como a eficiência de absorção e utilização de N. A terceira pesquisa foi conduzida na área experimental da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados-MS. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com cinco repetições. Os tratamentos foram dispostos em arranjo fatorial 2×5 , ou seja, ausência e presença de inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* e cinco doses de nitrogênio (0, 48, 72, 96 e 120 kg ha⁻¹). Os parâmetros avaliados foram: altura de inserção de espiga, diâmetro do colmo, massa de espiga, comprimento de espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por espiga, diâmetro da base da espiga, massa de mil grãos, massa seca da parte aérea, produtividade, teor de clorofila e teor de N nas folhas de milho. Os resultados obtidos permitiram concluir que a adubação nitrogenada associada a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* influenciaram positivamente a massa de espiga, diâmetro de espiga, número de grão por espiga, massa seca da parte aérea, produtividade e teor de clorofila de plantas de milho. Os teores de N, P, K e Zn nas

folhas de milho aumentaram com a adubação nitrogenada e a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. A inoculação com *Azospirillum brasilense* sem adubação nitrogenada promoveu maiores acúmulos de N, K, Ca e Mg nos grãos em relação aos tratamentos inoculados com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* e, adubados com 30 e 120 kg ha⁻¹ de N. A inoculação de *Azospirillum brasilense* ou *Herbaspirillum seropedicae* associada à adubação nitrogenada pode proporcionar uma redução no uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos na cultura do milho. Pela técnica da abundância natural do ¹⁵N, a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* contribui em média com 19,40 e 9,49%, respectivamente, do N necessário ao desenvolvimento da cultura do milho. O híbrido BRS 3035 se destaca para a maioria das variáveis analisadas, produzindo maior quantidade de massa seca de parte aérea, plantas com maior altura, volume de raízes e apresentando maiores índices de eficiência de utilização de N. A inoculação com a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae* promoveu aumento no volume de raízes, comprimento de raízes, massa seca da parte aérea, teor de clorofila, teor de N na parte aérea, eficiência de absorção do N e eficiência de utilização do N por plantas de milho. A inoculação da estirpe Z-94 de *H. seropedicae* acrescido de 80 kg ha⁻¹ de N aumentou o teor de N na parte aérea das plantas de milho em até 25% nos genótipos avaliados. Existe distinção entre genótipos de milho para produção de massa seca da parte aérea e porcentagem de N na parte aérea proveniente do fertilizante. O híbrido P3646H e o híbrido BRS3035 apresentaram aumentos de 34,3% e 64,4%, respectivamente, na eficiência de utilização do N quando inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* sem adição de N. As plantas de milho, mesmo em solo fértil, responderam à aplicação de nitrogênio para os diferentes componentes de produção, e nessas condições a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* não influenciou nenhuma das variáveis estudadas.

Palavras-chave: *Zea mays* L., *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, adubação nitrogenada, ¹⁵N, fixação biológica de nitrogênio.

QUANTIFICATION OF CONTRIBUTION OF DIAZOTROPHIC BACTERIA IN NITROGEN UPTAKE BY CORN CULTURE

ABSTRACT

The endophytic diazotrophic bacteria associated with grasses have great potential for use as biofertilizers, being that the efficient use of nitrogen is an essential factor for a sustainable agriculture and to the global agribusiness. Given the above, the objective of this thesis was to quantify the contribution of diazotrophic bacteria in nitrogen uptake by corn culture in a distroférico Red Latosol, evaluating the effects of inoculation of diazotrophic bacteria associated to nitrogen fertilization on productivity of maize grains, nitrogen uptake by corn, the accumulation of nutrients by culture, nitrogen use efficiency and the contribution of biological nitrogen fixation. The first study was carried out in the experimental field of Embrapa Agropecuária Oeste, in Dourados-MS. the experimental design used was randomized blocks, with nine treatments and six replications. The parameters evaluated were: height of the plants, culm diameter, height of insertion of cob, cob mass, spike length, number of rows of grains per spike, number of grains per spike, spike base diameter, mass of thousand grains, dry mass of the aerial part, productivity, chlorophyll content, content of nutrients in leaves and grains of maize, amount of N accumulated in plant, percentage of N in the plant from the fertilizer, quantity of N in the plant from the fertilizer, efficiency of utilization of the N applied as fertilizer and the percentage of biological fixation of N. The second study was conducted in a greenhouse at the Faculty of agricultural sciences of the University Federal of Great Dourados, in Dourados-MS. the experimental design used was the completely randomized design in factorial scheme 3 x 2 x 2, and three hybrids of corn: Maximus, P3646H and BRS3035; inoculated and non-inoculated plants and two doses of nitrogen: 0.0 and 80 kg ha⁻¹, with four replicates. To 35 days after emergence, plant height was determined, the culm diameter, the chlorophyll content, root length, root volume, the concentration of N in the shoot and root, as well as the efficiency of absorption and use of N. The third survey was conducted in the experimental area of the Faculty of agricultural sciences of the University Federal of Great Dourados, in Dourados-MS. the experimental design used was randomized blocks with five repetitions. Treatments were arranged in factorial arrangement 2 x 5, namely the absence and presence of *Herbaspirillum seropedicae* and inoculation with five nitrogen doses (0, 48, 72, 96 and 120 kg ha⁻¹). The parameters evaluated were: height of insertion of cob, culm diameter, mass of spike, spike length, number of rows of grains per spike, number of grains per spike, spike base diameter, mass of thousand grains, dry mass of the aerial part, productivity, chlorophyll content and N content in the leaves of corn. The obtained results allowed concluding that the nitrogen fertilization associated with inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* positively influenced the mass of cob, COB diameter, number of grain per Spike, aerial dry mass, productivity and chlorophyll content of corn plants. The levels of N, P, K, and Zn in the leaves of maize increased by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense* and

Herbaspirillum seropedicae. The inoculation with *Azospirillum brasilense* without nitrogen fertilization promoted greater accumulation of N, K, Ca and Mg in grains in relation to the treatments inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* and composted with 30 and 120 kg ha⁻¹ of N. The inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* or associated with nitrogen fertilization can provide a reduction in use of synthetic nitrogen fertilizers on maize culture. The technique of natural abundance of ¹⁵N, inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* contributes on average with 19.40% and 9.49%, respectively, of the N needed for the development of the culture of corn. The hybrid BRS 3035 stands out for most of the variables analyzed, producing greater amount of dry mass of aerial part, plants with greater height, root volume and highest rates of N use efficiency. Inoculation with strain Z-94 of *Herbaspirillum seropedicae* promoted increase in the volume of roots, root length, dry mass of the aerial part, chlorophyll content, content of N in aboveground, absorption efficiency of N and N utilization efficiency by corn plants. Inoculation of strain Z-94 of *H. seropedicae* plus 80 kg ha⁻¹ of N increased the concentration of N in the aerial part of plants of corn by as much as 25% in the evaluated genotypes. There is no distinction between maize genotypes for dry matter production of aerial part and percentage of N in aboveground from fertilizer. The P3646H and BRS3035 hybrid hybrid showed 34.3% increases and 64.4%, respectively, in the efficiency of use of *Herbaspirillum seropedicae* N when inoculated with no added N. Corn plants, even in fertile soil, responded to nitrogen application for the different components of production, and under such conditions, inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* did not influence any of the variables studied.

Key words: *Zea mays* L., *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, nitrogen fertilization, ¹⁵N, nitrogen biological fixation.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil ocupa a terceira posição no *ranking* em produção de grãos de milho, sendo superado apenas por EUA e China. A estimativa de área plantada com milho na safra 2012/2013 foi de 15.416,8 milhões de hectares com uma produção de 76.011,0 milhões de toneladas de milho (CONAB, 2013). Além desta expressiva área cultivada no território brasileiro, a cultura gera empregos no setor agrícola e tem grande importância pela utilização direta na alimentação humana e de animais.

Dentre os nutrientes minerais, o nitrogênio (N) é o elemento requerido em maior quantidade pela maioria das plantas, sendo fundamental no metabolismo vegetal, pois exerce importante função nos processos bioquímicos e fisiológicos da planta. Contudo, o único processo biológico de obtenção de N, disponível na natureza, e que pode beneficiar as plantas, é a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (ALVES, 2007). O processo de FBN é realizado por um grupo restrito de organismos ditos diazotróficos, com destaque para as bactérias que vivem em associação com as plantas. Essas bactérias contêm o complexo enzimático da nitrogenase, sendo capazes de quebrar a tripla ligação que une os dois átomos de nitrogênio e fazer a redução do N_2 à amônia (NH_3).

Além da capacidade de FBN, as bactérias diazotróficas em associação com gramíneas são conhecidas por atuarem diretamente na produção de hormônios como auxinas, giberilinas e citocininas (DOBBELAERE et al., 2003; KHALIQ et al., 2004; DONATE-CORREA et al., 2004; RADWAN et al., 2004; CREUS et al., 2004); solubilização de fosfatos e óxidos de zinco (RODRIGUEZ et al., 2004; BALDOTTO et al., 2010); aumento da atividade da redutase do nitrato, quando ocorrem endofiticamente nas plantas (CÁSSAN et al., 2008) e indiretamente no controle biológico de patógenos (MARIANO et al., 2004; CORREA et al., 2008).

Bactérias diazotróficas, dos mais diferentes gêneros e espécies, têm sido relatadas em associação com um grande número de gramíneas, tanto de clima tropical como em clima temperado (REIS JUNIOR et al., 2008), sendo que a possibilidade da ocorrência de aumentos significativos na produtividade e na disponibilidade de nitrogênio por meio da FBN na cultura do milho tem sido descrita por vários autores (ALVES, 2007; ZILLI et al., 2008; REIS JUNIOR et al., 2008;

DALLA SANTA et al., 2008; MONTANEZ et al., 2009; HUNGRIA et al., 2010; DOTTO et al., 2010; ALVES, 2011; LANA et al., 2012; BRACCINI et al., 2012).

O interesse crescente pelo uso de inoculantes contendo essas bactérias que promovem o crescimento de plantas e incrementam a produtividade deve-se ao alto custo dos fertilizantes químicos e à conscientização em prol de uma agricultura sustentável e menos poluente (HUNGRIA et al., 2011). As projeções são de que, nos próximos anos, haverá um incremento substancial no uso de fertilizantes no Brasil para atender a intensificação da agricultura. Porém, o mercado brasileiro de fertilizantes é frágil e com grande dependência das importações, sendo fundamental encontrar alternativas para o uso mais eficiente dos fertilizantes e, nesse contexto, as bactérias fixadoras de nitrogênio e/ou promotoras do crescimento de plantas podem desempenhar um papel relevante e estratégico para garantir altas produtividades a baixo custo e com menor dependência de importação de insumos. Estima-se que a economia resultante pela inoculação com essas bactérias em gramíneas possa ser na ordem de 2 bilhões de dólares por ano (HUNGRIA et al., 2011).

Com base nos pontos abordados, a utilização e o conhecimento das potencialidades dessas bactérias que aportam N via fixação biológica, e que contribuem para o aumento da eficiência de utilização dos fertilizantes como alternativa para nutrição nitrogenada representa uma estratégia economicamente viável. Todavia, espera-se que a produção de grãos possa ter seus custos reduzidos pelo aumento do uso e eficiência da FBN e que a aplicação dessa forma alternativa de adubo, reduza a necessidade de aplicação de N fertilizante para a cultura do milho, economizando recursos, garantindo a segurança alimentar e preservando o meio ambiente.

Para tanto, a hipótese deste trabalho é que a inoculação com bactérias diazotróficas pode suprir parcialmente as necessidades de nitrogênio para a cultura do milho por meio da fixação biológica de nitrogênio. Assim, o objetivo desta tese foi quantificar a contribuição de bactérias diazotróficas na absorção de nitrogênio pela cultura do milho em um Latossolo Vermelho distroférrico, avaliando os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas associada à abubação nitrogenada sobre: (i) a produtividade de grãos de milho (ii) a absorção de nitrogênio pelo milho; (iii) o acúmulo de nutrientes pela cultura, (iv) a eficiência de utilização do nitrogênio; e (v) a contribuição da fixação biológica de nitrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. C. **Efeito da Inoculação de Bactérias dos Gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na Cultura do Milho**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

ALVES, G. C. **Estudo da interação da bactérias BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae* com plantas de milho**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2011. 52 p. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

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

BALDOTTO, L. E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F. L.; PIO VIANA, A.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar vitória durante aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 349-360, 2010.

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

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABSTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/2012: Oitavo Levantamento**. Brasília: Conab, 2013, 27p.

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

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, p.273-281, 2004.

DALLA SANTA, O. R.; DALLA SANTA, H. S.; FERNANDÉZ, R.; MICHELENA, G.; JUNIOR, P. R.; SOCCOL, C. R. Influence of *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats. **Ambiência**, v.4, n.2 p.197-207, 2008.

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

DONATE-CORREA, J.; LEON-BARRIOS, M.; PEREZ-GALDONA, R. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus*, a forage ter-shrub legume endemic to the Canary Islands. **Plant and Soil**, v.266, n.1-2, p.261-272, 2004.

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**, v. 5, n. 3, p.376-382, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, n.1-2, p.413-425, 2010.

KHALIQ, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, n.96, p.473-480, 2004.

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

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v.1, p.89-111, 2004.

MONTANEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, p. 253-263, 2009.

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

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODECK, 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.

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

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; REIS, V. M.; ALVES, G. C.; BALDANI, V. L. D.; CORDEIRO, A. C. C. **Contribuição da Bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para o Rendimento de Grãos de Arroz e Milho em Roraima.** Embrapa Roraima, Boa Vista, 2007, 20 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento).

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

Cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma monocotiledônea pertencente à família das Poaceae, gênero *Zea*, cientificamente denominado *Zea mays* L., cujo ciclo fenológico varia de 90 a 205 dias, dependendo do genótipo e do clima. Além disso, é uma planta C4, extremamente eficiente na conversão de CO₂, apresentando altas taxas de fotossíntese líquida, mesmo em elevados níveis de luz (FANCELLI e DOURADO NETO, 2004).

Há indícios de que a origem do milho tenha sido nas Américas, possivelmente no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos. Logo depois do descobrimento, o milho foi levado para a Europa onde foi cultivado em jardins até que seu valor alimentício tornou-se conhecido. Desde então passou a ser plantado em escala comercial e difundiu-se por todos os continentes (FORNASIERI-FILHO, 2007).

A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. O uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% no mundo. Nos Estados Unidos, cerca de 50% é destinado a esse fim, enquanto que no Brasil varia de 60 a 80%, dependendo da fonte de estimativa e do ano considerado (EMBRAPA, 2002).

Na evolução mundial de produção de milho, o Brasil tem destaque como o terceiro maior produtor, superado apenas pelo EUA e China. No ano agrícola de 2012/2013 foi produzido 854,4 milhões de toneladas (t), do qual os Estados Unidos foram responsáveis com 313,9 milhões de t, a China com 191,8 milhões de t e o Brasil com 76,0 milhões de t (FAO, 2012). Segundo a FAO (2012), enquanto os Estados Unidos cultivam uma área de 35 milhões de hectares (ha), em que obtiveram uma produtividade média de 10,3 t ha⁻¹ de grãos, a China obteve 5,4 t ha⁻¹ de grãos

numa área de 30 milhões de ha^{-1} e o Brasil, com uma área de 15,4 milhões de ha^{-1} alcançou uma produtividade média de grãos de apenas 4,48 t ha^{-1} . Essa baixa produtividade se deve ao fato de que 43% da área cultivada com o grão no país é destinada à subsistência, sendo que apenas 11% dos agricultores fazem uso de alta tecnologia para produção (VON PINHO, 2001).

No cenário nacional, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), a estimativa de área plantada com milho na safra 2012/2013 foi de 15.416,8 milhões de hectares. Atualmente, o milho é o segundo grão mais importante para a agricultura brasileira, sendo que no ano agrícola de 2012/2013, sua produção correspondeu a 32,8% da produção total de grãos do país, só perdendo para a soja, que representou 45,3% da produção nacional (IBGE, 2013).

No território brasileiro, 92% da produção concentraram-se, nas regiões Sul (32,23% da produção), Sudeste (17,73% da produção) e Centro-Oeste (41,76% da produção). A participação dessas regiões em área plantada e produção vêm se alterando ao longo dos anos, com a região Centro-Oeste aumentando a sua participação em detrimento das regiões Sul e Sudeste. Na safra 2011/12, o Centro-Oeste tomou a posição do Sul como maior região produtora de milho no país, e vem firmando essa posição nas safras seguintes (EMBRAPA, 2012). Embora o milho seja uma cultura importante para o agronegócio brasileiro, praticamente toda a sua produção é consumida internamente, ao contrário da soja, que concentra sua comercialização em mercados externos (ALVES, 2007).

Bactérias diazotróficas

As bactérias diazotróficas estão distribuídas no ambiente (bactérias de vida livre) e associadas às plantas (endofíticas), sendo estes microrganismos portadores do complexo enzimático da nitrogenase, e, portanto, fixadores de nitrogênio.

Diferentemente dos rizóbios em simbiose com as leguminosas, as bactérias diazotróficas associadas a gramíneas não formam nódulos e colonizam desde as raízes até as folhas, na região da rizosfera até o interior do tecido vegetal (BALDANI et al., 1997). Neste segundo caso, as bactérias são chamadas endofíticas e acredita-se que estas sejam as principais responsáveis pelo ganho de N através da

FBN observado em diversas culturas (REIS, 2007). A divisão do termo em endofítico facultativo e obrigatório foi proposta para distinguir respectivamente, estirpes capazes de colonizar tanto a superfície quanto o interior da raiz e com alta sobrevivência no solo, das que apresentam baixa sobrevivência no solo, mas colonizam o interior e a parte aérea dos tecidos vegetais, sem emitir nenhum sintoma de patogenicidade (BALDANI et al., 1997). Tais endófitos apresentam grande potencial para FBN devido a sua habilidade de colonizar a planta como um todo, recebendo os nutrientes diretamente no interior do vegetal (KENNEDY et al., 2004). Esses microrganismos podem prontamente disponibilizar o N fixado e outras moléculas promotoras de crescimento para as plantas (BALDANI et al., 1997).

Sabe-se que as associações envolvendo bactérias diazotróficas ocorrem em diferentes graus de interação, e em muitos casos estão relacionadas à especificidade de interação entre as características genéticas microbianas e da planta hospedeira (OLIVARES et al., 1997). Bactérias diazotróficas de baixa especificidade colonizam geralmente regiões superficiais do vegetal, sendo que algumas estirpes de *Azospirillum* são encontradas no interior dos vegetais, por isso denominados endófitos facultativos. Estas bactérias colonizam preferencialmente o rizoplane e a rizosfera de plantas, devido ao acúmulo de uma variedade de compostos orgânicos liberados pelas raízes por exsudação, secreção e deposição (DOBBELAERE et al., 2003). As bactérias que colonizam preferencialmente tecidos vegetais internos são denominadas endófito obrigatório, como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Azoarcus* spp., e *Burkholderia* spp., e geralmente possuem um espectro restrito de plantas hospedeiras (BALDANI et al., 1997).

A capacidade de colonização de tecidos internos das plantas pode conferir às bactérias endofíticas vantagens ecológicas sobre outras. Os tecidos internos das plantas proporcionam um ambiente mais uniforme e protegido para os microrganismos que a superfície, onde estão expostos a condições ambientais desfavoráveis de temperatura, potencial osmótico, radiação ultravioleta e competição microbiana, que são fatores limitantes à sobrevivência das bactérias ao longo do tempo (COCKING, 2003).

Além da capacidade de FBN (HAN et al., 2005; HUERGO et al., 2008), as bactérias diazotróficas em associação com gramíneas estimulam diretamente o crescimento das plantas por: a) produzirem hormônios de crescimento como auxinas,

giberilinas e citocianinas (DOBBELAERE et al., 2003; KHALIQ et al., 2004; DONATE-CORREA et al., 2004; RADWAN et al., 2004; CREUS et al., 2004), os quais estimulam o crescimento principalmente de raízes, aumentando a densidade de pêlos radiculares e a taxa de aparecimento de raízes secundárias, sendo que este incremento resulta numa melhora na absorção de água e nutrientes, aumentando a capacidade da planta de produzir e tolerar estresses ambientais (BALDANI et al., 1983; DOBBELAERE et al., 1999); b) atuarem na solubilização de fosfatos e óxidos de zinco (RODRIGUEZ et al., 2004; BALDOTTO et al., 2010), onde esses microrganismos excretam ácidos orgânicos e seus prótons associados, que atuam dissolvendo diretamente o material fosfático e os óxidos de zinco, podendo posteriormente ser disponibilizado às plantas, uma vez que esses íons são solúveis em meio ácido (VASSILEV e VASSILEVA, 2003; VESSEY, 2003); c) aumentarem a atividade da redutase do nitrato quando ocorrem endofiticamente nas plantas (CÁSSAN et al., 2008); e indiretamente por: a) atuarem no controle biológico de patógenos (MARIANO et al., 2004; CORREA et al., 2008) através de vários mecanismos como produção de chitinases, glucanases e antibiose; e b) síntese de sideróforos, onde os sideróforos são moléculas secretadas pelos microrganismos que sequestram Fe de baixo peso molecular e o disponibilizam para as plantas na forma de complexo sideróforo- Fe^{3+} , atuando no crescimento vegetal e imobilizando o Fe que estaria disponível para a proliferação de fitopatógenos (VESSEY, 2003).

Em geral, acredita-se que as bactérias diazotróficas associativas promovem o crescimento de plantas por uma combinação de todos esses mecanismos (DOBBELAERE et al., 2003).

Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias diazotróficas associativas amplamente encontrada nos solos de clima tropical e subtropical. O gênero atualmente possui quatorze espécies identificadas: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (TARRAND et al., 1978); *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983); *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987); *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989); *A. largomobile* (DEKHIL et al., 1997); *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001); *A. oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005); *A. melinis* (PENG et al., 2006); *A. canadense*

(MEHNAZ et al., 2007a); *A. zae* (MEHNAZ et al., 2007b); *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008); *A. picis* (LIN et al., 2009) e *A. thiophilum* (LAVRINENKO et al., 2010).

Bactérias deste gênero têm sido encontradas em associação com raízes de gramíneas de grande importância econômica, como milho, arroz, sorgo, trigo e diversas forrageiras, além de outras espécies vegetais (REIS, 2007). Uma consequência dessa versatilidade é a baixa especificidade em relação à planta hospedeira e as diversas vias metabólicas alternativas que permitem o microrganismo utilizar uma variedade de ácidos orgânicos e compostos aromáticos (VICTORIA e LOVELL, 1994), açúcares e aminoácidos disponíveis na rizosfera (HARTMANN e ZIMEER, 1994).

No solo, as bactérias do gênero *Azospirillum* podem ser encontradas na rizosfera de plantas, caracterizando uma colonização externa das raízes. Na colonização interna, as células de *Azospirillum* podem penetrar nos espaços intercelulares de raízes e se alojarem (BALDANI et al., 1996).

A espécie *Azospirillum amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983) tem sido isolada de cereais, forrageiras e pupunheira no Brasil (BALDANI et al., 1997; MAGALHÃES et al., 1984). A espécie *A. irakense* tem sido isolada de raízes de arroz na região subtropical do Iraque (KHAMMAS et al., 1989). *A. halopraeferens* tem sido isolado da gramínea Kallar grass (*Leptochloa fusca* L.) que cresce em solos salino-sódicos no Paquistão (REINHOLD et al., 1987). Já *A. largomobile* tem ocorrência restrita em áreas de um lago na Austrália (DEKHIL et al., 1997). *A. doebereineriae* foi isolada de raízes da gramínea do gênero *Miscanthus*, cultivada na Alemanha (ECKERT et al., 2001). *A. oryzae* isolada de arroz (*Oryza sativa*) no Japão, possui células em forma de espirilo ou vibrio, móveis (XIE e YOKOTA, 2005). *A. melinis* foi isolada de capim - gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.) na China, promovendo o crescimento da planta e aumentando sua tolerância à acidez do solo (PENG et al., 2006). Já *A. canadense* e *A. zeaeformis* ambas isoladas da rizosfera de milho no Canadá (MEHNAZ et al., 2007a; MEHNAZ et al., 2007b). Outras duas espécies (*A. rugosum* e *A. thiophilum*) não foram isoladas da rizosfera ou de tecidos vegetais, mas de solo contaminado com óleo (YOUNG et al., 2008) e manancial contaminado com sulfeto na Rússia (LAVRINENKO et al., 2010), mas ambas são fixadoras de nitrogênio.

Tem sido verificado que a sobrevivência do gênero *Azospirillum* no solo, na ausência das plantas hospedeiras, está relacionada a vários mecanismos fisiológicos de proteção. Tais mecanismos permitem classificar os representantes deste gênero em bactérias rizocompetentes (DEL GALLO e FENDRIK, 1994), dentre eles: produção de melanina, poli- β -hidroxibutirato (PHB) e polissacarídeos (DEL GALLO e FENDRIK, 1994), formação de cistos (agregados celulares) e mudança na forma da célula. Segundo trabalho realizado por Bashan (1991), em plantas de sorgo que não foram submetidas ao estresse hídrico, *Azospirillum* ocorria na forma víbrio, enquanto nas plantas que foram submetidas ao estresse, eles ocorriam na forma cística, preferencialmente. Quando as condições de estresse foram removidas, as células bacterianas reverteram-se para formas víbrio com concomitante crescimento da população. Aparentemente, a forma cística é a resposta da bactéria ao estresse hídrico na rizosfera. Os representantes do gênero *Azospirillum* são considerados bactérias endofíticas facultativas e apresentam alta sobrevivência no solo (BALDANI et al., 1996).

Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* é composto atualmente de onze espécies: *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1986); *H. rubrisulbalbicans* (BALDANI et al., 1996); *H. frisingense* (KIRCHHOF et al., 2001); *H. lusitanum* (VALVERDE et al., 2003); *H. chlorophenolicum* (IM et al., 2004); *H. huttiense subsp. huttiense*, (DING; YOKOTA, 2004); *H. hiltneri* (ROTHBALLER et al., 2006); *H. rhizosphaerae* (JUNG et al., 2007), *H. huttiense subsp. putei*, *H. autotrophicum* e *H. aquaticum* (DOBRITSA et al., 2010). Entre as onze espécies descritas acima, apenas às quatro primeiras são fixadoras de nitrogênio. Dependendo da estirpe, da variedade ou genótipo da planta, algumas espécies de *Herbaspirillum* podem fixar de 19 a 54% do nitrogênio necessário ao desenvolvimento da cultura (KENEDDY et al., 2004). A espécie *H. chlorophenolicum* não fixa nitrogênio (IM et al., 2004).

Inicialmente, *H. seropedicae* foi considerada uma nova espécie de *Azospirillum* por ter apresentado características de crescimento em meio de cultura semi-sólido (sem N) similares a esse gênero. Entretanto, após análise do 16S rRNA foi evidenciado que se tratava de um novo gênero de bactéria diazotrófica

(BALDANI et al., 1986). Posteriormente, Baldani et al. (1996) reclassificaram *Pseudomonas rubrisulbalbicans*, primeiramente descrita como agente causadora da estria mosqueada em variedades sensíveis de cana-de-açúcar, em *H. rubrisulbalbicans*. As três espécies foram incluídas como um grupo na subdivisão β -Proteobacteria, junto com *Orolobacter formigenes* como demonstrado por Sievers et al. (1998). As células deste gênero são gram-negativas contendo grânulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB), formato espirillum, móveis e com presença de 1-3 flagelos unipolares na espécie *H. frisingense*, de 1-3 flagelos bipolares na espécie *H. seropedicae* e vários flagelos bipolares na espécie *H. rubrisulbalbicans* (BALDANI et al., 1997).

O gênero *Herbaspirillum* tem sua ocorrência um pouco mais restrita do que as demais espécies de diazotróficos atualmente conhecidas. *H. seropedicae* isolada primeiramente por Baldani et al. (1986), em associação com raízes de arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*), apresenta baixa sobrevivência em solo sem cultivo (BALDANI et al., 1992). Essa espécie tem sido isolada de vários membros da família Poácea sendo encontrada colonizando raízes, colmos e parte aérea de arroz e milho (OLIVARES et al., 1996). A espécie *H. frisingense* (KIRCHOL et al., 2001) é encontrada nas plantas C4: *Spartina pectinata*, *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus* e *Pennisetum purpureum*. Demais representantes do gênero *Herbaspirillum* também têm sido isolados de bananeiras e abacaxizeiros no Brasil (WEBER et al., 2000) e alguns dos isolados obtidos apresentaram características diferenciais das espécies conhecidas (CRUZ et al., 2001).

Os representantes do gênero *Herbaspirillum* são considerados bactérias endofíticas obrigatórias e apresentam baixa sobrevivência no solo (BALDANI et al., 1996). Esses microrganismos são capazes de colonizar nichos específicos no interior dos tecidos vegetais, podendo transferir mais eficientemente para planta os compostos nitrogenados produzidos e ainda não sofrerem limitações de substâncias ricas em carbono (OLIVARES et al., 1997). Por isto, encontram-se livres da competição com outros microrganismos edáficos.

Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas

Embora o nitrogênio gasoso (N_2) constitua 78% dos gases atmosféricos, nenhum animal ou vegetal consegue utilizá-lo como nutriente, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos de N_2 , que é uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza (HUNGRIA et al., 2011). O grupo de bactérias, que tem a capacidade de fixar N_2 e convertê-lo em amônia é denominado diazotrófico e o mecanismo responsável pela incorporação de N à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Para ocorrer a FBN, a ligação tripla de N precisa ser rompida e, em seguida, 3 átomos de H são ligados a cada N, formando-se $2NH_3$ (amônia). Para isso, a planta hospedeira cede carboidrato ao microrganismo, e esse, através de um sistema bioquímico (complexo da nitrogenase), realiza a quebra da ligação tripla do N_2 , fornecendo em troca a amônia (NH_3) à planta.

Acredita-se que a redução biológica do N_2 processa-se em três etapas: 1) a redução da Fe-proteína I por ferredoxinas; 2) a transferência de elétrons da Fe-proteína I para Fe-Mo proteína II; e 3) a redução propriamente dita do substrato no sítio ativo da Fe-Mo proteína (em que o N_2 se liga na presença dos elétrons que serão utilizados para quebrar a tripla ligação) (NUNES et al., 2003).

No caso das bactérias endofíticas obrigatórias (ex.: *Herbaspirillum spp.*) ou endofíticas facultativas (ex.: *Azospirillum spp.*), o mesmo complexo da nitrogenase realiza a conversão do N_2 da atmosfera em amônia. Contudo, ao contrário das bactérias simbióticas, bactérias diazotróficas associadas a gramíneas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada; posteriormente, a mineralização da matéria orgânica pelas bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas. Desse modo, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias em associação com gramíneas consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas em nitrogênio (HUNGRIA et al., 2011).

Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para cultura do milho

As pesquisas com bactérias diazotróficas relacionadas a gramíneas no Brasil tiveram início na década de 50, com o isolamento de *Azobacter* a partir de solos ácidos da Baixada Fluminense (DOBEREINER, 1953). No entanto, foi a partir da década de 70 que estas bactérias ganharam destaque mundialmente, com a descoberta pela pesquisadora da Embrapa, Dra. Johanna Dobereiner (1924-2000), da capacidade de fixação biológica do nitrogênio pelo gênero *Azospirillum* quando em associação com gramíneas. Desde então, vários trabalhos foram desenvolvidos pela comunidade científica mundial com o intuito de identificar novas bactérias (GOVINDARAJAN et al., 2008). Atualmente, sabe-se que diversas espécies de bactérias são capazes de estabelecer associações com várias espécies de gramíneas (BHATTACHARJEE et al., 2008).

No Brasil, Alves (2007) pela da técnica de abundância natural de ^{15}N observou que a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* aumenta a contribuição de N proveniente da FBN em 44% e 67%, respectivamente, em experimentos com milho de primeira e segunda safra (safrinha) em um Planossolo Háplico. Já em 2011, Alves constatou que a inoculação da estirpe BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae* em milho contribuiu em média com 26% no N necessário ao desenvolvimento da cultura em um Latossolo Vermelho.

Na Argentina, García de Salamone et al. (1996) testaram quatro genótipos de milho quanto à contribuição da FBN, inoculados com *Azospirillum* e utilizando solo marcado com ^{15}N , e observaram uma contribuição significativa da FBN nos genótipos Dekalb 4D70 e CMS 22, em 58,3 % e 48%, respectivamente.

No Uruguai, Montanez et al. (2009) sob condições de casa de vegetação, verificaram pela técnica de diluição isotópica de ^{15}N para dezenove genótipos de milho, que a porcentagem de nitrogênio derivada do ar variou entre 12 e 33%, demonstrando que o milho pode obter significativas quantidades de N proveniente da FBN.

Utilizando a estratégia de combinar a inoculação com a aplicação de fertilizantes nitrogenados, Dalla Santa et al. (2004) constataram a possibilidade de substituição de até 40% da dose recomendada para a cultura do milho em ensaios

utilizando estirpes RAM- 7 e RAM- 5 de *Azospirillum sp.* Riggs et al. (2001), trabalhando com milho em condições de casa de vegetação verificaram que a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* promoveu acréscimos de produção de massa seca em 49%, quando aplicada juntamente com o fertilizante nitrogenado. Dobbelaere et al. (2002) observaram que o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* estirpe SP 245 e *Azospirillum irakense* estirpe KBC1 em plantas de milho foi maior quando associado às doses de nitrogênio. Dobbelaere et al. (2003) afirmam que a contribuição das bactérias é maior quando a planta recebe doses de fertilizante nitrogenado, pois o fertilizante nitrogenado altera o estado da planta e influencia na associação com os microrganismos.

Inoculantes comerciais contendo mistura de diazotróficos foram lançados no mercado mundial. Nos Estados Unidos, um produto com o nome de Azo-GreenTM foi produzido e recomendado para aumentar o vigor da semente, estabelecimento do sistema radicular, resistência a geada e melhoria da saúde da planta (REIS, 2007). Na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido pela companhia Heligenetics um produto chamado Zea NitTM contendo uma mistura de *Azospirillum brasilense* (estirpe CD) e *Azospirillum lipoferum* (estirpe BR17) na formulação líquida e turfosa, recomendado para reduzir a aplicação de nitrogênio necessário à cultura em 30% e 40% (REIS, 2007). Na França, foi lançado outro produto à base de *Azospirillum*, estirpe CRT1. No México, foi desenvolvido, pela Universidade de Puebla, um inoculante à base de *Azospirillum* que tem sido usado com sucesso na culturas de milho, trigo e cevada (REIS, 2007). Na Argentina, foi lançado um produto denominado GraminanteTM, à base de pó de carbonato de cálcio, contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum*, podendo aumentar a produção de grãos em cerca de 20% (REIS, 2007). Na Índia, várias indústrias produzem biofertilizantes contendo *Azospirillum* para diversas culturas (REIS, 2007). No Brasil, a Embrapa Soja e a UFPR em parceria com a empresa privada Total Biotecnologia lançaram o inoculante líquido contendo estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* para milho e trigo, sendo que outras indústrias estão desenvolvendo formulações e fazendo testes de eficiência agrônômica com as mesmas estirpes Ab-V5 e Ab-V6 (HUNGRIA et al. 2011).

Diversos estudos têm mostrado resultados tanto interessantes quanto promissores com inoculantes no Brasil. No trabalho de Hungria et al. (2010), a

inoculação de estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* proporcionaram incremento no rendimento de grãos de milho na ordem de 30% em relação ao controle não inoculado. Resultados similares com bactérias diazotróficas também foram obtidos por Dotto et al. (2010), no qual verificaram que a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em milho proporcionou um incremento de 8,6% na produtividade do híbrido AS 1540; por Zilli et al. (2008), onde constataram que a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em sementes de milho contribuiu significativamente para o aumento no rendimento de grãos do híbrido BRS1010, ao passo que com a variedade BRS 4157 este efeito não foi observado; e por Lana et al. (2012), onde observaram que a inoculação *Azospirillum brasilense* promoveu aumento na produtividade de grãos e massa seca de plantas de milho em 26% e 7,2%, respectivamente.

São inúmeros os efeitos positivos da inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de milho. Reis Junior et al. (2008) constataram que a inoculação com *Azospirillum amazonense* proporcionou aumento significativo na produção de matéria seca e conteúdo de nitrogênio nas raízes de plantas de milho cultivadas em casa de vegetação e colhidas 25 dias após o plantio. Braccini et al. (2012) verificaram relativo aumento na produção de massa seca com a inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense*. Dobbelaere et al. (2001), observaram aumento nos teores de N, P e K nas folhas de milho ao trabalharem com bactérias do gênero *Azospirillum*; enquanto que Francisco et al. (2012) constataram aumento nas concentrações de Zn nas folhas de milho quando inoculados com *Azospirillum brasilense* + 30 kg ha⁻¹ de N.

O número de trabalhos com inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas cresceu muito nos últimos anos, e, apesar dos resultados animadores, a utilização de inoculantes contendo essas bactérias como uma prática usual na agricultura requer análise crítica cuidadosa devido à alta variabilidade observada, geralmente, na resposta de plantas de diferentes genótipos sob condições edafoclimáticas distintas (OLIVEIRA et al., 2006).

CONCLUSÕES

Deve-se salientar que a exploração e a utilização da fixação biológica de nitrogênio em sistemas agrícolas de produção de milho visando à complementação do nitrogênio fornecido por meio de fertilizantes industriais é uma estratégia fundamental, ecologicamente correta e economicamente viável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. C. **Efeito da Inoculação de Bactérias dos Gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na Cultura do Milho**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

ALVES, G. C. **Estudo da interação da bactérias BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae* com plantas de milho**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2011. 52 p. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

BALDANI, J. I., POT, B., KIRCHHOF, G., FALSEN, E., BALDANI, V. L. D., OLIVARES, F. L., HOSTE, B., KERSTERS, K., HARTMANN, A. G., DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of *Pseudomonas rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb nov; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p. 802-810, 1996.

BALDANI, J. I., CARUSO, L., BALDANI, V. L., GOI, S. R., DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n.5-6, p. 911-922, 1997.

BALDANI, V. L. D., BALDANI, J. I., OLIVARES, F. L., DOBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65-73, 1992.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 1986, 238f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1986.

BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29,n.8, p. 924-929, 1983.

BALDOTTO, L. E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F. L.; PIO VIANA, A.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar vitória durante aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 349-360, 2010.

BASHAN, Y. Airborne transmission of the rhizosphere bacterium *Azospirillum*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, p. 257-269, 1991.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.80, p.199-209, 2008.

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

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

COCKING, E. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, n.252, p.169-175, 2003.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABSTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/2012: Oitavo Levantamento**. Brasília: Conab, 2013, 27p.

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

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v .82, p.273-281, 2004.

CRUZ, L. M., SOUZA, E. M., WEBER, O. B., BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musasp.*) and pineapple (*Ananas comosus*(L) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n.5, p. 2375-2379, 2001.

DALLA SANTA, O. R.; SOCCOL, C. R.; JUNIOR, P. R.; HERNÁNDEZ, R. H.; ALVAREZ, G. L. M.; DALLA SANTA, H. S.; PANDEY, A. Effects of inoculation of *Azospirillum sp.* in maize seeds under field conditions. **Food, Agriculture & Environment**, v.2, n.1, p. 238- 242, 2004.

DEKHILL, S. B., CAHILL, M., STACKBRANDT, E. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis subs. largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis subs. Parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 72-77, 1997.

DEL GALLO, M.; FENDRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: Okon, Y. (Ed.). *Azospirillum* plant association. **CGC Critical Reviews in Plant Science**. Boca Raton, p. 57-7, 1994.

DING, L., YAKOTA, A.. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p. 2223–2230, 2004.

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

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

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

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A. V. ; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, p.155-164, 1999.

DOBEREINER, J. *Azobacter* em solos ácidos. **Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola**, Rio de Janeiro, v.11, n.1, p.36, 1953.

DOBRITSA, A. P., REDDY, M. C. S., SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *Huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p. 1418-1426, 2010.

DONATE-CORREA, J.; LEON-BARRIOS, M.; PEREZ-GALDONA, R. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus*, a forage ter-shrub legume endemic to the Canary Islands. **Plant and Soil**, v.266, n.1-2, p.261-272, 2004.

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**, v. 5, n. 3, p.376-382, 2010.

ECKERT, B., WEBER, O. B., KIRCHHOF, G., HALBRITTER, A., STOFFELS, M., HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.1, p. 17-26, 2001.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária**. 2002. Disponível em:<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>.> Acesso em: 10 de Maio de 2013.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária**. 2012. Disponível em:http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_8ed/economia.htm. Acesso em: 10 de Maio de 2013.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. 2.ed. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360p.

FAO - **Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Faostat-agriculture**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 10 de Maio de 2013.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: Funep, 2007. 576p.

FRANCISCO, E. A. B.; KAPPES, C.; DOMINGUES, L.; FELIPPI, C. L. Nodulação de Sementes de Milho com *Azospirillum brasilense* e Aplicação de Nitrogênio em Cobertura. In: XXIX Congresso Nacional de milho e Sorgo, Águas de Lindóia, **Anais...Águas de Lindóia**, 2012.

GARCIA DE SALAMONE, I. E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize geno-type associations as evaluated by 15N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v.23, p.249-256, 1996.

GOVINDARAJAN. M.; BALANDREAU, J.; KWON, S. W.; WEON, H. Y.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* and related endophytic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, v.55, p.21-37, 2008.

HAN, J.; SUN, L.; DONG, X.; CAI, Z.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y.; SONG, W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and potential biocontrol agent against various pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.66-76, 2005.

HARTMANN, A., ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: Okon, Y. (Ed.) *Azospirillum/Plant associations*. **CGC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, USA. p.15-39, 1994.

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

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, n.1-2, p.413-425, 2010.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. GRUPO DE COORDENAÇÃO DE ESTATÍSTICAS AGROPECUÁRIAS (GCE/IBGE, DPE, COAGRO). **Estatística da Produção Agrícola (LSPA)** – Abril de 2013. Disponível:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201304.pdf>. Acesso em: 10 de Maio de 2013.

IM, W. T.; BAE, H. S.; YOKOTA, A.; LEE, S.T. *Herbaspirillum chlorophenicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n.3, p. 851–855, 2004.

JUNG, S.Y.; LEE, M.H.; OH, T.K.; YOON, J.H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, n.10, p. 2284–2288, 2007.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n.8, p. 1229-1244, 2004.

KHALIQ, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, n.96, p.473-480, 2004.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, v. 140, n.9, p. 679-693, 1989.

KIRCHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen fixing bacterial species that occurs in C4 - fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.1, p. 157-168, 2001.

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

LAVRINENKO, K.; CHEMOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E.; DUBININA, G.; AKIMOV, V.; KUEVER, J.; LYSENKO, A.; GRABOVICH, M. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, n.12, p.2832-2837, 2010.

LIN, S. Y.; YOUNG, C. C.; HUPTER, H.; SIERING, C.; ARUN, A. B.; CHEN, W. M.; LAI, W. A.; SHEN, F.T.; REKHA, P. D.; YASSIN, A. F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, n.4, p. 761-765, 2009.

MAGALHÃES, F. M. M.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. A new acid- tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 417-430, 1983.

MAGALHÃES, F. M. M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, v.15, p. 246-252, 1984.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.1, p.89-111, 2004.

MEHNAZ, S. WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n.3, p. 620–624, 2007a.

MEHNAZ, S. WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n.12, p. 2805–2809, 2007b.

MONTANEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 45, p. 253-263, 2009.

NUNES, F.S.; RAIMONDI, A.C.; NIEDWIESKI, C.N. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases, **Química Nova**, v.26, n.6, p. 872-879, 2003.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. D. L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Graminae. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, n.3, p. 197-200, 1996.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotrophic *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v.135, p.723-737, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, J. I.; URQUIAGUA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugar cane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria, **Plant and Soil**, v.284, p.23-32, 2006.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses Grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n.6, p. 1263–1267, 2006.

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

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I. *halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.1, p. 43-51, 1987.

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODECK, 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.

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

RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPLER, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n.9, p.829-836, 2001.

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

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, n.6, p. 1341–1348, 2006.

SIEVERS, M.; SCHLEGEL, H.G.; CABALLERO-MELLADO, J.; DOBEREINER, J.; LUDWIG, W. Phylogenetic identification of two major nitrogen-fixing bacteria associated with sugarcane. **Systematic and Applied Microbiology**, v.21, n.4, p. 505-508, 1998.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, 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, n.8, p. 976-980, 1978.

VALVERDE, A.; VELASQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53,n.6, p. 1979–1983, 2003.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, n.5-6, p.435-440, 2003.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VICTORIA, L.; LOVELL, G. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n.9, p. 2951-2955, 1993.

VON PINHO, R. G. V. Produção de milho no Brasil e no mundo: realidade e perspectiva. In: V Simpósio de Atualização em Genética e Melhoramento de Plantas: Genética e Melhoramento do Milho, **Anais...**Lavras, 2001.

WEBER, O. B.; CRUZ, L. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.3, p. 201-205, 2001.

XIE, C.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n.4, p. 1435-1438, 2005.

YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W. A.; REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, M. H.; CHEN, W.M.; YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n.4, p. 959–963, 2008.

ZILLI, J .E.; MARSON, L. C.; REIS, V. M.; ALVES, G. C.; BALDANI, V. L. D.; CORDEIRO, A. C. C. **Contribuição da Bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para o Rendimento de Grãos de Arroz e Milho em Roraima.** Embrapa Roraima, Boa Vista, 2007, 20 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento).

CAPÍTULO II

EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA ASSOCIADA À INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* NA CULTURA DO MILHO

RESUMO

O interesse crescente pelo uso de inoculantes contendo bactérias diazotróficas que promovem o crescimento das plantas, propiciando incrementos na produtividade das culturas, ocorre devido ao alto custo dos fertilizantes químicos e a preocupação com a qualidade ambiental. Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar, em condições de campo, o efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade, os parâmetros fitotécnicos e o estado nutricional da cultura do milho. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com nove tratamentos e seis repetições, sendo: Controle sem N e sem inoculação; Inoculação com *A. brasilense* e sem N; Inoculação com *H. seropedicae* e sem N; 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; *A. brasilense* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; *H. seropedicae* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura; *A. brasilense* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura e *H. seropedicae* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura. Os parâmetros avaliados foram: altura das plantas, diâmetro do colmo, altura de inserção de espiga, massa de espiga, comprimento de espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por espiga, diâmetro da base da espiga, massa de mil grãos, massa seca da parte aérea, produtividade, teor de clorofila e teor de nutrientes nas folhas e nos grãos de milho. A adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* influenciaram positivamente a massa de espiga, diâmetro de espiga, número de grão por espiga, massa seca da parte aérea, produtividade e teor de clorofila de plantas de milho. Os teores de N, P, K e Zn nas folhas de milho aumentaram com a adubação nitrogenada e a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. A inoculação com *Azospirillum brasilense* sem adubação nitrogenada promoveu maiores acúmulos de N, K, Ca e Mg nos grãos em relação aos tratamentos inoculados com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* e, adubados com 30 e 120 kg ha⁻¹ de N. A inoculação de *Azospirillum brasilense* ou *Herbaspirillum seropedicae* associada à adubação nitrogenada pode proporcionar uma redução no uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos na cultura do milho.

Palavras-chave: *Zea mays* L., nitrogênio, bactérias diazotróficas.

**EFFECT OF NITROGEN FERTILIZATION ASSOCIATED WITH
INOCULATION WITH *Azospirillum brasilense* AND *Herbaspirillum
seropedicae* IN THE CULTURE OF MAIZE**

ABSTRACT

The growing interest by the use of inoculants containing diazotrophic bacteria that promote plant growth, resulting in crop productivity increments, occurs due to the high cost of chemical fertilizers and the concern with environmental quality. Thus, the objective of the present study to evaluate, under field conditions, the effect of nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* on productivity, the fitotecnic parameters and the nutritional status of the culture of maize. The experimental design used was randomized blocks, with nine treatments and six replications, being: Control without N and without inoculation; Inoculation with *A. brasilense* and without N; Inoculation with *H. seropedicae* and without N; 30 kg ha⁻¹ of N in planting; *A. brasilense* + 30 kg ha⁻¹ of N in planting; *H. seropedicae* + 30 kg ha⁻¹ of N in planting; 30 kg ha⁻¹ of N in planting + 90 kg ha⁻¹ of N in coverage; *A. brasilense* + 30 kg ha⁻¹ of N in planting + 90 kg ha⁻¹ of N topdressing and *H. seropedicae* + 30 kg ha⁻¹ of N in planting + 90 kg ha⁻¹ of N in cover. The parameters evaluated were: height of the plants, diameter of culm, height of insertion of cob, cob mass, spike length, number of rows of grains per spike, number of grains per spike, spike base diameter, mass of thousand grains, dry mass of the aerial part, productivity, chlorophyll content and nutrient content in leaves and corn grain. The nitrogen fertilization associated with inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* positively influenced the mass of cob, cob diameter, number of grain per spike, aerial dry mass, productivity and chlorophyll content of corn plants. The levels of N, P, K, and Zn in the leaves of maize increased by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. Inoculation with *Azospirillum brasilense* without nitrogen fertilization promoted greater accumulation of N, K, Ca and Mg in grains in relation to the treatments inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* and composted with 30 and 120 kg ha⁻¹ of N. The inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* or associated with nitrogen fertilization can provide a reduction in use of synthetic nitrogen fertilizers on maize culture.

Key words: *Zea mays* L., nitrogen, diazotrophic bacteria.

INTRODUÇÃO

Dentre os nutrientes minerais, o nitrogênio (N) é um dos mais importantes e limitantes na produtividade do milho, sendo requerida a sua aplicação em grandes quantidades para suprir a demanda da cultura (DOTTO et al., 2010). Os custos econômicos e ambientais relacionados à fertilização nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a utilização destes fertilizantes, sem que haja diminuição da produção. Uma das possibilidades para viabilizar uma produção com menores custos sem prejudicar o ambiente é a utilização dos recursos biológicos do solo, como as bactérias diazotróficas, que são também consideradas promotoras do crescimento vegetal, por possuírem a capacidade de fixar nitrogênio (N₂) para a planta e produzir hormônios de crescimento, como auxinas e giberelinas (DOBBELAERE et al., 2002; RADWAN et al., 2002).

O processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em gramíneas não é tão eficiente quanto na cultura da soja, onde até 94% do N requerido pelas plantas pode ser fornecido pela FBN (HUNGRIA et al., 2006). Em gramíneas, a transferência do N fixado para a planta ocorre lentamente e apenas uma pequena parte torna-se disponível para o vegetal, logo, o processo de FBN por essas bactérias em associação com gramíneas consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas em nitrogênio (HUNGRIA et al., 2011).

Dentre os microrganismos diazotróficos encontrados em associações com gramíneas, as espécies de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* constituem os grupos mais bem estudados atualmente. Bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico, como os gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* têm sido isolados em plantas de arroz, trigo, milho e cana-de-açúcar (REIS JÚNIOR et al., 2004; 2008; PERIN et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006). Os resultados de inoculação destes gêneros são variáveis e efeitos significativos sobre a produção de grãos e absorção de nutrientes já foram relatados (KENNEDY et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2007; FERREIRA et al., 2010; HUNGRIA et al., 2010; BRACCINI et al., 2012). Neste contexto, Alves (2007) verificou que a inoculação de estirpes do gênero *Herbaspirillum* contribuiu com até 34% do N absorvido em plantas de milho. Em

2011, Alves e colaboradores constataram que a inoculação com a estirpe BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae* contribui em média com 26% do N necessário ao desenvolvimento da cultura do milho. García de Salomone et al. (1996) verificaram que algumas variedades de milho cultivadas em vasos fixaram por volta de 58% do seu requerimento em N, quando inoculadas com *Azospirillum* sp..

A maioria dos estudos referentes ao assunto aborda apenas o isolamento destas espécies de bactérias em plantas de milho e os estudos bioquímicos destas em laboratório, sendo restritos os estudos mais abrangentes, em condições de campo, que demonstrem a interação planta-microrganismo-ambiente relacionada com o desenvolvimento da cultura (DOTTO et al., 2010). Portanto, a utilização e o conhecimento das potencialidades dessas bactérias como alternativa para nutrição nitrogenada em diversas culturas de Poaceas de importância econômica como o milho pode resultar em forte impacto, não apenas no que se refere ao volume de produção e tamanho de área plantada, mas também por sua importância socioeconômica e ambiental, sendo o estudo da eficiência agrônômica dessas bactérias uma estratégia importante e economicamente viável.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar, em condições de campo, o efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade, os parâmetros fitotécnicos e o estado nutricional da cultura do milho.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no campo experimental da Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados-MS, de março a julho de 2012. As coordenadas geográficas são 22° 14' S e 54° 9' W, com altitude média de 450 metros. O clima da região é do tipo Cwa, segundo a classificação de Köppen. O solo foi classificado como Latossolo Vermelho distroférrico, de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2013). Dados médios de temperatura e precipitação pluviométrica durante a condução do experimento foram obtidos na Estação Agrometeorológica da Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados,MS, e são mostrados na Figura 1.

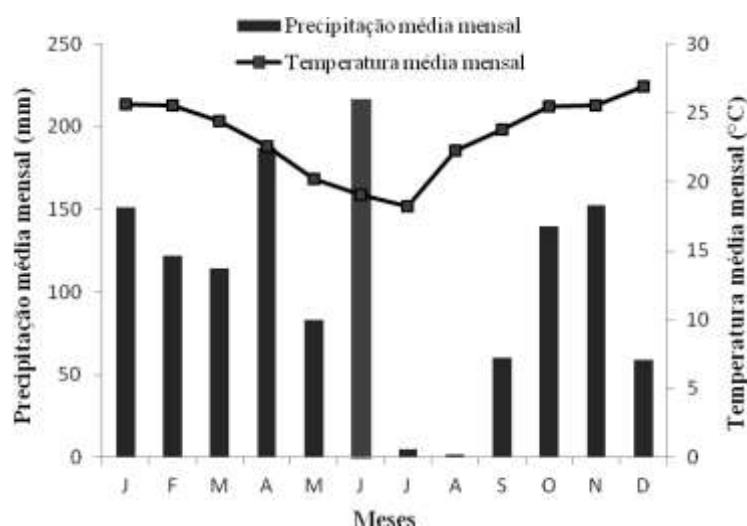


FIGURA 1. Precipitação (mm) e temperatura (°C) médias mensais, registradas na estação meteorológica da Embrapa Agropecuária Oeste, Município de Dourados, MS, no ano de 2012.

Os resultados da análise química do solo, na profundidade de 0-20 cm, antes da instalação do experimento, resultaram nos seguintes valores: pH (CaCl₂): 4,5; M.O. 31,18 g dm⁻³; C: 18,13 g dm⁻³; P (mehlich): 22,07 mg dm⁻³; K: 6,0 mmolc dm⁻³; Ca: 35,4 mmolc dm⁻³; Mg: 8,7 mmolc dm⁻³; Al: 4,8 mmolc dm⁻³; H+Al: 62,1 mmolc dm⁻³; SB: 50,1 mmolc dm⁻³; CTC: 112,2 mmolc dm⁻³, saturação por bases 44,65%; Zn: 1,65 mg dm⁻³; Cu: 9,27 mg dm⁻³; Fe: 29,14 mg dm⁻³; Mn: 24,06 mg dm⁻³.

³. A análise granulométrica proporcionou os seguintes valores: areia 215 g kg⁻¹; silte 115 g kg⁻¹ e argila 670 g kg⁻¹. A correção do solo foi realizada um mês antes da semeadura, na dose de 1720 kg ha⁻¹ de calcário dolomítico (PRNT 100%), considerando-se os resultados da análise do solo, com o objetivo de elevar a saturação por bases a 60%. A área foi irrigada após a implantação da cultura e em períodos de maior déficit hídrico.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com nove tratamentos e seis repetições, sendo: 1) Controle sem N e sem inoculação; 2) Inoculação com *Azospirillum brasilense* e sem N; 3) Inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* e sem N; 4) 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; 5) *Azospirillum brasilense* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; 6) *Herbaspirillum seropedicae* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; 7) 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 8) *Azospirillum brasilense* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 9) *Herbaspirillum seropedicae* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura.

Foram utilizadas sementes do híbrido simples P3646H, sendo previamente inoculadas com produto contendo uma combinação de duas estirpes de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6), em inoculante com formulação líquida, e o inoculante contendo a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae*, em veículo à base de turfa, produzido pela Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ. A dose aplicada foi de 150 mL para cada 50 kg de sementes de milho para o inoculante com formulação líquida, e de 250 g para cada 10 kg de sementes de milho do inoculante com veículo à base de turfa. Para a inoculação com a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae* foram adicionados 60 mL para cada 10 kg de semente de uma solução açucarada a 10% (p/v), visando aumentar a adesão do inoculante às sementes.

Na semeadura, a adubação de base foi realizada à lanço, com posterior incorporação, aplicando-se 300 kg ha⁻¹ da formulação 0-20-20 para o suprimento de 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e K₂O, respectivamente. A semeadura foi realizada manualmente, com o auxílio de “matraca”, colocando-se duas sementes por cova, deixando-se após o desbaste seis plantas por metro linear. Cada unidade experimental foi composta por 5 linhas de 5 metros de comprimento, espaçadas em 0,90 m entre linhas. Consideraram-se como parcela útil as três linhas centrais, excluindo-se 0,5 m de cada extremidade da parcela.

A adubação nitrogenada foi aplicada na dose de 30 kg ha⁻¹ de N no sulco de plantio e 90 kg ha⁻¹ de N parcelados em duas vezes de 45 kg ha⁻¹, em cobertura, na forma de ureia (45%), na área total da parcela, nos estádios de desenvolvimento V4 e V7, respectivamente.

No período de florescimento (aparecimento da inflorescência feminina “cabelo”) da cultura, foram efetuadas amostragens foliares, conforme metodologia proposta por Malavolta et al. (1997), a fim de determinar o teor de nutrientes no tecido foliar das plantas. Para tanto, coletou-se o terço médio com nervura da folha oposta e abaixo da inserção da espiga principal, num total de 10 folhas por unidade experimental e, neste mesmo estágio fenológico, foi determinado o teor de clorofila na folha com auxílio do clorofilômetro modelo SPAD-502.

Todo o material vegetal coletado foi lavado em água corrente, solução de HCl a 0,1 mol L⁻¹ e água deionizada. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e secos em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C, por 72 horas, e posteriormente moídas. As amostras moídas foram submetidas à digestão sulfúrica e digestão nitro-perclórica, seguidas das determinações dos teores foliares de N, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Fe e Mn, utilizando a metodologia descrita em Embrapa (2009). Na colheita, também foram determinados os teores de nutrientes nos grãos de milho.

A colheita do milho foi realizada manualmente, coletando-se todas as espigas das plantas, de uma área útil determinada de 9,0 m². Para a determinação dos componentes de produção amostraram-se 10 espigas representativas por parcela, colhidas fora da área de produção de grãos. Os parâmetros avaliados foram: massa de espiga, comprimento de espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por espiga, diâmetro da base da espiga e massa de mil grãos. Na planta, foram avaliados a altura das plantas, o diâmetro do colmo e a altura de inserção de espiga. Para determinar a produtividade de grãos, as espigas foram debulhadas com o auxílio de uma máquina manual, e pesadas. Os resultados obtidos foram transformados para kg ha⁻¹, corrigindo-se a umidade para 13% em base úmida. A massa seca da parte aérea das plantas foi estimada pela amostragem de três plantas dentro de cada parcela. A determinação da massa seca da parte aérea foi realizada por meio da secagem das amostras de plantas em uma estufa de circulação forçada, a uma

temperatura de 65°C, por 72 horas. Os dados referentes à massa seca foram expressos em g/planta.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) para massa de espiga, diâmetro de espiga, número de grão por espiga, massa seca da parte aérea, produtividade e teor de clorofila em resposta à adubação nitrogenada e a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* (Quadros 1 e 2).

A massa de espiga apresentou os maiores valores no tratamento correspondente à inoculação com *H. seropedicae* + 120 kg ha⁻¹ de N, sendo superior ao controle (sem inoculação e sem N) e ao tratamento apenas inoculado com *H. seropedicae*, e similar aos demais tratamentos avaliados (Quadro 1). Os valores variaram de 217,42 g/planta (controle) a 249,42 g/planta (*H. seropedicae* + 120 kg ha⁻¹ de N), com acréscimos em relação ao controle de 14,71% (Quadro 1). O diâmetro da espiga e o número de grãos por espiga foram superiores no tratamento com adubação de 120 kg ha⁻¹ de N, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) do tratamento controle, inoculado com *H. seropedicae* e aquele inoculado com *A. brasilense* + 30 kg ha⁻¹ de N (Quadro 1). Guimarães et al. (2012) verificaram que a inoculação das sementes de milho com o *Azospirillum* spp., em combinação com a adubação nitrogenada (60 kg ha⁻¹ de N), resultou em espigas com maior diâmetro e maior número de fileiras de grãos.

Não se verificou efeito significativo da adubação nitrogenada associada à inoculação com *A. brasilense* e *H. seropedicae* para altura de planta, altura de inserção de espiga, diâmetro do colmo, comprimento de espiga, fileira de grãos por espiga e massa de mil grãos (Quadros 1 e 2). Resultados similares foram obtidos, também em condições de campo, por Lana et al. (2012), que não observaram resposta positiva da adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum* sp. para altura de planta e altura de inserção de espiga em plantas de milho; por Braccini et al. (2012), que não verificaram efeito da inoculação com *A. brasilense* no peso de mil grãos de milho; e por Dotto et al. (2010), que não encontraram efeitos significativos da inoculação com *H. seropedicae* para diâmetro do colmo, altura de inserção de espiga, massa de espiga, massa de sabugo, comprimento de espiga e massa de mil grãos de milho.

QUADRO 1. Altura de plantas (ALT), altura de inserção de espiga (AIE), diâmetro do colmo (DIA), massa de espiga (ME), comprimento de espiga (CE), diâmetro de espiga (DE), fileira de grãos por espiga (FGE) e número de grãos por espiga (NGE) de plantas de milho em resposta a adubação nitrogenada e a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. Dourados, MS (2012).

Tratamentos	ALT	AIE	DIA	ME		CE	DE		FGE	NGE	
	____(cm)____		(mm)	(g)		(cm)	(mm)				
1. Controle	216,30	122,63	21,32	217,42	b	17,04	51,45	b	15,44	493,16	b
2. <i>A.brasilense</i>	218,40	124,00	20,20	220,52	ab	17,03	52,72	ab	15,52	517,16	ab
3. <i>H. seropedicae</i>	219,30	122,63	20,31	216,23	b	17,13	51,53	b	15,66	501,00	b
4. 30 kg ha ⁻¹ N	222,20	126,20	20,51	242,19	ab	18,12	53,12	ab	15,47	543,38	ab
5. <i>A.brasilense</i> + 30 kg ha ⁻¹ N	216,80	122,93	20,30	224,08	ab	17,57	51,43	b	15,66	510,33	ab
6. <i>H. seropedicae</i> + 30 kg ha ⁻¹ N	218,83	124,20	21,48	220,63	ab	17,82	52,59	ab	15,61	544,30	ab
7. 30 kg ha ⁻¹ N + 90 kg ha ⁻¹ N	223,36	125,06	21,62	245,97	ab	17,89	53,83	a	16,55	576,66	a
8. <i>A. brasilense</i> + 120 kg ha ⁻¹ N (30+90)	223,66	123,60	21,18	238,82	ab	17,82	53,08	ab	16,00	530,64	ab
9. <i>H. seropedicae</i> + 120 kg ha ⁻¹ N (30+90)	228,86	127,46	22,09	249,42	a	17,82	53,34	ab	16,00	554,94	ab
Média	220,85	124,30	21,00	230,59		17,64	52,57		15,73	530,17	
Teste F	1,40 ^{ns}	0,51 ^{ns}	1,00 ^{ns}	3,91*		1,63 ^{ns}	3,41*		0,93 ^{ns}	2,95*	
CV (%)	3,78	4,59	7,98	7,14		5,15	2,26		5,60	7,32	

* e ^{ns} – significativo a 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente. Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

O rendimento de massa seca da parte aérea variou de 246,63 g/planta no tratamento controle, a 314,80 g/planta no tratamento inoculado com *H. seropedicae* + 120 kg ha⁻¹ de N. Destaca-se que este último tratamento mostrou-se superior ($p \leq 0,05$) ao tratamento controle e similar aos demais tratamentos (Quadro 2). O incremento de massa seca da parte aérea foi de 27,64% em relação ao tratamento controle (sem adubação e sem inoculação). Salienta-se que essa maior produção de massa seca da parte aérea das plantas inoculadas com *H. seropedicae* e supridas com 120 kg ha⁻¹ de N pode ter sido favorecida pela produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias. Reis Junior et al. (2008) observaram incremento na massa seca de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum* spp.. Lana et al. (2012) verificaram que a inoculação com *Azospirillum* spp. sem a adubação nitrogenada aumentou a massa seca de plantas de milho em 7,2%. Braccini et al. (2012) constataram relativo aumento na produção de massa seca com a inoculação de sementes de milho com *A. brasilense*. Resultados similares também foram obtidos por Quadros (2009), com inoculação de *Azospirillum* spp. em milho, e por Ferreira et al. (2010) e Guimarães et al. (2010), em plantas de arroz inoculadas com *H. seropedicae*.

As maiores produtividades de grãos de milho foram obtidas pelo tratamento correspondente à adubação de 120 kg ha⁻¹ de N, não diferindo estatisticamente do tratamento inoculado com *H. seropedicae* acrescido 120 kg ha⁻¹ de N e aquele inoculado com *A. brasilense* e suprido com 30 e 120 kg ha⁻¹ de N (Quadro 2). Destaca-se que o tratamento corresponde à adubação de 120 kg ha⁻¹ de N promoveu um aumento na produtividade de grãos na ordem de 10%, em comparação com ao tratamento controle, que não recebeu inoculação e nem adubação nitrogenada. Já os tratamentos com inoculação de *H. seropedicae* acrescido de 120 kg ha⁻¹ de N e aquele inoculado com *A. brasilense* e suprido com 30 e 120 kg ha⁻¹ de N promoveram incrementos no rendimento de grãos na ordem de 6,78%, 6,82% e 3,25%, respectivamente, em relação ao controle. Em média, esses tratamentos proporcionaram incremento de 518,74 kg ha⁻¹ de grãos de milho em relação ao tratamento controle, o que representa um ganho de 8,64 sacas a mais por hectare cultivado, sugerindo a aplicabilidade da inoculação associada a adubação nitrogenada para o cultivo do milho.

Diversos estudos realizados até o momento têm relatado efeito benéfico da inoculação com *Azospirillum* ou *Herbaspirillum* à cultura do milho. Kappes et al. (2013) constataram acréscimos de 9,4% na produtividade de grãos de milho quando as

sementes foram inoculadas com *A.brasilense*. Alves (2007) observou percentuais de incrementos para produtividade do milho de 24% e 34% com a utilização de *H. seropedicae* na safrinha e na safra, respectivamente, e que a inoculação pode suprir até 40 kg ha⁻¹ de N. Hungria et al. (2011) e Lana et al. (2012) verificaram que a inoculação de *A.brasilense* promoveu aumento na produtividade de grãos de milho de 26% e 15,4%, respectivamente. Em estudos com trigo e arroz, Dalla Santa et al. (2008) e Pedraza et al. (2009) também relataram que a inoculação com *Azospirillum* spp. aumentou o rendimento de grãos em relação ao controle (sem N e sem inoculante).

Aumentos na produção de massa seca e produtividade de grãos de milho em resposta à inoculação podem ser atribuídos ao estímulo que as bactérias diazotróficas fornecem ao desenvolvimento de sistema radicular, com aumento na densidade de pêlos radiculares, comprimento, volume e número de raízes laterais, resultando em maior capacidade de absorção e utilização de água e nutrientes, conforme relatado por Hungria et al. (2011) e Huergo et al. (2008).

É importante salientar, com bases nos resultados já apresentados, que a maioria dos tratamentos com inoculação de bactérias diazotróficas acrescidos de 30 kg ha⁻¹ de N apresentaram resultados similares ao tratamento com a maior dose de N (120 kg ha⁻¹ de N) para massa de espiga, diâmetro da espiga, número de grãos por espiga, produção de massa seca da parte aérea e produtividade de grãos (Quadros 1 e 2), o que permite sugerir que é menos onerosa a aplicação de 30 kg ha⁻¹ de N quando comparado a dose de 120 kg ha⁻¹ de N, sendo que a adoção dessa tecnologia em milho pode proporcionar uma redução no uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos, e conseqüentemente redução nos custos de produção

Os teores mais elevados de clorofila foram verificados nos tratamentos com inoculação de *A.brasilense* acrescido de 120 kg ha⁻¹ de N ou apenas adubado com 120 kg ha⁻¹ de N, que não diferiram estatisticamente ($p \geq 0,05$) dos tratamentos com inoculação de *A. brasilense*, isoladamente ou suprida com 30 kg ha⁻¹ de N, e do tratamento com inoculação de *H. seropedicae* acrescida de 120 kg ha⁻¹ de N (Quadro 2). Observa-se que o teor de clorofila da folha se correlaciona positivamente com o teor de N na planta (BOOIJ et al., 2000). Diversos estudos têm demonstrado que a adição de N no milho tem efeito direto sobre a exsudação radicular, aumentando o fornecimento de fontes de carbono às bactérias, estimulando sua colonização e efetivação da inoculação (KOLB e MARTIN, 1987), bem como, pode beneficiar a fixação biológica de

nitrogênio (DALLA SANTA et al., 2004; ALVES, 2007; FERREIRA et al., 2011). Isso ocorre porque sob condições de deficiência de N a planta não consegue excretar, depositar ou exsudar compostos orgânicos e/ou exsudados radiculares suficiente para emitir sinais aos microrganismos. Assim, é essencial a suplementação nitrogenada que proporcione o bom desenvolvimento da planta, mas que não venha prejudicar a FBN, uma vez, que a movimentação dos microrganismos em direção as raízes ocorre quando existe o reconhecimento bioquímico (quimiotaxia), ou seja, a emissão de sinais da planta para o microrganismo. Em 2013, Canellas e colaboradores também observaram aumento no teor de clorofila de plantas de milho quando inoculadas com *H. seropedicae* em associação com substâncias húmicas.

QUADRO 2. Massa seca da parte aérea (MSPA), produtividade (PRO), massa de mil grãos (M1000) e teor de clorofila (CLO) de plantas de milho em resposta a adubação nitrogenada e a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. Dourados, MS (2012).

Tratamentos	MSPA		PRO		M1000	CLO	
	(g)		(kg ha ⁻¹)		(g)	(SPAD)	
1. Controle	246,63	b	9231,71	b	358,67	61,58	b
2. <i>A.brasilense</i>	257,26	ab	9078,41	b	352,04	65,18	abc
3. <i>H. seropedicae</i>	258,50	ab	9023,88	b	351,03	61,85	c
4. 30 kg ha ⁻¹ N	271,03	ab	9302,05	b	350,76	61,60	c
5. <i>A.brasilense</i> + 30 kg ha ⁻¹ N	274,40	ab	9531,75	ab	351,55	63,45	abc
6. <i>H. seropedicae</i> + 30 kg ha ⁻¹ N	293,96	ab	9133,32	b	357,62	62,51	bc
7. 30 kg ha ⁻¹ N + 90 kg ha ⁻¹ N	276,68	ab	10146,52	a	356,35	69,06	a
8. <i>A. brasilense</i> + 120 kg ha ⁻¹ N (30+90)	283,83	ab	9861,37	ab	362,27	69,06	a
9. <i>H. seropedicae</i> + 120 kg ha ⁻¹ N (30+90)	314,80	a	9858,23	ab	359,43	68,18	ab
Média	275,23		9463,00		355,52	64,72	
Teste F	2,27*		4,76*		0,57 ^{ns}	5,92*	
CV (%)	12,21		4,81		3,90	5,04	

* e ^{ns} – significativo a 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente. Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

Os teores de N, P, K e Zn nas folhas e N, K, Ca e Mg nos grãos de milho foram influenciados positivamente pela adubação nitrogenada e a inoculação com bactérias diazotróficas, enquanto que os teores de Ca, Mg, S, Cu, Fe e Mn nas folhas e os teores de P, S, Zn, Cu e Fe nos grãos de milho não responderam aos tratamentos (Quadros 3 e 4). O teor de N nas folhas de milho variou de 32,20 g kg⁻¹ no tratamento controle, a 49,18 g kg⁻¹ no tratamento inoculado com *A. brasilense* + 120 kg ha⁻¹ de N, evidenciando que a inoculação em combinação com 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N na cobertura aumentou o teor de N nas folhas de milho na ordem de 52,73%, em relação ao controle (sem inoculação e sem N) (Quadro 3). O teor de P, K e Zn nas folhas, diferentemente do teor de N, foi superior no tratamento inoculado com *H. seropedicae* + 120 kg ha⁻¹ de N. Houve um incremento de 30%, 64,29% e 13,49%, nos teores de P, K e Zn em relação ao controle não inoculado e não adubado, respectivamente (Quadro 3). Esses resultados sugerem que a inoculação com essas bactérias diazotróficas associada à adubação nitrogenada eleva os teores de N, P, K e Zn nas folhas de milho e que a inoculação pode contribuir para melhorar a utilização do N fertilizante pela planta (DOBBELAERE et al., 2003).

Dobbelaere et al. (2001) observaram aumento nos teores de N, P e K nas folhas de milho ao trabalharem com bactérias do gênero *Azospirillum*. Francisco et al. (2012) constataram aumento nas concentrações de Zn nas folhas de milho quando inoculados com *A. brasilense* acrescidos de 30 kg ha⁻¹ de N. Hungria et al. (2010) observaram maior conteúdo de N, P, Zn e Cu nas folhas de milho em plantas inoculadas com *Azospirillum* spp.. Bashan et al. (2004) e Alves (2007) também relataram aumentos nos teores de nutrientes em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas.

Essa maior absorção de nutrientes, como N, P, K e Zn pelas raízes pode ocorrer em razão da produção de substâncias promotoras do crescimento pela bactéria (BALDANI e BALDANI, 2005), a mudanças na arquitetura radicular (DOBBELAERE et al., 1999), o que permite melhor exploração do solo e aumenta a capacidade da planta em absorver nutrientes (CREUS et al., 2004), ou ainda, podem ser atribuídos à fixação de nitrogênio e à solubilização de fosfatos e óxidos de zinco pelas bactérias (BALDOTTO et al., 2010).

QUADRO 3. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* sobre o teor de nutrientes (g kg^{-1} de macronutrientes e mg g^{-1} de micronutrientes) nas folhas de plantas de milho no florescimento. Dourados, MS (2012).

Tratamentos	N		P		K (g kg^{-1})		Ca	Mg	S	Zn	Cu mg g^{-1}		Fe	Mn
1. Controle	32,20	b	3,23	c	17,98	e	1,90	0,56	1,34	13,34	ab	8,99	296,67	40,67
2. <i>A.brasilense</i>	40,44	ab	3,48	bc	21,20	cde	2,02	0,65	1,15	13,20	ab	9,24	292,34	42,19
3. <i>H. seropedicae</i>	39,69	ab	3,92	ab	20,71	de	2,00	0,61	1,29	13,03	ab	9,27	255,87	39,09
4. $30 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$	39,94	ab	4,02	ab	25,91	ab	2,10	0,64	1,40	12,85	ab	9,77	215,41	49,65
5. <i>A.brasilense</i> + $30 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$	40,69	ab	3,52	bc	24,51	bcd	2,21	0,62	1,33	11,09	b	8,60	289,84	46,41
6. <i>H. seropedicae</i> + $30 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$	37,69	ab	4,24	a	25,75	ab	2,17	0,71	1,26	12,31	ab	8,57	202,62	45,93
7. $30 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N} + 90 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$	45,43	ab	4,21	a	26,24	ab	1,97	0,64	1,14	13,45	ab	9,64	266,28	53,05
8. <i>A. brasilense</i> + $120 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$ (30+90)	49,18	a	3,91	ab	25,33	abc	1,67	0,53	1,34	14,24	a	8,98	263,43	47,87
9. <i>H. seropedicae</i> + $120 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$ (30+90)	42,94	ab	4,20	a	29,72	a	1,89	0,63	1,44	15,14	a	9,40	285,45	47,98
Média	40,91		3,86		24,15		1,99	0,62	1,30	13,18		9,16	274,21	45,87
Teste F	2,19*		6,64*		13,34*		2,11 ^{ns}	1,18 ^{ns}	1,94 ^{ns}	2,86*		0,78 ^{ns}	1,50 ^{ns}	1,79 ^{ns}
CV (%)	19,28		9,04		9,87		13,83	18,89	13,67	12,46		12,66	13,82	17,88

* e ^{ns} – significativo a 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente. Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV – coeficiente de variação.

Quanto aos teores de N e K nos grãos de milho, a inoculação com *A. brasilense* sem adubação nitrogenada promoveu maiores acúmulos nos grãos, diferindo estatisticamente dos tratamentos com inoculação e acrescidos de adubação nitrogenada (Quadro 4). A inoculação com *A. brasilense* promoveu aumentos médios nos teores de N e K nos grãos de milho na ordem de 25,47% e 72,35%, respectivamente, em relação aos tratamentos inoculados e adubados com 30 e 120 kg ha⁻¹ de N, não diferindo estatisticamente do tratamento controle. Estes resultados corroboram aos encontrados por Rodrigues et al. (2006) e Pedraza et al. (2009), que verificaram aumento significativo no teor de N nos grãos de trigo e arroz com a inoculação de *Azospirillum* spp., sem adição de N. Guimarães (2006) observou incrementos no acúmulo de nitrogênio dos grãos de 64% nas plantas de arroz (variedade IR 42) inoculadas com a estirpe ZAE 94 e adubadas com 50 kg N ha⁻¹, em relação ao controle não inoculado nem adubado.

Já os teores de Ca, Mg e Mn foram superiores, tanto à inoculação com *A. brasilense* e *H. seropedicae* sem adubação nitrogenada, quanto em combinação com a maior dose de N (120 kg ha⁻¹ de N), não diferindo estatisticamente entre si. A inoculação com bactérias diazotróficas e a adubação nitrogenada proporcionam uma melhoria na qualidade dos grãos de milho para comercialização, com um incremento no teor proteico dos grãos, o que permite obter grãos nutricionalmente melhores do ponto de vista protéico. Resultados observados por Hungria et al. (2010) indicam que a inoculação com *Azospirillum* spp. promove pequenos aumentos nos teores P, K, Mg, S, Zn, Mn e Cu nos grãos de milho, podendo muitas vezes não diferir do tratamento controle.

QUADRO 4. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* sobre o teor de nutrientes (g kg^{-1} de macronutrientes e mg g^{-1} de micronutrientes) nos grãos de plantas de milho. Dourados, MS (2012).

Tratamentos	N		P	K	Ca		Mg	S	Zn	Cu	Fe	Mn		
	(g kg ⁻¹)								(mg g ⁻¹)					
1. Controle	18,72	ab	5,48	4,34	ab	0,32	ab	1,14	a	0,69	13,71	1,50	51,53	1,71
2. <i>A.brasilense</i>	19,99	a	4,88	4,92	a	0,34	a	1,01	a	0,63	13,26	0,49	41,90	1,68
3. <i>H. seropedicae</i>	15,47	bc	4,86	3,76	ab	0,24	bc	0,93	a	0,61	13,30	0,72	41,96	1,67
4. 30 kg ha ⁻¹ N	15,97	bc	4,90	4,26	ab	0,17	c	0,54	b	0,68	14,90	0,78	39,21	2,06
5. <i>A.brasilense</i> + 30 kg ha ⁻¹ N	12,48	c	4,52	4,01	ab	0,21	c	0,48	b	0,76	13,99	0,83	54,50	1,79
6. <i>H. seropedicae</i> + 30 kg ha ⁻¹ N	14,48	bc	5,07	3,76	ab	0,18	c	0,53	b	0,78	12,22	1,46	30,62	1,71
7. 30 kg ha ⁻¹ N + 90 kg ha ⁻¹ N	15,47	bc	5,26	3,51	b	0,20	c	0,60	b	0,72	13,54	2,06	22,48	1,98
8. <i>A. brasilense</i> + 120 kg ha ⁻¹ N (30+90)	15,47	bc	5,40	3,59	b	0,35	a	1,06	a	0,73	10,17	2,24	42,16	2,02
9. <i>H. seropedicae</i> + 120 kg ha ⁻¹ N (30+90)	14,98	bc	5,56	3,59	b	0,36	a	1,10	a	0,76	10,02	2,34	47,62	2,05
Média	16,36		5,10	3,97		0,26		0,82		0,70	12,74	1,38	41,33	1,85
Teste F	7,94*		1,56 ^{ns}	3,12*		15,17*		17,37*		8,96 ^{ns}	11,15 ^{ns}	8,01 ^{ns}	1,87 ^{ns}	8,95 ^{ns}
CV (%)	17,84		13,21	16,05		17,80		19,64		8,27	13,02	79,17	43,03	20,40

* e ^{ns} – significativo a 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente. Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV – coeficiente de variação.

CONCLUSÕES

1. A adubação nitrogenada associada a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* influenciaram positivamente a massa de espiga, diâmetro de espiga, número de grão por espiga, massa seca da parte aérea, produtividade e teor de clorofila de plantas de milho.
2. Os teores de N, P, K e Zn nas folhas de milho aumentaram com a adubação nitrogenada e a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*.
3. A inoculação com *Azospirillum brasilense* sem adubação nitrogenada promoveu maiores acúmulos de N, K, Ca e Mg nos grãos em relação aos tratamentos inoculados com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* e, adubados com 30 e 120 kg ha⁻¹ de N.
4. A inoculação de *Azospirillum brasilense* ou *Herbaspirillum seropedicae* associada à adubação nitrogenada pode proporcionar uma redução no uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos na cultura do milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. C. **Estudo da interação da bactérias BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae* com plantas de milho.** Rio de Janeiro: UFRRJ, 2011. 52 p. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

ALVES, G. C. **Efeito da Inoculação de Bactérias dos Gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na Cultura do Milho.** Rio de Janeiro: UFRRJ, 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

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, N.3, p.549-579, 2005.

BALDOTTO, L. E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F. L.; PIO VIANA, A.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar vitória durante aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 349-360, 2010.

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. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, Associated with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 58-64, 2012.

BOOIJ, R.; VALENZUELA, J. L.; AGUILERA, C. **Determination of crop nitrogen status using non-invasive methods.** In: HAVERKORT, A.J.; MACKERRON, D.K.L. (Eds.). Management of nitrogen and water in potato production. The Netherlands, Wageningen Pers, p. 72-82, 2000.

CAMPOS, B. C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante graminante na cultura do milho. **Ciência Rural**, v. 30, n.4, p.713-715. 2000.

CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F. L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil**, n.366, p.119–132, 2013.

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

CONAB. 2012. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/2012: Oitavo Levantamento, Junho/2012**, Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, CONAB, 33p.

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v.82, p.273-281, 2004.

DALLA SANTA, O. R.; DALLA SANTA, H. S.; FERNANDÉZ, R.; MICHELENA, G.; JUNIOR, P. R.; SOCCOL, C. R. Influence of *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats. **Ambiência**, v.4, n.2 p.197-207, 2008.

DALLA SANTA, O. R.; SOCCOL, C. R.; JUNIOR, P. R.; HERNÁNDEZ, R. H.; ALVAREZ, G. L. M.; DALLA SANTA, H. S.; PANDEY, A. Effects of inoculation of *Azospirillum* sp. in maize seeds under field conditions. **Food, Agriculture & Environment**, v.2, n.1, p. 238- 242, 2004.

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

DOBBELAERE, S. et al. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal Plant and Physiology**, v. 28, n.9, p. 871-879, 2001.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v.212, p.155-164, 1999.

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**, v. 5, n. 3, p.376-382, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3 Ed. rev. ampl.- Brasília, DF: Embrapa Solos, 2013. 353p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**.- 2. Ed, Brasília., Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000.

FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Produção de grãos de arroz em função as inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.13; p. 826-833, 2011.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010.

FRANCISCO, E. A. B.; KAPPES, C.; DOMINGUES, L.; FELIPPI, C. L. Inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense* e aplicação de nitrogênio em Cobertura. In: XXIX Congresso Nacional de milho e Sorgo, Águas de Lindóia, **Anais...Águas de Lindóia**, 2012.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; DOBEREINER, J.; IRGUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v.23, n.3, p.249-256, 1996.

GUIMARÃES, F. V.; PINTO JUNIOR, A. S.; OFFEMANN, L. C.; RODRIGUES, L. F. O. S.; KLEIN, J.; INAGAKI, A. M.; POZZEBOM, W.; DIAMANTE, M. S.; BULEGON, L. G.; BELLÉ, R. F.; COSTA, A. C. P. R. Componentes de Produção e Produtividade do Híbrido de Milho 30F53H Inoculado com as Estirpes Ab-V5 e Ab-V6 da Bactéria *Azospirillum brasilense*. In: XXIX Congresso Nacional de milho e Sorgo, Águas de Lindóia, **Anais...Águas de Lindóia**, 2012.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 393-398, 2007.

GUIMARÃES, S. L. **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. 2006, 88f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K. REDDY, P. M.; LADHA, J. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v.154, p.131-145, 2002.

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

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum* brasiliense: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, n.1-2, p.413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (Ed.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston: Studium Press, LLC, 2006. p. 43-93.

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

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n.8, p. 1229-1244, 2004.

KOLB, W.; MARTIN, P. Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indolacetic acid. In: KLINGMÜLLER, W. ***Azospirillum* III: genetics, Physiology, Ecology**. Berlin: Ed. Springer, 1987. P. 215-221.

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

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

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. **Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants**. ASM News, 63:364-370, 1997.

PEDRAZA, R. O.; BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C.; BOA SORTE, P. M. F.; TEIXEIRA, R. S. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 36–43, 2009.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1931-1937, 2006.

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum spp.* em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: UFRGS, 2009. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

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, n.3, p. 1139-1146, 2008.

REIS JÚNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; UUQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados à *Brachiaria spp.* em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitohormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 1, p. 103-113, 2004.

RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPPLE, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n.9, p.829-836, 2001.

RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.2, p. 275-284, 2006.

SALOMONE, G.; DÖBEREINER, J. Maize genotypes effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology Fertilizer Soils**, v.21, p.193-196, 1996.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, 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.833-842, 2007.

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

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; REIS, V. M.; ALVES, G. C.; BALDANI, V. L. D.; CORDEIRO, A. C. C. **Contribuição da Bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para o Rendimento de Grãos de Arroz e Milho em Roraima.** Embrapa Roraima, Boa Vista, 2007, 20 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento).

CAPÍTULO III

EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA ASSOCIADA À INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SOBRE A EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N NA CULTURA DO MILHO DETERMINADA COM USO DE ^{15}N

RESUMO

A utilização de bactérias diazotróficas associativas como alternativa para aumentar a disponibilidade e o aproveitamento do nitrogênio pela cultura do milho pode ser uma opção menos onerosa e mais viável ecologicamente. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em associação com a fertilização nitrogenada sobre a eficiência de utilização e fixação biológica de N pela cultura do milho, em condições de campo, utilizando a técnica isotópica ^{15}N . O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com nove tratamentos e seis repetições, sendo: Controle sem N e sem inoculação; Inoculação com *A. brasilense* e sem N; Inoculação com *H. seropedicae* e sem N; 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; *A. brasilense* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; *H. seropedicae* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura; *A. brasilense* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura e *H. seropedicae* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura. Foi avaliada a produtividade de grãos de milho, a produção de massa seca, a quantidade de N acumulada na planta, a porcentagem de N na planta proveniente do fertilizante, a quantidade de N na planta proveniente do fertilizante, a eficiência de utilização do N aplicado como fertilizante e a porcentagem de fixação biológica de N. Os resultados permitiram concluir que a adubação nitrogenada associada a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* influencia positivamente a produtividade de grãos de milho. A inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* acrescidos de 30 e 120 kg ha⁻¹ de N promove redução na porcentagem de N nos grãos e na parte aérea de plantas de milho. O aumento da dose de nitrogênio associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* proporciona aumento na quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante nos grãos e na parte aérea do milho e reduz a eficiência de utilização desse nutriente pela planta. Pela técnica da abundância natural do ^{15}N , a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* contribui em média com 19,40 e 9,49%, respectivamente, do N necessário ao desenvolvimento da cultura do milho.

Palavras-chave: *Zea mays* L., *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, ^{15}N , fixação biológica de nitrogênio.

**EFFECT OF NITROGEN FERTILIZATION ASSOCIATED WITH
INOCULATION DIAZOTROPHIC BACTERIA ON THE EFFICIENCY OF
USE AND BIOLOGICAL FIXATION OF N IN MAIZE CULTURE
DETERMINED USING ^{15}N**

ABSTRACT

The use of diazotrophic bacteria associative has an alternative to increase the availability and the nitrogen utilization by maize culture can be a less costly option and more ecologically viable. Thus, aimed to evaluate the effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in association with nitrogen fertilization on utilization efficiency and biological fixation of N by the culture of corn, under field conditions, using the ^{15}N isotope technique. The experimental design used was randomized blocks, with nine treatments and six replications, being: Control without N and without inoculation; Inoculation with *A. brasilense* and without N; Inoculation with *H. seropedicae* and without N; 30 kg ha⁻¹ of N in planting; *A. brasilense* +30 kg ha⁻¹ of N in planting; *H. seropedicae* +30 kg ha⁻¹ of N in planting; 30 kg ha⁻¹ of N in planting + 90 kg ha⁻¹ of N in coverage; *A. brasilense* + 30 kg ha⁻¹ of N in planting + 90 kg ha⁻¹ of N topdressing and *H. seropedicae* + 30 kg ha⁻¹ of N in planting + 90 kg ha⁻¹ of N in cover. It was evaluated the productivity of corn grain, dry matter production, the amount of N accumulated in plant, the percentage of N in the plant from the fertilizer, the amount of N in the plant from the fertilizer, the efficiency of utilization of the N applied as fertilizer and the percentage of biological fixation of N. The conclusion that nitrogen fertilization associated with inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* influences positively the productivity of corn grains. Inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* plus 30 and 120 kg ha⁻¹ of N promotes reduction in percentage of N in grains and in aerial part of corn plants. Inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* plus 30 and 120 kg ha⁻¹ of N promotes reduction in percentage of N in grains and in aerial part of corn plants. Increasing nitrogen dose associated with inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* provides increase in the amount of nitrogen from the fertilizer in grain and in the aerial part of the maize and reduces the efficiency of nutrient utilization by the plant. The technique of natural abundance of ^{15}N , inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* contributes on average with 19.40 and 9.49%, respectively, of the N needed for the development of culture of maize

Key words: *Zea mays* L., *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, ^{15}N , biological nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO

A cultura do milho apresenta demanda elevada por fertilizantes nitrogenados, fazendo com que a aplicação desse nutriente seja necessária para obtenção de altas produtividades (BASTOS et al., 2008; FIDELIS et al., 2007). Devido ao elevado custo econômico e ambiental do processo industrial de fixação de nitrogênio (N) aliado ao aumento da demanda por alimentos, surge à necessidade de se incorporar à atividade agrícola, novas tecnologias que visem à racionalização do uso de fertilizantes nitrogenados. Uma alternativa é o aproveitamento dos benefícios proporcionados pela associação entre bactérias diazotróficas e culturas de grande interesse econômico, visto que tais microrganismos são capazes de promover o crescimento vegetal e gerar incrementos no desenvolvimento e na produtividade das culturas (BALDANI et al., 1997).

Segundo Hungria (2011), as bactérias diazotróficas associadas a gramíneas podem estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras. Além da capacidade de fixação biológica de nitrogênio (HAN et al., 2005; HUERGO et al., 2008), podem atuar no aumento da atividade da redutase do nitrato, quando crescem endofiticamente nas plantas (CÁSSAN et al., 2008); na produção dos hormônios vegetais, tais como auxinas, giberelinas, etileno, entre outros (KHALIQ et al., 2004; DONATE-CORREA et al., 2004; RADWAN et al., 2004; CREUS et al., 2004; DOBBELAERE et al., 2003); na solubilização de fosfatos e óxidos de zinco (RODRIGUEZ et al., 2004; BALDOTTO et al., 2010); e no controle biológico de patógenos (MARIANO et al., 2004).

Os gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* abrangem um grupo de bactérias promotoras do crescimento de plantas, com boa capacidade associativa com a cultura do milho. Essas bactérias contêm o complexo enzimático da nitrogenase, sendo capazes de quebrar a tripla ligação que une os dois átomos de nitrogênio e fazer a redução do N_2 à amônia. No entanto, a eficiência de fixação N_2 , não tem se mostrado suficiente para suprir todas as necessidades do milho (HUNGRIA, 2011), sendo necessária, além da inoculação, a realização da adubação nitrogenada complementar.

De maneira geral, aproximadamente 70% dos experimentos realizados a campo com inoculação de bactérias diazotróficas, em várias culturas e em diferentes condições edafoclimáticas, mostraram aumentos de produtividade, podendo chegar a 30% (OKON e LABANDERA-GONZÁLEZ, 1994), sendo que essa contribuição das bactérias é maior quando as plantas recebem doses variáveis de fertilizante nitrogenado (DOBBELAERE et al., 2003).

Atualmente, a técnica mais utilizada para se determinar a eficiência de utilização do N (EUN) aplicado como fertilizante na cultura do milho é a do isótopo ^{15}N . Dentre os vários resultados obtidos, verifica-se grande variação na EUN pela cultura do milho, encontrando-se valores de 10 a 65% do N aplicado (LARA CABEZAS et al., 2000; CANTARELLA et al., 2003; SILVA et al., 2003; GAVA et al., 2006; GAVA et al., 2010). A contribuição da FBN para cultura do milho também pode ser quantificada pela técnica isotópica de ^{15}N , baseada na abundância natural desse isótopo.

A utilização de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) como alternativa para aumentar a disponibilidade e contribuir no aproveitamento do nitrogênio pela cultura do milho pode ser uma opção menos onerosa e mais viável ecologicamente. Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em associação com a fertilização nitrogenada sobre a eficiência de utilização e fixação biológica de N_2 pela cultura do milho, em condições de campo, utilizando a técnica isotópica ^{15}N .

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no campo experimental da Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados-MS, de março a julho de 2012. As coordenadas geográficas são 22° 14' S e 54° 9' W, com altitude média de 450 metros. O clima da região é do tipo Cwa, segundo a classificação de Köppen. O solo foi classificado como Latossolo Vermelho distroférrico, de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2013). Dados médios de temperatura e precipitação pluviométrica durante a condução do experimento foram obtidos na Estação Agrometeorológica da Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados, MS, e são mostrados na Figura 1.

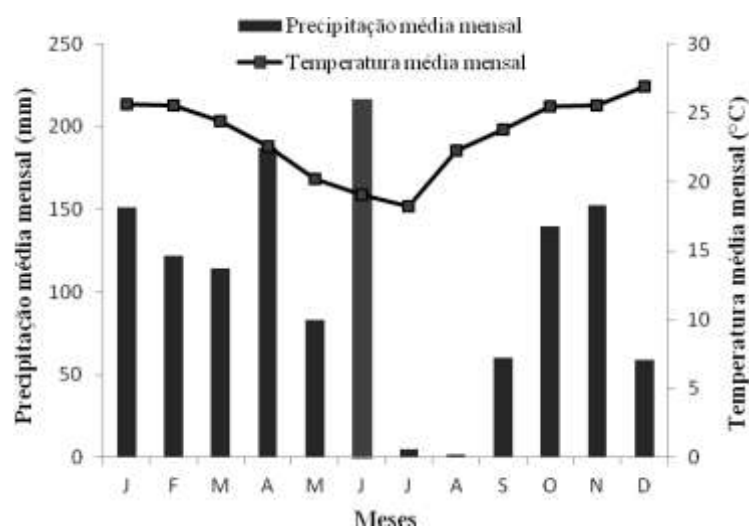


FIGURA 1. Precipitação (mm) e temperatura (°C) médias mensais, registradas na estação meteorológica da Embrapa Agropecuária Oeste, Município de Dourados, MS, no ano de 2012.

Os resultados da análise química do solo, na profundidade de 0-20 cm, antes da instalação do experimento, resultaram nos seguintes valores: pH (CaCl₂): 4,5; M.O. 31,18 g dm⁻³; C: 18,13 g dm⁻³; P (mehlich): 22,07 mg dm⁻³; K: 6,0 mmolc dm⁻³; Ca: 35,4 mmolc dm⁻³; Mg: 8,7 mmolc dm⁻³; Al: 4,8 mmolc dm⁻³; H+Al: 62,1 mmolc dm⁻³; SB: 50,1 mmolc dm⁻³; CTC: 112,2 mmolc dm⁻³, saturação por bases

44,65%; Zn: 1,65 mg dm⁻³; Cu: 9,27 mg dm⁻³; Fe: 29,14 mg dm⁻³; Mn: 24,06 mg dm⁻³. A análise granulométrica proporcionou os seguintes valores: areia 215 g kg⁻¹; silte 115 g kg⁻¹ e argila 670 g kg⁻¹. A correção do solo foi realizada um mês antes da semeadura, na dose de 1720 kg ha⁻¹ de calcário dolomítico (PRNT 100%), considerando-se os resultados da análise do solo, com o objetivo de elevar a saturação por bases a 60%. A área foi irrigada após a implantação da cultura e em períodos de maior déficit hídrico.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com nove tratamentos e seis repetições, sendo: 1) Controle sem N e sem inoculação; 2) Inoculação com *Azospirillum brasilense* e sem N; 3) Inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* e sem N; 4) 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; 5) *Azospirillum brasilense* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; 6) *Herbaspirillum seropedicae* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio; 7) 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 8) *Azospirillum brasilense* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 9) *Herbaspirillum seropedicae* + 30 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura.

Foram utilizadas sementes do híbrido simples P3646H, sendo previamente inoculadas com produto contendo uma combinação de duas estirpes de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6), em inoculante com formulação líquida e o inoculante contendo a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae*, em veículo à base de turfa, produzido pela Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ. A dose aplicada foi de 150 mL para cada 50 kg de sementes de milho para o inoculante com formulação líquida, e de 250 g para cada 10 kg de sementes de milho do inoculante com veículo à base de turfa. Para a inoculação com a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae* foram adicionados 60 mL para cada 10 kg de semente de uma solução açucarada a 10% (p/v), visando aumentar a adesão do inoculante às sementes.

Na semeadura, a adubação de base foi realizada à lanço, com posterior incorporação, aplicando-se 300 kg ha⁻¹ da formulação 0-20-20 para o suprimento de 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e K₂O, respectivamente. A semeadura foi realizada manualmente, com o auxílio de “matraca”, colocando-se duas sementes por cova, deixando-se, após o desbaste seis plantas por metro linear. Cada unidade experimental foi composta por 5 linhas de 5 metros de comprimento, espaçadas em 0,90 m entre linhas. Consideraram-se como parcela útil as três linhas centrais, excluindo-se 0,5 m de cada

extremidade da parcela. Em cada parcela, foi instalada uma microparcela que recebeu a ureia marcada com ^{15}N . Cada microparcela possuía um segmento de linha de 2 m lineares, sendo a área útil de amostragem de plantas restrita a 1 m linear central.

A adubação nitrogenada foi aplicada na dose de 30 kg ha^{-1} de N no sulco de plantio e 90 kg ha^{-1} de N parcelados em duas vezes de 45 kg ha^{-1} , em cobertura, na forma de ureia (45%), na área total da parcela, exceto nas microparcelsas.

Nos tratamentos (4, 5 e 6) a adubação nitrogenada foi aplicada na forma de ureia enriquecida com 2,6% átomos de ^{15}N em excesso. Para estes tratamentos foram aplicados 12 gramas de ureia marcada em cada microparcela de 2 m lineares.

Nos tratamentos (7, 8 e 9) a adubação nitrogenada foi aplicada na forma de ureia enriquecida com 0,7% átomos de ^{15}N em excesso, que receberam no total 120 kg ha^{-1} de N, sendo 30 kg ha^{-1} de N no plantio e 90 kg ha^{-1} de N em cobertura aplicada em duas vezes de 45 kg ha^{-1} de N. Nestes tratamentos foram aplicados no plantio em cada microparcela 12 gramas de ureia enriquecida 2,6 % átomos de ^{15}N em excesso, e na cobertura, para cobrir os 90 kg ha^{-1} de N, foi aplicado nas mesmas microparcelsas 36 gramas de uréia enriquecida com 0,7% átomos de ^{15}N em excesso, aplicada em duas vezes de 18 gramas. A primeira aplicação de N em cobertura foi realizada no estágio de desenvolvimento V4, correspondente a 4 folhas totalmente expandidas, e a segunda aplicação no estágio de desenvolvimento V7, correspondente a 7 folhas totalmente expandidas.

A colheita do milho foi realizada manualmente, coletando-se todas as espigas das plantas, da área útil das parcelas ($9,0 \text{ m}^2$). Para determinar a produtividade de grãos, as espigas foram debulhadas com o auxílio de uma máquina manual, e pesadas. Os resultados obtidos foram transformados para kg ha^{-1} , corrigindo-se a umidade para 13% em base úmida. A massa seca (palha) das plantas foi estimada pela amostragem de três plantas dentro de cada microparcela. A determinação da massa seca foi realizada por meio da secagem das amostras de plantas em uma estufa de circulação forçada, a uma temperatura constante de 65°C , por um período de 72 horas. Os dados referentes à massa seca foram expressos em kg ha^{-1} .

Por ocasião da colheita as plantas foram divididas em parte aérea (palha) e grãos. Todo o material vegetal coletado foi lavado em solução de detergente a 3 mL

L⁻¹, água corrente, solução de HCl a 0,1 mol L⁻¹ e água deionizada, respectivamente. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel e secos em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65°C, por 72 horas. Após a secagem do material vegetal, procederam-se a pesagem e moagem da massa seca em moinho tipo Wiley para as análises de N total e composição isotópica do N.

O N total nas diferentes partes da planta (palha e grãos) foi determinado pelo método de Kjeldahl, de acordo com a metodologia descrita em Embrapa (2009). Quanto às análises da composição isotópica de ¹⁵N, as amostras foram processadas de acordo com o método de Rittenberg (1946); partindo-se do destilado final obtido na análise da percentagem de N total, os extratos foram novamente acidificados com H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ e concentrados por evaporação, e o N-NH₄⁺ foi convertido em N₂ por oxidação com hipobrometo de lítio (LiOBr) (PORTER e O'DEEN, 1977). As análises da composição isotópica de ¹⁵N foram determinadas em espectrômetro de massa Delta Plus, do Laboratório de Isótopos Estáveis John M. Day da Embrapa Agrobiologia. Com os resultados de composição isotópica de nitrogênio (% de átomos de ¹⁵N) das amostras, foram calculados:

a) Quantidade de N total acumulada (QNT, mg/planta)

$$QNT = \frac{RMS \times N}{100}$$

em que RMS é o rendimento de massa seca, e N é o teor de N na planta (g kg⁻¹).

b) Porcentagem de N na planta proveniente do fertilizante (%NPPF)

$$\%NPPF = \frac{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso na planta}}{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso no fertilizante}} \times 100$$

c) Quantidade de N na planta proveniente do fertilizante

$$QNPPF = \frac{\%NPPF \times QNT}{100}$$

d) Eficiência de utilização do N aplicado como fertilizante, em função da quantidade aplicada (QNA)

$$EUN = \frac{QNPPF}{QNA} \times 100$$

A contribuição da FBN para cultura do milho foi quantificada através da técnica de diluição isotópica de ^{15}N , baseada na abundância natural de ^{15}N (SHEARER e KOHL, 1986). Além das amostras das plantas de milho, obtidas no estágio R6, espécies espontâneas, não leguminosas, foram coletadas para serem utilizadas como referência da abundância natural de ^{15}N disponível no solo. Assim, foram coletadas três plantas como referência, em cada repetição dos tratamentos testemunha, as quais foram utilizadas para estimativa de FBN. Foram elas: *Commelia benghalensis* L., *Digitaria insularis* e *Cenchrus echinatus*. O material colhido foi secado em estufa a 65°C, moído e analisado para abundância natural de ^{15}N (OKITO et al., 2004).

A estimativa da FBN através da abundância natural de ^{15}N foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{FBN} = \left(1 - \frac{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N} \text{ em excesso na planta teste}}{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N} \text{ em excesso no controle}} \right) \times 100$$

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As maiores produtividades de grãos de milho foram obtidas pelo tratamento correspondente à adubação de 120 kg ha⁻¹ de N, não diferindo estatisticamente do tratamento inoculado com *H. seropedicae* acrescido 120 kg ha⁻¹ de N e aquele inoculado com *A. brasilense* e suprido com 30 e 120 kg ha⁻¹ de N (Quadro 1). Destaca-se que o tratamento corresponde à adubação de 120 kg ha⁻¹ de N promoveu um aumento na produtividade de grãos na ordem de 10%, em comparação com ao tratamento controle, que não recebeu inoculação e nem adubação nitrogenada. Já os tratamentos com inoculação de *H. seropedicae* acrescido de 120 kg ha⁻¹ de N e aquele inoculado com *A. brasilense* e suprido com 30 e 120 kg ha⁻¹ de N promoveram incrementos no rendimento de grãos na ordem de 6,78%, 6,82% e 3,25%, respectivamente, embora não tenham apresentado diferença significativa em relação ao controle. Em média, esses tratamentos proporcionaram incremento de 518,74 kg ha⁻¹ de grãos de milho em relação ao tratamento controle, o que representa um ganho de 8,64 sacas a mais por hectare cultivado, sugerindo a aplicabilidade da inoculação associada a adubação nitrogenada para o cultivo do milho.

Em trabalho conduzido por Neto (2008), a inoculação do produto à base de *A. brasilense* proporcionou aumento significativo na produtividade de grãos de milho de 9021 kg ha⁻¹ para 9814 kg ha⁻¹, ou seja, aumento médio de 9%. Já Alves (2007) observou percentuais de incrementos para produtividade do milho de 34% e 24% com a utilização de *H. seropedicae* na safra e na safrinha, e que a inoculação pode suprir até 40 kg ha⁻¹ de N. Dalla Santa et al. (2004) em estudo com inoculação das estirpes RAM- 7 e RAM- 5 de *Azospirillum* sp., observaram redução de 40% na quantidade de fertilização nitrogenada para a cultura do milho. Hungria et al. (2010) e Lana et al. (2012) verificaram que a inoculação de *A. brasilense* promoveu aumento na produtividade de grãos de milho de 26% e 15,4%, respectivamente. Em 2013, Canellas e colaboradores observaram aumento de 65% na produção de grãos de milho em relação ao controle quando inoculados com *H. seropedicae* em combinação com substâncias húmicas.

Segundo Huergo et al. (2008) e Hungria et al. (2011) aumentos na produção de massa seca e produtividade de grãos de milho em resposta à inoculação

podem ser atribuídos ao estímulo que as bactérias diazotróficas fornecem ao desenvolvimento de sistema radicular, com aumento na densidade de pêlos radiculares, comprimento, volume e número de raízes laterais, resultando em maior capacidade de absorção e utilização de água e nutrientes.

É importante salientar, que os tratamentos com inoculação de bactérias diazotróficas acrescidos de 30 kg ha⁻¹ de N apresentaram resultados similares ao tratamento com a maior dose de N (120 kg ha⁻¹ de N) para produtividade de grãos (Quadros 1), o que permite sugerir que é menos onerosa a aplicação de 30 kg ha⁻¹ de N quando comparado a dose de 120 kg ha⁻¹ de N, sendo que a tendência a adoção dessa tecnologia em milho pode proporcionar uma redução no uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos, e conseqüentemente redução nos custos de produção.

A porcentagem de N nos grãos (%NG) e a quantidade total de N nos grãos (NTG) de milho apresentaram diferença significativa entre os tratamentos inoculados com bactérias diazotróficas e acrescidos de 30 e 120 kg ha⁻¹ de N em relação ao controle (não inoculado e não adubado) (Quadro 1). Os tratamentos inoculados com *A. brasilense* e *H. seropedicae* acrescidos de 30 e 120 kg ha⁻¹ de N apresentaram redução na %NG, e por conseguinte, no NTG. Quanto à porcentagem de N na parte aérea (%NPA), a inoculação com *A. brasilense* promoveu maior incremento nos teores de N na parte aérea de plantas de milho, não diferindo do controle e dos tratamentos inoculados e adubados com 120 kg ha⁻¹ de N (Quadro 1). Estes resultados corroboram aos encontrados por Rodrigues et al. (2006) e Pedraza et al. (2009), que verificaram aumento significativo no teor de N nos grãos de trigo e arroz com a inoculação de *Azospirillum* spp., sem adição de N. Guimarães (2006) observou incrementos no acúmulo de nitrogênio dos grãos de 64 % nas plantas de arroz (variedade IR 42) inoculadas com a estirpe ZAE 94 e adubadas com 50 kg N ha⁻¹, em relação ao controle não inoculado nem adubado.

QUADRO 1. Produtividade (PRO), massa seca total (MST), porcentagem de nitrogênio no grão (%NG), porcentagem de nitrogênio na parte aérea (%NPA), nitrogênio total do grão (NTG) e nitrogênio total da parte aérea (NTPA) de planta de milho em resposta a adubação nitrogenada e a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. (Dourados,MS (2012).

Tratamentos	PRO		MST		NG		NPA		NTG		NTPA	
	kg ha ⁻¹				%				kg ha ⁻¹			
1. Controle	9231,71	b	9977,91		1,66	ab	0,86	ab	154,46	ab	83,61	
2. <i>A.brasilense</i>	9078,41	b	9802,84		1,82	ab	0,90	a	165,67	ab	89,85	
3. <i>H. seropedicae</i>	9023,88	b	10098,58		1,99	a	0,79	abc	180,83	a	80,02	
4. 30 kg ha ⁻¹ N	9302,05	b	10633,24		1,29	cd	0,62	bc	121,33	c	67,64	
5. <i>A.brasilense</i> + 30 kg ha ⁻¹ N	9531,75	ab	11587,76		1,23	d	0,58	c	117,58	c	68,76	
6. <i>H. seropedicae</i> + 30 kg ha ⁻¹ N	9133,32	b	9531,11		1,25	d	0,66	bc	114,92	c	63,74	
7. 30 kg ha ⁻¹ N + 90 kg ha ⁻¹ N	10146,52	a	10198,58		1,26	cd	0,85	ab	128,31	bc	87,46	
8. <i>A. brasilense</i> + 120 kg ha ⁻¹ N	9861,37	ab	11197,74		1,35	cd	0,75	abc	134,02	bc	84,37	
9. <i>H. seropedicae</i> + 120 kg ha ⁻¹ N	9858,23	ab	11867,71		1,47	bcd	0,76	abc	144,98	bc	92,88	
Média	9463,03		10543,89		1,48		0,75		140,23		79,81	
Teste F	4,76*		1,55 ^{ns}		10,02*		4,52*		6,39*		1,81 ^{ns}	
CV (%)	4,81		15,42		14,50		16,95		15,85		24,05	

* e ^{ns} – significativo a 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente. Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em média, a porcentagem de N nos grãos proveniente do fertilizante (%NGPF) foi de 11,63% no tratamento adubado com 30 kg ha⁻¹ de N e nos tratamentos inoculados com *A. brasilense* e *H. seropedicae* e acrescidos de 30 kg ha⁻¹ de N, não diferindo estatisticamente entre si (Quadro 2). Contudo, quando acrescidos 120 kg ha⁻¹ de N na ausência e presença de inoculação com *A. brasilense* e *H. seropedicae* o %NGPF foi em média 37,62%, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos tratamentos inoculados e acrescidos de 30 kg ha⁻¹ de N (Quadro 2). A %NPAPF foi de 17,56% nos tratamentos adubados com 30 kg ha⁻¹ de N e inoculados com *A. brasilense* e *H. seropedicae*, enquanto que, com a adição de 120 kg ha⁻¹ de N o %NPAPF foi 41,23%, contudo, houve um incremento médio superior a 100% com adição de 120 kg ha⁻¹ de N em relação a adição de 30 kg ha⁻¹ de N (Quadro 2).

A quantidade de N nos grãos proveniente do fertilizante (QNGPF) e a quantidade de N na parte aérea proveniente do fertilizante (QNPAPF) seguiram a mesma tendência observada para %NGPF e %NPAPF. Houve um incremento médio de 266 e 216 kg ha⁻¹ de N nos grãos e na parte aérea, respectivamente, de plantas de milho quando adubadas com 120 kg ha⁻¹ de N e inoculadas com *A. brasilense* e *H. seropedicae* em relação aos tratamentos adubados com 30 kg ha⁻¹ de N e inoculados (Quadro 2).

Os resultados revelam que tanto a porcentagem e quanto a quantidade de N proveniente do fertilizante foram proporcionais às doses de N aplicadas e inoculadas com *A. brasilense* e *H. seropedicae*.

Contudo, a eficiência de utilização do N pela planta (EUNPL) respondeu de maneira contrária aos parâmetros anteriores. As plantas adubadas com 30 kg ha⁻¹ de N e inoculadas com *A. brasilense* e *H. seropedicae* apresentaram as maiores porcentagem de eficiência de utilização do N. Em média, nestes tratamentos a EUNPL foi de 84,65% contra 64,63% nos tratamentos adubados com 120 kg ha⁻¹ de N e inoculados com *A. brasilense* e *H. seropedicae* (Quadro 2). Verifica-se que não foi calculada a eficiência de utilização do N para os tratamentos que não receberam aplicação de N, já que a eficiência de utilização do N leva em consideração o N aplicado ao solo e, nesses casos, tal procedimento não ocorreu.

O estudo da eficiência de utilização do nitrogênio em sistemas produtivos é fundamental, pois à medida que a quantidade aplicada ultrapassa a capacidade da planta em absorver o nutriente para produção, o nitrogênio pode ser lixiviado ou acumular-se nos

tecidos, reduzindo sua eficiência de aproveitamento. No presente estudo, as maiores eficiências de utilização do N pelas plantas foram obtidas com a dose de 30 kg ha⁻¹ de N e inoculadas com *A. brasilense* e *H. seropedicae* não diferindo estatisticamente entre si. Esses dados revelam que as plantas de milho não possuíram potencial para utilizar mais eficientemente o N em doses superiores a 30 kg ha⁻¹ de N nas condições do estudo e inoculadas com bactérias diazotróficas. Redução no aproveitamento de N por plantas de milho com aumento das doses de N também tem sido relatado por outros autores (FERNANDES et al., 2005; SILVA et al., 2009). Alves et al. (2006) avaliando a fertilização nitrogenada na cultura do milho em um Latossolo vermelho ditroférrico, encontraram resultados de EUNPL de 18% para os 25 kg ha⁻¹ de N aplicados ao plantio, sendo que valores mais elevados de EUNPL, de 62% para milho, foram encontrados para a dose de 45 kg ha⁻¹ de N. na aplicação realizada aos 26 dias depois da emergência.

Os resultados de eficiência de utilização do N pelos grãos (EUNG) e pela parte aérea (EUNPA) não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$). No entanto, a EUNG e EUNPA apresentaram valores médios de 45,88% e 38,77%, respectivamente, nos tratamentos adubados com 30 kg ha⁻¹ de N e inoculadas com *A. brasilense* e *H. seropedicae*, corroborando com os resultados encontrados para EUNPL (Quadro 2).

Em estudos com o milho, em Latossolo Vermelho, utilizando-se métodos isotópicos com ¹⁵N, foram encontradas diferentes eficiências de recuperação do N do fertilizante pelo milho: 26 a 49% (FIGUEIREDO et al., 2005); 40 a 50% (SILVA et al., 2006); 45% (GAVA et al., 2006) e 39% (DUETE et al., 2008). A variação no aproveitamento do N proveniente de fertilizantes minerais pelo milho é decorrente de diversos fatores, principalmente das condições edafoclimáticas, do fertilizante utilizado, do manejo da adubação (dose, época e modo de aplicação) e do sistema de cultivo (semeadura direta ou preparo convencional) (LARA CABEZAS et al., 2004; DUETE et al., 2008). As perdas de N por lixiviação, volatilização, desnitrificação e erosão e a imobilização microbiana também têm influência no aproveitamento do N proveniente de fontes minerais (LARA CABEZAS et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2005).

QUADRO 2. Porcentagem de nitrogênio no grão proveniente do fertilizante (%NGPF), Porcentagem de nitrogênio na parte aérea proveniente do fertilizante (%NPAPF), quantidade de nitrogênio grão proveniente do fertilizante (QNGPF), quantidade de nitrogênio na parte aérea proveniente do fertilizante (QNPAPF), eficiência de utilização do N no grão (EUNG), eficiência de utilização do N na parte aérea (EUNPA) e eficiência de utilização do N pelas plantas (EUNPL) de milho em resposta a adubação nitrogenada e a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. Dourados, MS (2012).

Tratamentos	NGPF		NPAPF		QNGPF		QNPAPF		EUNG	EUNPA	EUNPL	
	%				kg ha ⁻¹				%			
4. 30 kg ha ⁻¹ N	11,70	b	17,66	b	14,33	b	11,77	b	47,76	39,26	87,03	a
5. <i>A.brasilense</i> + 30 kg ha ⁻¹ N	11,58	b	17,73	b	13,70	b	12,22	b	45,68	40,73	86,44	a
6. <i>H. seropedicae</i> + 30 kg ha ⁻¹ N	11,63	b	17,30	b	13,26	b	10,90	b	44,22	36,34	80,57	a
7. 30 kg ha ⁻¹ N + 90 kg ha ⁻¹ N	38,74	a	43,83	a	49,33	a	38,36	a	36,54	28,42	64,96	b
8. <i>A. brasilense</i> + 120 kg ha ⁻¹ N	36,86	a	39,69	a	49,15	a	33,61	a	36,40	24,89	61,30	b
9. <i>H. seropedicae</i> + 120 kg ha ⁻¹ N	37,27	a	40,19	a	52,84	a	38,48	a	39,14	28,50	67,64	b
Média	24,63		29,40		32,10		24,22		41,63	33,79	74,66	
Teste F	45,28*		37,63*		76,41*		14,22*		2,08 ^{ns}	2,09 ^{ns}	3,31*	
CV (%)	21,05		17,72		17,54		37,29		19,99	21,37	21,31	

* e ^{ns} – significativo a 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente. Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A avaliação da quantificação da FBN, apresentada nos quadros 3 e 4, demonstra a capacidade do genótipo P3646H de milho em obter N derivado da FBN para seu desenvolvimento. Para estas avaliações foram utilizadas plantas de referência (PR) *Commelia benghalensis* L., *Digitaria insularis* e *Cenchrus echinatus* para calcular a FBN e parcelas que não receberam adição de N mineral.

No quadro 3 são apresentados resultados de PR que foram usadas para controle na determinação das contribuições da FBN. Observou-se que nestas avaliações, a taxa de FBN do híbrido P3646H inoculado tanto com *A. brasilense* quanto com *H. seropedicae* não foram significativos. Os valores de abundância natural de ^{15}N das PR foram menores do que os observados nas plantas de milho, o que não possibilitou a aplicação da técnica de ^{15}N para a estimativa da contribuição da FBN para o milho, estipulado por Shearer e Kohl (1986).

Contudo, no quadro 4 são apresentados resultados de plantas não inoculadas que foram usadas para controle na determinação das contribuições da FBN. Para isto, admitiu-se que as contribuições da FBN nestas plantas através da associação com a microbiota diazotrófica nativa (não inoculada), ocorreu de forma uniforme para todos os tratamentos testados. Portanto, os valores apresentados referem-se ao ganho de FBN obtidos através do uso da inoculação com a estirpe selecionada de *A. brasilense* e *H. seropedicae*. Verificou-se que nestas avaliações, a taxa de FBN do híbrido P3646H inoculado com *A. brasilense* foi significativamente ($p \leq 0,05$) superior ao inoculado com *H. seropedicae*. A inoculação com *A. brasilense* contribuiu com 19,40% do N proveniente da FBN, enquanto que a inoculação com *H. seropedicae* contribuiu com 9,49% do N proveniente da FBN (Tabela 4). Esses resultados confirmam o potencial para FBN da cultura do milho concordando com resultados de outros autores que afirmam que a fixação biológica de nitrogênio é responsável por parte da necessidade nitrogenada da cultura (RIGGS et al., 2001; DOBBELAERE et al., 2002).

QUADRO 3. Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ dos tratamentos inoculados e não inoculados, estimados através da análise de abundância natural de ^{15}N de plantas de milho na safrinha.

Tratamento	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$ PR1	$\delta^{15}\text{N}$ PR2	$\delta^{15}\text{N}$ PR3	$\delta^{15}\text{N}$ média
1. Controle	8,0 $\pm$ 0,56				
2. <i>A.brasilense</i>	6,7 $\pm$ 0,32	6,4 $\pm$ 0,04	6,26 $\pm$ 0,06	6,60 $\pm$ 0,35	6,45 $\pm$ 0,12
3. <i>H. seropedicae</i>	7,3 $\pm$ 0,74				

Médias de quatro repetições, utilizando plantas de referência como controle para FBN. PR1: *Commelia benghalensis* L.(trapoeraba), PR2: *Digitaria insularis* (capim amargoso) e PR3: *Cenchrus echinatus* (capim carrapicho).

QUADRO 4. Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ e FBN dos tratamentos inoculados, estimados através da análise de abundância natural de ^{15}N de plantas de milho na safrinha.

Tratamento	$\delta^{15}\text{N}$ inoculado	$\delta^{15}\text{N}$ não inoculado	FBN (%)
1. <i>A.brasilense</i>	6,7 $\pm$ 0,32	8,0 $\pm$ 0,56	19,40 a
2. <i>H. seropedicae</i>	7,3 $\pm$ 0,74		9,49 b

Médias de seis repetições, utilizando plantas não inoculadas como controle para FBN.

Uma diversidade de diazotróficos tem sido identificada em milho (BALDANI et al., 1980, 1986; CHELIUS e TRIPLETT, 2000, 2001; PERIN et al., 2006) e descritas como bactérias promotoras de crescimento das plantas, mas não tem sido claramente documentada a contribuição da FBN para cultura do milho (CHELIUS e TRIPLETT, 2000; GUTIÉRREZ-ZAMORA e MARTÍNEZ-ROMERO, 2001). García de Salamone et al. (1996) verificaram através da técnica da diluição isotópica de ^{15}N , que a inoculação com *Azospirillum* spp. contribuiu com significantes níveis de FBN dependendo do genótipo de milho. Alves (2007) constatou pela técnica da abundância natural de ^{15}N , que o híbrido SHS 5050 recebeu contribuição de 45% e 36% de N proveniente da FBN nos experimentos de safrinha e safra quando inoculado com a estirpe BR 11417 de *H. seropedicae*. Montanez e colaboradores (2009) observaram uma variação de 12% a 33% de FBN em uma série de cultivares comerciais de milho do Uruguai pelo método de diluição isotópica de ^{15}N .

CONCLUSÕES

1. A adubação nitrogenada associada a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* influencia positivamente a produtividade de grãos de milho.

2. A inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* acrescidos de 30 e 120 kg ha⁻¹ de N promove redução na porcentagem de N nos grãos e na parte aérea de plantas de milho.

3. O aumento da dose de nitrogênio associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* proporciona aumento na quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante nos grãos e na parte aérea do milho e reduz a eficiência de utilização desse nutriente pela planta.

4. Pela técnica da abundância natural do ¹⁵N, a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* contribui em média com 19,40 e 9,49%, respectivamente, do N necessário ao desenvolvimento da cultura do milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URGUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.3, p.449-456, 2006.

ALVES, G. C. **Efeito da Inoculação de Bactérias dos Gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na Cultura do Milho**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

ANDRADE, A. C.; FONSECA, D. M.; QUEIROZ, D. S.; SALGADO, L. T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, p. 1643-1651, 2003. Edição especial.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.

BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp.* **Soil biology and Biochemistry**, v.12, p.33-439, 1980.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; PIO VIANA, A.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar vitória durante aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 349-360, 2010.

BASTOS, E. A.; CARDOSO, M. J.; MELO, F. B.; RIBEIRO, V. Q.; ANDRADE JÚNIOR, A. S. Doses e formas de parcelamento de nitrogênio para a produção de milho sob plantio direto. **Revista Ciência Agronômica**. v. 39, n. 02, p. 275-280, 2008.

BELARMINO, M. C. J.; PINTO, J. C.; ROCHA, G. P.; FURTINI NETO, A. E.; MORAIS, A. R. Altura de perfilho e rendimento de matéria seca de capim-tanzânia em função de diferentes doses de superfosfato simples e sulfato de amônio. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, p. 879-885, 2003.

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGUA, S. Use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.889-895, 2001.

CANTARELLA, H.; LERA, F. L.; BOLONHEZI, D.; LARA CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O. Antecipação de N em milho em sistema de plantio direto usando ^{15}N -uréia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...**Ribeirão Preto: SBCS, 2003. CD-ROM.

CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F. L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil**, n.366, p.119–132, 2013.

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

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of Archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbiology Ecology**, v.41, p.252-263, 2001.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumonia* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.783-787, 2000.

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v.82, p.273-281, 2004.

DALLA SANTA, O. R.; DALLA SANTA, H. S.; FERNANDÉZ, R.; MICHELENA, G.; JUNIOR, P. R.; SOCCOL, C. R. Influence of *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats. **Ambiência**, v.4, n.2 p.197-207, 2008.

DALLA SANTA, O. R.; SOCCOL, C. R.; JUNIOR, P. R.; HERNÁNDEZ, R. H.; ALVAREZ, G. L. M.; DALLA SANTA, H. S.; PANDEY, A. Effects of inoculation of *Azospirillum* sp. in maize seeds under field conditions. **Food, Agriculture & Environment**, v.2, n.1, p. 238- 242, 2004.

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

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

DONATE-CORREA, J.; LEON-BARRIOS, M.; PEREZ-GALDONA, R. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus*, a forage ter-shrub legume endemic to the Canary Islands. **Plant and Soil**, v.266, n.1-2, p.261-272, 2004.

DUETE, R. R. C.; MURAOKA T.; SILVA, E. C. da; TRIVELIN, P. C. O.; AMBROSANO, E. J. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (^{15}N) pelo milho em Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.161-171, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3 Ed. rev. ampl.- Brasília, DF: Embrapa Solos, 2013. 353p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**.- 2. Ed, Brasília., Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Screening crop genotypes for mineral stresses. In: WORKSHOP ON ADAPTATION OF PLANTS TO SOIL STRESSES, Lincoln, 1993. Proceedings. Lincoln, University of Nebraska, 1993. p.142-159.

FERNANDES, F. C. S.; BUZETTI, S.; ARF, O.; ANDRADE, J. A. C. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. **Revista Brasileira Milho Sorgo**, v.4, n.2, p.195-204, 2005.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000.

FIDELIS, R. R. SANTOS, I. C.; GALVÃO, J. C. C.; PELUZIO, J. M.; LIMA, S. O. Fontes de germoplasma de milho para estresse de baixo nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 03, p.147-153, 2007.

FIGUEIREDO, C. C. de; RESCK, D. V. S.; GOMES, A. C.; URQUIAGA CABALLERO, S. S. Sistemas de manejo na absorção de nitrogênio pelo milho em um Latossolo Vermelho no Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.279-287, 2005.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; DOBEREINER, J.; IRGUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ^{15}N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v.23, n.3, p.249-256, 1996.

GAVA, G. J. C.; OLIVEIRA, M. W.; SILVA, M. A.; JERÔNIMO, E. M.; CRUZ, J. C. S.; TRIVELIN, P. C. O. Produção de fitomassa e acúmulo de nitrogênio em milho cultivado com diferentes doses de ^{15}N -uréia. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 851-862, 2010.

GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; HEINRICHS, R.; SILVA, M. de A. Balanço do nitrogênio da uréia (^{15}N) no sistema solo-planta na implantação da semeadura direta na cultura do milho. **Bragantia**, v.65, p.477-486, 2006.

GUTIÉRREZ-ZAMORA, M. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Biotechnology**, v.91, p.117-126, 2001.

GUIMARÃES, S. L. **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. 2006, 88f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

HAN, J.; SUN, L.; DONG, X.; CAI, Z.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y.; SONG, W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and potential biocontrol agent against various pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.66-76, 2005.

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

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, n.1-2, p.413-425, 2010.

KHALIQ, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, n.96, p.473-480, 2004.

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

LARA CABEZAS, W. A. R.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA CABALLERO, S. S.; SANTANA, D. G. de. Influência da cultura antecessora e da adubação nitrogenada na produtividade de milho em sistema plantio direto e solo preparado. **Ciência Rural**, v.34, p.1005-1013, 2004.

LARA CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O.; KONDÖRFER, G. H.; PEREIRA, S. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura do milho, em sistema plantio direto no triângulo mineiro (Mg). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 363-376, 2000.

MARTINEZ, H. E. P.; CARVALHO, J. G.; SOUZA, R. B. Diagnose foliar. In: RIBEIRO A. C.; GUIMARÃES, P. T. G. & ALVAREZ V. H. V., eds. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais, 5ª aproximação**. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1999. p.143-168.

MONTANEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ^{15}N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, p. 253-263, 2009.

NETO, C. R. B. **Efeito do nitrogênio e da inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense* no rendimento de grãos de milho**. 2008, 27 p. Monografia – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

OKITO, A.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Isotopic fractionation during N_2 fixation by four tropical legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.1179-1190, 2004.

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

PEDRAZA, R. O.; BELLONE, C. H.; BELLO, E, S. C.; BOA SORTE, P. M. F.; TEIXEIRA, R. S. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 36–43, 2009.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; EESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1931-1937, 2006.

PORTER, L.K.; O'DEEN, W.A. Apparatus for preparing nitrogen from ammonium chloride for nitrogen-15 determinations. **Analytical Chemistry**, v.49, p.514-516, 1977.

RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPPLE, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n.9, p.829-836, 2001.

RITTENBERG, D. The preparation of gas sample for mass-spectrometric analysis. In: WILSON, D.W. (Ed.). **Preparation and measure of isotopic traces**. Michigan: Ann Arbor, 1946. p.31.

RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.2, p. 275-284, 2006.

SILVA, E. C.; MURAOKA, T.; VILLANUEVA, F. C. A.; ESPINAL, F. S. C. Aproveitamento de nitrogênio pelo milho, em razão da adubação verde, nitrogenada e fosfatada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.2, p.118-127, 2009.

SILVA, E. C. da; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; TRIVELIN, P. C. O. Manejo de nitrogênio no milho sob plantio direto com diferentes plantas de cobertura, em Latossolo Vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.477-486, 2006.

SILVA, E. C.; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; GUIMARÃES, L. Doses e épocas de aplicação e utilização do nitrogênio (^{15}N) pelo milho sob plantio direto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCS, 2003. CD-ROM.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. N_2 -fixation in field settings: estimations based on natural ^{15}N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.699-756, 1986.

CAPÍTULO IV

INOCULAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* EM TRÊS GENÓTIPOS DE MILHO SOB DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) associada à cultura do milho torna-se de extrema importância, mesmo que apenas parte da necessidade de N pela cultura possa ser suprida por este processo. Objetivou-se com o presente trabalho verificar o comportamento de três híbridos de milho à inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. O ensaio foi conduzido em condições controladas de casa de vegetação e o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 x 2, sendo, três híbridos de milho: Maximus, P3646H e BRS3035, plantas inoculadas e não inoculadas, duas doses de nitrogênio: 0,0 e 80 kg ha⁻¹, com quatro repetições. Aos 35 dias após a emergência, foi determinada a altura de plantas, o diâmetro do colmo, o teor de clorofila, o comprimento de raiz, o volume de raiz, o teor de N na parte aérea e na raiz, bem como a eficiência de absorção e utilização de N. O híbrido BRS 3035 se destaca para a maioria das variáveis analisadas, produzindo maior quantidade de massa seca de parte aérea, plantas com maior altura, volume de raízes e apresentando maiores índices de eficiência de utilização de N. A inoculação com a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae* promoveu aumento no volume de raízes, comprimento de raízes, massa seca da parte aérea, teor de clorofila, teor de N na parte aérea, eficiência de absorção do N e eficiência de utilização do N por plantas de milho. A inoculação da estirpe Z-94 de *H. seropedicae* acrescido de 80 kg ha⁻¹ de N aumentou o teor de N na parte aérea das plantas de milho em até 25% nos genótipos avaliados.

Palavras-chave: Inoculantes, bactérias diazotróficas, nutrição, fixação biológica de nitrogênio.

INOCALATION OF *Herbaspirillum seropedicae* IN THREE MAIZE GENOTYPES RATES DIFFERENT NITROGEN LEVELS

ABSTRACT

The biological nitrogen fixation (FBN) associated with maize culture becomes extremely important, even if only part of the need for N by culture may be supplied by this process. The aim of this study was to verify the behavior of three maize hybrids to inoculation of *Herbaspirillum seropedicae* under different nitrogen levels. The test was conducted under controlled conditions of greenhouse and the experimental design used was the completely randomized design in factorial scheme $3 \times 2 \times 2$, and three hybrids of corn: Maximus, P3646H and BRS3035, inoculated and non-inoculated plants, two doses of nitrogen: 0.0 and 80 kg ha⁻¹, with four replicates. To 35 days after emergence were determined the plant height, stem diameter, chlorophyll content, length root, volume of root, content N in shoot and root, as well as the efficiency of absorption of utilization of N. The hybrid BRS 3035 stands out for most of the variables analyzed, producing most of the shoot dry mass, plants with greater height, root volume and showing the highest rates of N use efficiency. The *H. seropedicae* inoculated with promoted increase in the volume of root, root length, dry weight of shoot, chlorophyll content, content of N in above ground, absorption efficiency of N and efficiency use N by corn plants. Inoculation strain Z-94 of *H. seropedicae* plus 80 kg ha⁻¹ de N increased the concentration of N in the aerial part of plants of corn by as much as 25% in the evaluated genotypes.

Key words: Inoculants, diazotrophic bacteria, nutrition, biological nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o milho é cultivado em praticamente todo território nacional, sendo que 90% da produção concentra-se nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Na safra 2012/2013 cerca de 15,9 milhões de hectares foram cultivados, com uma produção de aproximadamente 76 milhões de toneladas de milho (CONAB, 2013). Embora apresente elevada taxa fotossintética, o milho é uma cultura muito influenciada por problemas de estresse ambiental, dentre os quais se destacam aqueles relacionados à baixa fertilidade dos solos, que, em sua maioria, apresentam deficiência de nitrogênio (N). Segundo Fancelli e Dourado Neto (2008), tal deficiência pode reduzir o rendimento de grãos entre 14 e 80%.

A identificação, a seleção e o uso de genótipos de milho mais tolerantes à deficiência de N e eficientes na aquisição deste elemento constituem-se numa estratégia importante (REIS JUNIOR et al., 2008). Nesse sentido, deve ser considerada a busca por genótipos que formem associações mais eficientes com bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas. Sabe-se que existem interações entre o N e essas bactérias na assimilação e utilização desse nutriente pelas plantas (REIS JUNIOR et al., 2008). Huergo et al. (2008), Cássan et al. (2008) e Donate-Correa et al. (2004) observaram, por exemplo, que bactérias diazotróficas podem estimular o crescimento das plantas por atuarem na capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN), no aumento da atividade da redutase do nitrato quando ocorrem endofiticamente nas plantas, e na produção de fitohormônios como auxinas, giberilinas e citocianinas.

Em razão da extensa área ocupada pelos cereais, aproximadamente cinco vezes a das leguminosas, a FBN associada a essas culturas torna-se de extrema importância, mesmo que apenas parte de suas necessidades de N possa ser suprida pela FBN (SALA et al., 2007). Em relação à contribuição da FBN, Alves (2007) relatou contribuição de até 67% do N proveniente da FBN, quando inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* e incremento de até 34% na produtividade, dependendo do genótipo de milho e da dose de N-mineral.

Existem variações entre genótipos de milho na resposta à adubação nitrogenada (ALFOLDI et al., 1992), assim como interações entre o milho e

bactérias diazotróficas são dependentes dos genótipos da planta e dos microrganismos envolvidos nessas associações (GARCIA DE SALOMONE e DOBEREINER, 1996). Dentre os microrganismos diazotróficos encontrados em associações com cereais e gramíneas, as espécies de *Herbaspirillum* constituem um dos grupos mais bem estudados atualmente.

Embora o gênero *Herbaspirillum* seja constituído de nove espécies, apenas quatro são fixadoras de nitrogênio, sendo elas *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum frisingense* e *Herbaspirillum lusitanum*. A maioria dos experimentos de inoculação refere-se à *Herbaspirillum seropedicae*, pela sua ocorrência em maior número de plantas estudadas (ALVES, 2007). Estudos que envolvem a espécie *Herbaspirillum seropedicae* são interessantes, pois, dentre as características dessa espécie, destaca-se a capacidade de colonizar o interior e a parte aérea dos tecidos vegetais (BALDANI et al., 1997), recebendo nutrientes diretamente do interior vegetal, e podendo expressar seu potencial para FBN no seu grau máximo (KENNEDY et al., 2004).

No Brasil, poucos estudos têm focado as interações entre genótipos de milho, adubação nitrogenada e bactérias diazotróficas. Em muitos casos, a ausência de resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas tem sido atribuída ao uso de linhagens inadequadas. Há consenso de que o genótipo da planta é o fator-chave para obtenção dos benefícios oriundos da FBN, aliado à seleção de estirpes eficientes (REIS et al., 2000). Apesar de muitos anos de pesquisa, ainda se observam respostas muito variáveis, o que mostra a importância e justifica a realização de experimentos de campo e em casa de vegetação.

Neste sentido, objetivou-se com o presente trabalho verificar o comportamento de três híbridos de milho à inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes doses de nitrogênio, em ensaio conduzido em condições controladas de casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação, na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, MS, no período de dezembro de 2012 a janeiro de 2013, cujas coordenadas geográficas são latitude 22°12' S, longitude 54°56'W e altitude de 452 m. O clima da região é do tipo Cwa, segundo a classificação de Köppen. O solo utilizado neste estudo, classificado como Latossolo Vermelho distroférrico de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2013), foi coletado na profundidade de 0-20 cm. Os resultados da análise química do solo antes da instalação do experimento resultaram nos seguintes valores: pH (CaCl₂): 4,15; P: 26 mg dm⁻³; K: 5,0 mmolc dm⁻³; Ca: 9,0 mmolc dm⁻³; Mg 2,0 mmolc dm⁻³; Al: 3,3 mmolc dm⁻³; H+Al: 41,6 mmolc dm⁻³; SB: 115,1 mmolc dm⁻³; CTC: 531,1 mmolc dm⁻³, saturação por bases 21,7%. A análise granulométrica apresentou 225 g kg⁻¹ de areia, 125 g kg⁻¹ de silte e 650 g kg⁻¹ de argila.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 x 2, sendo, três híbridos de milho: Maximus, P3646H e BRS3035, plantas inoculadas e não inoculadas, duas doses de nitrogênio: 0,0 e 80 kg ha⁻¹, com quatro repetições. As unidades experimentais foram compostas por vasos plásticos com capacidade de 10 dm⁻³, preenchidos com solo seco ao ar, passado em peneira de 4 mm de abertura.

Com base nos resultados da análise química do solo, foi realizada a calagem 30 dias antes da semeadura com o intuito de elevar a saturação por bases para 50%, sendo utilizado calcário dolomítico finamente moído (PRNT 100%). Devido à baixa fertilidade do solo, também foi realizada uma adubação de base para garantir o estabelecimento da cultura. Foram aplicados (misturado ao solo) 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 60 kg ha⁻¹ de K₂O, na forma superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente. Os micronutrientes foram aplicados conforme a exigência da cultura, na forma de solução, usando água deionizada e sais p.a., de acordo com Epstein e Bloom (2006). A adubação nitrogenada foi realizada na dose de 80 kg ha⁻¹ de N na forma de uréia (45%), aplicados em duas vezes de 40 kg ha⁻¹ de N. A primeira aplicação de N foi realizada na semeadura e a segunda, em cobertura, aos 15 dias após a emergência das plantas.

A umidade dos vasos foi controlada diariamente, através da sua pesagem, sempre visando manter o solo com 60% da capacidade de campo. A irrigação foi feita com água deionizada.

Foram utilizadas sementes de milho do híbrido simples P3646H (Pioneer), híbrido triplo BRS3035 (Embrapa) e híbrido duplo Maximus (Syngenta), sendo as mesmas previamente inoculadas com a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae* (concentração de células no inoculante na faixa de 10^9) na formulação à base de turfa, produzido pela Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ. A dose aplicada foi de 250 g do inoculante turfoso para cada 10 kg de sementes de milho. Para a inoculação foram adicionados 60 mL para cada 10 kg de semente de uma solução açucarada a 10% (p/v), visando aumentar a adesão do inoculante turfoso às sementes. As sementes foram postas a germinar diretamente nos vasos, sendo, que aos oito dias após a emergência, realizou-se o desbaste, deixando-se apenas uma planta em cada unidade experimental.

Aos 35 dias após a emergência foram determinadas a altura de plantas, o diâmetro do colmo e o teor de clorofila nas folhas. A altura das plantas foi obtida pela medição do colo da planta até o meristema apical, utilizando-se uma régua graduada; o diâmetro do colmo foi determinado com o auxílio de paquímetro digital, na altura de 2 cm do colo da planta; e o teor de clorofila na folha (leitura SPAD) foi determinado com auxílio do clorofilômetro, modelo SPAD-502. Posteriormente as plantas foram coletadas e divididas em raiz e parte aérea. Todo o material vegetal coletado foi lavado em água corrente, solução de HCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e água deionizada, respectivamente. O comprimento de raiz foi determinado com uma régua graduada e o volume de raiz pelo método da proveta, no qual as raízes foram submersas em proveta graduada com volume de água destilada conhecido, sendo o volume determinado pela diferença entre o volume inicial e final do recipiente. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65°C , por 72 horas. Após a secagem do material vegetal, procederam-se a pesagem e moagem da massa seca em moinho tipo Wiley, sendo as amostras, submetidas à digestão sulfúrica, para determinação do teor de N nas diferentes partes da planta (raiz e parte aérea), de acordo com a metodologia descrita em Embrapa (2009). O índice de eficiência de absorção, razão entre o conteúdo total de nutriente na planta e a massa seca das raízes, foi calculado

de acordo com Swiader et al. (1994), enquanto que o índice de utilização do nitrogênio, razão entre a massa seca total produzida e o acúmulo total de nutriente na planta, foi calculado de acordo com Siddiqi e Glass (1981).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados efeitos significativos ($p \leq 0,05$) da interação híbrido (H) e inoculação (I), para o diâmetro do colmo e o teor de N na parte aérea, enquanto que a interação nitrogênio (N) e inoculação (I) influenciaram apenas o teor de N na parte aérea. Os demais resultados não apresentaram efeito significativo da interação e são apresentados independentes para cada híbrido, inoculação e nitrogênio (Quadro 1). As doses de N influenciaram todas as variáveis estudadas (Quadro 1).

Verificou-se efeito significativo da adubação nitrogenada quanto à altura da planta (Quadro 2). O incremento na altura de plantas observado neste estudo está associado ao alongamento do caule promovido pelo N devido ao fato de que, segundo Marschner (1995) a aplicação de doses elevadas de N nos estádios iniciais de desenvolvimento dos cereais promove aumento da produção de fitohormônios promotores do crescimento (auxinas, giberilinas e citocininas), responsáveis pelos processos de divisão e expansão celular. Estudando os efeitos da aplicação de nitrogênio na cultura do milho, Silva et al. (2003) constataram resposta positiva na altura de plantas com o aumento das doses de nitrogênio. Isso evidencia que plantas nutridas adequadamente com N podem ter maior desenvolvimento vegetativo.

O diâmetro basal do colmo foi influenciado positivamente pelo aumento da dose de N (Quadro 2). Cabe salientar que maior diâmetro do colmo está diretamente relacionado com o aumento da produção, uma vez que atua no armazenamento de sólidos solúveis que serão utilizados posteriormente para a formação dos grãos (FANCELLI e DOURADO NETO, 2008).

O volume de raiz, comprimento de raiz e massa seca de raiz aumentaram com a dose de N (Quadro 2), corroborando com os resultados de Taylor e Arkin (1981) e Glass (1990), que relataram alteração no crescimento das raízes em função da fertilidade do solo. Além disso, o N favorece o crescimento do sistema radicular propiciando à planta condições para maior absorção de água e nutrientes (RAO et al., 1992)

O teor de clorofila nas folhas de milho foi superior nas plantas adubadas com 80 kg ha^{-1} de N (Quadro 2). Os resultados da leitura de clorofila reforçam que a adubação nitrogenada melhorou o nível nutricional de nitrogênio no milho, devido ao

fato da quantidade desse pigmento correlacionar-se positivamente com teor de N na planta (BOOIJ et al., 2000). Em 2012, Mello e colaboradores também verificaram aumento no teor de clorofila nas folhas de milho com as doses de N. Kappes et al. (2013) observaram que a aplicação de 90 kg ha^{-1} de N em cobertura proporcionou maior índice de clorofila foliar em plantas de milho. Os resultados encontrados confirmam o papel do nitrogênio no metabolismo vegetal, diretamente ligado na biossíntese de clorofilas (ANDRADE et al., 2003), sendo importante no estágio inicial de crescimento e desenvolvimento da planta, período em que a absorção é mais intensa.

O teor de N na parte aérea, teor de N na raiz, eficiência de absorção e utilização do N pelas plantas de milho foi superior na dose 80 kg ha^{-1} de N (Quadro 2). Carvalho et al. (2013) avaliando cultivares de milho quanto à eficiência de absorção e utilização do N em níveis contrastantes de nitrogênio constataram efeito das doses de N sobre a produção de massa seca da parte aérea, teor de N na parte aérea e na raiz, e sobre a eficiência de utilização do N. Na literatura vários trabalhos corroboram aos encontrados nesse estudo (CARVALHO et al., 2013; KAPPES et al., 2013; KAPPES et al., 2011). Segundo Bull (1993), o estímulo proporcionado pela adubação nitrogenada no desenvolvimento da planta como um todo é devido ao fato do N estar intimamente ligado ao processo de crescimento da planta, participando da constituição de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucléicos, fitocromos, pigmentos fotossintéticos etc.

QUADRO 1. Resumo da análise de variância para altura de plantas (ALT), diâmetro do colmo (DIA), volume de raiz (VR), comprimento de raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), teor de clorofila (CLO), teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA), teor de nitrogênio na raiz (TNR), eficiência de absorção do nitrogênio (EAN) e eficiência de utilização de nitrogênio (EUN) por três híbridos de milho submetidos a diferentes níveis de nitrogênio e inoculados com *Herbaspirillum seropedicae*. Dourados, MS (2013).

Fonte de variação	GL	Quadrado médio										
		ALT	DIA	VR	CR	MSPA	MSR	CLO	TNPA	TNR	EAN	EUN
Híbrido (H)	2	83,01*	7,30*	885,89*	34,39	51,30*	3,94	114,16*	14,77	55,95*	8,64	1,36*
Nitrogênio (N)	1	485,14*	53,93*	7600,33*	143,52*	224,42*	41,45*	2328,26*	2473,07*	1181,88*	3923,52*	12,26*
Inoculação (I)	1	0,14	7,39	5292,00*	150,52*	33,41*	12,19	75,25*	107,71*	24,73	266,37*	1,17*
H*N	2	30,54	0,47	294,64	23,39	7,23	0,48	39,07	28,23	13,04	56,34	0,79
H*I	2	7,21	11,84*	192,56	18,89	2,55	12,53	2,67	65,63*	4,25	23,69	0,06
N*I	1	1,54	3,43	0,33	63,02	4,30	3,49	0,15	157,26*	24,73	1,88	0,06
H*N*I	2	47,09	1,93	143,39	141,89	0,77	0,72	3,88	81,53	62,31	150,46	0,66
Resíduo	36	11,16	2,08	84,50	15,32	3,33	5,01	3,36	8,22	10,05	14,13	0,12
CV (%)		6,39	8,91	12,41	6,58	24,07	9,18	7,50	13,13	19,35	15,79	17,41

* – significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

QUADRO 2. Efeito da aplicação de doses de N sobre a altura de plantas (ALT), diâmetro do colmo (DIA), volume de raiz (VR), comprimento de raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), teor de clorofila (CLO), teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA), teor de nitrogênio na raiz (TNR), eficiência de absorção do nitrogênio (EAN) e eficiência de utilização do nitrogênio (EUN) por plantas de milho cultivadas em casa de vegetação e colhidas aos 35 dias após o plantio. Dourados, MS (2013).

Nitrogênio	ALT	DIA	VR	CR	MSPA	MSR	CLO	TNPA	TNR	EAN	EUN
(kg ha ⁻¹)	(cm)	(mm)	(cm ³ /planta)	(cm)	____(g)____		(SPAD)	____(g kg ⁻¹)____		____mg g ⁻¹ ____	
0	49,10 b	15,14 b	61,50 b	57,75 b	5,43 b	23,47 b	17,49 b	14,66 b	11,42 b	14,76 b	1,52 b
80	55,45 a	17,26 a	86,66 a	61,20 a	9,75 a	25,33 a	31,42 a	29,02 a	21,34 a	32,84 a	2,54 a

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

Os híbridos de milho apresentaram resposta significativa ($p \leq 0,05$) para altura de plantas, diâmetro do colmo, volume de raiz, massa seca da parte aérea, teor de clorofila, teor de N na raiz e eficiência de utilização do N (Quadro 1). O híbrido BRS 3035 foi estatisticamente superior ($p \leq 0,05$) aos híbridos P3646H e Maximus para altura de plantas, volume de raiz, massa seca da parte aérea e eficiência de utilização de N (Quadro 3). Resultados inversos foram encontrados para as demais variáveis. O teor de clorofila e o teor de N na raiz do híbrido Maximus foi superior ao BRS 3035 (Quadro 3), demonstrando que o híbrido Maximus é mais eficiente na absorção de N, enquanto que o híbrido BRS 3035 é mais eficiente na utilização do nitrogênio. Fernandes et al. (2005), trabalhando com seis cultivares de milho, observaram diferenças significativas na eficiência de utilização de N pelas plantas. Reis Junior et al. (2008) também relataram diferença no acúmulo de massa seca e eficiência de utilização de N entre os híbridos de milho estudados. Araujo et al. (2013) confirmam a distinção de resposta entre cultivares de milho em termos de produção de massa seca e incremento de teor de N na parte aérea das plantas. Tal diferença entre híbridos de milho, quanto à eficiência de utilização do N, se deve às variações genéticas existentes entre os híbridos de milho (ALFOLDI et al., 1992).

QUADRO 3. Comportamento de três híbridos de milho em relação à altura de planta (ALT), diâmetro do colmo (DIA), volume de raiz (VR), massa seca da parte aérea (MSPA), teor de clorofila (CLO), teor de nitrogênio na raiz (TNR) e eficiência de utilização do nitrogênio (EUN). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação e colhidas aos 35 dias após o plantio. Dourados, MS (2013).

Híbrido	ALT	DIA	VR	MSPA	CLO	TNR	EUN
	(cm)	(mm)	(cm ³ /planta)	(g)	(SPAD)	(g kg ⁻¹)	mg g ⁻¹
Maximus	50,40 b	15,62 b	67,68 b	5,91 b	26,77 a	18,44 a	1,79 b
P3646H	51,62 b	16,04 ab	72,31 b	7,38 b	25,06 b	15,91 ab	1,94 b
BRS 3035	54,81 a	16,95 a	82,25 a	9,47 a	21,53 c	14,79 b	2,36 a

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

A inoculação com a estirpe Z-94 *H. seropedicae* influenciou o volume de raiz, comprimento de raiz, massa seca da parte aérea, teor de clorofila, teor de N na parte aérea, eficiência de absorção do N e eficiência de utilização de N (Quadro 4). Plantas inoculadas com esta estirpe apresentaram incremento na ordem de 33,02% no volume de raiz e de 61,52% no comprimento de raiz em relação ao controle não inoculado (Quadro 4 e Figura 1). Esse efeito se deve à produção de auxinas pelas bactérias, que estimula o crescimento das raízes secundárias, aumentando assim a área específica de absorção de água e nutrientes pelas plantas (RADWAN et al., 2004). Resultados concordantes foram evidenciados por Quadros (2009), verificando que o volume de raízes de milho nos tratamentos inoculados com *Azospirillum* foram aproximadamente 60% e 80% maiores em relação aos tratamentos não inoculados, para os híbridos P32R48 e D2B587. Canellas et al. (2013) constataram aumento da área radicular de plantas de milho quando inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* em combinação com substâncias húmicas. Em revisão recente, Monteiro et al. (2012) ressaltam que a infecção de *H. seropedicae* em Poáceas começa pela emissão de sinais pelas raízes, que fornece fontes de carbono para as bactérias, seguido do estabelecimento das bactérias na superfície radicular e subsequente colonização dos pontos de surgimento de raízes laterais.



FIGURA 1. Efeito da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sobre o desenvolvimento de raízes de plântulas de milho. A (Maximus), B (P3646H) e C (BRS 3035).

A produção de massa seca, o teor de N na parte aérea, a eficiência de absorção do N e utilização do N aumentaram na ordem de 24,74%, 14,74%, 21,95% e 17,11%, respectivamente com a inoculação de *H. seropedicae* em relação ao controle (Quadro 4), ficando evidente os efeitos benéficos da bactéria na assimilação de nitrogênio pelas plantas de milho. Corroborando com os resultados, Alves (2007) verificou que a inoculação com *Herbaspirillum* spp. contribuiu com até 28% do N absorvido em plantas de milho. Em condições de casa de vegetação, Guimarães et al. (2007), trabalhando com plantas de arroz inoculadas com a estirpe Z-94 de *H. seropedicae*, observaram aumentos de até 34% no nitrogênio total da parte aérea, em relação à testemunha absoluta. Dados semelhantes foram obtidos por Dobbelaere et al. (2001), ao trabalharem com bactérias do gênero *Azospirillum*. Estes autores relatam que o maior teor de N nas plantas inoculadas é resultado tanto da FBN, quanto dos mecanismos de promoção do crescimento radicular, que podem incrementar a capacidade das plantas em absorver este nutriente. Resultados similares também foram obtidos por Ferreira et al. (2011); Ferreira et al. (2010) e Guimarães et al. (2010), ao trabalharem com plantas de arroz inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae*.

Quanto aos valores obtidos com a leitura SPAD, observou-se que a inoculação com *H. seropedicae* aumentou o teor de clorofila nas folhas em 10,81% em relação ao tratamento controle (Quadro 4), evidenciando a eficiência desse microrganismo para incrementar o conteúdo de clorofila na folha, e correlacionando-se com o aumento no teor de nitrogênio na planta. Segundo Chapman e Barreto (1997), isso pode ser atribuído ao fato de mais de 50% do nitrogênio total da folhas serem integrantes de compostos do cloroplasto e da clorofila das folhas. Concordante aos resultados encontrados, Lima (2010) e Canelas et al. (2013) relataram efeito positivo da inoculação com *Bacillus subtilis* e *Herbaspirillum seropedicae*, respectivamente, sob o teor de clorofila nas folhas de milho, confirmando o efeito da inoculação com essas bactérias no desenvolvimento do milho e na promoção de maior capacidade fotossintética da planta.

QUADRO 4. Efeito da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sobre o volume de raiz (VR), comprimento de raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA), teor de clorofila (CLO), teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA), eficiência de absorção do nitrogênio (EAN) e eficiência de utilização do nitrogênio (EUN) por plantas de milho cultivadas em casa de vegetação e colhidas aos 35 dias após o plantio. Dourados, MS (2013).

Inoculação	VR	CR	MSPA	CLO	TNPA	EAN	EUN
	(cm ³ /planta)	(cm)	(g)	(SPAD)	(g kg ⁻¹)	____mg g ⁻¹ ____	
Sem	63,58 b	57,70 b	6,75 b	23,20 b	20,34 b	21,45 b	1,87 b
Com	84,58 a	61,25 a	8,42 a	25,71 a	23,34 a	26,16 a	2,19 a
Aumento (%)	33,02	61,52	24,74	10,81	14,74	21,95	17,11

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

Houve efeito da interação entre híbridos (H) de milho e a inoculação (I) com *H. seropedicae* sobre o diâmetro do colmo e o teor de N na parte aérea (Quadro 5). Observa-se que o híbrido Maximus na ausência de inoculação obteve o menor diâmetro do colmo, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) do híbrido P3646H e sendo igual ao híbrido BRS3035, no entanto, na presença do inoculante o híbrido BRS 3035 apresentou o maior diâmetro do colmo, evidenciando o efeito do inoculação sobre essa variável (Quadro 5). No entanto, observa-se que não houve diferença significativa entre os híbridos de milho para teor de nitrogênio na parte aérea. Já em relação a presença e ausência de inoculação os híbridos P3646H e BRS3035 diferiram estatisticamente, ou seja, houve incremento nos teores de N nas raízes dos híbridos com a inoculação de *H. seropedicae* (Quadro 5).

QUADRO 5. Diâmetro do colmo (DIA) e teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA) de três genótipos de milho inoculados ou não com *Herbaspirillum seropedicae*. Dourados, MS (2013).

Híbrido	DIA (mm)		TNPA (g kg ⁻¹)	
	Inoculação		Inoculação	
	Sem	Com	Sem	Com
Maximus	14,55 bB	16,70 abA	23,40 aA	21,90 aA
P3646H	16,61 aA	15,46 bA	18,72 bB	22,84 aA
BRS 3035	16,27 abA	17,63 aA	18,91 bB	25,27 aA

As letras minúsculas separam as médias dentro de cada coluna e as maiúsculas separam as médias dentro da linha. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Houve interação significativa entre inoculação de *H. seropedicae* e os níveis de N apenas para o teor de N na parte aérea das plantas (Quadro 6). Observa-se que a inoculação da estirpe Z-94 de *H. seropedicae* acrescida de 80 kg ha⁻¹ de N proporcionou um aumento no teor de N na parte aérea de plantas de milho na ordem de 25,74% em relação ao controle adubado com 80 kg ha⁻¹ (Quadro 6). Já em relação ao controle inoculado e não adubado, este aumento foi superior a 100%. Deve-se salientar que em gramíneas comumente é verificada uma maior contribuição da inoculação associada à adubação nitrogenada. Segundo Baldani et al. (1996), a inoculação de *Herbaspirillum* na presença de pequenas doses de N mostra-se mais

eficiente para o sistema planta/bactéria quando comparada com o uso isolado da bactéria. Isso se deve ao fato de que a riqueza de compostos orgânicos excretados, depositados e/ou exsudados na rizosfera pela planta na presença de pequenas doses N produz intensas atividades e interações microbianas que permitem essas bactérias efetuarem a colonização, ou seja, permite a emissão de sinais aos microrganismos. Dobbelaere et al. (2002) verificaram que o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense*, estirpe Sp 245, e *Azospirillum irakense* estirpe KBC1 foi maior quando associado às doses de nitrogênio. Em experimentos de inoculação conduzidos sob condições de casa de vegetação, utilizando as estirpes M130 (*Burkholderia* sp.), ZAE94 (*H. seropedicae*) e M209 (*Burkholderia* sp.), foi observado que houve uma contribuição variando de 11% a 20% no nitrogênio acumulado na massa seca das plantas de arroz (BALDANI et al., 2000). Dalla Santa et al. (2004), em ensaios com milho, utilizando *Azospirillum* sp. estirpes RAM- 7 e RAM- 5, constataram que o uso dessas estirpes foi capaz de reduzir em 40% a quantidade de fertilização nitrogenada recomendada.

QUADRO 6. Teor de N na parte aérea (TNPA) de plantas de milho em resposta à adubação nitrogenada e à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. Dourados, MS (2013).

Nitrogênio	TNPA (g kg ⁻¹)	
	Inoculação	
	Sem	Com
0	14,98 bA	14,35 bA
80 kg ha	25,71 aB	32,33 aA

As letras minúsculas separam as médias dentro da coluna e as maiúsculas separam as médias dentro da linha. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

CONCLUSÕES

1. O híbrido BRS 3035 se destaca para a maioria das variáveis analisadas, produzindo maior quantidade de massa seca de parte aérea, plantas com maior altura, volume de raízes e apresentando maiores índices de eficiência de utilização de N.

2. A inoculação com a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae* promoveu aumento no volume de raízes, comprimento de raízes, massa seca da parte aérea, teor de clorofila, teor de N na parte aérea, eficiência de absorção do N e eficiência de utilização do N por plantas de milho.

3. A inoculação da estirpe Z-94 de *H. seropedicae* acrescido de 80 kg ha⁻¹ de N aumentou o teor de N na parte aérea das plantas de milho em até 25% nos genótipos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFOLDI, Z.; PINTER, L.; FEIL, B. Accumulation and partitioning of biomass and soluble carbohydrates in maize seedlings as affected by source of nitrogen, nitrogen concentration and cultivar. **Journal of Plant Nutrition**, v.15, n.11, p.2567-2585, 1992.

ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do milho**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

ANDRADE, A. C.; FONSECA, D. M.; QUEIROZ, D. S.; SALGADO, L. T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*pennisetum purpureum schum. cv. napier*). **Ciência e Agrotecnologia**, edição especial, p.1643-1651, 2003.

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

ARAUJO, F. F.; FOLONI, J. S. S.; WUTZKE, M.; MELEGARI, A. S.; RACK, E. Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1043-1054, 2013.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n.5-6, p. 485–491, 2000.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in FBN with non-legume plants. **Soil Biology**. v.29, n.5, p.911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of “*Pseudomonas*” *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n.3, p. 802-810, 1996.

BOOIJ, R.; VALENZUELA, J. L.; AGUILERA, C. Determination of crop nitrogen status using non-invasive methods. In: HAVERKORT, A.J.; MACKERRON, D.K.L. (Eds.). **Management of nitrogen and water in potato production**. The Netherlands, Wageningen Pers, p. 72-82, 2000.

BULL, L. T. Nutrição mineral do milho. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. (ed). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1993. p.63-131.

CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F. L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, n.366, p.119–132, 2013.

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

CARVALHO, R. P.; VON PINHO, R. G.; DAVIDE, L. V. C. Eficiência de cultivares de milho na absorção e uso de nitrogênio em ambiente de casa de vegetação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2125-2136, 2012.

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

CHAPMAN, S. C.; BARRETO, H. J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, v. 89, n.1, p. 557-562, 1997.

CONAB. 2013. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/2012: Oitavo Levantamento**, Fevereiro/2013, Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, CONAB, 27p.

DALLA SANTA, O. R.; SOCCOL, C. R.; JUNIOR, P. R.; HERNÁNDEZ, R. H.; ALVAREZ, G. L. M.; DALLA SANTA, H. S.; PANDEY, A. Effects of inoculation of *Azospirillum* sp. in maize seeds under field conditions. **Food, Agriculture & Environment**, v.2, n.1, p. 238- 242, 2004.

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

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

DONATE-CORREA, J.; LEON-BARRIOS, M.; PEREZ-GALDONA, R. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus*, a forage tereshrub legume endemic to the Canary Islands. **Plant and Soil**, v.266, n.1-2, p.261-272, 2004.

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**, v. 5, n. 3, p.376-382, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3 Ed. rev. ampl.- Brasília, DF: Embrapa Solos, 2013. 353p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**.- 2. Ed, Brasília,, Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

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

FANCELI, L. A.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Livroceres: Livraria e Editora Agropecuária Ltda, 2º Edição, 2008, 360p.

FERNANDES, F. C. S.; BUZETTI, S.; ARF, O.; ANDRADE, J.A.C. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. **Revista Brasileira de Milho Sorgo**, v.4, n.2, p.195-204, 2005.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000.

FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Produção de grãos de arroz em função as inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, n.13; p. 826-833, 2011.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010.

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

GLASS, A. D. M. **Íon absorption and utilization**: the celular level. In: BALIGAR, V.C., DUNCAN, R.R. (Ed). **Crops as enhancers of nutrient use**. San Diego: Academic Press, 1990. p.37-64.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 393-398, 2007.

GUIMARÃES, S. L., CAMPOS, D. T. S., BALDANI, V. L. D., JACOB-NETO, J. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**. v.23, n.4, p.32-39, 2010.

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

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

KAPPES, C.; ANDRADE, J. A. C.; ARF, O.; OLIVEIRA, A. C.; ARF, M. V.; FERREIRA, J. P. Desempenho de híbridos de milho em diferentes arranjos espaciais de plantas. **Bragantia**, v. 70, n. 2, p. 334-343, 2011.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n.8, p. 1229-1244, 2004.

LIMA, F. F. **Bacillus subtilis e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e produtividade do milho**. Teresina: UFPI, 2010, 52p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic Press, 1995. 889p.

MELLO, N. **Inoculação de Azospirillum brasilense nas culturas de milho e trigo**. Passo Fundo: UPF, 2012. 90 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade de Passo Fundo, 2012.

MONTEIRO, F.; GENIN, S.; VAN DIJK, I.; VALLS, M. A luminescent reporter evidences active expression of *Ralstonia Solana* cearam type III secretion system genes throughout plant infection. **Microbiology**, n.158, p. 2107–2116, 2012.

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

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum spp.* em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 2009. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

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

RAO, A. C. S.; SMITH, J. L.; PARR, J. F.; PAPENDICK, R. I. Considerations in estimating nitrogen recovery efficiency by the difference and isotopic dilution methods. **Fertilizer Research**, v.33, p.209-217, 1992.

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, n.3, p. 1139-1146, 2008.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, 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.833-842, 2007.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 4, n.3, p. 289-302, 1981.

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

SWIADER, J. M. CHYAN, Y.; FREIJI, F. G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **Journal of Plant Nutrition**, v.17, n.10, p.1687-1699, 1994.

TAYLOR, D.; ARKIN, G. F. Root zone modification fundamentals and alternatives. In: **Modifying the root environment to reduce crop stress**. St. Joseph: ASAE, 1981. p.3-16.

CAPÍTULO V

INOCULAÇÃO COM *Herbaspirillum seropedicae* E FERTILIZAÇÃO NITROGENADA SOBRE A EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DO N POR DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO

RESUMO

A utilização de fertilizantes químicos nitrogenados em plantas não leguminosas constitui um dos maiores custos na agricultura. Assim, a fixação biológica proporcionada por bactérias diazotróficas pode representar alternativa para produção de milho em sistemas agrícolas mais sustentáveis ou de baixa utilização de insumos. Dessa forma, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito interativo da inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae* e da adubação nitrogenada na eficiência de utilização do N por diferentes genótipos de milho, pela técnica de diluição isotópica de ^{15}N . O ensaio foi conduzido em condições controladas de casa de vegetação utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial $3 \times 2 \times 2$, sendo, três híbridos de milho: Maximus, P3646H e BRS3035, plantas inoculadas e não inoculadas, duas doses de nitrogênio: 0,0 e 80 kg ha⁻¹, com quatro repetições. Aos 35 dias após a emergência as plantas foram coletadas e divididas em raiz e parte aérea, sendo avaliado a produção de massa seca da parte aérea e raiz, quantidade de N acumulada na planta, porcentagem de N na planta proveniente do fertilizante, quantidade de N na planta proveniente do fertilizante e a eficiência de utilização do N aplicado como fertilizante. Os resultados permitiram concluir-se que existe distinção entre genótipos de milho para produção de massa seca da parte aérea e porcentagem de N na parte aérea proveniente do fertilizante. A produção de massa seca da parte aérea é influenciada pela inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. A inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* na presença da adubação nitrogenada promove incrementos de aproximadamente de 32% na quantidade de N na parte aérea do híbrido P3646H e de 62% do híbrido BRS 3035. O híbrido P3646H e o híbrido BRS3035 apresentaram aumentos de 34,3% e 64,4%, respectivamente, na eficiência de utilização do N quando inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* sem adição de N.

Palavras-chave: *Zea mays* L., bactérias diazotróficas, ^{15}N , adubação nitrogenada.

**EFFICIENCY OF UTILIZATION OF N BY DIFFERENT MAIZE
GENOTYPES *Herbaspirillum seropedicae* INOCULATION INFLUENCED
AND NITROGEN FERTILIZATION**

ABSTRACT

The use of nitrogen fertilizers in leguminous plants is one of the biggest costs in agriculture. Thus, the biological fixation provided by diazotrophic bacteria can represent an alternative to corn production in more sustainable agricultural systems or low use of inputs. Thus, the objective of this work to evaluate the interactive effect of inoculation of *Herbaspirillum seropedicae* with seeds and nitrogen fertilizer use efficiency of different maize genotypes N, by the technique of isotopic dilution of ^{15}N . The test was conducted under controlled conditions of greenhouse and the experimental design used was the completely randomized design in factorial scheme $3 \times 2 \times 2$, and three hybrids of corn: Maximus, P3646H and BRS3035, inoculated and non-inoculated plants, two doses of nitrogen: 0.0 and 80 kg ha⁻¹, with four replicates. To 35 days after emergence plants were collected and divided into root and aerial part, being evaluated the dry matter production of shoot and root, amount of N accumulated in plant, percentage of N in the plant from the fertilizer, quantity of N in the plant comes from fertilizer and use efficiency of N applied as fertilizer. The results it is concluded that there is no distinction between maize genotypes for dry matter production of aerial part and percentage of N in aboveground from fertilizer. The dry matter production of aerial part is influenced by inoculation with *Herbaspirillum seropedicae*. Inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* in the presence of nitrogen fertilizer promotes increments of approximately 32% on the amount of N in the aerial part of the hybrid P3646H and 62% of the hybrid BRS 3035. The hybrid P3646H and hybrid BRS3035 showed increases of 34.3% and 64.4%, respectively, in the efficiency of utilization of N when inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* no added N.

Key words: *Zea mays* L., diazotrophic bacteria, ^{15}N , nitrogen fertilization.

INTRODUÇÃO

O milho é uma cultura exigente em fertilidade do solo, com destaque para o nitrogênio (N), cuja deficiência pode reduzir entre 10 a 22% o rendimento de grão (SUBEDI e MA, 2009). Assim, o manejo inadequado da adubação nitrogenada ainda se configura com um dos principais gargalos ao aumento da produtividade. Atualmente, os fertilizantes nitrogenados representam mais de 70% do custo de adubação do milho, o que influencia expressivamente na viabilidade econômica da cultura (MACHADO et al., 1998). A obtenção de cultivares adaptada a solos pobres em N e capazes de se associar a bactérias diazotróficas podem representar uma alternativa economicamente viável para a produção de milho em sistemas agrícolas com baixo aporte de insumos.

O uso de doses relativamente altas de nitrogênio durante o crescimento de cultivares híbridos de milho pode levar à seleção de genótipos que apresentem consumo de luxo do nutriente e/ou que requeiram elevada adubação nitrogenada para expressar seu potencial produtivo (CARLONE e RUSSEL, 1987). Por outro lado, baixas doses de nitrogênio podem contribuir naturalmente para a seleção de genótipos eficientes na associação com bactérias fixadoras de nitrogênio, os quais podem proporcionar redução no consumo de fertilizantes nitrogenados sintéticos (ROESCH et al., 2005), e seleção e/ou o desenvolvimento de cultivares com maior eficiência no uso de N (CARVALHO et al., 2012).

A eficiência no uso de nitrogênio (EUN), definida como a razão entre a produtividade de grãos ou peso de parte aérea da planta seca por unidade de nitrogênio disponível no solo (MOLL et al., 1982), permite as plantas atingirem altas produtividades com maior sustentabilidade (AHLGREN et al., 2008). Cultivares de milho mais eficiente no uso de N podem ser obtidos com melhoramento genético para eficiência na absorção e/ou na utilização de N (GALLAIS e HIREL, 2004; SOUZA et al., 2008).

A obtenção de maior eficiência na utilização do N tem sido um objetivo almejado tanto para a agricultura capitalizada, quanto para a de baixos insumos. Isto ocorre devido aos desperdícios e à escassez do nitrogênio que podem gerar problemas econômicos, ambientais, de saúde pública e de segurança alimentar

(CARVALHO et al., 2012). Entretanto, os caminhos para se obter genótipos mais eficientes na utilização do nitrogênio são bastante complexos, pois o metabolismo do nitrogênio é influenciado por diversos fatores ambientais (HIREL et al., 2001; MAJEROWICZ et al., 2002).

A interação positiva entre bactérias diazotróficas e a cultura do milho tem sido demonstrada por vários autores e, embora o maior obstáculo para a utilização desta tecnologia seja a inconsistência de resultados (DOBBELAERE et al., 2001; REIS, 2007), levantamentos de diversos experimentos realizados em vários países mostram que a inoculação com bactérias do gênero *Herbaspirillum* resultou, na maioria dos casos, em aumento de massa seca, produtividade e acúmulo de nitrogênio.

Assim, tendo em vista que a amplitude genética pode influenciar a interação de plantas de milho com bactérias diazotróficas endofíticas, objetivou-se com o presente trabalho estudar o efeito interativo da inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae* e da adubação nitrogenada sobre a eficiência de utilização do N por diferentes genótipos de milho, determinada pela técnica de diluição isotópica de ^{15}N .

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação, na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, MS, no período de dezembro de 2012 a janeiro de 2013, cujas coordenadas geográficas são latitude 22°12' S, longitude 54°56'W e altitude de 452 m. O clima da região é do tipo Cwa, segundo a classificação de Köppen. O solo utilizado neste estudo, classificado como Latossolo Vermelho distroférrico de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2013), foi coletado na profundidade de 0-20 cm. A análise química do solo antes da instalação do experimento resultou nos seguintes valores: pH (CaCl₂): 4,15; P: 26 mg dm⁻³; K: 5,0 mmolc dm⁻³; Ca: 9,0 mmolc dm⁻³; Mg 2,0 mmolc dm⁻³; Al: 3,3 mmolc dm⁻³; H+Al: 41,6 mmolc dm⁻³; SB: 115,1 mmolc dm⁻³; CTC: 531,1 mmolc dm⁻³, saturação por bases 21,7%. A análise granulométrica apresentou 225 g kg⁻¹ de areia, 125 g kg⁻¹ de silte e 650 g kg⁻¹ de argila.

A correção do solo foi realizada 30 dias antes da semeadura com o intuito de elevar a saturação por bases para 50%, sendo utilizado calcário dolomítico finamente moído (PRNT 100%), considerando os resultados da análise do solo. Devido à baixa fertilidade do solo, também foi realizada uma adubação de base para garantir o estabelecimento da cultura. Foram aplicados (misturado ao solo) 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ (270 mg dm⁻³) e 60 kg ha⁻¹ de K₂O (51 mg dm⁻³), na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente. Os micronutrientes foram aplicados conforme a exigência da cultura, na forma de solução, usando água deionizada e sais p.a., de acordo com Epstein e Bloom (2006). A adubação nitrogenada foi realizada na dose de 80 kg ha⁻¹ de N (54 mg dm⁻³), na forma de ureia (45%), aplicados em duas vezes de 40 kg ha⁻¹ de N (27 mg dm⁻³). A primeira aplicação de N foi realizada na semeadura e a segunda, em cobertura, aos 15 dias após a emergência das plantas. O enriquecimento isotópico utilizado foi de 0,7% de átomos de ¹⁵N em excesso para dose de 80 kg ha⁻¹. Para facilitar a aplicação uniforme, o fertilizante nitrogenado foi diluído em 50 mL de água deionizada e aplicado com auxílio de uma pipeta.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 x 2, sendo, três híbridos de milho: Maximus, P3646H e

BRS3035, plantas inoculadas e não inoculadas, duas doses de nitrogênio: 0,0 e 80 kg ha⁻¹, com quatro repetições. As unidades experimentais foram compostas por vasos plásticos com capacidade de 10 dm³, cujo solo foi irrigado diariamente com água deionizada de maneira controlada para repor a água evapotranspirada, visando manter 60% da capacidade de campo.

Na semeadura foram utilizadas sementes de milho do híbrido simples P3646H (Pioneer), híbrido duplo Maximus (Syngenta) e triplo BRS3035 (Embrapa), sendo as mesmas previamente inoculadas com a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae* (concentração de células no inoculante na faixa de 10⁹) na formulação à base de turfa, produzido pela Embrapa Agrobiologia, Seropédica - RJ. A dose aplicada foi de 250 g do inoculante turfoso para cada 10 kg de sementes de milho. Para a inoculação foram adicionados 60 mL para cada 10 kg de semente de uma solução açucarada a 10% (p/v), visando aumentar a adesão do inoculante turfoso às sementes. As sementes foram postas a germinar diretamente nos vasos, sendo, que aos oito dias após a emergência, realizou-se o desbaste deixando apenas uma planta em cada unidade experimental.

Aos 35 dias após a emergência as plantas foram coletadas e divididas em raiz e parte aérea. Todo o material vegetal coletado foi lavado em água corrente, solução de HCl a 0,1 mol L⁻¹ e água deionizada, respectivamente. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel e secos em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65°C, por 72 horas. Após a secagem do material vegetal, procederam-se a pesagem e moagem da massa seca em moinho tipo Wiley para as análises de N total e composição isotópica do N.

O N total nas diferentes partes da planta (raiz e parte aérea) foi determinado pelo método de Kjeldahl, de acordo com a metodologia descrita em Embrapa (2009). Quanto às análises da composição isotópica de ¹⁵N, as amostras foram processadas de acordo com o método de Rittenberg (1946); partindo-se do destilado final obtido na análise da percentagem de N total, os extratos foram novamente acidificados com H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ e concentrados por evaporação, e o N-NH₄⁺ foi convertido em N₂ por oxidação com hipobrometo de lítio (LiOBr) (PORTER e O'DEEN, 1977). As análises da composição isotópica de ¹⁵N foram determinadas em espectrômetro de massa Delta Plus, do Laboratório de Isótopos

Estáveis John M. Day da Embrapa Agrobiologia. Com os resultados de composição isotópica de nitrogênio (% em átomos de ^{15}N) das amostras, foram calculados:

- a) Quantidade de N total acumulada (QNT, mg/planta)

$$\text{QNT} = \frac{\text{RMS} \times \text{N}}{100}$$

em que RMS é o rendimento de massa seca, e N é o teor de N na planta (g kg^{-1}).

- b) Porcentagem de N na planta proveniente do fertilizante (%NPPF)

$$\% \text{NPPF} = \frac{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N} \text{ em excesso na planta}}{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N} \text{ em excesso no fertilizante}} \times 100$$

- c) Quantidade de N na planta proveniente do fertilizante

$$\text{QNPPF} = \frac{\% \text{NPPF} \times \text{QNT}}{100}$$

- d) Eficiência de utilização do N aplicado como fertilizante, em função da quantidade aplicada (QNA)

$$\text{EUN} = \frac{\text{QNPPF}}{\text{QNA}} \times 100$$

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados efeitos significativos ($p \leq 0,05$) da interação híbrido x inoculação x nitrogênio na porcentagem de nitrogênio na parte aérea (%NPA) e na quantidade de nitrogênio total na parte aérea (QNTPA). As massas secas da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) não apresentaram efeito significativo da interação e são apresentados independentes para cada híbrido, inoculação e nitrogênio (Quadro 1).

Os híbridos de milho diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) em relação à massa seca da parte aérea (Quadro 1), a qual foi 60,5% maior no híbrido BRS 3035 em comparação com o híbrido Maximus e 28,3% comparado ao híbrido P3646H (Figura 1). Em 2008, Reis Junior e colaboradores também observaram diferença no acúmulo de massa seca entre híbridos de milho estudados.

No presente estudo, a adubação nitrogenada promoveu aumento na produção de massa seca da parte aérea de plantas de milho em 79,5% em relação ao controle não adubado (Figura 1). Resultados similares foram obtidos por Gava et al. (2010), onde constataram que a elevação da dose de N-fertilizante resultou no aumento da massa seca e na taxa de produção de massa seca pela cultura do milho. A massa seca da raiz do tratametno adubado foi 7,92% superior ao tratamento não adubado (Figura 2), corroborando com os resultados de Taylor e Arkin (1981) e Glass (1990), relataram alteração no crescimento das raízes em função da fertilidade do solo. Além disso, o N favorece o crescimento do sistema radicular, propiciando à planta condições para maior absorção de água e nutrientes (RAO et al., 1992)

QUADRO 1. Resumo da análise de variância para massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), porcentagem de nitrogênio na parte aérea (%NPA) e quantidade de nitrogênio total da parte aérea (QNTPA) de três híbridos de milho submetidos a diferentes níveis de nitrogênio e inoculados com *Herbaspirillum seropedicae*. Dourados, MS (2013).

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		MSPA	MSR	%NPA	QNTPA
Híbrido (H)	2	51,30*	3,94	0,58*	8357,16*
Nitrogênio (N)	1	224,42*	41,45*	8,50*	193080,79*
Inoculação (I)	1	33,41*	12,19	0,01	11041,70*
H*N	2	7,23	0,48	0,07	6130,75*
H*I	2	2,55	12,53	0,32*	2703,31
N*I	1	4,30	3,49	0,15*	1692,00
H*N*I	2	0,77	0,72	0,41*	5262,89*
Resíduo	36	3,33	5,01	0,02	916,63
Média		7,59	24,40	1,43	116,68
CV (%)		24,07	9,18	11,32	25,95

* – significativo pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Observa-se que a inoculação com a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae* proporcionou um incremento de 24,74% na produção de massa seca da parte aérea em relação ao controle não inoculado. Os valores variaram de 6,75 g/planta no tratamento controle para 8,52 g/planta no tratamento inoculado (Figura 1). Essa maior produção de massa seca da parte aérea das plantas inoculadas pode ter sido favorecida pela produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias. Ferreira et al. (2011); Ferreira et al. (2010) e Guimarães et al. (2010) também observaram efeito significativo da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de arroz sobre o acúmulo de massa seca da parte aérea.

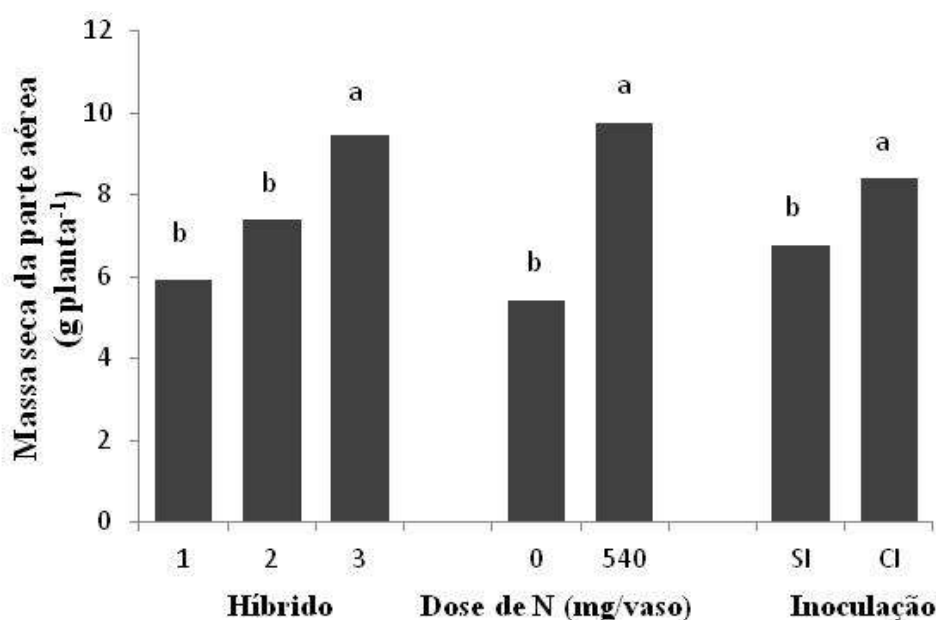


FIGURA 1. Massa seca da parte aérea de três genótipos de milho inoculados ou não com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. Híbrido 1 (Maximus), Híbrido 2 (P3646H) e Híbrido 3 (BRS 3035); SI (sem inoculação); CI (com inoculação).

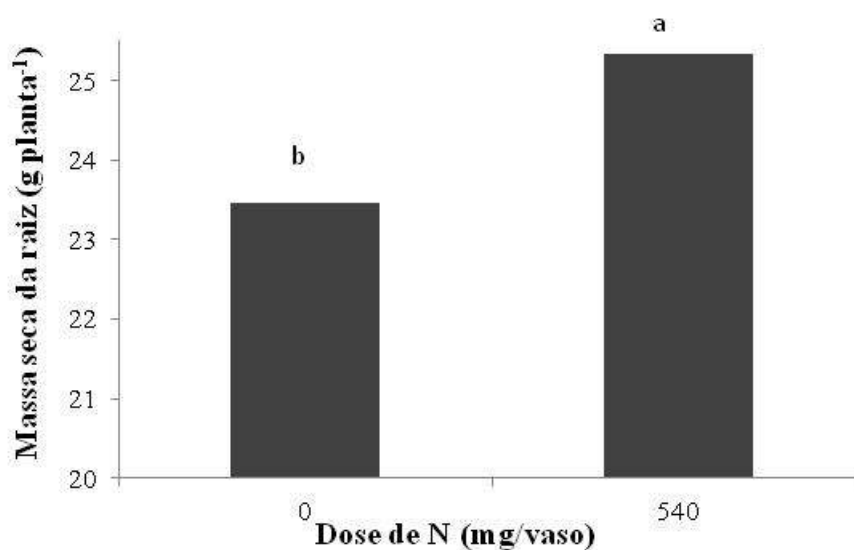


FIGURA 2. Massa seca da raiz de em resposta a adubação nitrogenada.

Para a %NPA das plantas de milho, houve interação significativa entre genótipos de milho, inoculação das sementes com *Herbaspirillum seropedicae* e doses de nitrogênio (Quadro 2). Não houve diferença significativa entre os genótipos de milho sem inoculação e sem adubação nitrogenada (Quadro 2). Na presença de inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* e sem adubação nitrogenada verificou-se menor %NPA no híbrido BRS 3035 em comparação aos demais híbridos (Quadro 2). No trabalho de Sala et al. (2007), para um dos dois genótipos de trigo testados, sem adição de N-fertilizante, as plantas que não receberam inoculação com bactérias diazotróficas apresentaram maior acúmulo de N do que nos tratamentos com inoculação. Araujo et al. (2013) relataram que na ausência de adubo nitrogenado a inoculação pode reduzir a massa seca da parte aérea das plantas. Esse efeito negativo encontrado também pode ocorrer em razão de um aumento do sistema radicular, em detrimento do desenvolvimento da parte aérea. Uma das explicações para isso é que um dos benefícios proporcionados pelas bactérias diazotróficas em culturas de gramíneas é a sua capacidade de produzir fitohormônios (DOBBELAERE et al., 2001, 2002; MENDONÇA et al., 2006; SALA et al., 2007).

Na presença da adubação nitrogenada e inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* verifica-se um incremento de 26,8% e 36,2% na %NPA dos híbridos P3646H e BRS 3035, respectivamente, quando adubado e inoculado com

Herbaspirillum seropedicae (Quadro 2). No entanto, resultados contrários foram obtidos para o híbrido Maximus tanto para %NPA quanto para QNTPA (Quadro 2).

A QNTPA não diferiu estatisticamente entre os híbridos de milho no tratamento sem adubação nitrogenada, com e sem inoculação. No entanto, na presença da adubação nitrogenada, a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* aumentou em aproximadamente 32% a QNTPA do híbrido P3646H e 62% do híbrido BRS 3035 em relação ao tratamento adubado e não inoculado com *H. seropedicae* (Quadro 2). Relatos reforçam que são comuns respostas variáveis de inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas em culturas de gramíneas, o que tem justificado investimentos para aprimorar tal tecnologia (SALA et al., 2007). Mesmo em ambientes controlados, como em casa de vegetação, têm sido frequentes respostas discrepantes de associação de bactérias diazotróficas e cultivares de milho, o que, provavelmente, tem limitado a consolidação de inoculantes comerciais (DOBBELAERE et al., 2002).

A porcentagem de nitrogênio na parte aérea proveniente do fertilizante (%NPAPF) diferiu apenas entre os híbridos de milho, enquanto que a quantidade de nitrogênio na parte aérea proveniente do fertilizante (QNPAPF) e eficiência de utilização do nitrogênio na parte aérea (EUNPA) foram influenciados pela interação híbrido e inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* (Quadro 3).

QUADRO 2. Porcentagem de nitrogênio na parte aérea (%NPA) e quantidade de nitrogênio total na parte aérea (QNTPA) de três genótipos de milho inoculados ou não com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. Dourados, MS (2013).

%NPA													
		H1				H2				H3			
N ₀	SI	1,10	a	A	<i>b</i>	1,14	a	A	<i>b</i>	0,90	a	A	<i>b</i>
	CI	1,07	a	A	<i>b</i>	1,09	a	A	<i>b</i>	0,76	b	A	<i>b</i>
N ₅₄₀	SI	2,09	a	A	<i>a</i>	1,86	a	B	<i>a</i>	1,38	b	B	<i>a</i>
	CI	1,54	c	B	<i>a</i>	2,36	a	A	<i>a</i>	1,88	b	A	<i>a</i>
QNTPA (mg planta ⁻¹)													
		H1				H2				H3			
N ₀	SI	33,76	a	A	<i>b</i>	48,20	a	A	<i>b</i>	50,12	a	A	<i>b</i>
	CI	64,78	a	A	<i>b</i>	60,19	a	A	<i>b</i>	62,49	a	A	<i>b</i>
N ₅₄₀	SI	144,60	a	A	<i>a</i>	181,40	a	B	<i>a</i>	151,00	a	B	<i>a</i>
	CI	118,54	b	A	<i>a</i>	238,59	a	A	<i>a</i>	246,55	a	A	<i>a</i>

As letras minúsculas comparam efeito do híbrido, as letras maiúsculas comparam o efeito da inoculação e as letras em itálico comparam o efeito do nitrogênio. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Híbrido 1 (Maximus), Híbrido 2 (P3646H) e Híbrido 3 (BRS 3035); SI (sem inoculação) CI (com inoculação).

QUADRO 3. Resumo da análise de variância para porcentagem de nitrogênio na parte aérea proveniente do fertilizante (%NPAPF), quantidade de nitrogênio na parte aérea proveniente do fertilizante (QNPAPF) e eficiência de utilização do nitrogênio na parte aérea (EUNPA) por três híbridos de milho submetidos a diferentes níveis de nitrogênio e inoculados com *Herbaspirillum seropedicae*. Dourados, MS (2013).

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		%NPAPF	QNPAPF	EUNPA
Híbrido (H)	2	18,32*	12129,35*	415,95*
Inoculação (I)	1	3,81	9100,66	312,09*
H*I	2	1,67	6157,04*	211,14*
Resíduo	18	2,44	1350,96	46,32
Média		88,77	159,05	29,45
CV (%)		1,77	23,11	23,11

* – significativo pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A %NPAPF foi superior no híbrido P3646H, com percentuais de incremento de 2,8% e 3,1% em relação aos híbridos Maximus e BRS3035, respectivamente (Figura 3). Em média, 89,8% do N total acumulado na parte aérea do híbrido P3646H é proveniente do fertilizante. Já a QNPAPF diferiu entre os híbridos de milho e na presença e ausência de inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. Não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os híbridos de milho sem inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, enquanto que os híbridos P3646H e BRS3035 apresentaram maior QNPAPF na presença de inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, ambos diferindo do tratamento sem inoculação (Quadro 4). Esse aumento na QNPAPF, quando inoculado com *H. seropedicae* pode ter ocorrido devido à produção de auxinas pelas bactérias, que estimula o crescimento das raízes, e aumenta o volume de solo explorado, contribuindo com o aumento na quantidade de nutriente absorvido.

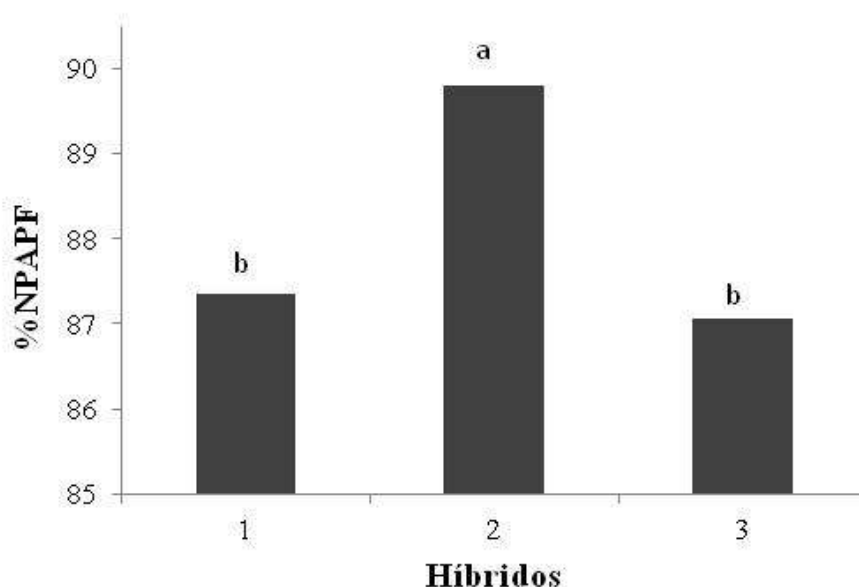


FIGURA 3. Porcentagem de nitrogênio proveniente do fertilizante na parte aérea de três genótipos de milho. Híbrido 1 (Maximus), Híbrido 2 (P3646H) e Híbrido 3 (BRS 3035).

A eficiência de utilização do nitrogênio pela parte aérea (EUNPA), que se refere ao aproveitamento do N-fertilizante, em relação à quantidade de N aplicada como fertilizante diferiu entre os híbridos de milho e na presença e ausência de inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* (Quadro 4). Não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) para EUNPA entre os híbridos de milho sem inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, enquanto que os híbridos P3646H e BRS 3035 apresentaram maior EUNPA na presença de inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, com acréscimos percentuais na ordem de 34,3% e 64,4% em relação ao tratamento sem inoculação (Quadro 4). Resultados contrários foram obtidos pelo híbrido Maximus em relação à QNPAPF e a EUNPA. O híbrido Maxinus apresentou decréscimo de 22,11% na QNPAPF e na EUNPA em relação ao tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* (Quadro 4). A maioria dos estudos demonstra que existe grande variação no aproveitamento do N-fertilizante pelas plantas, raramente ultrapassando 50% do aplicado. No presente estudo, o aproveitamento relativamente alto dos híbridos de milho em relação aos tratamentos com e sem inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, provavelmente está relacionado à condição de vaso, onde o sistema radicular permanece confinado, explorando todo o volume de solo e, também não ocorrendo perda de N por lixiviação, para camadas fora do alcance das raízes. Resultados similares foram obtidos por Brito et al. (2011), avaliando a contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio no solo no desenvolvimento de feijão comum e caupi.

QUADRO 4. Quantidade de nitrogênio derivado do fertilizante na parte aérea (QNDFPA) e eficiência do uso de nitrogênio na parte aérea (EUNPA) por três genótipos de milho inoculados ou não com *Herbaspirillum seropedicae*. Dourados, MS (2013).

	QNPAPF (mg planta ⁻¹)						EUNPA (%)					
	H1		H2		H3		H1		H2		H3	
SI	126,46	aA	161,25	aB	131,03	aB	23,41	aA	29,86	aB	24,26	aB
CI	103,57	bA	216,59	aA	215,41	aA	19,17	bA	40,11	aA	39,89	aA

As letras minúsculas comparam efeito do híbrido e as letras maiúsculas comparam o efeito da inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Híbrido 1 (Maximus), Híbrido 2 (P3646H) e Híbrido 3 (BRS 3035); SI (sem inoculação) CI (com inoculação).

CONCLUSÕES

1. Há distinção entre genótipos de milho para produção de massa seca da parte aérea e porcentagem de N na parte aérea proveniente do fertilizante.
2. A produção de massa seca da parte aérea é influenciada pela inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*.
3. A inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* na presença da adubação nitrogenada promove incrementos de aproximadamente de 32% na quantidade de N na parte aérea do híbrido P3646H e de 62% do híbrido BRS 3035.
4. O híbrido P3646H e o híbrido BRS3035 apresentaram aumentos de 34,3% e 64,4%, respectivamente, na eficiência de utilização do N quando inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* sem adição de N.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLGREN, S.; BAKY, A.; BERNESSON, S.; NORDBERG, K.; NORÉN, O.; HANSSON, P. A. Ammonium nitrate fertilizer production based on biomass - environmental effects from a life cycle perspective. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8034-8041, 2008.

ARAUJO, F. F.; FOLONI, J. S. S.; WUTZKE, M.; MELEGARI, A. S.; RACK, E. Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1043-1054, 2013.

CARLONE, M. R.; RUSSEL, W. A. Response to plant densities and nitrogen levels for four maize cultivars from different eras of breeding. **Crop Science**, v. 27, n. 2, p. 465-470, 1987.

CARVALHO, R. P.; VON PINHO, R. G.; DAVIDE, L. V. C. Eficiência de cultivares de milho na absorção e uso de nitrogênio em ambiente de casa de vegetação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2125-2136, 2012.

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

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 agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 871-879, 2001.

BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, v. 70, n. 1, p.206-215, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3 Ed. rev. ampl.- Brasília, DF: Embrapa Solos, 2013. 353p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. Ed.- Brasília, DF: Embrapa, 2009. 627 p.

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

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000.

FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.13; p. 826-833, 2011.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010.

GLASS, A. D. M. Íon absorption and utilization: the cellular level. In: BALIGAR, V.C., DUNCAN, R.R. (Ed). **Crops as enhancers of nutrient use**. San Diego: Academic Press, 1990. p.37-64.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 295-306, 2004.

GAVA, G. J. C.; OLIVEIRA, M. W.; SILVA, M. A.; JERÔNIMO, E. M.; CRUZ, J. C. S.; TRIVELIN, P. C. O. Produção de fitomassa e acúmulo de nitrogênio em milho cultivado com diferentes doses de ^{15}N -uréia. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 851-862, 2010.

GUIMARÃES, S. L., CAMPOS, D. T. S., BALDANI, V. L. D., JACOB-NETO, J. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, v.23, n.4, p.32-39, 2010.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, v. 125, n. 3, p. 1258-1270, 2001.

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**, v. 33, n. 6, p. 961-970, 1998.

MAJEROWICZ, N.; PEREIRA, J. M. S.; MEDICI, L. O.; PEREIRA, O. B. M. B.; SANTOS JÚNIOR, U. M. Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasileira Botânica**, v. 25, n. 2, p. 129-136, 2002.

MENDONÇA, M. M.; URQUIAGA, S. S.; REIS, V. M. Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. L.; JACKSON, A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, v. 74, n. 3, p. 562-564, 1982.

PORTER, L. K.; O'DEEN, W. A. Apparatus for preparing nitrogen from ammonium chloride for nitrogen-15 determinations. **Analytical Chemistry**, v.49, p.514-516, 1977.

RAO, A. C. S.; SMITH, J. L.; PARR, J. F.; PAPENDICK, R. I. Considerations in estimating nitrogen recovery efficiency by the difference and isotopic dilution methods. **Fertilizer Research**, v.33, p.209-217, 1992.

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, n.3, p. 1139-1146, 2008.

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

RITTENBERG, D. The preparation of gas sample for mass-spectrometric analysis. In: WILSON, D.W. (Ed.). **Preparation and measure of isotopic traces**. Michigan: Ann Arbor, 1946. p.31.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F.; SELBACH, P.; SAES, P. L. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 924-927, 2005.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G. de; SILVEIRA, A. P. D. da. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 6, p. 833-842, 2007.

SAWAZAKI, E.; PATERNIANI, M. E. A. Z. Evolução dos cultivares de milho no Brasil. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 55-84.

SOUZA, L. V.; MIRANDA, G. V.; GALVÃO, J. C. C.; ECKET, F. R.; MANTOVANI, E. E.; LIMA, R. O.; GUIMARÃES, L. J. M. Genetic control of grain yield and nitrogen use efficiency in tropical maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 11, p. 1517-1523, 2008.

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

TAYLOR, D.; ARKIN, G. F. Root zone modification fundamentals and alternatives.
In: **Modifying the root environment to reduce crop stress**. St. Joseph: ASAE,
1981. p. 3-16.

CAPÍTULO VI

NITROGÊNIO E INOCULAÇÃO COM *Herbaspirillum seropedicae* NA CULTURA DO MILHO EM CONDIÇÕES DE SOLO FÉRTIL

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) já estabelecida entre leguminosas pode ser uma abordagem tecnológica útil para aumentar a produção de gramíneas, visto que microrganismos do gênero *Herbaspirillum* apresentam potencial para a FBN e produção de substâncias promotoras do crescimento. Objetivou-se com o presente trabalho avaliar em condições de solo fértil o desempenho agrônômico do milho em função da inoculação das sementes com *Herbaspirillum seropedicae*, sob diferentes níveis de nitrogênio. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com cinco repetições, dispostos em arranjo fatorial 2 x 5, ou seja, ausência e presença de inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* e cinco doses de nitrogênio (0, 48, 72, 96 e 120 kg ha⁻¹). Os parâmetros avaliados foram: altura de inserção de espiga, diâmetro do colmo, massa de espiga, comprimento de espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por espiga, diâmetro da base da espiga, massa de mil grãos, massa seca da parte aérea, produtividade, teor de clorofila e teor de N nas folhas de milho. Os resultados permitiram concluir que as plantas de milho, mesmo em solo fértil, responderam à aplicação de nitrogênio para os diferentes componentes de produção e nessas condições a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* não influenciou nenhuma das variáveis estudadas.

Palavras-chave: *Zea mays* L., diazotrófico, endofíticos, fixação biológica de nitrogênio, inoculante.

NITROGEN AND INOCULATION WITH *Herbaspirillum seropedicae* IN CORN CULTURE IN CONDITIONS OF FERTILE SOIL

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (FBN) already established between leguminous plants can be a technological approach useful to increase the production of gamines, seen, that micro-organisms of the genus *Herbaspirillum* present potential for FBN and production of substances that promote growth. The objective of this work to evaluate in terms of fertile soil maize agronomic performance in function of the inoculation of seeds with *Herbaspirillum seropedicae*, under different nitrogen levels. The experimental design used was randomized blocks with five repetitions, arranged in factorial arrangement 2x5, that is, the absence and presence of *Herbaspirillum seropedicae* with inoculation and five nitrogen rates (0, 48, 72, 96 and 120 kg ha⁻¹). The parameters evaluated were: spike insertion height, diameter of stem, mass of spike, spike length, number of rows of grains per spike, number of grains per spike, spike base diameter, weight of one thousand grains, dry mass of the shoot, productivity, chlorophyll content and N content the leaves of corn. The conclusion that corn plants, even in fertile soil, responded to nitrogen application for the different components of production, and under such conditions, inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* did not influence any of the variables studied.

Key words: *Zea mays* L., diazotrophic, endophytic, biological nitrogen fixation, inoculants.

INTRODUÇÃO

O milho é uma das principais culturas de importância econômica para o Estado de Mato Grosso do Sul, necessitando de grandes quantidades de nitrogênio para complementar a quantidade suprida pelo solo, e/ou adicionada ao solo na semeadura e em cobertura, quando se deseja altas produtividades. Devido a sua dinâmica no solo, o nitrogênio (N) apresenta um manejo complexo, sendo, geralmente, o elemento mais caro no sistema de produção da cultura do milho (BASTOS et al., 2008; CANTARELLA e MARCELINO, 2008). Além do alto custo deste insumo, os riscos de poluição ambiental decorrentes da adubação nitrogenada podem ser elevados, especialmente em condições de intensa precipitação e altas doses de adubação. A safra brasileira de milho de 2011/2012 teve uma produção de 67 milhões de toneladas (CONAB, 2012). Em média, utilizam-se 22 kg ha⁻¹ de N para cada 1000 quilos de grãos produzidos, sendo assim, estima-se que foram utilizados 3.715,555 milhões de toneladas de ureia (45%) para a produção nesta safra.

Tendo em vista os custos ambientais e econômicos e o fato de que o Brasil importa atualmente 70% da ureia utilizada na agricultura, se faz necessário encontrar alternativas viáveis que visem à redução no seu uso. Desse modo, a inoculação com bactérias diazotróficas pode ser uma alternativa biotecnológica na busca pela sustentabilidade, visto que estes microrganismos podem atuar na disponibilidade de N para a planta, além de produzirem fitohormônios, substâncias responsáveis pelo estímulo ao crescimento das plantas, podendo dessa maneira reduzir a utilização de uréia na cultura do milho (QUADROS, 2009).

Entre as bactérias diazotróficas, destacam-se as do gênero *Herbaspirillum*, que podem colonizar desde as raízes até as folhas, na região da rizosfera até tecidos internos da planta, sem emitir nenhum sintoma de patogenicidade (TERVER e HOLLIS, 2002). O mecanismo de promoção do crescimento vegetal incluem ações diretas, como a fixação biológica de nitrogênio (BALDANI et al., 1997), produção de reguladores de crescimento vegetal (CÁSSAN et al., 2001; DONATE-CORREA et al., 2004), solubilização de fosfatos (VASSILEV e VASSILEVA, 2003), e ações indiretas, como o controle biológico

(MARIANO et al., 2004), produção de sideróforos (LODEWYCKX et al., 2002) e indução a resistência sistêmica no hospedeiro (JETIYANON e KLOEPPER, 2002).

A interação positiva entre estas bactérias e o milho, bem como entre outras gramíneas tem sido demonstrada por vários autores (DOTTO et al., 2010; FERREIRA et al., 2011, GUIMARÃES et al., 2010; SABINO et al., 2012) e, embora o maior obstáculo para a utilização desta tecnologia seja a inconsistência de resultados em condições de campo, ligada a fatores como condições edafoclimáticas e interações com a biota do solo (REIS, 2007), levantamentos de diversos experimentos realizados em vários países mostram que a inoculação com *Herbaspirillum* resultou, na maioria dos casos, em aumento de massa seca, produtividade e acúmulo de nitrogênio. Apesar de muitos anos de pesquisa, ainda se observam respostas muito variáveis, o que mostra a importância e justifica a realização de experimentos a fim de se obter informações sobre a interação planta-bactéria-ambiente.

O efeito do *Herbaspirillum* spp. no desenvolvimento do milho tem sido pesquisado nos últimos anos, não somente quanto ao rendimento das culturas, mas também com relação às causas fisiológicas que, possivelmente, aumentam esse rendimento, esperando que a aplicação dessa forma alternativa de adubo reduza a necessidade de aplicação de N fertilizante para a cultura (ALVES, 2007; ALVES, 2011).

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar, em condições de solo fértil, o desempenho agrônômico do milho em função da inoculação das sementes com *Herbaspirillum seropedicae*, sob diferentes níveis de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no campo experimental da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados-MS, de março a julho de 2012. As coordenadas geográficas são 22° 13' 16" S e 54° 17' 01" W, com altitude média de 452 m. O clima da região é do tipo Cwa, segundo a classificação de Köppen. O solo foi classificado como Latossolo Vermelho distroférico, de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2013). Dados médios de temperatura e precipitação pluviométrica durante a condução do experimento foram obtidos na Estação Agrometeorológica da Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados, MS, e são mostrados na Figura 1.

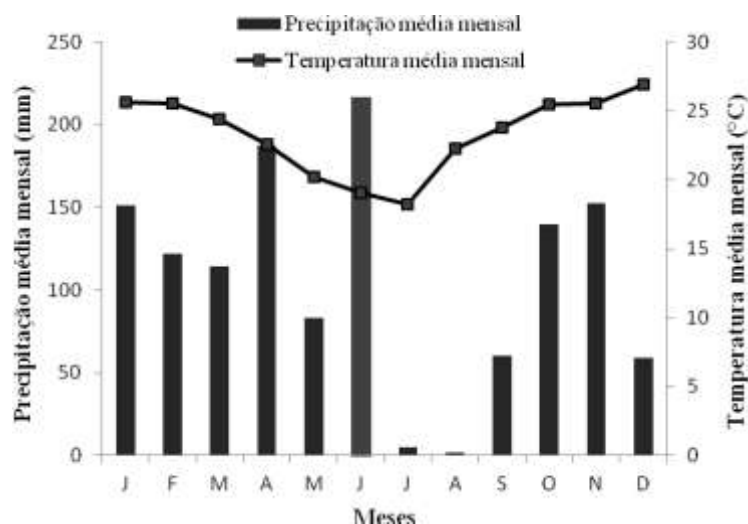


FIGURA 1. Precipitação (mm) e temperatura (°C) médias mensais, registradas na estação meteorológica da Embrapa Agropecuária Oeste, Município de Dourados, MS, no ano de 2012.

Os resultados da análise química do solo, na profundidade de 0-20 cm, antes da instalação do experimento resultaram nos seguintes valores: pH (CaCl₂) 5,90; M.O. 31,18 g dm⁻³; C: 18,13 g dm⁻³; P (mehlich): 18,50 mg dm⁻³; K: 5,5 mmolc dm⁻³; Ca: 77,9 mmolc dm⁻³; Mg 28,4 mmolc dm⁻³; Al: 0,00 mmolc dm⁻³; H+Al: 34,2 mmolc dm⁻³; SB: 111,8 mmolc dm⁻³; CTC: 146,0 mmolc dm⁻³, saturação por bases

76,58%. A análise granulométrica proporcionou os seguintes valores: 225 g kg⁻¹ de areia, 125 g kg⁻¹ de silte e 650 g kg⁻¹ de argila.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com cinco repetições. Os tratamentos foram dispostos em arranjo fatorial 2 x 5, ou seja, ausência e presença de inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* e cinco doses de nitrogênio (0, 48, 72, 96 e 120 kg ha⁻¹).

Foram utilizadas sementes do híbrido simples P3646H, sendo previamente inoculadas com a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae*, em veículo à base de turfa, produzido pela Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ. A dose aplicada foi de 250 g para cada 10 kg de sementes de milho do inoculante com veículo à base de turfa. Visando aumentar a adesão do inoculante às sementes foram adicionados 60 mL para cada 10 kg de semente de uma solução açucarada a 10% (p/v).

Na semeadura, a adubação de base foi realizada à lanço, com posterior incorporação, aplicando-se 300 kg ha⁻¹ da formulação 0-20-20 para o suprimento de 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e K₂O, respectivamente. A semeadura foi realizada manualmente, com o auxílio de “matraca”, colocando-se duas sementes por cova, deixando-se após o desbaste seis plantas por metro linear. As unidades experimentais foram compostas por quatro linhas de seis metros de comprimento espaçadas em 0,90 m entre linhas. Foram eliminadas as duas linhas laterais e 0,5 m de cada extremidade da parcela, avaliando os cinco metros de cada uma das duas linhas centrais.

A adubação nitrogenada foi aplicada na dose de 48 kg ha⁻¹ de N no sulco de plantio, na forma de ureia (45%), e o restante em cobertura, quando as plantas apresentavam-se em estágio de desenvolvimento V4 e V7, sendo esta realizada a lanço na área total da parcela. A área foi irrigada após a implantação da cultura e em períodos de maior déficit hídrico. Os demais tratos culturais foram realizados de acordo com as exigências da cultura.

No período de florescimento (aparecimento da inflorescência feminina “cabelo”) do milho, foram efetuadas amostragens foliares, conforme metodologia proposta por Malavolta et al. (1997), a fim de determinar o teor de nitrogênio no tecido foliar do milho. Coletou-se o terço médio com nervura da folha oposta e abaixo da inserção da espiga principal, num total de 10 folhas por unidade experimental e neste mesmo estágio fenológico foi determinado o teor de clorofila na

folha, com auxílio do clorofilômetro modelo SPAD-502. Todo o material vegetal coletado foi lavado em água corrente, solução de HCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e água deionizada. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e secos em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65°C , por 72 horas, e posteriormente moídas. As amostras moídas foram submetidas à digestão sulfúrica, seguida da determinação do teor foliar de N, utilizando a metodologia descrita em Embrapa (2009).

A colheita do milho foi realizada manualmente, coletando-se todas as espigas da área útil da parcela ($9,0 \text{ m}^2$). Para a determinação dos componentes de produção, amostraram-se 10 espigas representativas por parcela, fora da área de produção de grãos. Os parâmetros avaliados foram: massa de espiga, comprimento de espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por espiga, diâmetro da base da espiga e massa de mil grãos. Na planta, foram avaliados a altura de inserção de espiga e o diâmetro do colmo. Para determinar a produtividade de grãos, as espigas foram debulhadas com o auxílio de uma máquina manual, e pesadas. Para determinar a produtividade de grãos, as espigas foram debulhadas com o auxílio de uma máquina manual e pesadas. Os resultados obtidos foram transformados para kg ha^{-1} , corrigindo-se a umidade para 13 % em base úmida. A massa seca da parte aérea das plantas foi estimada pela amostragem de três plantas dentro de cada parcela. A determinação da massa seca da parte aérea foi realizada por meio da secagem das amostras de plantas em uma estufa de circulação forçada, a uma temperatura de 65°C , por 72 horas. Os dados referentes à massa seca foram expressos em g/planta.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). Para as variáveis com significância estatística (teste F) em função das doses de N foi utilizada análise de regressão pelo teste t de Student.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados evidenciaram efeitos significativos ($p \leq 0,05$) das doses de nitrogênio sobre a altura de inserção de espiga, massa de espiga, comprimento de espiga, número de grãos por espiga, massa seca da parte aérea, massa de mil grãos, produtividade, teor de clorofila e teor de nitrogênio nas folhas de milho (Quadro 1). A inoculação com a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae* e a interação nitrogênio (N) x Inoculação (I) não influenciaram nenhuma das variáveis estudadas, ou seja, foi detectada ausência de efeitos decorrente da aplicação do inoculante com *H. seropedicae* às sementes de milho (Quadro 1).

A falta de sinergismo entre adubação nitrogenada e inoculação com bactérias diazotróficas é relativamente bem conhecida, mas ainda não totalmente esclarecido. Acredita-se que a disponibilidade de nitrogênio no solo altera o estado da planta e inibe, de forma indireta, o estabelecimento da FBN, isto porque metabolicamente é menos dispendioso para a planta utilizar o nitrogênio que está prontamente disponível no solo, ao invés de estabelecer uma associação com bactérias diazotróficas (GYANESHWAR et al., 2002). Além disso, em solos ricos em N ocorre uma diminuição na liberação de exsudados radiculares pelas plantas, diminuindo o suprimento de C prontamente disponível para as bactérias e, assim, a planta reduz os sinais bioquímicos emitidos aos microrganismos, o que afeta a associação com o organismo diazotrófico (MUTHUKUMARASAMY al., 1999). Dobbelaere et al. (2002) relataram que as características do solo estão frequentemente associadas à ausência de resposta à inoculação.

Houve efeito quadrático significativo sobre a altura de inserção de espiga de plantas de milho com o aumento das doses de N (Figura 2). A altura máxima de inserção de espiga correspondeu a 122,6 cm na dose de 48 kg ha⁻¹ de N. Estes resultados são concordantes aos encontrados por Mar et al. (2003), em que altura de inserção de espiga de plantas de milho respondeu de forma quadrática às doses crescentes de N (30, 60, 90, 120 e 150 kg ha⁻¹), com altura média de 99 cm obtidas com as doses de 121,5 kg ha⁻¹ de N.

QUADRO 1. Resumo da análise de variância para altura de inserção de espiga (AIE), diâmetro do colmo (DIA), massa de espiga (ME), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), fileira de grãos por espiga (FGE), número de grãos por espiga (NGE), massa seca da parte aérea (MSPA), massa de mil grãos (M1000), produtividade (PRO), teor de clorofila (CLO) e teor de nitrogênio (N) das folhas de milho em resposta a adubação nitrogenada e a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. Dourados, MS (2012).

Fonte de variação	GL	Quadrado médio					
		AIE	DIA	ME	CE	DE	FGE
Bloco	4	123,22	5,23	239,44	0,23	1,29	0,45
Nitrogênio (N)	4	243,32*	3,93	1507,07*	2,23*	6,27	1,21
Inoculante (I)	1	264,50	1,99	371,66	0,42	11,73	0,76
N*I	4	60,00	3,70	253,44	1,54	3,31	0,42
Resíduo	36	65,00	2,73	339,73	0,45	2,96	0,26
CV (%)		6,78	8,01	7,67	3,55	3,27	3,27

Fonte de variação	GL	Quadrado médio					
		NGE	MSPA	M1000	PRO	CLO	N
Bloco	4	2700,85	4791,15	353,90	2273435,09	2,83	30,36
Nitrogênio (N)	4	2860,52*	15966,31*	643,40*	2491902,93*	60,11*	204,15*
Inoculante (I)	1	763,62	2360,94	0,03	497951,40	0,61	37,74
N*I	4	619,10	990,77	149,24	1242595,94	12,83	46,94
Resíduo	36	828,73	2280,49	230,02	787835,91	6,74	1791
CV (%)		4,74	15,20	4,45	12,59	4,64	12,10

* – significativo a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

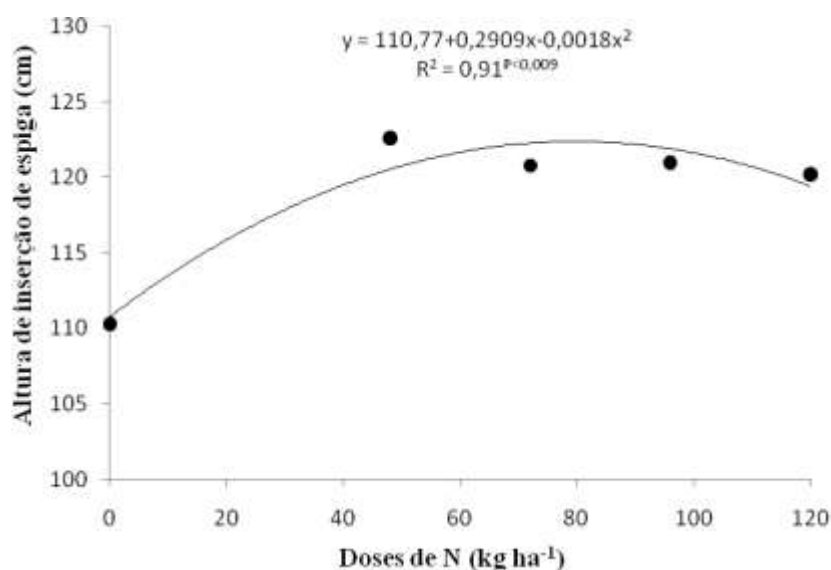


FIGURA 2. Altura de inserção de espiga em plantas de milho em resposta à adubação nitrogenada.

As doses de nitrogênio exerceram efeito linear crescente e significativo sobre a massa de espiga, comprimento de espiga e número de grãos por espiga (Figura 3A, 3B e 3C). Verifica-se que a massa de espiga, o comprimento de espiga e o número de grãos por espiga aumentaram com o incremento das doses de N na ordem de 8,94%, 5,39% e 4,46%, respectivamente. Dotto et al. (2010) observaram que a aplicação de doses crescentes de N em cobertura influencia significativamente a massa de espiga. Amaral Filho et al. (2005) constataram que o incremento nas doses de N (0, 50, 100 e 150 kg ha⁻¹ de N) promoveu aumento linear no número de grãos por espiga. Veloso et al. (2006) verificaram que o incremento na dose de N proporcionou aumento no número de grãos por espiga e número de grãos por fileira. Melo et al. (2011) observaram, que com dose de N em torno de 125 kg ha⁻¹ foram obtidos os maiores valores para número de grãos por espiga. Soratto et al. (2010) e Souza; Soratto (2006) também obtiveram incremento linear no número de grãos por espiga do milho safrinha cultivado após soja, com aplicação de N em cobertura, independentemente da fonte utilizada.

Para Ernani et al. (2005), o suprimento insuficiente de N durante o estágio de diferenciação floral pode reduzir o número de óvulos nos primórdios da

espiga e, com isso, diminuir a produtividade de grãos. Um importante papel do N em assegurar alta produtividade de milho está no estabelecimento da capacidade do dreno reprodutivo. Apesar da capacidade do dreno reprodutivo ser função do número e do tamanho dos grãos; o número de grãos por espiga se correlaciona mais intensamente com a produtividade de grãos de milho que qualquer outro componente da produção (BELOW, 2002).

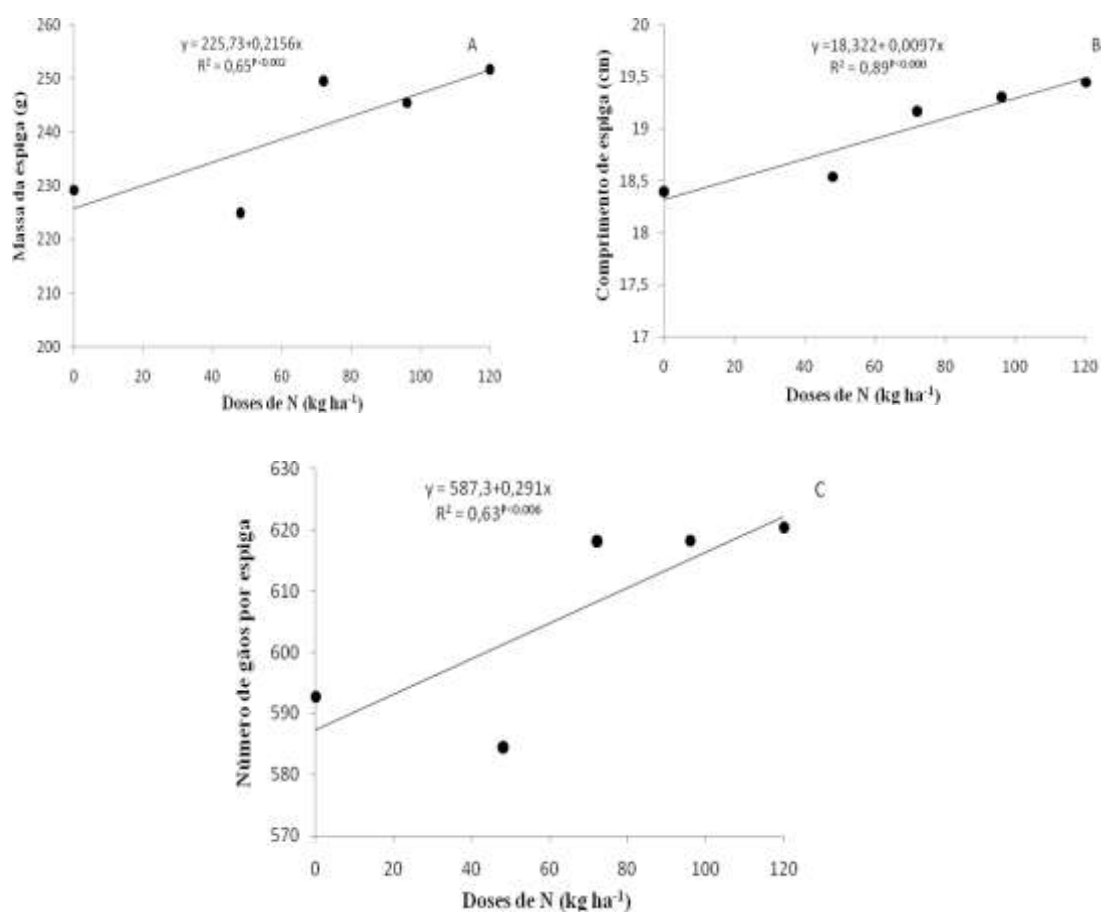


FIGURA 3. Massa de espiga (A), comprimento de espiga (B) e número de grãos por espiga (C) de plantas de milho em resposta à adubação nitrogenada.

O modelo matemático que melhor se ajustou à produção de massa seca da parte aérea de plantas de milho na maturação fisiológica foi o linear crescente (Figura 4). Resultados similares foram obtidos por Gava et al. (2010), onde constataram que a elevação da dose de N-fertilizante resultou no aumento da massa seca e na taxa de produção de massa seca pela cultura do milho; e por Fernandes et al. (2003), em que observaram incremento na massa seca de plantas de milho com aumento das doses de N (0, 30, 90 e 180 kg ha⁻¹).

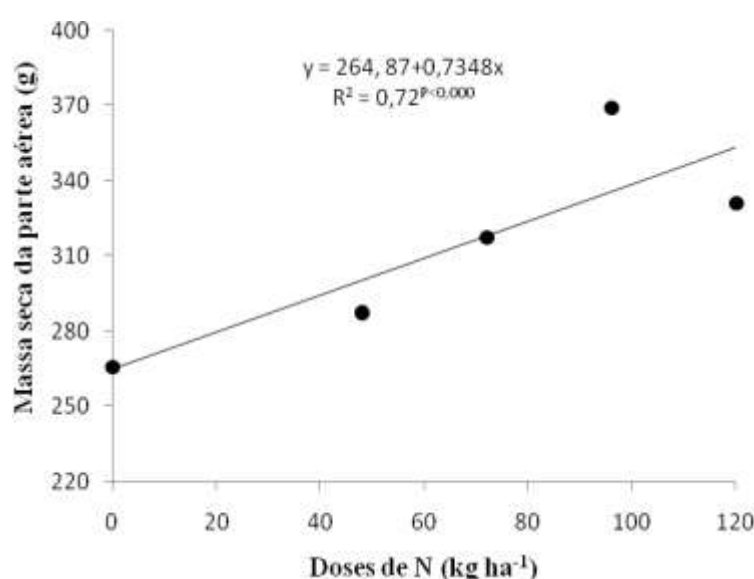


FIGURA 4. Massa seca da parte aérea de plantas de milho em resposta à adubação nitrogenada.

A produtividade de grãos de milho aumentou linearmente com as doses de N, variando de 6.310 kg ha⁻¹ a 7.568 kg ha⁻¹, com um incremento na ordem de 16,62% na dose de 120 kg ha⁻¹ em relação ao controle (0 kg ha⁻¹ de N) (Figura 5). Esse aumento demonstra que, apesar de o solo possuir boa fertilidade e teor de MO elevado (31,18 g dm⁻³), houve considerável resposta à aplicação de nitrogênio, o que, provavelmente, está relacionado com o genótipo utilizado. A menor produtividade foi de 6.310 kg ha⁻¹ de massa de grãos; entretanto, esse valor encontra-se bem acima da produtividade média nacional das últimas safras (safra 11/12 e safra 12/13), que foi de 4.949 kg ha⁻¹ (CONAB, 2013). Concordando com os resultados encontrados, Soratto et al. (2010) e Kappes et al. (2009) observaram incremento significativo da

produtividade do milho com a aplicação de N, independentemente da fonte utilizada. Mar et al. (2003), Souza; Soratto (2006) e Bastos et al. (2008) constataram aumento da produtividade de grãos do milho com a aplicação de até 120 kg ha⁻¹ de N e 180 kg ha⁻¹ de N, respectivamente. Gava et al. (2010) verificaram que produtividade de grãos de milho aumentou linearmente em função das doses de N (0, 50, 100, 150 e 200 kg ha⁻¹ de N) aplicadas no cultivo do milho em semeadura direta.

Salienta-se, que a produtividade de grãos da cultura de milho depende diretamente da atividade fotossintética da planta, sendo que a fotossíntese, por sua vez, depende da área foliar e do tempo de permanência das folhas em plena atividade na planta (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000), o que, por sua vez, depende do estado nutricional da planta, principalmente N, em virtude desse nutriente estar relacionado diretamente com a divisão e a expansão celular, influenciando o crescimento e o desenvolvimento da planta (BULL,1993). Nas adubações nitrogenadas, é importante que a quantidade de N a ser aplicada na cultura do milho seja precisa, minimizando tanto os excessos, que prejudicam a qualidade ambiental e oneram o produtor, quanto as quantidades deficiências, que comprometem a produtividade projetada (AMADO et al., 2002).

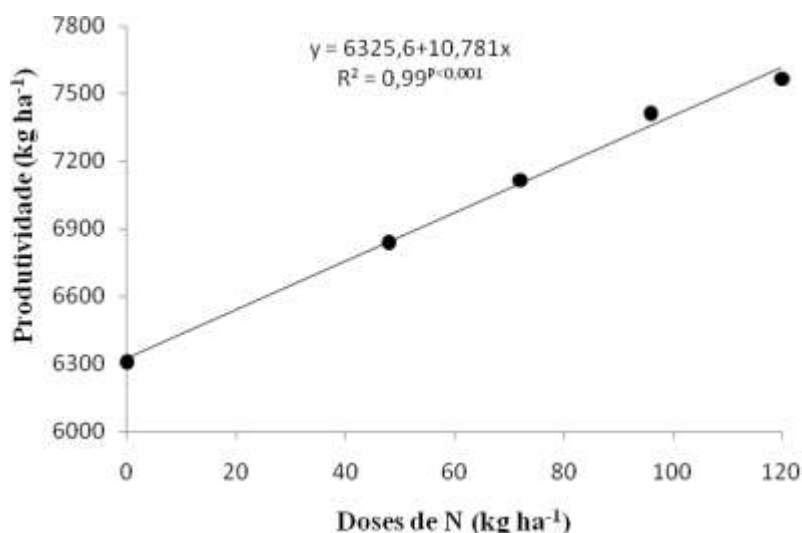


FIGURA 5. Produtividade de plantas de milho em resposta à adubação nitrogenada.

A massa de mil grãos foi aumentada pela aplicação de doses de N (Figura 6). Observa-se que o aumento dessa variável foi até a dose máxima de 72 kg ha⁻¹ de N, proporcionando aumento de 5,77% em relação ao controle (0 kg ha⁻¹ de N). Resultados similares foram obtidos por Soratto et al. (2010), onde encontraram aumento na massa de mil grãos até a dose máxima estimada de 78, 5 kg ha⁻¹ de N; por Ferreira et al. (2001), no qual obtiveram resposta quadrática, sendo que a massa máxima de mil grãos (352 g) foi obtida para a dose de 207 kg de N ha⁻¹; e por Dotto et al. (2010) no qual a aplicação de N em cobertura influenciou significativamente a massa de mil grãos de plantas de milho. O N desempenha importante papel como constituinte essencial dos aminoácidos, participando diretamente da biossíntese de proteínas e clorofilas. Assim, como a formação dos grãos depende de proteínas na planta, a massa dos grãos e a produtividade estão diretamente relacionadas com o suprimento de N (BELOW, 2002).

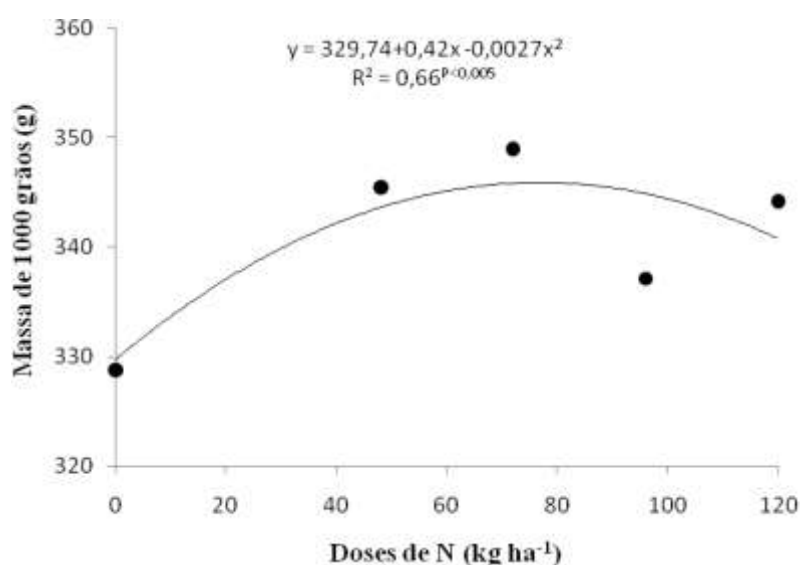
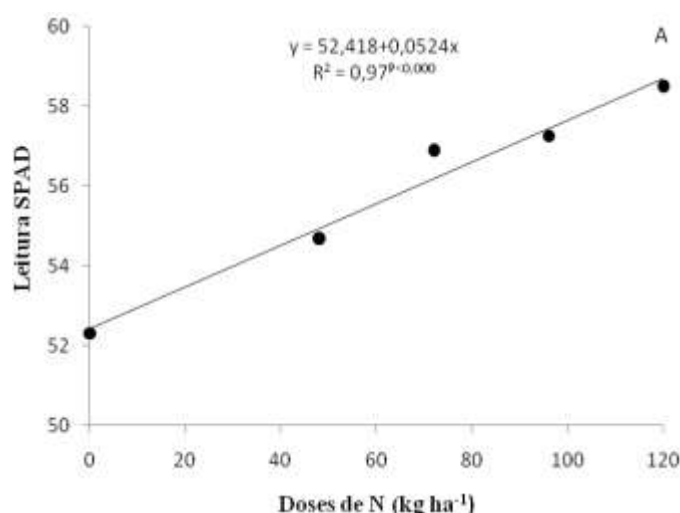


FIGURA 6. Massa de mil grãos de plantas de milho em resposta à adubação nitrogenada.

As leituras médias do índice SPAD nas folhas de milho aumentaram linearmente com as doses de N (Figura 7A). Aumento no teor de clorofila em função de doses de N foi observado por Melo et al. (2012), Jordão et al. (2010), Jakelaitis et al. (2005) e Argenta et al. (2004) para a cultura do milho. O teor de clorofila na folha é utilizado para prever o nível nutricional de nitrogênio em plantas, devido ao fato da quantidade desse pigmento correlacionar-se positivamente com o teor de N (BOOIJ et al., 2000). Este pigmento absorve radiação na faixa de 400 a 700 nm (exceto a faixa da cor verde) e está diretamente associado ao potencial de atividade fotossintética, assim como o estado nutricional das plantas está associado, geralmente, à quantidade e qualidade da clorofila (ZOTARELLI et al., 2003).

O teor de N nas folhas foi influenciado positivamente pelas doses de N aplicadas (Figura 7B). Verifica-se que as doses de N aumentaram linearmente os teores desse elemento na folha do milho. Mar et al. (2003) também verificaram aumento no teor foliar de N no milho safrinha, em função da aplicação de N em cobertura. Contudo, mesmo no tratamento controle (0 kg ha^{-1}), o teor de N estava na faixa considerada adequada ($27 - 35 \text{ g kg}^{-1}$) por Cantarella et al. (1996), este fato pode ser resultado da disponibilização de razoáveis quantidades do nutriente mediante o processo de mineralização da matéria orgânica do solo, que no presente solo era de $31,18 \text{ g dm}^{-3}$.



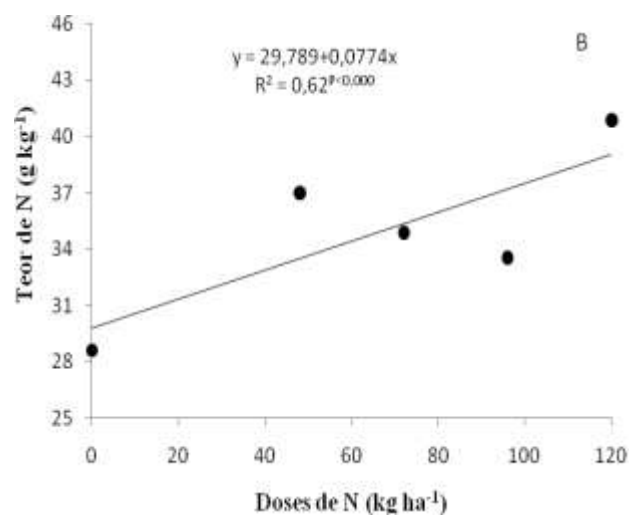


FIGURA 7. Leitura do teor de clorofila total (índice SPAD)(A) e teor de nitrogênio (B) nas folhas de milho por ocasião do florescimento em resposta à adubação nitrogenada.

CONCLUSÕES

1. As plantas de milho, mesmo em solo fértil, responderam à aplicação de nitrogênio para os diferentes componentes de produção, e nessas condições a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* não influenciou nenhuma das variáveis estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. C. **Estudo da interação da bactérias BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae* com plantas de milho.** Rio de Janeiro: UFRRJ, 2011. 52 p. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do milho.** Rio de Janeiro: UFRRJ, 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

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

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

ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F.; FOSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L, SUHRE, E.; TEICHAMANN, L. L. Adubação nitrogenada em milho pelo monitoramento do nível de nitrogênio na planta por meio do clorofilômetro. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.27, n.1, p. 109-119, 2003.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in FBN with non-legume plants. **Soil Biology**, v.29, n.5, p.911-922, 1997.

BASTOS, E. A.; CARDOSO, M. J.; MELO, F. B.; RIBEIRO, V. Q.; ANDRADE JUNIOR, A. S. Doses e formas de parcelamento de nitrogênio para a produção de milho sob plantio direto. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 2, p. 275-280, 2008.

BELOW, F. E. **Fisiologia, nutrição e adubação nitrogenada do milho.** Informações Agronômicas, n. 99, p. 7-12, 2002.

BOOIJ, R.; VALENZUELA, J. L.; AGUILERA, C. **Determination of crop nitrogen status using non-invasive methods.** In: HAVERKORT, A.J.; MACKERRON, D.K.L. (Eds.). Management of nitrogen and water in potato production. The Netherlands, Wageningen Pers, p. 72-82, 2000.

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

CANTARELLA, H.; MARCELINO, R. **Fontes alternativas de nitrogênio para a cultura do milho**. Informações Agronômicas, n. 122, p. 12-14, 2008.

CANTARELLA, H.; RAIJ, B. Van; CAMARGO, C. E. O. Cereais. In: RAIJ, B. Van, *et al.* (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 1996. p. 45-71. (Boletim Técnico, 100).

CANTARELLA, H.; MARCELINO, R. **Fontes alternativas de nitrogênio para a cultura do milho**. Informações Agronômicas, n. 122, p. 12-14, 2008.

CÁSSAN, F.; BOTTINI, R.; SCHNEIDER, G.; POCCOLI, P.; *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of rice dwarf mutants 1. **Plant Physiology**, v.125, p. 2053-2058, 2001.

CONAB. 2012. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/2012: Oitavo Levantamento, Junho/2012**, Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, CONAB, 33p.

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

DONATE-CORREA, J.; LEON-BARRIOS, M.; PEREZ-GALDONA, R. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus*, a forage tree-legume endemic to the Canary Islands. **Plant and Soil**, v.266, n.1-2, p.261-272, 2004.

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**, v. 5, n. 3, p.376-382, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3 Ed. rev. ampl.- Brasília, DF: Embrapa Solos, 2013. 353p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**.- 2. Ed, Brasília., Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

ERNANI, P. R. SANGOI, L.; LECH, V. A.; RAMPAZZO, C. A forma de aplicação da uréia e dos resíduos vegetais afeta a disponibilidade de nitrogênio. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 360-365, 2005.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000.360 p.

FERNANDES, F. C. C.; BUZETTI, S.; ARF, O., ANDRADE, A. C. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.4, n.2, p.195-204, 2005.

FERREIRA, A. C. B.; ARAUJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G.; CARDOSO, A. A. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agrícola**, v. 58, n.1, p. 131-138, 2001.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000.

FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Produção de grãos de arroz em função as inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.13; p. 826-833, 2011.

FERREIRA, A. C. B.; ARAÚJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G. P.; CARDOSO, A. A. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 131-138, 2001.

GAVA, G. J. C.; OLIVEIRA, M. W.; SILVA, M. A.; JERÔNIMO, E. M.; CRUZ, J. C. S.; TRIVELIN, P. C. O. Produção de fitomassa e acúmulo de nitrogênio em milho cultivado com diferentes doses de 15N-uréia. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 851-862, 2010.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K. REDDY, P. M.; LADHA, J. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v.154, p.131-145, 2002.

GUIMARÃES, S. L., CAMPOS, D. T. S., BALDANI, V. L. D., JACOB-NETO, J. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, v.23, n.4, p.32-39, 2010.

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

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

JORDÃO, L. T.; LIMA, F. F.; LIMA, R. S.; MORETTI, P. A. E. M.; PEREIRA, H. V.; MUNIZ, A. S.; OLIVEIRA, M. C. N.. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 29.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 13.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 11.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 8., 2010, Guarapari. Fontes de nutrientes e produção agrícola: modelando o futuro: **Anais...Viçosa**: SBCS, 2010. 4p.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D.; Endophytic bacteria and their potential applications. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, v.21, n.6, p. 583 -606, 2002.

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

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

MAR, G .D.; MARCHETTI, M. E.; SOUZA, L. C. F.; GONÇALVES, M. C.; NOVELINO, J. O. Produção do milho safrinha em função de doses e épocas de aplicação de nitrogênio. **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 267-274, 2003.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para a agricultura sustentável, **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p.89-111, 2004.

MELLO, N. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho e trigo**. Passo Fundo: UPF, 2012. 90 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade de Passo Fundo, 2012.

MELO, F. B.; CORÁ, J. E.; CARDOSO, M. J. Fertilização nitrogenada, densidade de plantas e rendimento de milho cultivado no sistema plantio direto. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 27-31, 2011.

MEIRA, F. A.; BUZETTI, M.; ARF, O.; SÁ, M. E.; ANDRADE, J. A. C. Fontes e épocas de aplicação do nitrogênio na cultura do milho irrigado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 02, p. 275-284, 2009.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum spp.* from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n.2, p. 157–164, 1999.

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum spp.* em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 2009. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

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

RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adu-bação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2 ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 1997. 285 p. (IAC.Boletim Técnico, 100).

SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Bactérias diazotróficas como promotoras do desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15; p. 2012.

SILVA, E. C.; FERREIRA, S. M.; SILVA, G. P.; ASSIS, R. L.; GUIMARÃES, G. L. Épocas e formas de aplicação de nitrogênio no milho sob plantio direto em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n.5, p. 725-733, 2005.

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

SOUZA, E. de F. C. de; SORATTO, R. P. Efeito de fontes e doses de nitrogênio em cobertura, no milho safrinha, em plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 5, n. 3, p. 387-397, 2006.

TERVER, I. W.; HOLLIS, J. P. Bacteria in the storage organs of healthy tissue. **Phytopathology Journal**, v.38, p.960 – 967, 2002.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, n.5-6, p.435-440, 2003.

VELOSO, M. E. C.; DUARTE, S. N.; DOURADO NETO, D.; MIRANDA, J. H.; SILVA, E. C.; SOUSA, V. F. Doses de nitrogênio na cultura do milho, em solos de várzea, sob sistema de drenagem subterrânea. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.5, n.3, p.382-394, 2006.

ZOTARELLI, L.; CARDOSO, E. G.; PICCININ, J. L.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; TORRES, E.; ALVES, B. J. Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n. 9, p. 1117-1122, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

1. A adubação nitrogenada associada a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* influenciaram positivamente a massa de espiga, diâmetro de espiga, número de grão por espiga, massa seca da parte aérea, produtividade e teor de clorofila de plantas de milho.

2. Os teores de N, P, K e Zn nas folhas de milho aumentaram com a adubação nitrogenada e a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*.

3. A inoculação com *Azospirillum brasilense* sem adubação nitrogenada promoveu maiores acúmulos de N, K, Ca e Mg nos grãos em relação aos tratamentos inoculados com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* e, adubados com 30 e 120 kg ha⁻¹ de N.

4. A inoculação de *Azospirillum brasilense* ou *Herbaspirillum seropedicae* associada à adubação nitrogenada pode proporcionar uma redução no uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos na cultura do milho.

5. Pela técnica da abundância natural do ¹⁵N, a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* contribui em média com 19,40 e 9,49%, respectivamente, do N necessário ao desenvolvimento da cultura do milho.

6. O híbrido BRS 3035 se destaca para a maioria das variáveis analisadas, produzindo maior quantidade de massa seca de parte aérea, plantas com maior altura, volume de raízes e apresentando maiores índices de eficiência de utilização de N.

7. A inoculação com a estirpe Z-94 de *Herbaspirillum seropedicae* promoveu aumento no volume de raízes, comprimento de raízes, massa seca da parte aérea, teor de clorofila, teor de N na parte aérea, eficiência de absorção do N e eficiência de utilização do N por plantas de milho.

8. A inoculação da estirpe Z-94 de *H. seropedicae* acrescido de 80 kg ha⁻¹ de N aumentou o teor de N na parte aérea das plantas de milho em até 25% nos genótipos avaliados.

9. Existe distinção entre genótipos de milho para produção de massa seca da parte aérea e porcentagem de N na parte aérea proveniente do fertilizante.

10. O híbrido P3646H e o híbrido BRS3035 apresentaram aumentos de 34,3% e 64,4%, respectivamente, na eficiência de utilização do N quando inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* sem adição de N.

11. As plantas de milho, mesmo em solo fértil, responderam à aplicação de nitrogênio para os diferentes componentes de produção, e nessas condições a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* não influenciou nenhuma das variáveis estudadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A FBN comporta-se como uma importante fonte de N ao sistema solo-planta, e vislumbram a possibilidade de que o manejo adequado e a utilização de genótipos eficientes para a FBN é possível reduzir a adubação com fertilizantes nitrogenados na cultura do milho, economizando recursos, garantindo segurança alimentar e a preservação do meio ambiente.