

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola**

**MILHO SAFRA SUBMETIDO À INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS E DOSES DE NITROGÊNIO**

**JULIO CEZAR FORNAZIER MOREIRA**

**RONDONÓPOLIS – MT**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola**

**MILHO SAFRA SUBMETIDO À INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS E DOSES DE NITROGÊNIO**

**JULIO CEZAR FORNAZIER MOREIRA**  
Engenheiro Agrícola e Ambiental

Orientador: Prof. Dr. SALOMÃO LIMA GUIMARÃES

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Federal de Mato Grosso, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.

**RONDONÓPOLIS – MT**  
**2014**

### Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

M838m Moreira, Julio Cezar Fornazier.  
MILHO SAFRA SUBMETIDO À INOCULAÇÃO COM  
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS E DOSES  
DE NITROGÊNIO / Julio Cezar Fornazier Moreira. -- 2014  
64 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Salomão Lima Guimarães.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato  
Grosso, Instituto de Ciências Agrárias e Tecnológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola,  
Rondonópolis, 2014.  
Inclui bibliografia.

1. Adubação nitrogenada.
2. Fixação biológica de nitrogênio.
3. *Zea mays* L. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

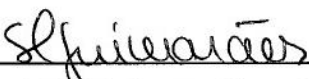
**Título:** MILHO SAFRA SUBMETIDO À INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS E DOSES DE NITROGÊNIO

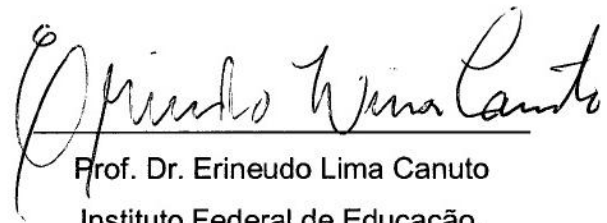
**Autor:** JULIO CEZAR FORNAZIER MOREIRA


**Orientador:** Dr. SALOMÃO LIMA GUIMARÃES

Aprovada em 05 de dezembro de 2014.

Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Salomão Lima Guimarães  
Universidade Federal de Mato Grosso  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Erineudo Lima Canuto  
Instituto Federal de Educação,  
Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

  
\_\_\_\_\_  
Profª Dra. Maria Aparecida Peres de Oliveira  
Universidade Federal de Mato Grosso

**RONDONÓPOLIS – MT**  
**2014**

A minha amada Mãe, pelo exemplo de vida,  
**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, por ter me iluminado e me dado forças para seguir confiante ao longo desta jornada;

Aos meus queridos pais, Terezinha Fornazier e Elviro Moreira Junior, pelos conselhos e apoio;

Ao meu irmão Augusto Fornazier Moreira, parceiro e acima de tudo amigo fiel em todos os momentos, inclusive os mais complicados;

À toda minha família;

À Ellen Cristina Alves de Anicésio pelo amor, compreensão e disposição de estar sempre contribuindo na condução deste e de outros trabalhos;

À Jakeline Rosa de Oliveira e Marcel Thomas Job Pereira pela grande amizade construída e aos muitos momentos felizes que passamos juntos, os quais ficaram guardados para a vida;

Aos amigos que junto comigo caminharam durante todo o período do mestrado, me apoiando durante a realização dos experimentos e estudos. Aqui deixo minha profunda gratidão ao João Ângelo, Samara e Wilson Kanashiro.

Aos meus grandes amigos, Edmo Valadares, João Carlos Carvalho, Giancarlo Goldoni, Rafael Araújo, Rafael San Miguel e Andressa pela parceria e companheirismo durante todos esses anos;

À Fundação de Apoio à cultura da Soja (FACS) e a Associação dos Produtores de Soja e Milho de Mato Grosso, pela concessão da bolsa de estudos;

À Universidade Federal de Mato Grosso, em especial ao programa de pós-graduação em Engenharia Agrícola;

Ao professor Dr. Salomão Lima Guimarães, pelo acompanhamento e orientação na execução deste trabalho e tantos outros ao longo de toda minha vida acadêmica, por acreditar e apoiar as minhas decisões;

Ao professor Dr. Erineudo Lima Canuto por todo apoio durante a condução do experimento em Campo Verde;

À todos os professores do programa de pós-graduação em Engenharia Agrícola, que sempre com muita paciência e dedicação transmitiram seus conhecimentos.

## MILHO SAFRA SUBMETIDO À INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS E DOSES DE NITROGÊNIO

**RESUMO** – A utilização de bactérias diazotróficas caracteriza uma importante alternativa ao fornecimento de nitrogênio as culturas. Objetivou-se por este trabalho avaliar os efeitos da inoculação e doses de nitrogênio, no desenvolvimento, nutrição e produção do milho safra, cultivado em Mato Grosso. O experimento foi conduzido na safra 2013/2014, em campo experimental, sob delineamento de blocos ao acaso em arranjo fatorial 4x3. Os tratamentos constaram de um inoculante comercial, dois isolados de bactérias diazotróficas associativas (MTAz8 e MTh2), e a ausência da inoculação combinadas com três doses de nitrogênio (0, 55 e 110 kg ha<sup>-1</sup>), em quatro repetições. As sementes foram peletizadas utilizando a turfa como veículo de inoculação, exceto o inoculante comercial que foi aplicado líquido, conforme recomendações do fabricante. A adubação nitrogenada foi parcelada em duas aplicações de cobertura. As avaliações foram realizadas aos 63, 90 e 125 dias após a semeadura, onde avaliou-se: índice de clorofila, concentração de nitrogênio nas folhas, altura das plantas, altura da inserção da espiga e diâmetro do colmo. Após a colheita foram determinados a produção de massa da parte aérea e a concentração de nitrogênio total e proteína bruta dos grãos. Os resultados evidenciaram interação significativa apenas para a produção da massa seca da parte aérea. Entretanto, todas as demais variáveis analisadas, com exceção para diâmetro do colmo e peso de mil grãos, foram influenciados de forma isolada pelos fatores em estudo. A produtividade de grãos foi incrementada quando a inoculação esteve associada às doses de nitrogênio em cobertura. A inoculação com bactérias diazotróficas proporciona ganhos na produtividade de grãos e a adubação nitrogenada promove incrementos no desenvolvimento, nutrição e produção da cultura do milho cultivado em Mato Grosso, no período de safra.

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

## **CORN CROP SUBMITTED TO INOCULATION WITH DIAZOTROPHIC BACTERIA AND RATES OF NITROGEN**

**ABSTRACT** - The diazotrophic bacteria is an important alternative nitrogen supply cultures. The aim of this study was to evaluate the effects of inoculation and nitrogen rates in the development, nutrition and production of the corn crop, grown in Mato Grosso. The experimental design was a randomized complete block with four replications and treatments arranged in a 4 x 3 factorial. The treatments consisted of inoculation of seeds (control, strain MTAz8, strain of MTh2 and commercial inoculant) and nitrogen rates (0, 55, and 110 kg ha<sup>-1</sup>). Inoculants were produced applied by pelleting the seeds, except the commercial inoculant was applied according manufacturer recommendations. Nitrogen rates was split in two applications of coverage. The relative leaf chlorophyll content, nitrogen content and dry mass of shoots, ear and plant height and stem diameter were evaluated during in three stages the maize cycle. After harvest, the components of grain yield, nitrogen contend and crude protein grains. There was significant interaction only for the production of dry mass of shoots. However, all parameters were influenced by nitrogen fertilization, except for stem diameter and 1000 grain weight. Inoculation associated nitrogen rates in coverage provided the highest average when seeds were not inoculated. Concluded that inoculation with diazotrophic bacteria provides yield effects and nitrogen fertilization promotes increases in development, nutrition and yield of corn grown in Mato Grosso, in the first growing season.

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



## LISTA DE FIGURAS

1. Temperatura média e precipitação pluviométrica acumulada na cidade de Campo Verde no período de 01/12/2013 à 20/04/2014. (Fonte: Estação meteorológica automática de Campo Verde/MT – INMET) .....24
2. Avaliação da altura das plantas (A) e do diâmetro do colmo (B) em plantas de milho submetidas a inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio.....28
3. (A) Sintomas visuais de deficiência por nitrogênio em plantas de milho que não receberam adubação nitrogenada e (B) plantas que receberam adubação nitrogenada completa, com 110 kg ha<sup>-1</sup> aos 33 DAS.....37

## LISTA DE TABELAS

1. Propriedades químicas e físicas do solo na área experimental localizada no IFMT, núcleo Campo Verde, antes da implantação do experimento .....26
2. Análise de variância para altura (ALT), altura de inserção da espiga (INSER), diâmetro do colmo (DC), índice de clorofila (IC) e concentração de nitrogênio foliar (N FOLIAR), nos estádios VT (emissão da inflorescência masculina) e R3 (grãos pastosos) da cultura do milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio.....30
3. Análise de variância para concentração de nitrogênio nos grãos (N GRÃOS), Massa seca da parte aérea (MSPA), Produtividade de grãos (PROD) e Massa de 1000 grãos (M1000G) da cultura do milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio .....30
4. Altura de plantas (cm) em plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 63, 90 e 125 DAS .....31
5. Altura de inserção da espiga (cm) em plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 63, 90 e 125 DAS .....33
6. Índice de clorofila em folhas de plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 63 e 90 DAS .....36
7. Concentração de nitrogênio ( $\text{g kg}^{-1}$ ) em folhas de plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 90 DAS .....39
8. Concentração de nitrogênio e proteína bruta ( $\text{g kg}^{-1}$ ) nos grãos de plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 125 DAS .....41
9. Produção de massa seca da parte aérea ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 125 DAS .....43
10. Produtividade de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 125 DAS 45

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1 A cultura do milho .....	13
2.2 Adubação nitrogenada na cultura do milho .....	14
2.3 Bactérias diazotróficas associadas à família Poaceae .....	18
2.4 Bactérias diazotróficas e a promoção do crescimento vegetal .....	20
2.4.1 Fixação biológica de nitrogênio (FBN).....	20
2.4.2 Produção de Fitormônios.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	24
3.1 Localização do experimento .....	24
3.2 Delineamento experimental .....	25
3.3 Inoculação das sementes .....	25
3.4 Instalação e condução do experimento .....	26
3.5 Avaliações .....	27
3.5.1 Avaliações durante a condução do experimento .....	27
3.5.2 Avaliações pós-colheita .....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
4.1 Altura das plantas .....	31
4.2 Altura de inserção das espigas.....	33
4.3 Diâmetro do colmo.....	34
4.4 Índice de clorofila.....	35
4.5 Concentração de nitrogênio foliar .....	38
4.6 Concentração de nitrogênio e proteína bruta nos grãos.....	40
4.7 Produção de massa seca da parte aérea .....	43
4.8 Massa de 1000 grãos .....	44
4.9 Produtividade de grãos.....	45
5 CONCLUSÃO .....	48
REFERÊNCIAS .....	49

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea Mays* L.) é uma espécie da família Poaceae amplamente cultivada mundialmente. Na agricultura brasileira, a produção de milho na safra 2013/2014 correspondeu à 40% do total de grãos produzidos, gerando uma receita superior à 28 bilhões de reais, o que a torna essencial tanto no cenário econômico como no social, pois é empregado na alimentação humana e animal, além de servir como matéria prima para diversos processos industriais (CONAB, 2014b).

O nitrogênio é um dos nutrientes mais demandado pelos vegetais, este alto requerimento se deve ao fato deste compor a maioria das moléculas de compostos orgânicos, tais como, aminoácidos e proteínas, além de fazer parte de diversos processos vitais à planta, como a síntese de proteínas, absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular (MARSCHNER, 1995; MALAVOLTA, 2006). Dessa forma, o suprimento adequado deste nutriente na planta proporciona incrementos em diversos parâmetros relacionados ao crescimento e desenvolvimento, os quais, direta ou indiretamente, afetam a produtividade de grãos da cultura (ARAÚJO et al., 2004; GOMES et al., 2007; DUETE et al., 2008).

A cultura do milho absorve e exporta, sob a forma de grãos e biomassa, grandes quantidades de nitrogênio do solo, sendo por esse motivo que na maioria das áreas produtivas a adubação nitrogenada se faz necessária. Por outro lado, dentre os fertilizantes utilizados, o nitrogênio é o que mais onera o custo de produção da cultura do milho, isto porque seu processo de fixação industrial demanda um alto nível energético, que geralmente é suprido com a queima de combustíveis fósseis (CANTARELLA e DUARTE, 2004).

Tendo em vista a crescente demanda por fertilizantes nitrogenados e a preocupação com as perdas e contaminação do ambiente (FERNANDES e LIBARDI, 2007), principalmente por volatilização, desnitrificação e lixiviação (IVANKO, 1972) torna-se necessária a busca por tecnologias alternativas que possibilitem o fornecimento de nitrogênio às plantas. Em meio à isso, a inoculação com bactérias diazotróficas associativas representa uma promissora alternativa para a substituição parcial do fertilizante nitrogenado fornecido a cultura do milho. Esta associação promove benefícios advindos de processos como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a produção de fitormônios, que atuam como promotores do desenvolvimento vegetal (MOREIRA et al., 2010).

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) desempenhado pelas bactérias diazotróficas é responsável pela quebra da tripla ligação presente entre as duas moléculas de nitrogênio atmosférico, reduzindo-o à amônia por meio de uma enzima chamada nitrogenase (REIS e TEIXEIRA, 2005).

Além da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, as bactérias diazotróficas associativas podem sintetizar substâncias que atuam na promoção do desenvolvimento vegetal, tais como: auxinas, giberilinas e citocininas. Estas substâncias induzem um maior desenvolvimento do sistema radicular que resulta em maiores taxas de absorção de água e nutrientes, promovendo plantas mais vigorosas e produtivas (HUNGRIA et al., 2011).

Diante dos benefícios obtidos com a inoculação de bactérias diazotróficas associativas na cultura do milho, pesquisas estão sendo direcionadas para a identificação de estirpes adaptadas às condições específicas de cada região produtora, de modo a se obter maior eficiência na associação planta x micro-organismo. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da inoculação com bactérias diazotróficas associativas e doses de nitrogênio, no desenvolvimento, nutrição e produção do milho safra, cultivado em Mato Grosso.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura do milho

O milho é uma espécie monocotiledônea, diplóide e alógama da família Poaceae, cujo ciclo fenológico varia de 90 a 205 dias, dependendo do genótipo e das condições climáticas (FAGERIA, 1989). Por ser uma espécie que realiza fotossíntese pela via C4, possui alta eficiência na conversão do CO<sub>2</sub>, gerando altas taxas de fotossíntese líquida (NORMAN et al., 1995).

O milho está entre os cereais mais cultivados mundialmente, devido seu elevado potencial produtivo e importância na alimentação humana e animal. O Brasil destaca-se como terceiro maior produtor, superado apenas pelos Estados Unidos e China. No ano agrícola de 2013/14 a produção mundial se concentrou em uma área de 179,85 milhões de hectares, com uma produção de 984,45 milhões de toneladas. Deste total, 353,72 milhões de toneladas foram produzidos pelos Estados Unidos em uma área de 35,48 milhões de hectares, 218,49 milhões pela China em uma área de 36,32 milhões de hectares e 78,8 milhões pelo Brasil em uma área de 16,8 milhões de hectares (USDA, 2014).

No cenário nacional, o milho é o segundo grão mais importante para a agricultura, sendo que no ano agrícola de 2013/14, sua produção correspondeu a 40% do total produzido no país, sendo superado apenas pela soja, que representou 44,5% da produção nacional de grãos (CONAB, 2014a). Dados obtidos no ano de 2012 revelaram que a produção nacional de milho foi responsável por gerar uma receita de 61,2 bilhões de reais, o que corresponde a 8% da receita total obtida pela agricultura, a qual foi 347,9 bilhões de reais (CONAB, 2014b).

O estado de Mato Grosso ocupa a primeira colocação entre produtores de milho, com uma área plantada de 3,2 milhões de hectares e produção total de 17,72 milhões de toneladas para a safra 2013/14. Contudo, sua produtividade (5.496 kg ha<sup>-1</sup>) ainda é inferior a de outros estados brasileiros, como, Goiás (6.459 kg ha<sup>-1</sup>) e Paraná (5.960 kg ha<sup>-1</sup>), o que demonstra a necessidade de se avaliar novas técnicas de manejo, a fim de obter alimento de qualidade, atender a demanda, incrementar a produtividade e aumentar os lucros para o agricultor (IMEA, 2014).

Quanto às condições climáticas para o bom desenvolvimento da cultura do milho, temperaturas ideais oscilam conforme a fase, sendo, para o início da germinação das sementes e emergência das plantas entre 25 e 30°C. No período de

florescimento e maturação, as médias ideais devem ser estar entre 15,5 e 26°C, sendo que, médias inferiores proporcionam o retardamento das fases de desenvolvimento, da mesma forma que, médias superiores podem, prontamente, acelerá-las (FANCELLI, 2000).

O requerimento mínimo de água pela cultura é de 350 - 550 mm, sendo que quantias inferiores a essas causam estresse hídrico que reduz o vigor vegetativo e reprodutivo, além de alterar o sincronismo de florescimento das inflorescências masculinas e femininas e, ainda, se ocorrer entre os estádios de 4 e 12 folhas pode reduzir sensivelmente o tamanho da espiga e, conseqüentemente, o rendimento de grãos. Dessa forma, deficiências hídricas durante o desenvolvimento da cultura podem afetar o estabelecimento das plantas, sendo possível retardar ou até mesmo paralisar o crescimento vegetal (FANCELLI e DOURADO NETO, 2004).

Quanto à fertilidade dos solos, a recomendação de adubação para regiões de Cerrado baseiam-se em dois aspectos: a análise química e granulométrica do solo e a expectativa de produtividade. Para se alcançar produtividades superiores a 8.000 kg ha<sup>-1</sup> as doses recomendadas de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O oscilam entre 70 a 120 kg ha<sup>-1</sup> e 60 a 90 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente, conforme os níveis obtidos na análise de solo. A recomendação de nitrogênio é dependente de fatores como teor de matéria orgânica e argila no solo, porém de modo geral, oscilam entre 20 e 30 kg ha<sup>-1</sup> com posterior complementação em cobertura, com doses entre 40 e 180 kg ha<sup>-1</sup>. Contudo, estes valores podem ser inferiores ou superiores, pois o nitrogênio possui manejo complexo e sua disponibilidade varia de acordo com diversos fatores ambientais (SOUSA e LOBATO, 2004a).

## **2.2 Adubação nitrogenada na cultura do milho**

O nitrogênio é o nutriente que mais limita a produção da cultura do milho, uma vez que exerce funções essenciais ao metabolismo vegetal. O alto requerimento de nitrogênio pelas plantas é consequência da sua função estrutural, pois compõem moléculas de compostos orgânicos, como aminoácidos e proteínas, sendo ainda, ativador de muitas enzimas (MARSCHENER, 1995). Os vegetais também dependem do nitrogênio para realização de um ou mais processos vitais, como síntese de proteínas, absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular, que proporciona uma vegetação verde e abundante, com maior produção de

folhagem e concentração de proteína nas plantas (MALAVOLTA, 2006; ROBERTO et al., 2010).

Por possuir essas características é o elemento que causa efeitos mais perceptíveis na produção das culturas. O milho é uma das culturas que removem grandes quantidades de nitrogênio, sendo normalmente necessária a adubação nitrogenada de cobertura para complementar a quantidade suprida pelo solo. Os efeitos da adubação vão além do aumento na produtividade de grãos, a adequada suplementação por nitrogênio confere às plantas aumentos no crescimento e desenvolvimento, as quais, direta ou indiretamente, afetam a produtividade da cultura (OKUMURA et al., 2011).

Encontram-se na literatura diversas citações que relatam resultados positivos da adubação nitrogenada, como no aumento do peso de mil grãos (FERREIRA et al., 2001; AMARAL FILHO et al., 2005), do número de espigas por planta (FERNANDES et al., 2005), do peso de espigas (ARAÚJO et al., 2004), do comprimento da espiga (BÜLL, 1993), do diâmetro do colmo, da altura de plantas (MAR et al., 2003), da produção de matéria seca (ARAÚJO et al., 2004; DUETE et al., 2008) e do crescimento radicular (BÜLL, 1993).

A disponibilidade do nitrogênio inorgânico no solo é baixa, a maior fração presente no solo encontra-se em formas orgânicas, na matéria orgânica ou como parte de organismos vivos. Aproximadamente 98% do nitrogênio no solo encontra-se sob formas orgânicas, sendo que 2% apresentam-se sob as formas inorgânicas de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e/ou nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), prontamente disponíveis às plantas (URQUIAGA e ZAPATA, 2000; MALAVOLTA, 2006).

O  $\text{NO}_3^-$  é a forma inorgânica mais comumente encontrada no solo. Essa predominância ocorre pois o nitrogênio amoniacal liberado através da decomposição da matéria orgânica é rapidamente convertido a nitrato por bactérias quimiossintetizantes. Contudo, em algumas situações, como pH ácido, altas concentrações de fenóis ou ausência de oxigênio, a amônia não é oxidada e algumas plantas a absorvem (PEDRINHO, 2009).

As plantas podem absorver tanto  $\text{NH}_4^+$  quanto  $\text{NO}_3^-$ , bem como outras formas (uréia, aminoácidos solúveis), contudo a forma predominantemente absorvida nas condições naturais é a nítrica (MALAVOLTA, 2006). Especificamente na cultura do milho, certos híbridos têm um alto requerimento de  $\text{NH}_4^+$ , e a absorção dessa forma ajuda a incrementar o rendimento de grãos (DECHEN e NACHTIGALL, 2007).



As recomendações atuais para a adubação nitrogenada sugerem aplicar parte da adubação na semeadura e o restante em cobertura, sendo essa parcelada ou não, com base na análise química do solo e na expectativa de produtividade. A aplicação em cobertura ocorre entre os estádios de quatro folhas (V4) e oito folhas completamente expandidas (V8). As recomendações das doses e da necessidade de parcelamento são embasadas na textura do solo (<35% de argila), no teor de matéria orgânica, na disponibilidade hídrica e na dose de nitrogênio (>150 kg ha<sup>-1</sup>) (MELLO et al., 1989; FANCELLI, 2010).

No estágio V4 da cultura do milho é onde ocorre a definição do número de óvulos e ovários que vão conter na espiga (RITCHIE et al., 2003) evento este que necessita de pelo menos 25 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio. Além disso, entre os estádios V4 e V12 (doze folhas expandidas) ocorre a definição do número de fileiras e do tamanho da espiga, que são componentes de rendimento de grãos (VITTI e BARROS JUNIOR, 2001). A taxa de absorção de nitrogênio pela planta aumenta proporcionalmente com o crescimento, atingindo o pico entre o início do florescimento e o início do enchimento de grãos (FORNASIERI-FILHO, 2007).

No Cerrado, os Latossolos, que representam 46% dos solos deste Bioma, apresentam teores de matéria orgânica acima de 26 g kg<sup>-1</sup>. Fornasieri-filho (2007) avaliou que um solo com teor de 27 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica na camada de 0 a 0,2 m, teoricamente seria capaz de fornecer o equivalente a 54 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, considerando uma taxa de mineralização de 2% do nitrogênio orgânico durante o ciclo da cultura, possibilitando uma produção de grãos estimada em 2.700 kg ha<sup>-1</sup>. Áreas produtivas que empregam alto nível tecnológico geralmente almejam produtividades superiores à 8.000 kg ha<sup>-1</sup>, dessa forma doses suplementares de nitrogênio são necessárias (COELHO, 2006).

Resultados experimentais obtidos sob diversas condições de solo, clima e sistemas de cultivo, mostram respostas generalizadas do milho à adubação nitrogenada, cerca de 70% a 90% dos ensaios de adubação com milho, realizados em campo, no Brasil, são responsivos à aplicação de nitrogênio (CRUZ et al., 2005).

Estudando a adubação nitrogenada na cultura do milho, Ferreira (1997), aplicou quatro níveis de nitrogênio (0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup>) e avaliou a qualidade de grãos de milho híbrido, obtendo aumento na produção de grãos, que atingiu ponto de máxima com a dose de 200 kg ha<sup>-1</sup>. Mar et al. (2003) avaliando a produção do milho safrinha em função de doses e épocas de aplicação de nitrogênio observaram efeito

quadrático para as doses de nitrogênio, sem efeito da época de aplicação, onde os máximos valores foram 99,54 cm, 210,52 cm, 28 g kg<sup>-1</sup> e 6549 kg ha<sup>-1</sup> para altura de inserção da espiga, altura das plantas, concentração de nitrogênio foliar e produtividade, respectivamente, sendo que para atingir esses valores a dose de nitrogênio aplicada variou de 116,16 kg ha<sup>-1</sup> à 145 kg ha<sup>-1</sup>.

O manejo da adubação nitrogenada a fim de aumentar a eficiência de utilização pela planta é fator importante na busca de melhores produtividades, tal manejo tem sido a parte mais desafiante e limitante na produção de milho, principalmente nos solos das regiões que, em geral, apresentam baixa capacidade de suprimento de nitrogênio (SILVA et al., 2005).

Outro ponto limitante, são as perdas de nitrogênio do sistema, compreendidas pela volatilização, desnitrificação e lixiviação (IVANKO, 1972). Nos últimos anos, houve um aumento da preocupação com a poluição do meio ambiente, proveniente do manejo inadequado de fertilizantes nitrogenados, especialmente com a contaminação de recursos hídricos por nitrato e da atmosfera por óxido nitroso (AMADO et al., 2002).

O nitrogênio pode ser perdido por volatilização da NH<sub>3</sub>, este processo é atenuado sob condições de elevada concentração de NH<sub>3</sub> no solo, elevado pH e altas temperaturas. Resultados demonstram que as perdas de NH<sub>3</sub> proveniente da uréia, aplicada superficialmente no solo atingem patamares entre 39 e 54% do nitrogênio aplicado (CANTARELLA e TABATABAI, 1985).

A desnitrificação consiste na redução bioquímica de formas oxidadas (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a formas gasosas (N<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O), é realizada por bactérias anaeróbias facultativas que na ausência de oxigênio utilizam o nitrogênio oxidado como aceptores terminais de elétrons. Os gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, dentre outras são conhecidos como responsáveis por esse processo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Segundo Kiehl (1987), lixiviação é o processo pelo qual sais solúveis são translocados através do fluxo descendente da água no perfil do solo. No caso do nitrogênio, a lixiviação diminui sensivelmente a quantidade de amônio e nitrato na camada arável e a disponibilidade às plantas. Em condições excessivas, a lixiviação ainda constitui um potencial risco de contaminação às águas subterrâneas por NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pois sob esta forma a sua carga negativa é repelida pelos colóides do solo, onde predomina as mesmas cargas (STARK et al., 1983; GONÇALVES et al., 2000).

Alternativas viáveis são necessárias para diminuir a utilização de fertilizantes nitrogenados, sem prejudicar a produtividade das culturas. Diante disso, surge também a necessidade de se encontrar meios para reduzir as perdas, pois o processo industrial da síntese do nitrogênio demanda energia, geralmente de fontes não renováveis e o seu uso indiscriminado, constitui um risco de poluição às águas superficiais e subterrâneas e da atmosfera (CANTARELLA, 2007).

Como alternativa à minimização destes riscos, a associação estabelecida por bactérias diazotróficas e espécies gramíneas constitui uma potencial alternativa à nutrição nitrogenada. Possibilitando incrementos no rendimento das culturas sem prejuízos aos recursos naturais (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

### **2.3 Bactérias diazotróficas associadas à família Poaceae**

Espécies da família Poaceae são capazes de associar-se a inúmeros gêneros de bactérias diazotróficas que colonizam diversas partes das plantas, desde a raiz e a região rizosférica, até as folhas e o interior dos tecidos vegetais.

Essa associação pode ser caracterizada pela colonização interna e externa dos tecidos vegetais, no caso das bactérias endofíticas facultativas e somente pela colonização interna, quando por bactérias diazotróficas endofíticas obrigatórias (BALDANI et al., 1997).

Muitas bactérias diazotróficas endofíticas já foram isoladas e identificadas, incluindo espécies dos gêneros *Azospirillum* (endofíticas facultativas), *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (endofíticas obrigatórias). Grande parte desses diazotróficos foram isolados de regiões tropicais do Brasil em associação com diversas gramíneas de importância agrícola, como: arroz, milho e sorgo (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1997).

A capacidade de colonizar tecidos vegetais internos das plantas confere as bactérias endofíticas algumas vantagens sobre aquelas que apenas colonizam as plantas epifiticamente. Os tecidos internos das plantas proporcionam um ambiente mais uniforme e protegido para os micro-organismos, diferente de quando estão expostas a condições ambientais extremas como temperatura, potencial osmótico, radiação ultravioleta e competição microbiana (COCKING, 2003).

Atualmente, no gênero *Azospirillum* existem quatorze espécies identificadas: *A. brasiliense* e *A. lipoferum* (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. zea* (MEHNAZ et al., 2007b), *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008), *A. picis* (LIN et al., 2009), *A. thiophilum* (LAVRINENKO et al., 2010).

Bactérias do gênero *Azospirillum* são caracterizadas por serem Gram-negativas, espiraladas, possuírem diâmetro de 1 µm e o comprimento de 2,1 a 3,8 µm (SILVA et al., 2004). Apresentam-se sob a forma de bastonetes, na maioria das vezes uniflageladas e com movimento vibratório. Desenvolvem-se com temperatura entre 28 a 41°C, dependendo da espécie (ECKERT et al., 2001). São aeróbias quando supridas com fontes nitrogenadas e microaerófilas quando crescem sob a dependência da FBN (DONZELI, 2002).

O gênero *Herbaspirillum* possui como característica colonizar obrigatoriamente tecidos vegetais. A espécie *H. seropedicae* foi a primeira a ser isolada de raízes de milho, sorgo e arroz desinfestadas superficialmente (BALDANI et al., 1986). Posteriormente, bactérias desta espécie foram isoladas de raízes, folhas e colmos de cana-de-açúcar, *Brachiaria decumbens* e *Digitaria decumbens* (OLIVARES et al., 1996), de raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (BODDEY et al., 1998), dendezeiro e pupunheira (FERREIRA et al., 1995), bananeira (CRUZ et al., 2001) e isolada em associação com arroz inundado (RODRIGUES, 2004).

As primeiras espécies de bactérias do gênero *Burkholderia* foram isoladas no interior de tecido vegetais de plantas de arroz, posteriormente evidenciou-se a associação com plantas de milho e café (GILLIS et al., 1991; ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). Trata-se de um gênero endofítico obrigatório, constituído por 37 espécies, destas as mais estudadas em associação com espécies Poaceae são *B. unamae*, *B. tropica*, *B. brasilensis* e *B. silvatlantica*, fazendo associação com plantas de milho, café, cana-de-açúcar e arroz (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001; PERIN et al., 2006)

Plantas de milho podem ser colonizadas por uma grande diversidade de bactérias diazotróficas simultaneamente (CHELIUS e TRIPLETT, 2001; LODWYCKX et al., 2002). Tais bactérias quando associadas às plantas, podem promover o crescimento vegetal, decorrente tanto pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico como pela produção de substâncias que auxiliam o desenvolvimento vegetal (MOREIRA et al., 2010).

## **2.4 Bactérias diazotróficas e a promoção do crescimento vegetal**

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) compõem um amplo grupo de bactérias encontradas na rizosfera em associação com a superfície das raízes, atuando no crescimento das plantas de forma direta ou indireta (AHMAD et al., 2008).

Os mecanismos de ação direta realizada pelas RPCP envolvem a FBN, síntese de sideróforos (BAR-NESS et al., 1992), produção de fitormônios (BASTIÁN et al., 1998; GLICK et al., 1999), solubilização de nutrientes complexados (SUNDARA et al., 2002; SARAVANAN et al., 2007), dentre outros. Os mecanismos de ação indiretos incluem a supressão de organismos deletérios do ambiente endofítico através de competição ou antibiose (NEJAD e JOHNSON, 2000, SOMERS et al., 2005), redução de fatores de estresses como etileno endógeno (ENYEDI et al., 1992), antagonismos a fitopatógenos (TSIMILI-MICHAEL et al., 2000; PIÑÓN et al., 2002), dentre outros.

Neste sentido, bactérias diazotróficas podem promover o crescimento vegetal tanto pela FBN como pela produção de uma ampla gama de substâncias bioestimuladoras importantes para o desenvolvimento vegetal (MOREIRA et al., 2010). Contudo, nesta revisão, serão apresentados os efeitos da FBN e da produção de fitormônios, realizados por bactérias promotoras do crescimento vegetal.

### **2.4.1 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)**

O nitrogênio é essencial à sobrevivência e ao crescimento dos organismos. Embora constitua praticamente 80% da atmosfera terrestre, sob condição gasosa ( $N_2$ ) é altamente estável, o que o torna quimicamente inerte a temperaturas atmosféricas. A estabilidade do gás  $N_2$  se dá devido à presença de uma forte tripla ligação entre as duas moléculas de nitrogênio (REIS e TEIXEIRA, 2005), o que impossibilita que animais e plantas o metabolizem em sua forma gasosa. Para isso, é necessário que a tripla ligação seja rompida e o nitrogênio esteja na forma de íon amônio (MOREIRA et al., 2010).

Na natureza, apenas um restrito grupo de micro-organismos unicelulares e procarióticos são capazes de fixar o nitrogênio presente na atmosfera, reduzindo-o à amônia. Esse processo que é denominado fixação biológica do nitrogênio, é realizado pelo complexo proteico da nitrogenase, enzima que catalisa a reação e está presente nos micro-organismos diazotróficos (EADY e POSTGATE, 1974; REIS e TEIXEIRA, 2005).

Segundo Evans e Burris (1992), as bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser agrupadas conforme a associação realizada com as plantas, sendo: diazotróficos de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso, sem necessariamente estarem associados às plantas; diazotróficos associativos, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose e os diazotróficos simbióticos, que estabelecem uma interação simbiótica, formando estruturas diferenciadas, denominadas nódulos.

As bactérias associadas à espécie *Poaceae* são consideradas associativas, ou seja, não formam estrutura diferenciadas nas raízes, contudo são encontradas em diversas gramíneas, tais como o arroz (BODDEY et al., 1995), cana-de-açúcar (JAMES, 2000), milho, sorgo e trigo (RONCATO-MACCARI et al., 2003). Entre estas culturas, a cana de açúcar é um dos melhores exemplos desta associação, onde aproximadamente 48% da necessidade de nitrogênio da cultura é suprida pela FBN (LIMA et al., 1987; OLIVEIRA et al., 2002).

Na cultura do milho, a associação das bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* tem sido estudada não somente quanto ao rendimento da cultura, mas, também, com relação às causas fisiológicas que, possivelmente, aumentam esse rendimento. Reis Junior et al. (2008) constataram aumento significativo na produção de matéria seca e no acúmulo de nitrogênio nas raízes de dois híbridos de milho quando submetidos à diferentes doses e formas de nitrogênio, e o efeito da inoculação com *Azospirillum amazonense*, em um ensaio em casa de vegetação.

Em experimento de campo, Quadros (2009) concluiu que a inoculação com estirpes de *Azospirillum* spp. juntamente com a adição de 50 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio na semeadura, apresentou desempenho equivalente à aplicação de 130 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, quanto ao rendimento de grãos para dois híbridos de milho. Barros Neto (2008) estudando o efeito da inoculação com *A. brasilense* constatou aumento significativo no rendimento de grãos de milho de 9.021 kg ha<sup>-1</sup> para 9.814 kg ha<sup>-1</sup>, ou seja, aumento médio de 9%. Do mesmo modo, Hungria et al. (2010) verificou que a inoculação das sementes com *A. brasilense* associada à aplicação de 24 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio na semeadura e 30 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio no florescimento proporcionou rendimento médio de 7.000 kg ha<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos com pesquisas envolvendo bactérias diazotróficas foram primordiais para que se chegasse à seleção das estirpes que hoje são recomendadas para inoculação na cultura do milho. Existem hoje no mercado diversos inoculantes

autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), compostos das estirpes Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *Azospirillum brasilense*, recomendadas para as culturas de milho, trigo e arroz (HUNGRIA, 2011).

Embora as pesquisas tenham avançado e culminando na obtenção de um inoculante para gramíneas, a eficiência associativa ainda não se equivale à aquela obtida com as leguminosas. Contudo, estima-se que a contribuição de nitrogênio fixado para as gramíneas está em torno de 25 a 50 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio ano<sup>-1</sup> o que equivale ao suprimento de cerca de 17% da quantia demandada pela culturas. Considerando a importância das culturas de trigo, arroz e milho, na composição das principais fontes de carboidratos na dieta humana, a fixação biológica de nitrogênio, mesmo baixa, representa uma grande economia nos custos de produção (MOREIRA et al., 2010).

#### **2.4.2 Produção de Fitormônios**

Fitormônios são substâncias orgânicas que em baixas concentrações promovem, inibem ou modificam o crescimento e desenvolvimento de plantas. São identificados seis principais grupos de fitormônios: giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, brassinosteróides e auxinas (MARTÍNEZ-MORALES et al., 2003).

Diversos grupos de microrganismos do solo têm demonstrado capacidade de biossíntese de fitormônios (REIS et al., 2000; BASHAN et al., 2004; SALA et al., 2005). A produção de hormônios vegetais associada a microrganismos diazotróficos tem sido demonstrado, dentre outros, pelos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

O principal hormônio produzido por estirpes de *Azospirillum* é uma auxina, o AIA (CROZIER et al., 1988) este hormônio é uma molécula sinal importante na regulação do desenvolvimento das plantas. Possui, como principal função a regulação do crescimento (NORMANLY, 1997). Estimulam o aumento da densidade e comprimentos dos pelos absorventes das raízes; aumento da velocidade de aparecimento de raízes laterais e aumento na absorção de nutrientes (OKON e LABANDERA-GONZALES, 1994; BASHAN e HOLGUIN, 1997).

Didonet e Magalhães (1993) analisando a associação de plantas de trigo com *Azospirillum* atribuíram a indução do alongamento e ramificação do sistema radicular à capacidade das bactérias em produzirem AIA. Do mesmo modo, Quadros (2009) descreveu efeitos semelhantes ao estudar a associação das bactérias com plantas de

milho, encontrando aumentos no número e diâmetro médio das raízes laterais e adventícias.

Quanto aos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, Bastián et al. (1998) e Baldani et al. (2000) detectaram a presença de AIA e giberelinas em culturas de *Herbaspirillum seropedicae* e Videira et al. (2012) constataram a produção de fitormônios por estirpes de *Burkholderia*, isoladas de dois genótipos de *Pennisetum purpureum* cultivados em campo.

A estimulação do crescimento vegetal promovida pela liberação de fitormônios produzidos por bactérias associadas a plantas, possibilita incrementos para as culturas, através do melhor desenvolvimento radicular, o qual possibilita maior absorção de água e nutrientes.



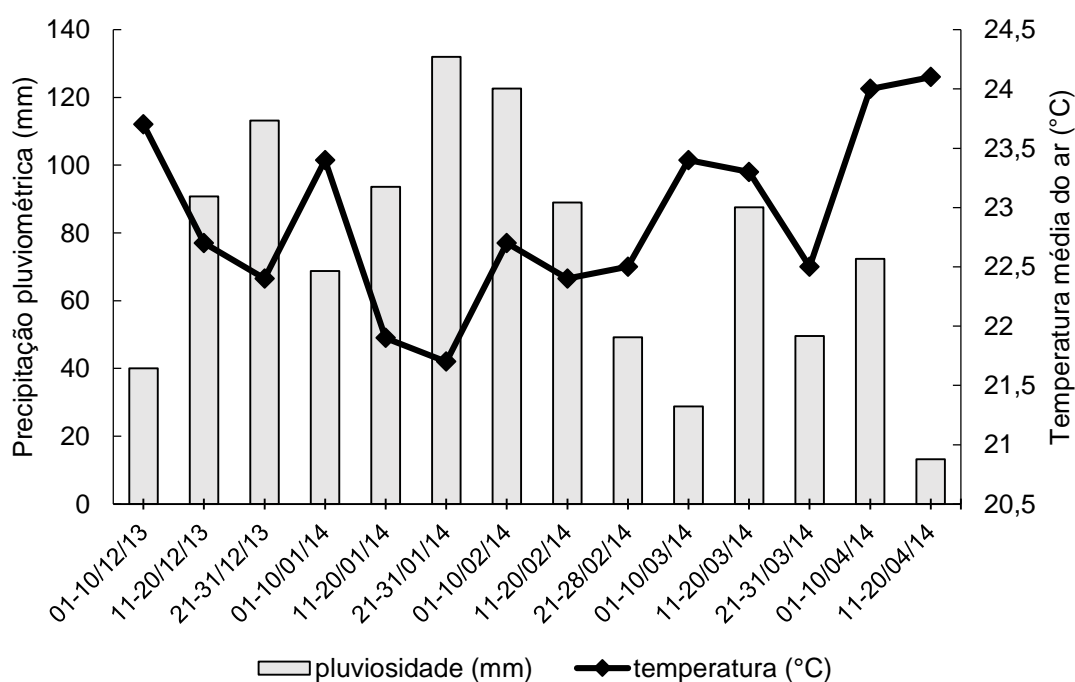
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Localização do experimento

O experimento foi conduzido no campo experimental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Mato Grosso, campus São Vicente, núcleo avançado de Campo Verde, situado na latitude 15°33'37,4" Sul, longitude 55°10'47,7" Oeste e altitude de 736 metros. O solo da área experimental é caracterizado como Latossolo Vermelho amarelo distrófico.

O clima foi classificado como tropical quente e sub-úmido, com quatro meses de seca (maio à agosto). A precipitação média anual é de 1.750 mm, concentrada nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro. A temperatura média anual situa-se nos 22°C.

No período entre dezembro de 2013 e abril de 2014 (período de condução do experimento), o balanço hídrico e as temperaturas médias apresentaram-se conforme apresentado na Figura 1.



**FIGURA 1.** Temperatura média e precipitação pluviométrica acumulada na cidade de Campo Verde no período de 01/12/2013 à 20/04/2014. (Fonte: Estação meteorológica automática de Campo Verde/MT – INMET)

### 3.2 Delineamento experimental

Utilizou-se delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial 4x3, correspondendo a inoculação com duas estirpes de bactérias diazotróficas MTAz8 e MTh2, um inoculante comercial composto pelas estirpes AbV-5 e AbV-6 (*A. brasilense*), e a ausência da inoculação combinados com doses de nitrogênio (0, 55 e 110 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio), totalizando 12 tratamentos. Cada tratamento foi composto por 4 repetições e cada parcela experimental constou de 4 linhas com 4 metros de comprimento, espaçadas entre si por 0,9 metros, totalizando 14,4 m<sup>2</sup>. Como área útil foram utilizadas as duas linhas centrais descartando 0,5 m de cada extremidade.

Os tratamentos foram definidos conforme recomendação descrita no protocolo oficial para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de estirpes, produtos e tecnologias relacionadas às bactérias associativas (BALDANI, 2007), que dispõem os seguintes tratamentos como necessários para realização do experimento:

- Tratamento 1. Ausência de fertilizante nitrogenado e de inoculação;
- Tratamento 2. Controle com suprimento de nitrogênio mineral na dose recomendada para a cultura;
- Tratamento 3. Metade da dose de nitrogênio recomendada para a cultura;
- Tratamento 4. Inoculação padrão contendo ao menos duas estirpes recomendadas para a cultura, quando existente.

Recomendou-se também empregar nos tratamentos 2 e 3 como fonte de nitrogênio a uréia, parcelando a dose total em duas aplicações.

### 3.3 Inoculação das sementes

As duas estirpes de bactérias associativas utilizadas no experimento foram isoladas e selecionadas por terem apresentado potencial produtivo em outros trabalhos (GUIMARÃES et al., 2013). Sendo denominadas como MTAz8 (semelhante à *Azospirillum* spp.) e MTh2 (semelhante à *Herbaspirillum* spp.).

Para preparo dos inoculantes, colônias puras dos isolados foram adicionadas em meio de cultura Dygs sob agitação constante por 24 horas, objetivando a multiplicação das bactérias e a obtenção do produto final (caldo bacteriano).

Posteriormente, foram adicionadas à turfa seca e estéril, 15 mL do caldo bacteriano para cada 35g de turfa (GUIMARÃES et al., 2007). O material foi homogeneizado e em seguida incubado à 30°C por 24 horas (etapa de maturação).

Anteriormente à inoculação, as sementes foram cobertas com uma solução adesiva açucarada (10% m/v) e posteriormente recobertas com o inoculante na proporção de 250 g de inoculante turfoso para cada 50 kg de sementes de milho.

A utilização do inoculante comercial seguiu as recomendações do fabricante, que indica a aplicação líquida nas sementes numa proporção de 100 mL para cada 25 kg de sementes.

### 3.4 Instalação e condução do experimento

A correção da acidez do solo não foi necessária, pois o solo da área experimental encontrava-se em condições adequadas para cultivo, dessa forma apenas procedeu-se a limpeza da área e a semeadura.

Seguindo-se recomendação de Souza e Lobato (2006) foi realizada a adubação no momento da semeadura com 80 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 60 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, utilizando como fonte o superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente.

O nitrogênio foi aplicado conforme os tratamentos descritos anteriormente, em duas aplicações de cobertura, utilizando como fonte a ureia (45% nitrogênio).

**TABELA 1.** Propriedades químicas e físicas do solo na área experimental localizada no IFMT, núcleo Campo Verde, antes da implantação do experimento

Propriedades	Amostra (0-0,2	Propriedades	Amostra (0-0,2
pH (CaCl <sub>2</sub> )	6,7	S (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	4,3
P (mg dm <sup>-3</sup> )	8	CTC (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	5,1
K (mg dm <sup>-3</sup> )	39	V (%)	85,3
Ca (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,45	m (%)	0,0
Mg (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,8	Areia (g kg <sup>-1</sup> )	730,0
Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0	Silte (g kg <sup>-1</sup> )	54,0
H + Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,75	Argila (g kg <sup>-1</sup> )	216,0
M.O. (g dm <sup>-3</sup> )	29,3		

Foram distribuídas manualmente a 5 cm de profundidade, 10 sementes por metro do híbrido triplo 2B688PW da Dow AgroSciences. O desbaste foi realizado 10 dias após a semeadura, mantendo-se 5 plantas por metro, totalizando uma densidade de 55.555 plantas por hectare.

A adubação nitrogenada foi parcelada em duas aplicações de cobertura, aos 14 e 34 dias após a semeadura (DAS), correspondendo aos estádios de 3-4 e 7-8 folhas totalmente expandidas, respectivamente. Em cada aplicação foram distribuídos 50% da dose correspondente ao tratamento, utilizando como fonte ureia. Ambas

aplicações foram realizadas no início da manhã, sob condições climáticas amenas (temperaturas entre 20 a 24°C), com o intuito de minimizar os efeitos adversos do ambiente sobre as perdas do fertilizante por volatilização.

Durante a aplicação da segunda parcela do fertilizante nitrogenado foram distribuídos 30 kg ha<sup>-1</sup> do formulado FTE-BR12 em todas as parcelas experimentais, buscando-se corrigir deficiência por micronutriente.

O manejo fitossanitário foi realizado com inseticida metomil (0,6 L ha<sup>-1</sup>) para controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e imidacloprido + beta-ciflutrina (0,8 L ha<sup>-1</sup>) para controle da cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*).

O fungicida azoxistrobina + ciproconazol (0,3 L ha<sup>-1</sup>) foi utilizado para controle de cercosporiose (*Cercospora zea-maydis*) e helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*), conforme recomendação do fabricante, em duas aplicações.

O controle de plantas invasoras foi realizado com capinas manuais e aplicação de herbicida glifosato (2 L ha<sup>-1</sup>).

### **3.5 Avaliações**

As avaliações foram realizadas em três fases de desenvolvimento das plantas, com o intuito de distribuí-las durante todo o ciclo da cultura. Os estádios de desenvolvimento da cultura do milho foram distribuídos conforme descrito por Magalhães et al. (2002), sendo as avaliações realizadas nos estádios VT (emissão da inflorescência masculina, 63 DAS), R3 (grãos pastoso, 90 DAS) e no momento da colheita (125 DAS).

As análises foram realizadas durante e após o ciclo de cultivo do milho, sendo separadas entre os parâmetros: a) desenvolvimento: altura das plantas e espigas e diâmetro do colmo; b) nutricionais: índice de clorofila e a concentração de nitrogênio nas folhas e grãos; c) produtivas: massa seca da parte aérea, massa de 1000 grãos e produtividade.

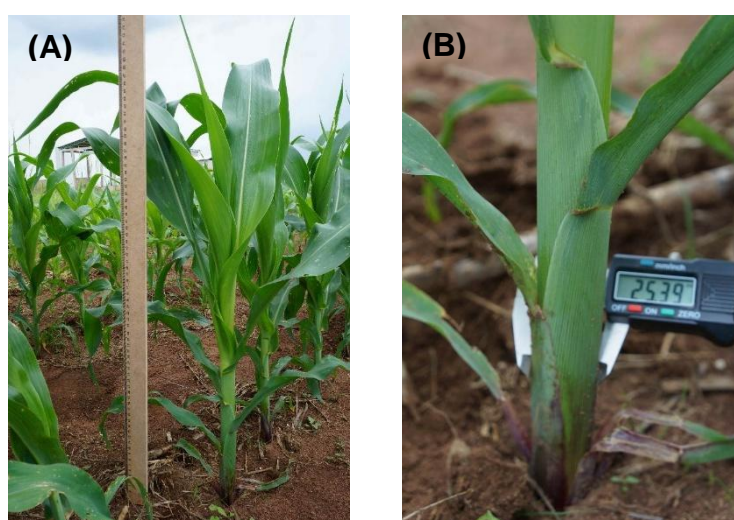
#### **3.5.1 Avaliações durante a condução do experimento**

Buscando uma maior uniformidade nos resultados, na ocasião da primeira avaliação as plantas foram identificadas para as posteriores avaliações, até o momento da colheita. Dessa forma, durante a condução do experimento foram avaliados os seguintes parâmetros: índice de clorofila nas folhas, concentração de nitrogênio foliar, altura das plantas e de inserção da espiga e diâmetro do colmo.

A avaliação do índice de clorofila nas folhas foi realizada aos 63 e 90 DAS, com o auxílio do clorofilômetro portátil marca Falker, modelo ClorofiLOG CFL1030. Não foi realizada avaliação aos 125 DAS (colheita) devido as plantas estarem secas, o que impossibilitou a leitura. As leituras foram realizadas sempre na folha índice, posicionada logo abaixo a inserção da espiga (ARGENTA et al., 2003). Para composição das médias foram realizadas 2 leituras em pontos distintos da folha e em 5 plantas por parcela, totalizando 10 medições por parcela.

Na avaliação do índice de clorofila realizada aos 63 DAS, 3 folhas de cada parcela experimental foram coletadas para determinação da concentração de nitrogênio total. Para isso, as folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 65°C e moídas em moinho tipo “Willey” com peneira de 1 mm de diâmetro. As concentrações de nitrogênio foliar foram determinadas de acordo com a metodologia Kjeldahl descrita por Silva (2009).

A altura das plantas, inserção da espiga e diâmetro de colmo foram determinados com o auxílio de régua graduada e paquímetro digital (Figura 2). Considerou-se para padronização das medições a superfície do solo como referência, assim o diâmetro do colmo foi medido à 5 cm e a altura das plantas até a curvatura média da última folha totalmente expandida.



**FIGURA 2.** Avaliação da altura das plantas (A) e do diâmetro do colmo (B) em plantas de milho submetidas a inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio

### **3.5.2 Avaliações pós-colheita**

Na ocasião da colheita foram coletadas espigas e plantas da área útil para avaliação dos parâmetros, massa seca da parte aérea, peso de mil grãos, produtividade de grãos, concentração de nitrogênio total e proteína bruta dos grãos.

Para determinação da massa seca da parte aérea as plantas foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação de ar forçado a 65°C até atingirem massa constante.

As espigas foram debulhadas manualmente, e os grãos pesados. Os valores foram ajustados para 13% de umidade e extrapolados para kg ha<sup>-1</sup> com o intuito de indicar a produtividade. Posteriormente, os grãos foram contados conforme metodologia descrita nas regras de análises de sementes para obtenção da massa de 1000 grãos (BRASIL, 2009).

Para análise da concentração de nitrogênio nos grãos, uma amostra foi seca em estufa de circulação forçada de ar à 65°C, moída em moinho tipo “Wiley” com peneira de 1 mm de diâmetro e posteriormente determinada de acordo com a metodologia Kjeldahl descrita por Silva (2009). A concentração de proteína bruta contida na amostra foi obtida através da multiplicação da concentração de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,25.

### **3.6 Análise estatística**

A normalidade dos dados foi analisada pelo método de Shapiro-wilk ( $p \leq 0,05$ ) através do software estatístico Assistat 7.7 (SILVA e AZEVEDO, 2006). Quando os dados apresentaram os pressupostos necessários foram analisados pelo software estatístico Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,1$ ).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre os fatores inoculação e doses de nitrogênio para a produção de massa seca da parte aérea. Os demais parâmetros não apresentaram interação, contudo ambos os fatores de forma isolada influenciaram a altura de inserção das espigas e a concentração de nitrogênio e proteína bruta nos grãos. A altura das plantas, índice de clorofila, concentração de nitrogênio foliar e a produtividade de grãos apresentaram resposta apenas para aplicação das doses de nitrogênio. Já o diâmetro do colmo e a massa de mil grãos não refletiram efeito sobre nenhum dos fatores estudados (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2.** Análise de variância para altura (ALT), altura de inserção da espiga (INSER), diâmetro do colmo (DC), índice de clorofila (IC) e concentração de nitrogênio foliar (N FOLIAR), nos estádios VT (emissão da inflorescência masculina) e R3 (grãos pastosos) da cultura do milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio

F.V.	G. L.	Quadrados Médios								
		ALT		INSER		DC		IC		N FOLIAR
		VT	R3	VT	R3	VT	R3	VT	R3	VT
Inoc. (I)	3	154,51	83,04	145,03**	82,00**	2,82	3,94	2,73	12,91	7,35
N	2	1250,64**	498,71**	91,21*	93,03**	6,84	6,65	79,34**	112,66**	28,81**
I x N	6	52,40	25,09	28,68	11,65	1,31	4,55	9,90	5,49	4,81
Bloco	3	492,09**	465,05**	200,59	146,33	4,91	10,12**	3,29	15,71	11,42
Resíduo	33	81,58	48,43	25,68	23,55	3,25	3,58	7,03	10,70	5,37
C.V. (%)		5,11	3,84	6,11	5,33	7,71	9,27	4,97	6,04	8,22

\*, \*\* Significativos a 0,1 e a 0,05 de probabilidade pelo teste de F, respectivamente. Inoc. – Inoculação, N – Doses de nitrogênio.

**Tabela 3.** Análise de variância para concentração de nitrogênio nos grãos (N GRÃOS), Massa seca da parte aérea (MSPA), Produtividade de grãos (PROD) e Massa de 1000 grãos (M1000G) da cultura do milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio

F.V.	G.L.	Quadrados Médios			
		N GRÃOS	MSPA	PROD	M1000G
Inoc (I)	3	4,75**	212997,94	11625,08	194,34
N	2	11,26**	2089778,41**	3927744,18**	524,74
I x N	6	0,85	1305663,02*	1322898,34	302,88
Bloco	3	0,51	1459609,57	1179829,79	213,06
Resíduo	33	1,75	677641,99	1107696,46	403,54
C.V. (%)		9,24	16,66	14,34	7,40

\*, \*\* Significativos a 0,1 e a 0,05 de probabilidade pelo teste de F, respectivamente. Inoc. – Inoculação, N – Doses de nitrogênio.

#### 4.1 Altura das plantas

A altura das plantas foi influenciada pelas doses de nitrogênio aplicadas, proporcionando atingindo o máximo valor com o fornecimento de 110 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, com incrementos de 9,8; 5,8 e 6,2% quando comparado a ausência de adubação nitrogenada, aos 63, 90 e 125 DAS. Contudo, não houve diferença estatística de quando aplicou-se 55 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, nas três avaliações (Tabela 4).

**TABELA 4.** Altura de plantas (cm) em plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 63, 90 e 125 DAS

63 DAS – Estádio VT (CV% - 5,11)				
Inoculação	Doses de Nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> )			Média
	0	55	110	
Ausência	170,85 <sup>ns</sup>	180,25	190,80	180,63 <sup>ns</sup>
MTAz8	164,80	178,25	182,90	175,32
MTh2	163,00	180,40	173,75	172,38
Inoc. Comercial	167,60	182,80	184,55	178,32
Média	166,56 B	180,43 A	183,00 A	---
90 DAS – Estádio R3 (CV% - 3,84)				
Ausência	178,65 <sup>ns</sup>	185,05	190,70	184,80 <sup>ns</sup>
MTAz8	172,60	184,70	185,60	180,80
MTh2	172,45	183,85	179,00	178,43
Inoc. Comercial	175,70	182,15	184,75	180,87
Média	174,85 B	183,94 A	185,01 A	---
125 DAS – Colheita (CV% - 3,83)				
Ausência	180,20 <sup>ns</sup>	185,90	192,10	186,07 <sup>ns</sup>
MTAz8	173,10	183,25	187,90	181,42
MTh2	173,00	186,15	180,70	179,95
Inoc. Comercial	176,65	184,65	185,70	182,33
Média	175,74 B	184,99 A	186,60 A	---

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,1$ ). <sup>ns</sup> – Não significativo.

Esses resultados coincidem com outros trabalhos, onde a inoculação não proporcionou resultados positivos para o desenvolvimento de plantas de milho (CAMPOS et al., 2000; CAVALLET et al., 2000; FRANCISCO et al., 2012; MORAIS, 2012; DARTORA et al., 2013). Do mesmo modo, Lana et al. (2012) não observaram respostas da cultura do milho à inoculação com *Azospirillum* associada à adubação nitrogenada, efeito da inoculação sobre a altura das plantas. Ao contrário, Braccini et al., (2012) obtiveram aumento na altura das plantas com a inoculação de *Azospirillum*



*brasilense*, assim como Barassi et al. (2008) observaram plantas maiores e mais vigorosas ao inocularem as sementes com *A. brasilense*.

A inconsistência de trabalhos que avaliam a inoculação com bactérias diazotróficas é bastante conhecida e variações no ambiente, solo, plantas e nos componentes da microflora são consideradas como as principais responsáveis por esta variação (DOBBELAERE et al., 2001). A maioria dos relatos de sucesso da associação planta-bactéria está relacionado a fatores da própria bactéria, como a escolha da estirpe, número de células viáveis por sementes e sua viabilidade (OKON e LABANDERA-GONZÁLES, 1994).

Por outro lado, os resultados quanto à adubação nitrogenada são em sua maioria uniformes e positivos, como descrito por Lyra et al. (2014) que observaram a maior altura com a aplicação de 100 kg ha<sup>-1</sup>. Souza e Soratto (2006) ao avaliarem doses de nitrogênio (0, 30, 60, 90 e 120 kg ha<sup>-1</sup>) sob a forma de ureia na cultura do milho cultivado na safrinha também observaram respostas positivas para altura das plantas, com ajuste quadrático para as doses de nitrogênio fornecidas, atingindo a máxima altura (1,68 m) com a dose de 66,8 kg ha<sup>-1</sup>.

A resposta ao fornecimento de nitrogênio ocorre devido ao aumento na produção de fitormônios promotores do crescimento e de desenvolvimento, responsáveis por processos de divisão e expansão celular, aumentando o alongamento do caule e, conseqüentemente, a altura das plantas (MARSCHNER, 1995).

## 4.2 Altura de inserção das espigas

A altura de inserção das espigas foi influenciada, de forma isolada, tanto pela inoculação como pela adubação nitrogenada. A dose de 55 kg ha<sup>-1</sup> ocasionou a maior altura de inserção da espiga, contudo não diferiu do fornecimento de 110 kg ha<sup>-1</sup>, evidenciando incrementos de 5,9; 5,3 e 5,4 aos 63, 90 e 125 DAS (Tabela 5).

**TABELA 5.** Altura de inserção da espiga (cm) em plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 63, 90 e 125 DAS

63 DAS – Estádio VT (CV% - 6,11)				
Inoculação	Doses de Nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> )			Média
	0	55	110	
Ausência	82,15 <sup>ns</sup>	88,30	91,25	87,23 a
MTAz8	80,85	84,45	84,15	83,15 ab
MTh2	77,93	82,85	75,40	78,73 b
Inoc. Comercial	80,70	84,90	82,80	82,80 ab
Média	80,41 B	85,13 A	83,40 AB	---
90 DAS – Estádio R3 (CV% - 5,33)				
Ausência	92,25 <sup>ns</sup>	93,70	96,65	94,20 a
MTAz8	86,90	92,10	91,00	90,00 ab
MTh2	85,90	91,00	86,90	87,93 b
Inoc. Comercial	86,70	93,65	90,65	90,33 ab
Média	87,94 B	92,61 A	91,30 AB	---
125 DAS – Colheita (CV% - 5,66)				
Ausência	92,65 <sup>ns</sup>	96,85	100,15	96,55 <sup>ns</sup>
MTAz8	88,65	94,60	93,15	92,13
MTh2	90,95	94,70	90,55	92,07
Inoc. Comercial	90,50	96,15	94,00	93,55
Média	90,69 B	95,58 A	94,46 AB	---

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,1$ ). <sup>ns</sup> – Não significativo.

Na ausência de inoculação as plantas apresentaram-se com maior altura de inserção de espiga, embora não tenham diferido de quando inoculou-se com o isolado MTAz8 e o Inoculante Comercial. Considerando que a atividade e a sobrevivência da comunidade microbiana do solo sofre influência de diversos fatores ambientais, como temperatura, umidade e competição com outros micro-organismos, o maior desenvolvimento das plantas que não receberam inoculação pode estar relacionado a maior eficiência e adaptabilidade dos micro-organismos com ocorrência natural solo em que o estudo foi realizado (BRANDÃO, 1992).

A capacidade das bactérias diazotróficas utilizadas neste estudo em excretar fitormônios não foi avaliada, contudo assim como descrito por Kappes et al. (2013), o aumento da altura pode ser consequência da produção e liberação de substâncias promotoras de crescimento, principalmente o ácido indol acético (AIA), que é descrito como o principal fitormônio excretado por bactérias diazotróficas, o qual é responsável pelo crescimento de plantas em geral (BASHAN e HOLGUIN, 1997).

Radwan et al. (2004) avaliando a produção de compostos indólicos por estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* encontraram que ambas tiveram o pico de produção com 24 horas após a inoculação, com destaque para as estirpes do gênero *Azospirillum* que produziram de três a sete vezes mais compostos que as de *Herbaspirillum*. Os autores ainda ressaltam que a inoculação refletiu na formação de raízes com maior número de pelos radiculares e maior massa específica, o que por sua vez, influi diretamente no aumento da absorção de água e nutrientes pela planta.

O aumento na altura de inserção das espigas pode ser considerada um bom indicador para a produtividade. Santos et al. (2002) encontraram alta correlação entre estes parâmetros, inferindo que, com o aumento da altura de inserção da espiga, maior será a produtividade.

Todavia esses resultados devem ser avaliados criteriosamente, pois outros estudos atribuem as maiores alturas de inserção das espigas com uma maior predisposição da planta o acamamento ou quebramento, que podem ocorrer se o híbrido utilizado for suscetível. Durante o período de realização do estudo, não foram verificadas plantas acamadas, provavelmente pelo fato de o híbrido utilizado não ser suscetível a essa característica (MURAKAMI, 1997).

### **4.3 Diâmetro do colmo**

O diâmetro do colmo não foi influenciado pela inoculação e aplicação de nitrogênio em cobertura, corroborando com Basi (2013) ao avaliar doses de nitrogênio em cobertura (0, 75, 150, 225, 300 kg ha<sup>-1</sup>) associadas a inoculação com *Azospirillum brasilense*. O contrário foi obtido por Morais (2012), onde sob condições controladas, a dose de 100 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio proporcionou o maior diâmetro do colmo (14,76 mm) das plantas de milho. Já Dartora et al. (2013) encontraram que a inoculação com a combinação das estirpes Ab-V5 (*A. brasilense*) e SmR1 (*H. seropedicae*) proporcionaram maior diâmetro do colmo em relação à testemunha, não inoculada.

A ausência de resultados oriundos da inoculação são relatados por diversos autores, dentre eles Guimarães et al. (2013); Kappes et al. (2013) e Repke et al. (2013) trabalhando com o gênero *Azospirillum* e Dotto et al. (2010) com *Herbaspirillum*.

Em relação a adubação nitrogenada a ausência de respostas foram descritas por Gazola et al. (2014) avaliando a adubação em cobertura com cinco níveis de nitrogênio (0, 60, 120 e 180 kg ha<sup>-1</sup>). Assim como Meira et al. (2009) também não observaram diferença significativa avaliando o híbrido AGN 20A20 submetido a três fontes de nitrogênio e cinco doses em semeadura e cobertura. Os autores ressaltam que esta é uma característica altamente influenciada pelo genótipo e pouco dependente do meio, quando não se varia a densidade de plantas.

O aumento do diâmetro de colmo tem sido relacionado com o percentual de acamamento e quebraimento das plantas de milho. Além disso, é uma variável importante para incrementos na produtividade, uma vez que quanto maior o seu diâmetro, maior será a capacidade da planta em armazenar fotoassimilados que contribuíram com o enchimento dos grãos (KAPPES et al., 2011).

Resultados descritos por Castro et al. (2008) e confirmados por Repke et al. (2013) demonstram a importância do acúmulo e remobilização dos carboidratos contidos no colmo, sendo estes responsáveis pela manutenção da demanda nutricional requerida no estágio de florescimento das plantas, desenvolvimento das espigas e enchimento dos grãos.

#### **4.4 Índice de clorofila**

As doses de nitrogênio influenciaram o aumento do índice de clorofila nos dois estádios avaliados. Aos 63 DAS a dose de 110 kg ha<sup>-1</sup> proporcionou o maior índice, incrementando em 8,7% o índice de clorofila, quando comparado à ausência de fertilizante nitrogenado. Aos 90 DAS, os maiores índices foram obtidos com a aplicação de 55 kg ha<sup>-1</sup> e 110 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, onde houve incremento de 6,1 e 10,5%, respectivamente. Ao contrário da inoculação, que não influenciou o índice de clorofila, em ambas as avaliações (Tabela 6).

**TABELA 6.** Índice de clorofila em folhas de plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 63 e 90 DAS

63 DAS – Estádio VT (CV% - 4,97)				
Inoculação	Doses de Nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> )			Média
	0	55	110	
Ausência	51,90 <sup>ns</sup>	52,88	56,73	53,83 <sup>ns</sup>
MTAz8	52,95	52,63	55,03	53,53
MTh2	48,85	54,60	56,40	53,28
Inoc. Comercial	50,55	53,68	53,90	52,71
Média	51,07 C	53,44 B	55,51 A	---
90 DAS – Estádio R3 (CV% - 6,04)				
Ausência	53,28 <sup>ns</sup>	54,50	57,98	55,25 <sup>ns</sup>
MTAz8	52,68	54,15	56,48	54,43
MTh2	50,63	55,88	56,05	54,18
Inoc. Comercial	48,95	53,15	56,18	52,76
Média	51,28 B	54,42 A	56,67 A	---

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,1$ ). <sup>ns</sup> – Não significativo.

Pinto Junior et al. (2012) avaliando a inoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* em milho também não encontraram respostas significativas. Ao contrário de Jordão, et al. (2010) que conduzindo experimento com as mesmas estirpes obtiveram respostas positivas, com incremento no índice de clorofila.

O índice de clorofila tem sido utilizado como parâmetro para prever a nível nutricional de nitrogênio nas plantas, pelo fato de a quantidade desse pigmento correlacionar-se positivamente com o teor de nitrogênio na planta (PIEKIELEK et al., 1995). Argenta et al. (2003) conduzindo experimento que tinha por objetivo avaliar o teor de clorofila na folha, medido por meio do clorofilômetro, como método indicador do nível nutricional de nitrogênio na planta de milho, em quatro estádios de desenvolvimento, concluíram que para diagnosticar o nível de nitrogênio, as leituras no clorofilômetro acima de 45,4; 52,1; 55,3 e 58,0, respectivamente, para os estádios de três a quatro folhas, seis a sete folhas, 10 a 11 folhas e de espigamento, indicaram nível adequado de nitrogênio, independentemente do híbrido usado.

Baseando-se nos níveis indicados por Argenta et al. (2003) os valores observados no presente estudo situaram-se próximos aos adequados, porém abaixo. No estádio de espigamento, que correspondeu à avaliação realizada aos 63 DAS o índice obtido com a maior dose de nitrogênio aplicada foi de 55,51 e aos 90 DAS de 56,67. Dessa forma, as doses de nitrogênio fornecidas aparentemente foram

insuficientes para a adequada nutrição das plantas, embora não tenha sido notados sintomas visuais de deficiência, exceto àquelas que não receberam adubação nitrogenada (Figura 3).



**FIGURA 3.** (A) Sintomas visuais de deficiência por nitrogênio em plantas de milho que não receberam adubação nitrogenada e (B) plantas que receberam adubação nitrogenada completa, com  $110 \text{ kg ha}^{-1}$  aos 33 DAS.

O aumento do índice de clorofila em função da adubação nitrogenada também foi relatado por Waskom et al. (1996) na cultura do milho. A relação positiva entre o fornecimento de nitrogênio e o índice de clorofila é atribuída ao fato de mais de 50% do nitrogênio total das folhas serem integrantes de compostos do cloroplasto e da clorofila das folhas (CHAPMAN e BARRETO, 1997). Folhas bem nutridas com nitrogênio apresentam maior concentração de clorofila e conseqüentemente terão maior capacidade de assimilar  $\text{CO}_2$  e sintetizar carboidratos durante a fotossíntese (FERREIRA et al., 1997), resultando em maior acúmulo de biomassa e rendimento de grãos.

Amaral Filho et al. (2005) avaliando doses de nitrogênio (0, 50, 100 e  $150 \text{ kg ha}^{-1}$ ) na cultura do milho obtiveram ajuste linear para as doses aplicadas, atingindo

máximo índice de clorofila na maior dose do intervalo estudado. Costa et al. (2012) também encontraram os mesmos resultados, contudo avaliando um intervalo maior de doses de nitrogênio (0, 50, 100, 150 e 200 kg ha<sup>-1</sup>). Hurtado et al. (2011) estudando o manejo da adubação nitrogenada na cultura do milho com base no índice de suficiência de nitrogênio, monitorado pelo índice de clorofila, relataram a necessidade da aplicação de até 180 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio.

A ausência de respostas significativas em função da inoculação pode ter sido decorrente das condições ótimas de pluviosidade e temperatura encontradas no período de desenvolvimento da cultura. Os dados climáticos apresentados na figura 1 indicam que durante esse período, a temperatura do ar foi adequada para o desenvolvimento da cultura, haja vista que a produção é favorecida em temperaturas moderadas, entre 18 e 25 °C. Do mesmo modo, a precipitação pluviométrica foi adequada, havendo disponibilidade hídrica para o crescimento e desenvolvimento das plantas, mineralização da matéria orgânica e maior disponibilidade de nitrogênio (KAPPES et al., 2013). Portanto, as condições climáticas favoráveis podem ter beneficiado o desenvolvimento das plantas na ausência ou no fornecimento parcial de nitrogênio, neutralizando os efeitos provenientes da inoculação.

Mesmo não observado no presente estudo, pesquisas mencionam aumentos no índice de clorofila em decorrência da inoculação com bactérias diazotróficas. Jordão et al. (2010) e Kappes et al. (2013) avaliando plantas de milho, constataram efeito positivo da inoculação das sementes com *Azospirillum brasiliense*, em que o índice de clorofila foliar foi superior nos tratamentos com a presença da bactéria ao compará-la aos tratamentos onde não houve inoculação. Guimarães et al. (2011) obtiveram aumentos no índice de clorofila com a inoculação de bactérias diazotróficas em uma gramínea forrageira que corresponderam a 82% do índice obtido com o fornecimento de 200 mg dm<sup>-3</sup> de nitrogênio.

#### **4.5 Concentração de nitrogênio foliar**

A maior concentração de nitrogênio foliar foi obtida com a dose de 110 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, proporcionando aumento de 9,1% em relação à ausência de fertilizante nitrogenado, apesar de não diferir estatisticamente de quando aplicou-se 55 kg ha<sup>-1</sup>. A inoculação não proporcionou efeito sobre a concentração de nitrogênio foliar (Tabela 7).

**TABELA 7.** Concentração de nitrogênio ( $\text{g kg}^{-1}$ ) em folhas de plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 90 DAS

90 DAS – Estádio VT (CV% - 8,22)				
Inoculação	Doses de Nitrogênio ( $\text{kg ha}^{-1}$ )			Média
	0	55	110	
Ausência	27,39 <sup>ns</sup>	29,09	29,35	28,61 <sup>ns</sup>
MTAz8	26,56	26,74	28,06	27,12
MTh2	26,27	27,13	31,15	28,18
Inoc. Comercial	27,20	29,93	29,60	28,91
Média	26,85 B	28,22 AB	29,54 A	---

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,1$ ). <sup>ns</sup> – Não significativo.

Costa et al. (2012) obtiveram resultados que estão de acordos com os obtidos, observando incrementos lineares na concentração de nitrogênio foliar ao avaliar doses de nitrogênio que variaram de 0 à 200  $\text{kg ha}^{-1}$  em cobertura na cultura do milho, onde a máxima concentração (29,3  $\text{g kg}^{-1}$ ) foi obtida com a aplicação da maior dose dentro do intervalo estudado. Amaral Filho et al. (2005) relataram respostas semelhantes ao estudar plantas de milho submetidas à espaçamento entre linhas (0,6 e 0,8 m), densidade de plantas (40, 60 e 80 mil plantas  $\text{ha}^{-1}$ ) e doses de nitrogênio (0, 50, 100 e 150  $\text{kg ha}^{-1}$ ) onde, independente dos demais fatores, a adubação nitrogenada proporcionou aumento linear na concentração de nitrogênio foliar, atingindo concentração máxima de 37,46  $\text{g kg}^{-1}$ .

No que se refere ao desenvolvimento e nutrição da cultura do milho é de amplo consenso que a adubação nitrogenada contribui com resultados positivos. Mar et al. (2003) comprovaram isto ao avaliar o efeito de doses e épocas de aplicação de nitrogênio na produtividade do milho safrinha, onde a concentração de nitrogênio na parte aérea aumentou de forma quadrática independente da época de aplicação, atingindo ponto de máxima (28  $\text{g kg}^{-1}$ ) com a dose de 145  $\text{kg ha}^{-1}$  de nitrogênio.

Segundo Raij et al. (1996) a concentração de nitrogênio foliar que representa a adequada nutrição da cultura do milho encontra-se entre 27 a 35  $\text{g kg}^{-1}$ . Dessa forma, os dados observados no presente estudo indicam que apenas os tratamentos que não receberam a adubação nitrogenada apresentaram concentrações inferiores a estas.

Morais (2012) e Basi (2013) constataram, assim como no presente trabalho, que a inoculação não resultou em uma maior concentração de nitrogênio foliar. Mendonça et al. (2006) avaliando a contribuição da fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas (*Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum amazonense* e



*Burkholderia kururiensis*) em plantas de milho através da técnica de diluição isotópica  $^{15}\text{N}$ , observaram que os valores de enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  nas plantas de milho inoculadas foram similares aos encontrados nas plantas testemunhas não fixadoras (*Panicum* spp.), inferindo que as plantas de milho não receberam contribuição significativa da FBN, mesmo quando as bactérias diazotróficas estavam presentes no interior das plantas de milho.

Ao contrário, já foram descritos em diversos estudos o aumento na concentração de nitrogênio em plantas que foram inoculadas com bactérias diazotróficas (REIS JUNIOR et al., 2008; BALDOTTO et al., 2012; LANA et al., 2012; QUADROS et al., 2014). Os autores salientam que a maior absorção e concentração de nitrogênio pelas plantas inoculadas não é decorrente apenas do processo de FBN, mas também pela liberação de substâncias responsáveis por mecanismos de promoção do crescimento vegetal, que favorecem o desenvolvimento radicular e a capacidade das plantas em absorver o nutriente.

A instabilidade dos resultados obtidos em pesquisas que buscam a compreensão dos benefícios oriundos da inoculação com bactérias diazotróficas em gramíneas normalmente estão atribuídos ao uso de linhagens inadequadas e interações entre plantas e micro-organismos, que pode por sua vez, podem favorecer ou prejudicar à associação (REIS et al., 2000).

Além da ausência dos efeitos da inoculação, houve um pequeno incremento com o fornecimento das doses de nitrogênio. Esta baixa responsividade pode ter sido reflexo das condições climáticas predominantes durante a condução do experimento, como foi discutido anteriormente.

#### **4.6 Concentração de nitrogênio e proteína bruta nos grãos**

O fornecimento de fertilizante nitrogenado com a dose de  $110 \text{ kg ha}^{-1}$  de nitrogênio resultou na maior concentração de nitrogênio nos grãos e proteína bruta, evidenciando aumento de 11,13% em relação a ausência de adubação nitrogenada. A ausência de inoculação proporcionou as maiores concentrações, embora não tenha diferido da inoculação com o isolado MTh2 e o inoculante comercial (Tabela 8).

**TABELA 8.** Concentração de nitrogênio e proteína bruta ( $\text{g kg}^{-1}$ ) nos grãos de plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 125 DAS

Inoculação	Concentração de nitrogênio (CV% - 9,24)			Média
	Doses de Nitrogênio ( $\text{kg ha}^{-1}$ )			
	0	55	110	
Ausência	14,64 <sup>ns</sup>	14,66	16,38	15,23 a
MTAz8	13,67	13,67	14,24	13,86 b
MTh2	13,89	13,45	15,33	14,22 ab
Inoc. Comercial	12,81	13,85	15,16	13,94 ab
Média	13,75 B	13,91 B	15,28 A	---
Inoculação	Proteína bruta (CV% - 9,24)			Média
	Doses de Nitrogênio ( $\text{kg ha}^{-1}$ )			
	0	55	110	
Ausência	91,15 <sup>ns</sup>	91,63	102,38	95,19 a
MTAz8	85,43	85,44	89,00	86,63 b
MTh2	86,81	84,06	95,81	88,86 ab
Inoc. Comercial	80,06	86,56	94,75	87,13 ab
Média	85,94 B	86,94 B	95,5 A	---

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,1$ ). <sup>ns</sup> – Não significativo.

Basi (2013) avaliando a aplicação de doses de nitrogênio (0, 50, 100 e 150  $\text{kg ha}^{-1}$ ) em cobertura também incrementaram a concentração proteica de grãos de milho, obtendo ajuste linear e incrementos entre 5,8 e 21,5  $\text{g kg}^{-1}$ . Similarmente, Amaral Filho et al. (2005) ao submeterem doses de nitrogênio (0, 50, 100, 150 e 200  $\text{kg ha}^{-1}$ ) em diferentes arranjos populacionais verificaram aumento linear para a concentração de proteína nos grãos.

O aumento na concentração de nitrogênio e proteína bruta nos grãos quando não houve a inoculação das sementes pode ter sido decorrente de uma absorção excessiva de nitrogênio pela planta, porém sem reflexos nos componentes produtivos. Situações como essas não são desejáveis às culturas, pois além de causar desbalanceamento nutricional nas plantas, contribuem para o empobrecimento dos solos.

Considerando esses fatores e os resultados obtidos neste estudo, a associação realizada entre as bactérias diazotróficas e as plantas pode ter proporcionado uma melhor eficiência na utilização de nitrogênio, uma vez que, a produtividade obtida nas plantas que acumularam menores concentrações de nitrogênio foi equivalente aquelas que acumularam maiores concentrações. Benefícios como este constituem importantes características ecológicas, pois menores quantidades de fertilizantes seriam necessárias para viabilizar a produção (MENDONÇA et al., 2006).

A quantidade de nitrogênio acumulada, ou seja, a quantidade exportada nos grãos pela colheita foi de 93,1; 105,5 e 117,2 kg ha<sup>-1</sup> nos tratamentos que receberam adubações de 0, 55 e 110 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, respectivamente. Ou seja, é possível afirmar que em todos os tratamentos houve um acúmulo de nitrogênio superior ao que foi fornecido pelo fertilizante, podendo-se inferir que esse aporte foi oriundo de processos de mineralização da matéria orgânica do solo ou da fixação biológica de nitrogênio, realizada pelas bactérias diazotróficas presentes no solo ou inoculadas nas sementes. Alves et al. (2006) avaliando o efeito da fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio nas culturas de soja, milho e algodão, encontraram um acúmulo de nitrogênio nos grãos de milho na ordem de 78 kg ha<sup>-1</sup> aplicando 110 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, ou seja, inferior aos obtidos no presente estudo.

O suprimento adequado de nitrogênio permite a planta maior efetividade na composição dos aminoácidos, desempenhando um efeito direto no teor de proteínas dos grãos. Patroni et al. (2002) observaram maior teor de proteína nos grãos cujas plantas receberam os maiores níveis de adubação nitrogenada. Devido a estes motivos, a concentração de proteína manteve a mesma tendência da concentração de nitrogênio nos grãos.

Na cultura do milho, Ferreira et al. (2001) avaliando características nutricionais das plantas adubadas com nitrogênio, molibdênio e zinco verificaram que para as doses de nitrogênio aplicadas, entre 0 e 210 kg ha<sup>-1</sup>, o teor de proteína no grão passou de 75 para 105 g kg<sup>-1</sup>. Resultados estes, semelhantes aos obtidos nas circunstâncias do presente estudo.

O potencial incremento das plantas que receberam adubação nitrogenada deve-se, se deve ao fato do nitrogênio absorvido pelas plantas se combinar com esqueletos carbônicos para a produção de aminoácidos, os quais resultam em proteínas que ficam armazenadas nos tecidos vegetais. Por ocasião da fase de enchimento de grãos estas reservas são quebradas, translocadas e armazenadas nestes órgãos, na forma de proteínas e aminoácidos (MARSCHNER, 1995).

#### 4.7 Produção de massa seca da parte aérea

A produção de massa seca da parte aérea foi influenciada pelo efeito da interação entre a inoculação e as doses de nitrogênio. A inoculação do isolado MTh2 associada ao fornecimento de 55 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio proporcionou maior produção de massa seca da parte aérea, embora não tenha diferido da produção obtida com a inoculação do mesmo isolado associado ao fornecimento de 110 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, obtendo-se, um aumento de 1.200 kg ha<sup>-1</sup> na produção de massa seca da parte aérea. Quando inoculou-se às sementes com o isolado MTh2 associado ao fornecimento de 55 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio a produção de massa seca da parte aérea foi superior, embora não tenha diferido estatisticamente de quando forneceu-se 110 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio na ausência de inoculação (Tabela 9).

**TABELA 9.** Produção de massa seca da parte aérea (kg ha<sup>-1</sup>) de plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 125 DAS

Inoculação	Doses de Nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> )		
	0	55	110
Ausência	4240,74 aB	4794,77 aAB	5627,73 aA
MTAz8	4813,29 aA	4563,94 aA	5006,76 aA
MTh2	4518,57 aB	5809,31 aA	4609,17 aAB
Inoc. Comercial	4671,30 aA	4773,94 aA	5875,79 aA

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal e minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,1$ ).

De forma semelhante ao observado neste estudo, Lana et al. (2012) encontraram efeito significativo da interação entre a inoculação com *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio em cobertura. Os autores observaram que a inoculação com *A. brasilense* possibilitou respostas semelhantes na produção de massa seca da parte aérea das plantas independente do fornecimento de nitrogênio em cobertura, sugerindo a possibilidade da substituição da adubação nitrogenada pela inoculação. Quadros et al. (2014) obtiveram incrementos de até 4,8 t ha<sup>-1</sup> na matéria seca de plantas de milho inoculadas. Incrementos também foram relatados por Reis Júnior et al. (2008) na matéria seca de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum*.

Dartora et al. (2013) avaliando a inoculação combinada das estirpes AbV-5 (*A. brasilense*) e SmR1 (*H. seropedicae*) na cultura do milho, relataram incremento de 12% na matéria seca da parte aérea. Do mesmo modo, Quadros (2009), avaliando o

desempenho agrônomo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum* em associação com a adubação nitrogenada, encontrou incrementos ainda superiores, de até 53%.

Segundo Bashan et al. (2004) e Huergo et al. (2008) o aumento na produção da massa seca da parte aérea, bem como os incrementos em outros parâmetros relacionados ao desenvolvimento vegetal, é atribuído à liberação de fitormônios, principalmente o ácido indol acético, que desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas. Gopalswamy e Vidhyasekaran (1988) e Hartmann et al. (1983) observaram aumento na quantidade de pelos radiculares e na formação e desenvolvimento de numerosas raízes, laterais primárias e secundárias, em plântulas de milho, o que aumenta a absorção de nutrientes da solução do solo, favorecendo o desenvolvimento da parte aérea das plantas.

#### **4.8 Massa de 1000 grãos**

A massa de mil grãos não foi influenciada pela inoculação das sementes e adubação nitrogenada, corroborando em parte com os resultados obtidos por Casagrande e Fornazieri-Filho (2002), Souza e Soratto (2006), Cruz et al. (2008) e Kappes et al. (2009), que não encontraram resultados significativos avaliando a aplicação de doses de nitrogênio.

A ausência de efeito da inoculação para a massa de mil grãos tem sido relatadas em outros estudos com a cultura do milho (BASI et al., 2011; SANTOS et al., 2011). Basi (2013) trabalhando com a inoculação de *Azospirillum brasilense*, e as doses de nitrogênio (0, 75, 150, 225 e 300 kg ha<sup>-1</sup>) observaram efeito apenas para as doses de nitrogênio sobre a massa de mil grãos até a dose de 220 kg ha<sup>-1</sup> (296 g) com posterior decréscimo. Discordando de Quadros et al. (2014) que atribuíram à inoculação com *Azospirillum brasilense* o motivo pelo aumento na massa de mil grãos.

Segundo Borrás e Otegui (2001), esse é o componente de produção menos afetado por variações nas práticas de manejo e adubação. Contudo, tal afirmação não é unânime, pois Silva et al. (2006) e Lana et al. (2009), verificaram aumento no peso de grãos e o atribuíram ao fornecimento de nitrogênio em cobertura.

De acordo com Ulger et al. (1995), o referido componente produtivo é altamente dependente da absorção de nitrogênio pela planta, a qual alcança um pico durante o período compreendido entre o início do florescimento e o início da formação de grãos. No presente estudo, esse resultado pode ser justificado pela boa precipitação ocorrida

no período de enchimento dos grãos, pois, conforme Fancelli (1986), a massa média do grão é, marcadamente, afetada a partir dos grãos leitosos, principalmente pela disponibilidade de água.

#### 4.9 Produtividade de grãos

Quanto à produtividade de grãos não houve resultados significativos em função da inoculação. Contudo, a aplicação do fertilizante nitrogenado, representou acréscimo de 10,71 e 11,71% na produtividade de grãos, quando aplicou-se 55 kg ha<sup>-1</sup> e 110 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 10).

**TABELA 10.** Produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) de plantas de milho safra, em função da inoculação com bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio, aos 125 DAS

Inoculação	Doses de Nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> )			Média
	0	55	110	
Ausência	6335,95 <sup>ns</sup>	7378,75	8258,95	7324,54 <sup>ns</sup>
MTAz8	7285,41	7151,17	7695,19	7377,26
MTh2	6926,56	8092,53	6904,07	7307,72
Inoc. Comercial	6537,31	7711,73	7817,81	7355,62
Média	6771,31 B	7583,54 A	7669,01 A	---

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,1$ ). <sup>ns</sup> – Não significativo.

Aumentos na produtividade de grãos decorrentes do fornecimento de doses de nitrogênio a cultura do milho foram descritos por Mar et al. (2003) ao avaliar seis níveis de nitrogênio (0, 30, 60, 90, 120 e 150 kg ha<sup>-1</sup>) encontraram que a máxima produtividade (6549 kg ha<sup>-1</sup>) esteve associada ao fornecimento de 131 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio. Já Souza e Soratto (2006) aplicando cinco níveis de nitrogênio (0, 30, 60, 90, e 120 kg ha<sup>-1</sup>) obtiveram resposta linear, atingindo a máxima produtividade (3972 kg ha<sup>-1</sup>) com a dose de 120 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio.

Corroborando com a ausência de respostas quanto a inoculação Campos et al. (2000) relataram que a inoculação não propiciou efeitos significativos sobre a produção de grãos em milho. Bartchechen et al. (2010) avaliando o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na produtividade do milho também não obtiveram respostas significativas. Ao contrário, resultados positivos para a produção de grãos são relatados com o uso de *Azospirillum* na ordem de 7% (DARTORA et al., 2013); 9,4% (KAPPES et al., 2013); 14,1 (CAVALLET et al., 2000); 15,4% (LANA et

al., 2012) e 21% (ZILLI et al., 2008) quando inoculado na ausência de nitrogênio, e ao aplicar doses suplementares em coberturas os aumentos são ainda maiores, atingindo até 30% (CAVALLET et al., 2000).

A ausência de resposta quanto a inoculação pode estar relacionada à condição do solo na área experimental, que apresentou altos níveis de fertilidade, favorecendo assim o desenvolvimento do tratamento testemunha. Outro fator possivelmente responsável pela ausência de repostas à inoculação é a diminuição da proporção de diazotróficos no solo em virtude da adição do fertilizante nitrogenado, que altera a diversidade destas bactérias (BERGAMASCHI, 2006). Hungria (2011), trabalhando com a cultura do milho, ressaltou que, nos tratamentos que receberam 100% de nitrogênio na forma mineral de ureia, o efeito da inoculação com *Azospirillum* foi em geral anulado.

A especificidade da associação entre bactérias diazotróficas e plantas também constitui um fator para a redução nas respostas. Reis et al. (2000) atribuíram dentre outros possíveis motivos, a competição entre linhagens adaptadas as condições locais, que por sua vez, podem favorecer a associação das bactérias com as plantas de milho, sendo consenso que o genótipo da planta é fator determinante para a obtenção dos benefícios oriundos da FBN.

Nesse tocante, Dotto et al. (2010) avaliando a inoculação de *H. seropedicae* associada a doses de nitrogênio em plantas de milho obtiveram resultados contrastantes para os dois híbridos avaliados, de forma que, quando inoculou-se o híbrido AS 1570 houve incremento na produção de 8,6%, o que correspondeu a 649 kg ha<sup>-1</sup>, já ao inocular a mesma bactéria no híbrido AS 1540 houve um decréscimo de 5,1% na produção de grãos, ou seja, 360 kg ha<sup>-1</sup> a menos, demonstrando que os híbridos apresentam comportamentos diferenciados quando inoculados. Resultados semelhantes foram evidenciados por Alves (2007), o qual verificou que não houve resposta da inoculação do híbrido BRS 4157 em condições de campo, ao passo que para o híbrido BR 1030 ocorreu aumento de até 30% no rendimento de grão pela inoculação.

No presente estudo, analisando as médias absolutas, a omissão no fornecimento de nitrogênio associada à inoculação proporcionou produtividades superiores à testemunha sem inoculação, com aumentos de 201,36; 590,61 e 949,46 kg ha<sup>-1</sup> através da inoculação com inoculante comercial, estirpe MTh2 e MTAz8, respectivamente, o que representa incrementos na ordem de 3,1; 8,5 e 13%. Quando

houve fornecimento de metade da dose recomendada de nitrogênio a estirpe MTh2 aumentou a produção de 713,78 kg ha<sup>-1</sup> e o inoculante comercial de 332,98 kg ha<sup>-1</sup>, representando incrementos de 8,8 e 4,3%, respectivamente. No entanto, ao fornecer a dose total de nitrogênio, nenhum tratamento inoculado se mostrou superior à ausência de inoculação, o que pode ser reflexo de uma provável inibição no nitrogênio sobre a colonização das plantas pelas bactérias (ROESCH et al., 2006).

O efeito inibitório do aumento na concentração de nitrogênio é relatado por Reis et al. (2000) como sendo consequência do fato do nutriente alterar o estado fisiológico da planta e por consequência a sua associação às bactérias diazotróficas. Já Hartmann (1988), atribuem como reflexo das concentrações elevadas de compostos nitrogenados no solo, resultando em uma rápida paralização da atividade enzimática da nitrogenase, responsável pela conversão do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em formas assimiláveis às plantas (LOPES, 2007).

Ainda que experimentos com fertilização nitrogenada proporcionem produtividades superiores quando comparado ao uso de bactérias diazotróficas, isso não reduz o potencial de seu uso (HUNGRIA et al., 2010). Nesse sentido, a utilização micro-organismos na agricultura podem contribuir para a economia de fertilizantes nitrogenados, assim como melhorar a eficiência de absorção, cooperando para desenvolvimento de sistemas produtivos baseados em conceitos agrícolas sustentáveis.



## **5 CONCLUSÃO**

A inoculação com bactérias diazotróficas proporciona ganhos na produtividade de grãos e a adubação nitrogenada promove incrementos no desenvolvimento, nutrição e produção da cultura do milho cultivado em Mato Grosso, no período de safra.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plantgrowth promoting activities. **Microbiological Research**, v. 163, p. 173 – 181, 2008.
- ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T. de; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 449-456, 2006.
- ALVES, G. C. **Efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho**. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 2007.
- AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 241-248, 2002.
- AMARAL FILHO, J. P. R.; FORNASIERI FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J. C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, n.3, p. 467-473, 2005.
- ARAÚJO, L. A. N. de; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. da. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 8, p. 771-777, 2004.
- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F.; FOSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L.; SUHRE, E.; TEICHMANN, L. L. Adubação nitrogenada em milho pelo monitoramento do nível de nitrogênio na planta por meio do clorofilômetro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, p.109-119, 2003.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, J. L.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. Nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D. Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas. In: XIII Reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologias de inoculantes microbianos de interesse agrícola, Londrina - PR. **Anais...** Londrina, PR, 2007.

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

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B.; SANTANA, R. B.; MARCIANO, C. R. Initial performance of maize in response to NPK fertilization combined with *Herbaspirillum seropedicae*. **Revista Ceres**, Viçosa – MG, v. 59, n. 6, 2012.

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

BAR-NESS, E.; HADAR, Y.; SHANZER, A.; LIBMAN, J. Iron uptake by plants from microbial siderophores. A study with 7-nitrobenz-2 oxa-1,3-diazole-desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. **Plant Physiology**. v. 99, p. 1329 – 1335, 1992.

BARROS NETO, C.R. de. **Efeito do nitrogênio e da inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* no rendimento de grãos de milho**. 2008. 29p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa, PR, 2008.

BARTCHECHEN, A.; FIORI, C. C. L.; WATANABE, S. H.; GUARIDO, R. C. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L.). **Campo Digit@l**, Campo Mourão, v. 5, n. 1, p. 56-59, 2010.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 521-577, 2004.

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

BASI, S.; LOPES, E.C.P.; KAMINSKI, T.H.; PIVATTO, R.A.D.; CHENG, N.C.; SANDINI, I.E. *Azospirillum brasilense* nas sementes e no sulco de semeadura da cultura do milho. In.: Semana de Integração, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2. **Anais...** Guarapuava: Anais da II SIEPE, 2011. 4p. 2011.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indol-3-acetic acid and gibberellins A (1) and A (3) by *Acetobacter*

diazotrophicus and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7-11, 1998.

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

BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R. & BALDANI, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas no cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 23. Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 7. Simposio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 5. Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2., Caxambu. p. 809, 1998.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. de; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. de; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n.1, p. 195-209, 1995.

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

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

BRANDÃO, E. M. **Os componentes da comunidade microbiana do solo**. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. Microbiologia do solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.1-15.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

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

CAMPOS B. C. de; GNATTA S. T. V. Avaliação do inoculante "Graminante" na cultura do milho. **Ciência Rural**, v. 30, p. 713-715, 2000.

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

CANTARELLA, H.; DUARTE, A.P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V. (Ed.). **Tecnologia de produção de milho**. Viçosa: UFV, 2004, cap.5, p.139-182.

CANTARELLA, H.; TABATABAI, M. A. Volatilização de amônia de alguns fertilizantes nitrogenados aplicados a solos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA SO SOLO, 20. 1985. Belém. **Anais...** Belém: SBCS. 1985. p.90.

CASAGRANDE, J. R. R.; FORNAZIERI-FILHO, D. Adubação nitrogenada na cultura do milho safrinha. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 1, p. 33-40, 2002.

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

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

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

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.

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

COELHO, A. M. **Nutrição e adubação do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA. Dezembro, 2006. 10 p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira de grãos: Safra 2013/2014 - Décimo Segundo Levantamento - Setembro/2014**. Brasília: CONAB, 2014. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_09\\_10\\_14\\_35\\_09\\_boletim\\_graos\\_setembro\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_10_14_35_09_boletim_graos_setembro_2014.pdf)>. Acesso em: 17 set. 2014a.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Caderno estatístico da safra 2011-2012: Receita bruta dos produtores rurais brasileiros**. Brasília, v.5, p.1-234, 2014. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_09\\_03\\_11\\_41\\_12\\_caderno\\_2011-2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_03_11_41_12_caderno_2011-2012.pdf)>. Acesso em: 21 out. 2014b.

COSTA, N. R.; ANDREOTTI, M.; GAMEIRO, R. de A.; PARIZ, C. M.; BUZETTI, S.; LOPES, K. S. M. Adubação nitrogenada no consórcio de milho com duas espécies de braquiária em sistema plantio direto. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 47, n. 8, p. 1038 – 1047, 2012.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indóis in culture medium from

*Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

CRUZ, J. C.; PEREIRA, F. T. F. P.; PEREIRA FILHO, I. A.; COELHO, A. M. **Resposta de cultivares de milho à adubação nitrogenada em cobertura**. Sete Lagoas: EMBRAPA. Dezembro, 2005. 65p.

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

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

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

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. **Elementos requeridos à nutrição de plantas**. In: NOVAIS, R. F., ALVAREZ, V. V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F., CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). Fertilidade do Solo. 1ª edição. Viçosa: SBCS, 2007. p. 91-132.

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.

DIDONET, A. D., MAGALHÃES, A. C. N. The role of auxin-like compounds in plant Growth promoting rhizobacteria: the wheat-azospirillum association. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, p.179-183, 1993.

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

DONZELI, V.P. **Atividade de alguns componentes da comunidade microbiana do solo e microrganismos diazotróficos endofíticos sob influência do nitrogênio na cultura do milho**. 2002. Dissertação (Mestrado Pós-Graduação Instituto de Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002. 84 p.

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

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

EADY, R. R.; POSTGATE, J. R. Nitrogenase. **Nature**, v. 249, p. 805-810, 1974.

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, p. 17-26, 2001.

ENYEDI, A. J.; YALPANI, N.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. **The Cell**. v. 70, p. 879 – 886, 1992.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. **Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years**. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. Biological Nitrogen Fixation, New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.

FAGERIA, N. K. **Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas**. Brasília, DF: EMBRAPA-DPU, 1989. 245 p.

FANCELLI, A. L. Milho. p. 43-97. In PROCHNOW, L. I. et al. (eds). **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes**. Vol. 3. Piracicaba: IPNI – Brasil, 2010. 467 p.

FANCELLI, A. L. **Plantas alimentícias: guia para aula, estudos e discussão**. Piracicaba: CALQ, 1986.

FANCELLI, A.L. **Fisiologia, nutrição e adubação do milho para alto rendimento**. In: SIMPÓSIO ROTAÇÃO SOJA/MILHO NO PLANTIO DIRETO,1. Piracicaba, SP: POTAPHOS, 2000.

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

FERNANDES, F. C. S.; LIBARDI, P. L. Percentagem de recuperação de nitrogênio pelo milho, para diferentes doses e parcelamentos do fertilizante nitrogenado. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.6, n. 3, p. 285-296, 2007.

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 e Sorgo**, Sete Lagoas, v.4, n.2, p. 195-204, 2005.

FERREIRA, A. C. B. **Efeitos da adubação de N, Mo e Zn sobre a produção, qualidade de grãos e concentração de nutrientes no milho**. 1997. 74f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 1997.

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 Agricola**, Piracicaba, v.58, n.1, p.131-138, 2001.

FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: International symposium on sustainable agriculture for the tropics – the role of biological nitrogen fixation, 1995, Angra dos Reis, R.J. **Abstracts...** Embrapa-cnpab/UFRRJ/the brazilian academy of Sciences, 210, 1995.

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

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

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

GAZOLA, D.; ZUCARELI, C.; SILVA, R. R.; FOSECA, I. C. de B. Aplicação foliar de aminoácidos e adubação nitrogenada de cobertura na cultura do milho safrinha. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 7, p. 700-707, 2014.

GILLIS, M.; DOBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between (*Pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VICENZINI, M. **Nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer, v. 48, p. 292-284, 1991.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIM, G. PENROSE, D. M. **Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria**. Imperial College Press. Waterloo, Ontario, Canada, 267p, 1999.

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



GONÇALVES, C. N.; CERETTA, C. A.; BASSO, C. J. Sucessões de culturas com plantas de cobertura e milho em plantio direto e sua influência sobre o nitrogênio do solo. **Revista brasileira de ciência do solo**, Viçosa – MG, v. 24, p. 153-159, 2000.

GOPALSWAMY, G.; VIDHYASEKARAN, P. Effect of *Azospirillum lipoferum* inoculation and inorganic nitrogen on wetland rice. **Oryza**, v. 26, p. 378-380, 1988.

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**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 393-398, 2007.

GUIMARÃES, S. L.; BONFIM-SILVA, E. M.; KROTH, B. E.; MOREIRA, J. C. F.; REZENDE, D. Crescimento e desenvolvimento inicial de *Brachiaria decumbens* inoculada com *Azospirillum* spp. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 286-295, 2011.

GUIMARÃES, S. L.; MOREIRA, J. C. F.; BONFIM-SILVA, E. M.; POLIZEL, A. C.; SABINO, D. C. C. Características produtivas de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum* spp. cultivadas em Latossolo de Cerrado. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 558-567, 2013.

HARTMANN, A. Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 110, p. 225-238, 1988.

HARTMANN, A.; MAHAVIR, S.; KLIGMALLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indole acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 916-922, 1983.

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. **Regulamento de fixação de nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. In: CASSAN F. D.; SALAMONE I. G. de; (Eds.) *Azospirillum* spp.: fisiologia celular, interações de plantas e pesquisa agrônômica, na Argentina. Córdoba, Asociación Argentina de Microbiología. p.17-28, 2008.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 38 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).

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

HURTADO, S. M. C.; RESENDE, A. V.; SILVA, C. A.; CORAZZA, E. J.; SHIRATSUCHI, L. S. Clorofilômetro no ajuste da adubação nitrogenada em cobertura para o milho de alta produtividade. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1011 – 1017, 2011.

IMEA – Instituto Mato-Grossense de economia agropecuária. **Boletim Semanal do Milho nº 330**. Julho/2014. Cuiabá – Mato Grosso. Disponível em: <[http://www.imea.com.br/upload/publicacoes/arquivos/R403\\_2014\\_07\\_04\\_BSMilho.pdf](http://www.imea.com.br/upload/publicacoes/arquivos/R403_2014_07_04_BSMilho.pdf)>. Acesso em: 20 julho 2014.

IVANKO, S. Recent progress in the use of  $^{15}\text{N}$  in research on nitrogen balance studies sin soil plant relationship. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Isotope and radiation in soil-plant relationships includid forestry**: Vienna: IAEA, 1972, p. 483-497.

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

JORDÃO, L. T.; LIMA, F. F.; LIMA, R. S.; MORETTI, P. A. E.; PEREIRA, H. V.; MUNIZ, A. S.; OLIVEIRA, M. C. N. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum braziliense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária. In: FERTBIO, 2010, Guarapari. **Anais...** Viçosa: SBCS, 2010. 1 CD-ROM.

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**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 334-343, 2011.

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

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**, Goiânia, v. 39, n. 3, p. 251-259, 2009.

KIEHL, J.C. Nitrogênio: dinâmica e disponibilidade no solo. In: FERNANDES, F.M.; NASCIMENTO, V.M. (Coord.). **Curso de atualização em fertilidade do solo**. Campinas: Fundação Cargill, p.139-157, 1987.

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

LANA, M. C.; WOYTICHOSKI JÚNIOR, P. P.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ÁVILA, M. R.; ALBRECHT, L. P. Arranjo espacial e adubação nitrogenada em cobertura na cultura do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 433-438, 2009.

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

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

LIMA, E.; BODDEY R. M.; DOBEREINER J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a <sup>15</sup>N aimed nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, n.1, p. 165-170, 1987.

LIN, S. Y., YOUNG, C. C., HUPFER, 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, p. 761-765, 2009.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LEITE, D. Endophytic bacteria and potential applications. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.

LOPES A. S. Fixação biológica do nitrogênio no sistema solo planta. In: I Simpósio Sobre Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira, Piracicaba. **Anais... IPNI Brasil**, p.43-72, 2007.

LYRA, G. B.; ROCHA, A. E. Q. da; LYRA, G. B.; SOUZA, J. L. de; TEODORO, I. Crescimento e produtividade do milho, submetido a doses de nitrogênio nos Tabuleiros Costeiros de Alagoas. **Revista Ceres**, Viçosa – MG, v. 61, n. 4, 2014.

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

MAGALHÃES. P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Fisiologia do milho**. Circular técnica, Embrapa milho e sorgo. Sete lagoas, MG, 2002.

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

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

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

MARTÍNEZ-MORALES, L. J.; SOTO-URZÚA, L.; BACA, B. E.; SÁNCHEZ-AHÉDO, J. A. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 228, p. 167 – 173, 2003.

MEIRA, F. de A.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M.; ARF, O.; SÁ, M. E. de; ANDRADE, J. A. da C. Fontes e épocas de aplicação do nitrogênio na cultura do milho irrigado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 275-283, 2009.

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, p. 620-624, 2007a.

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

MELLO, F. A. de; SOBRINHO, M. D. C. de ARZOLLA, S. SILVEIRA, R. I., NETTO, A. C.; KIEHL, J. C. de. **Fertilidade do solo**. São Paulo: Nobel, 1989.

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.

MORAIS, T. P. de; **Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense* em híbridos de milho**. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG, 2012.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 625p. Cap. 7: Transformações bioquímicas e ciclos dos elementos no solo.

MURAKAMI, D.M. Comportamento de alguns híbridos comerciais de milho (*Zea mays* L.) na Região Sul do Estado de Mato Grosso, safrinha 1997. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2000, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: ABMS/EMBRAPA MILHO SORGO/UFU, 2000. p.108.

NEJAD, P.; JOHNSON, P. A. Entophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oil seed rape and tomato. **Biological Control**. v. 18, p. 208 – 215, 2000.

NORMANLY, J. Auxin metabolisms. **Plant Physiology**. v. 100, p. 431 – 442, 1997.

NORMAN, M. J. T.; PEARSON, C. J.; SEARLE, P. G. E. **The ecology of tropical food crops**. 2. ed. Melbourne: Cambridge University Press, 1995. 430 p.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years of world-wide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p. 1591-1601, 1994.

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

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistance sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *herbaspirillum*. **New Phytologist**, Oxford, v. 135, p. 723-737, 1996.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 242, p. 205-215, 2002.

PATRONI, S.M.S. et al. A. Avaliação de diferentes níveis de adubação em três cultivares de feijão carioca. 2- Qualidade nutricional dos grãos. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7, 2002, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2002. p. 541-543.

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

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, p. 1263–1267, 2006.

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**, Reading, v. 56, p. 1931-1937, 2006.

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

PIÑÓN, D.; CASA, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VICENTE, C.; SOLAS, M. T.; LEGAZ, M. E. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endosymbiont produces bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugarcane pathogen. **Research in Microbiology**.v. 153, p. 345 – 351, 2002.

PINTO JUNIOR, A. S.; GUIMARÃES, V. F.; RODRIGUES, L. F. O. S.; OFFEMANN, L. C.; COSTA, A. C. P. R. da; SILVA, M. B. da; DRANSKI, J. A. L.; BANDEIRA, K. B.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. de; Resposta a inoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho na região oeste do Paraná. In.: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 29, Águas de Lindóia. **Anais...** In.: Anais do Congresso Nacional de milho e Sorgo, Águas de Lindóia, p. 282-288, 2012.

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

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMES, 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**, Brasília, v. 39, n. 10, 2004.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2 ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1996. 285 p.

REINHOLD, B., HUREK, T., FENDRIK, I., POT, B., GILLIS, M., KERSTERS, K., THIELEMANS, S., DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. a nitrogenfixing organism associated with roots of the kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 43-51, 1987.

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

REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Review in Plant Sciences**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 227-247, 2000.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. **Fixação biológica do nitrogênio - Estado da arte**. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de (Ed.) Processos biológicos no sistema solo - planta: ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 368 p.

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

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. **Como a planta de milho se desenvolve**. Piracicaba: Potafos, 2003. 20p. (Informações Agronômicas, 103).

ROBERTO, V.M.O.; SILVA, C.D.; LOBATO, P.N. Resposta da cultura do milho a aplicação de diferentes doses de inoculante (*Azospirillum brasilense*) via semente. In.: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 18, 2010. Goiânia. **Anais...** Goiânia: Anais do Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010.

RODRIGUES, L. da S. (2004). Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado. Tese (Doutorado - Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 94 f.

ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L.; PASSAGLIA, L. P. M.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S de; CAMARGO, F. A. O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, n. 9, p. 967-974, 2006.

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

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

SANTOS, K.C.; NOVAKOWISKI, J.H.; BAZZANEZI, A.N.; NOVAKOWISKI, J.H.; PECENTCHUK, F.; SANDINI, I.E. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* sobre a produtividade e massa de mil grãos de diferentes híbridos de milho. In.: Semana de Integração, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2. **Anais...** Guarapuava: Anais da SIEPE, 2011.

SANTOS, P. G.; JULIATTI, F. C.; BUIATTI, A. L.; HAMAWAKI, O. T. Avaliação do desempenho agrônômico de híbridos de milho em Uberlândia, MG. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 597-602, 2002.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere**, v. 66, p. 1794 – 1798, 2007.

SILVA, A. A. O.; FELIPE, T. A.; BACH, E. E. Ação do *Azopsirillum brasiliense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Conscientiae Saúde**, Universidade Nove de Julho, São Paulo, v. 3, p. 29-35, 2004.

SILVA, E. C.; 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**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 477-486, 2006.

SILVA, E.C.; BUZETTI, S.; GUIMARÃES, G.L.; LAZARINI, E. & SÁ, M.E. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio na cultura do milho em plantio direto sobre Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 353-362, 2005.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

SILVA, F. de A. S. e; AZEVEDO, C. A. V. de. A New Version of The Assisat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, p.393-396, 2006.

SOMERS, E.; PTACEK, D.; GYSEGOM, P.; SRINIVASAN, M.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1803 – 1810, 2005.

SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. Adubação com nitrogênio. In: SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. Planaltina – DF, Embrapa Cerrados, 2ª ed., p. 129-144, 2004c.

SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. Calagem e adubação para culturas anuais e perenes: Milho. In: **Cerrado: correção do solo e adubação**, Planaltina – DF, Embrapa Cerrados, 2ª ed., p. 306-308, 2004a.

SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**, Planaltina – DF, Embrapa Cerrados, 2ª ed., p. 306-308, 2004b.

SOUZA, E. F. C.; SORATTO, R. P. Efeito de fontes e doses de nitrogênio em cobertura, no milho safrinha, em plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, n. 3, p. 395-405, 2006.

STARK, J. C.; JARREL, W. M.; LETEY, J. Evolution of irrigation-nitrogen management practices for celery using continuous-variable irrigation. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 47, p. 95-98, 1983.

SUNDARA, B.; NATARAJAN, V.; HARI, K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. **Field Crops Research**. v. 77, p. 43 – 49, 2002.

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

TSIMILLI-MICHAEL, M.; EGGENBERG, P.; BIRO, B. Synergistic and antagonistic effects of Arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and Rhizobium nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfafa, probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescent transient O-J-I-P. **Applied Soil Ecology**. v. 15, p. 169 – 182, 2000.

ULGER, A. C.; BECKER, A. C.; KHANT, G. Response of maize inbred lines and hybrids to increasing rates of nitrogen fertilizer. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Madison, v. 159, n. 3, p. 157-163, 1995.

URQUIAGA, S.; ZAPATA, F. Fertilización nitrogenada em sistemas de producción agrícola. In: URQUIAGA, S.; ZAPATA, F. **Manejo eficiente de la**



**fertilización nitrogenada de cultivos anuales em América Latina y el Caribe.** Porto Alegre: Gênese; Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2000. p.77-88.

USDA, United States Department of Agriculture, **Official Estimates World Corn Production.** Created in 11/07/2014. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=884&hidReportRetrievalTemplateID=1>>. Acesso em: 14/07/2014.

VIDEIRA, S. S.; OLIVEIRA, D. M.; MORAIS, R. F.; BORGES, W. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 356, n. 1-2, p. 51-66, 2012.

VITTI, G.C.; BARROS JÚNIOR, M.C. **Diagnóstico da fertilidade do solo e adubação para alta produtividade de milho.** In: FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. Milho: tecnologia e produtividade. Piracicaba: ESALQ/LPV, 2001, p.179-222.

WASKOM, R. M.; WESTFALL, D. G.; SPELLMAN, D. E.; SOLTANPOUR, P. N. Monitoring nitrogen status of corn with a portable chlorophyll meter. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 27, n. 3 p. 545-560, 1996.

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, 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, p. 959–963, 2008.

ZILLI, J. E.; PERIN, L.; MARSON, B. F.; ALVES, G. C.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D. Rendimento de grãos da cultura do milho inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* no cerrado de Roraima. In: FERTBIO 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: SBCS, 2008, CD Rom.