



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO SOLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA: SOLOS E NUTRIÇÃO DE
PLANTAS

GILDEAN PORTELA MORAIS

COMPORTAMENTO DE HÍBRIDOS DE MILHO ADUBADOS COM NITROGÊNIO
E INOCULADOS COM DIAZOTRÓFICOS ASSOCIATIVOS

FORTALEZA

2014

GILDEAN PORTELA MORAIS

**COMPORTAMENTO DE HÍBRIDOS DE MILHO ADUBADOS COM NITROGÊNIO
E INOCULADOS COM DIAZOTRÓFICOS ASSOCIATIVOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Solos e Nutrição de Plantas, do Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Vânia Felipe Freire Gomes

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M825c Morais, Gildean Portela.
 Comportamento de híbridos de milho adubados com nitrogênio e inoculados com diazotróficos associativos / Gildean Portela Morais. – 2014.
 66 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências do Solo, Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Solos e Nutrição de Plantas, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.
 Orientação: Profa. Dra. Vânia Felipe Freire Gomes.
1. Milho. 2. Sulfato de amônio. 3. Nitrogênio - Fixação. I. Título.

CDD 631.4

GILDEAN PORTELA MORAIS

**COMPORTAMENTO DE HÍBRIDOS DE MILHO ADUBADOS COM NITROGÊNIO
E INOCULADOS COM DIAZOTRÓFICOS ASSOCIATIVOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Solos e Nutrição de Plantas, do Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

Dissertação aprovada em: 24/07/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Vânia Felipe Freire Gomes - (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes Filho

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luis Alfredo Pinheiro Leal Nunes

Universidade Federal do Piauí (UFPI)

A Deus.

Aos meus pais, Josenias e Aglair.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser presente em minha vida, pela saúde, pela minha família, pelas conquistas, amigos e felicidade.

Aos meus pais Josenias Morais Inácio e Aglair Portela Soares Morais, por sempre estarem presentes em minha vida acompanhando efetivamente todos meus passos, por todo amor, dedicação e por terem construídos juntos nossa família.

À meu tio Brêmio Portela Soares, por sempre ser presente em todas as etapas de minha vida.

Aos meus irmãos: Jelian, Ailan e Jardânio, por acreditarem em meus ideais.

À minha orientadora, Vânia Felipe Freire Gomes, pela orientação, amizade, atenção, apoio, serenidade, alegria e por confiar em nosso trabalho.

Aos professores do Departamento de Solos da Universidade Federal do Ceará, em especial Paulo Furtado Mendes Filho e Boannerges Freire de Aquino por sempre estarem a disposição e por todos ensinamentos repassados.

Ao professor da Universidade Federal do Piauí, Luis Alfredo Pinheiro Leal Nunes pela amizade e pela disposição em participar desse trabalho.

À Juciane Maria, um agradecimento especial, pela dedicação, amizade e apoio incondicional à execução desse trabalho.

À todos meus amigos e parceiros, Darlan Braga, Diego Rolney, Donavan Noleto, Erivan Felipe e Francisco Sérgio pela amizade e convivência.

À todos amigos do mestrado e doutorado, David Campelo, Carlos Levi, Thiago Leite, Maria da Assunção, Gabrielle Santana e Petersson em especial à Aldênia Mascena e Jackson Lima, pela participação efetiva nesse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Solos, especialmente Antônio José, Edilson, Marilene, Fátima e Helena.

À Universidade Federal do Ceará e ao Departamento de Ciências do Solo.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

“Um pássaro, enquanto repousa em uma árvore nunca teme que o galho se quebre pois sua confiança, não está no galho mas em suas asas” (Gustavo Coelett)

RESUMO

O desenvolvimento de novas tecnologias que buscam a redução no uso de fertilizantes, especialmente os nitrogenados, é essencial para a sustentabilidade do sistema de produção na cultura do milho (*Zea mays* L.). O uso de microrganismos na agricultura é uma alternativa amplamente pesquisada, que busca a diminuição no uso de fertilizantes nitrogenados com consequente redução da degradação do meio ambiente. O presente trabalho objetivou comprovar a hipótese do efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas, sobre o crescimento e teores de nutrientes em dois híbridos de milho submetidos a quatro doses de adubações nitrogenadas e sobre a atividade microbiana do solo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, por um período de 90 dias. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, avaliando-se dois híbridos de milho (AG 1051 e BM 3061), os tratamentos foram dispostos no esquema fatorial 2 x 4, com quatro repetições, inoculado e não inoculado com o produto comercial a base de *Azospirillum brasilense* e submetidos a quatro diferentes doses de nitrogênio (0; 0,5; 1,0 e 1,5 g vaso⁻¹). Neste ensaio, houve interação significativa entre os fatores inoculação e doses de nitrogênio para o acúmulo de nitrogênio da raiz e no acúmulo de fósforo da parte aérea do híbrido AG 1051, em relação ao híbrido BM 3061 apresentou interação significativa sobre o acúmulo do potássio da parte aérea. Na avaliação, houve efeitos isolados dos fatores inoculação e doses de nitrogênio para a massa seca da raiz, no acúmulo de nitrogênio e potássio da parte aérea do híbrido AG 1051, para o híbrido BM 3061 efeitos significativos para o teor de fósforo da parte aérea e do potássio na raiz. O fator isolado da inoculação com *Azospirillum brasilense* revelou efeito significativo apenas sobre a respiração basal do solo sob influencia do híbrido BM 3061. Os dados relativos à altura, diâmetro do colmo, área foliar, teor de clorofila, massa seca das folhas, colmo e raiz das plantas de milho, cultivadas em condições de casa de vegetação, revelam que houve efeitos significativos atribuídos apenas à adição de fertilizantes nitrogenados, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense*. Conclui-se que a inoculação com *Azospirillum brasilense* nesse estudo pouco contribuiu com as variáveis avaliadas, o híbrido de milho AG 1051 se mostrou mais sensível à inoculação do que o BM 3061, e que os híbridos de milhos são sensíveis à variação do teor de nitrogênio aplicado no solo.

Palavras-chave: Fixação Biológica do Nitrogênio, *Zea mays* L., Sulfato de amônio, *Azospirillum brasilense*.

ABSTRACT

The development of new technologies that seek to reduce the use of fertilizers, especially nitrogen, is essential for the sustainability of the production system in maize (*Zea mays* L.). The use of microorganisms in agriculture is a widely researched alternative, seeking a reduction in the use of nitrogen fertilizers with consequent reduction in environmental degradation. This study aimed at proving the hypothesis of the effect of inoculation with endophytic diazotrophic bacteria on growth and nutrient content in two maize hybrids subjected to four levels of nitrogen fertilization and on the soil microbial activity. The experiment was conducted in a greenhouse for a period of 90 days. The experimental design was randomized blocks, evaluating two maize hybrids (AG 1051 and BM 3061), the treatments were arranged in a 4 x 2 factorial design, with four replicates, inoculated and not inoculated with the commercial product based on *Azospirillum brasilense* and subjected to four different doses of nitrogen (0, 0.5, 1.0 and 1.5 g pot⁻¹). In this trial, there was a significant interaction between inoculation factors and nitrogen doses root nitrogen accumulation and shoot phosphorus accumulation of the hybrid AG 1051. Regarding the BM 3061 hybrid, it showed a significant interaction on the shoot potassium accumulation. In the assessment, there have been isolated factors of inoculation and nitrogen doses for root dry mass, the accumulation of nitrogen and potassium of shoots for AG 1051. For BM 3061 hybrid, there were significant effects of phosphorus content of shoots and root potassium. The isolated factor of inoculation with *Azospirillum brasilense* showed significant effect only on the basal soil respiration under the influence of the hybrid BM 3061. Data on height, stem diameter, leaf area, chlorophyll content, dry mass of leaves, stems and roots of maize plants grown under greenhouse conditions showed significant effects attributed solely to the addition of nitrogen fertilizer, regardless of inoculation with *Azospirillum brasilense*. It was concluded that inoculation with *Azospirillum brasilense* in this study contributed little to the parameters evaluated, the maize hybrid AG 1051 was more sensitive to the inoculation with BM 3061, and that the maize hybrids are sensitive to the variation of the nitrogen content applied to the soil.

Keywords: Biological Nitrogen Fixation, *Zea mays* L., Ammonium Sulphate, *Azospirillum brasilense*.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Casa de vegetação (A) e temperaturas mínimas e máximas (B) durante o período de 02 de setembro a 01 de novembro de 2013 na casa de vegetação da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza-CE.....	23
Figura 2	- Região de mata nativa (A) e amostragem do solo (B) na Fazenda Experimental Raposa, Maracanaú-CE.....	24
Figura 3	- Semente de milho híbrido AG 1051 (A) e planta com 60 dias após a emergência (B)	27
Figura 4	- Semente de milho híbrido BM 3061 (A) e planta com 60 dias após a emergência (B)	28
Figura 5	- Disposição do arranjo experimental dos tratamentos em casa de vegetação	29
Figura 6	- Instalação e condução do experimento: aplicação de calcário dolomítico (A), plantio (B), inoculação das sementes (C), disposição das plantas em casa de vegetação (D), colheita do experimento (E) e retirada das raízes dos vasos (F)	32
Figura 7	- Determinação do teor relativo de clorofila nas folhas de milho com clorofilômetro	33
Figura 8	- Determinação da altura (A), diâmetro do colmo (B) e área foliar (C)..	34
Figura 9	- Altura média dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso^{-1})	38
Figura 10	- Diâmetro médio do colmo dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso^{-1})	39
Figura 11	- Área foliar dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso^{-1}) (b)	40
Figura 12	- Teor de clorofila dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso^{-1})	41
Figura 13	- Massa da matéria seca das folhas dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso^{-1})	43
Figura 14	- Massa da matéria seca do colmo híbrido de milho AG 1051, após inoculação ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> e aplicação de doses de nitrogênio (g vaso^{-1})	44

Figura 15	-	Massa da matéria seca da raiz do híbrido de milho BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso ⁻¹)	45
Figura 16	-	Teor de nitrogênio na parte aérea do híbrido de milho AG 1051, após em inoculação ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> (a); teor de nitrogênio na parte aérea do híbrido de milho AG 1051, em função de doses de nitrogênio (g vaso ⁻¹) (b)	47
Figura 17	-	Teor médio de nitrogênio da parte aérea dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso ⁻¹)	48
Figura 18	-	Teor médio de nitrogênio da raiz no híbrido de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso) (b).....	49
Figura 19	-	Teor de fósforo na parte aérea do híbrido de milho AG 1051, em função doses de nitrogênio (g vaso ⁻¹).....	50
Figura 20	-	Teor de fósforo raiz do híbrido de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso ⁻¹)	51
Figura 21	-	Teor de potássio da parte aérea do híbrido de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso ⁻¹)	53
Figura 22	-	Teor de potássio da parte aérea do híbrido de milho BM 3061, após inoculação ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> (a); teor de potássio da parte aérea do híbrido de milho BM 3031, em função de doses de nitrogênio (g vaso ⁻¹) (b).....	54
Figura 23	-	Teor de potássio da raiz do híbrido de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso ⁻¹)	55

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	- Características químicas e físicas do solo da área experimental amostrado na profundidade de 0-20 cm, na fazenda Raposa, Maracanaú-CE, 2013.	25
Tabela 2	- Características químicas do produto comercial líquido contendo estirpes de bactéria <i>Azospirillum brasilense</i>	26
Tabela 3	- Características do híbrido de milho AG 1051	27
Tabela 4	- Características do híbrido de milho BM 3061	28
Tabela 5	- Descrição dos tratamentos utilizados no experimento em casa de vegetação	29
Tabela 6	- Resumo da análise de variância para as variáveis: altura, diâmetro do colmo, área foliar e teor de clorofila, avaliados em híbrido de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D).....	37
Tabela 7	- Comparação de médias para as variáveis: altura (m), diâmetro do colmo (mm), área foliar (cm ²) e teor de clorofila (ICF).....	38
Tabela 8	- Resumo da análise de variância para as variáveis: massa da matéria seca das folhas, massa da matéria seca do colmo e massa da matéria seca da raiz, avaliadas em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada(D).	42
Tabela 9	- Comparação de médias para as variáveis: massa da matéria seca das folhas, massa da matéria seca do colmo e massa da matéria seca da raiz	43
Tabela 10	- Resumo da análise de variância para teor de Nitrogênio da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D)	46
Tabela 11	- Comparação de médias para as variáveis teor de nitrogênio da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> em diferentes doses de adubação nitrogenada.....	46

Tabela 12	-	Resumo da análise de variância para teor de fósforo da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D)	49
Tabela 13	-	Comparação de médias para as variáveis teor de fósforo da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> em diferentes doses de adubação nitrogenada.....	50
Tabela 14	-	Resumo da análise de variância para teor de potássio da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D)	52
Tabela 15	-	Comparação de médias para as variáveis teor de potássio da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> em diferentes doses de adubação nitrogenada.....	52
Tabela 16	-	Resumo da análise de variância para as variáveis: carbono da biomassa microbiana do solo (CBMS), respiração basal do solo (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO^2), avaliadas em solos sob influencia dos híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D)	57
Tabela 17	-	Comparação de médias para as variáveis: carbono da biomassa microbiana do solo (CBMS), respiração basal do solo (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO^2), avaliadas em solos sob influencia dos híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D)	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	A cultura do milho.....	17
2.2	O Nitrogênio na cultura do milho	18
2.3	A fixação biológica do nitrogênio (FBN)	18
2.4	Bactérias diazotróficas endofíticas.....	19
2.5	O Gênero <i>Azospirillum</i>	20
2.6	Respostas do milho à associação com bactérias do gênero <i>Azospirillum</i>	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Localização e clima da área experimental	23
3.2	Solo utilizado	24
3.3	Inoculante a base de <i>Azospirillum brasilense</i>	26
3.4	Material vegetal utilizado.....	26
3.4.1	<i>Híbrido de milho AG 1051</i>	26
3.4.2	<i>Híbrido de milho BM 3061</i>	27
3.5	Delineamento experimental e tratamentos	28
3.6	Instalação e condução	30
3.7	Variáveis analisadas	33
3.7.1	<i>Determinação do teor relativo de clorofila da folha de milho</i>	33
3.7.2	<i>Altura, diâmetro do colmo e área foliar das plantas de milho</i>	33
3.7.3	<i>Massa da matéria seca da parte aérea e sistema radicular</i>	34
3.7.4	<i>Teores de nutrientes na planta de milho</i>	35
3.7.5	<i>Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo</i>	35
3.7.6	<i>Respiração basal do solo</i>	35
3.7.7	<i>Quociente metabólico do solo</i>	35
3.8	Análises estatísticas	36
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	37
4.1	Altura, diâmetro do colmo, área foliar e teor de clorofila.....	37
4.2	Massa da matéria seca da parte aérea e sistema radicular.....	41
4.3	Teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) na planta de milho.....	45
4.4	Determinação do carbono da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico do solo.....	56

5	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de enorme importância no cenário mundial devido sua diversidade de utilização, além de ser fonte de alimentação humana e de animais domésticos constituindo-se em matéria-prima para uma série de produtos industrializados, criando e movimentando indústrias onde empregos são gerados refletindo diretamente nos aspectos socioeconômicos. No entanto, seus sistemas de produção devem ser aprimorados buscando aumento na rentabilidade por meio de maiores produtividade que essa cultura pode proporcionar. Atualmente, alguns estudos vêm sendo realizados com ênfase na utilização de bactérias diazotróficas visando possíveis benefícios no desenvolvimento de gramíneas, em especial o milho, e sua capacidade de associação aos diferentes genótipos dessa cultura.

O desenvolvimento de novas tecnologias que buscam a redução no uso de fertilizantes, especialmente os nitrogenados, é essencial para a sustentabilidade do sistema de produção do milho que se encontra em plena expansão. O uso de microrganismos na agricultura é uma alternativa amplamente pesquisada que busca a diminuição no uso de fertilizantes nitrogenados com consequente redução dos custos de produção e possível contaminação do meio ambiente.

Diante disso, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um importante processo bioquímico pelo qual bactérias associadas à planta transformam o N_2 da atmosfera em nitrogênio assimilável pelas plantas. Na FBN, bactérias com capacidade de fixar o nitrogênio utilizam parte da energia derivada da fotossíntese das plantas e, dessa forma, espécies vegetais capazes de se associarem de forma eficiente com bactérias diazotróficas aproveitam naturalmente o nitrogênio atmosférico, contribuindo para uma enorme economia de energia fóssil.

Recentemente, estudos com bactérias diazotróficas têm se intensificado graças não só à capacidade de fixar N, como também às suas potencialidades como agentes de promoção de crescimento em algumas espécies vegetais. O sucesso para inoculação depende de um criterioso processo de seleção, começando pela escolha de estirpes bacterianas eficientes quanto à capacidade de fixação biológica do nitrogênio e que produzam substâncias promotoras de crescimento de plantas, assim como, selecionar genótipos de plantas adaptados às diversas condições edafoclimáticas e que sejam propensos à colonização de bactérias diazotróficas (OLIVEIRA *et al.* 2006).

No Brasil, pesquisas com inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em milho têm sido realizadas priorizando-se o incremento de produtividade agrônômica e

economia no uso de fertilizantes minerais nitrogenados. Pequenos incrementos derivados da FBN numa cultura estratégica como o milho, podem representar para o Brasil, ganhos com a economia de recursos gastos com fertilizantes provenientes de fontes não renováveis.

Supõe-se que a inoculação de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum brasilense* em sementes de milho pode suprir total ou parcialmente as necessidades de nitrogênio para a cultura do milho. Essas bactérias devem proporcionar melhor absorção de nutrientes, favorecendo o estado nutricional e, conseqüente desenvolvimento das plantas. Outra suposição de interesse é a de que plantas de milho se associam com bactérias diazotróficas e podem se beneficiar da FBN, porém apresentam variações quanto aos diferentes genótipos.

O presente trabalho objetivou estudar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas associativas, sobre o crescimento e teores de nutrientes em dois híbridos de milho submetidos a quatro doses de adubações nitrogenadas e sobre a atividade microbiana do solo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais antigas do mundo, há indícios de que sua origem tenha sido na América Central mais precisamente no México (MACNEISH; EUBANKS, 2000), caracterizado como planta monocotiledônea, da família das Poaceae, é monóica, possui uma inflorescência masculina (pendão) e uma feminina (espiga) que, quando fecundada vai originar o grão classificado como fruto-semente (cariopse). Tem raízes fasciculadas, caule do tipo colmo com nós e entrenós e folhas paralelinérveas alternadas (MAGALHÃES *et al.*, 2002). O ciclo fenológico varia de 90 a 205 dias, dependendo do genótipo e do clima. É uma planta C4, sendo extremamente eficiente na conversão de CO₂, apresentando altas taxas de fotossíntese líquida, mesmo em elevados níveis de luz (TOLLENAAR; DWYER, 1999; FANCELLI, 2010).

Possuindo alta capacidade de adaptação as mais diferentes condições ambientais, o milho é considerado uma planta plástica, sendo cultivado desde regiões de baixas a altitudes mais elevadas, superiores a 2.500 m (TEIXEIRA *et al.*, 2002). Parte dessa adaptabilidade pode ser resultado de pesquisas com melhoramento genético que visam o desenvolvimento de cultivares cada vez mais produtivos indicados às mais distintas regiões.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial deste cereal tendo na safra 2013/2014 uma estimativa de colheita em torno 72 milhões de toneladas do grão. Estados Unidos e China ocupam a primeira e segunda posição, com uma produção estimada em 355,7 e 212 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2014). Os maiores produtores nacionais de milho são os estados do Paraná, Mato Grosso e Minas Gerais (CONAB, 2014).

Quanto à fertilidade do solo, o nitrogênio é o elemento mais requerido pelo milho, sendo também o que mais limita a produtividade. Para cada tonelada de grão produzido, são exigidos 20 kg ha⁻¹ deste nutriente (COELHO *et al.*, 2010). O nitrogênio é um dos responsáveis pelo aumento da produtividade e pelos teores de proteínas nos grãos e com sua deficiência, o potencial máximo de produção não é atingido, o que afeta a quantidade e a qualidade dos grãos produzidos. Além do nitrogênio, a cultura exige potássio e fósforo, aumentando ainda mais os custos de produção, nutrientes considerados importantes para o metabolismo das plantas (BAIRD, 2002).

2.2 O Nitrogênio na cultura do milho

O nitrogênio é um dos nutrientes fundamentais na cultura do milho, é absorvido pelas raízes e folhas na forma de $N-NO_3$ predominantemente e se relaciona com a produtividade da cultura, na germinação da semente na maturação do fruto e na senescência da planta (YAMADA; ABDALLA; VITTI, 2007).

Os solos tropicais, em sua maioria, são deficientes em N, não possuindo quantidades suficientes para que as plantas expressem seu máximo crescimento. Devido às transformações bioquímicas que o N está sujeito no solo, a recomendação de adubação nitrogenada é complexa e dependente das condições edafoclimáticas (CANTARELLA; DUARTE, 2004), alterando significativamente sua disponibilidade (WIETHOLTER, 1996). A recomendação de adubação nitrogenada para o milho é baseada na expectativa de produtividade de grãos e no teor de matéria orgânica do solo (ARGENTA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2010).

O nitrogênio aplicado como adubo mineral é requerido em grandes quantidades no solo, sobretudo pelas perdas decorrentes de práticas de manejos inadequadas e pela lixiviação, elevando assim os custos de produção da cultura (CANTARELLA, 2007). Dentre os fertilizantes mais utilizados se destaca a ureia, sendo um insumo energético derivado do petróleo que é uma fonte de matéria prima não renovável (REVISTA RURAL, 2009).

Quando convertido em amônia, o nitrogênio molecular é essencial ao metabolismo da planta, passando a fazer parte de sua estrutura na forma de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, coenzimas, ácidos nucleicos, citocromos, clorofila, hormônios e outras moléculas, a disponibilidade de nitrogênio no solo é um fator limitante para o desenvolvimento de muitas culturas (ZHANG; MACKENZIE; SMITH, 1994; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

2.3 A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)

A presença do nitrogênio no solo pode ocorrer através de processos biológicos, por eletrodeposição, pela decomposição da matéria orgânica e pela adubação mineral (TAIZ; ZEIGER, 2004). Embora o nitrogênio (N_2) seja abundante na atmosfera, representando certa de 78% dos gases que a constitui, a força da ligação existente entre seus dois átomos dificulta sua absorção pelas plantas.

Os gases atmosféricos se espalham pelas camadas porosas do solo, e com a reação do complexo enzimático da nitrogenase (pela ação das enzimas dinitrogenase redutase ou proteína Fe e nitrogenase ou proteína Fe-Mo), o nitrogênio molecular tem sua tripla ligação rompida transformando o gás N_2 em amônia (NH_3^+), sendo assim absorvido pelas bactérias fixadoras de nitrogênio e fornecido às plantas (POSTGATE, 1982; HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é uma alternativa ecológica e econômica aos fertilizantes nitrogenados, podendo até mesmo reduzir o uso desses insumos e ainda apresentar um maior aproveitamento do nitrogênio biologicamente fixado pelas plantas quando em associação (FRANCO; DÖBEREINER, 1994). A FBN é um processo microbiano amplamente estudado, principalmente por sua relação direta com a agricultura e considerada, após a fotossíntese, o mais importante processo biológico do planeta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Na natureza apenas os microrganismos procariotos denominados diazotróficos são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia, processo realizado pelo complexo da nitrogenase, que é um sistema enzimático que catalisa a reação (EADY; POSTGATE, 1974). Como potencial biotecnológico para a fixação de nitrogênio, os resultados mais expressivos apontam para a interação rizobium-leguminosas. No entanto existem ocorrências de aumentos significativos da disponibilidade de nitrogênio por meio da FBN para gramíneas (JAMES, 2000; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). O milho pode ser colonizado simultaneamente por uma diversidade de bactérias diazotróficas associativas, sendo uma cultura potencialmente viável para o processo de inoculação (ROESCH *et al.*, 2007).

2.4 Bactérias diazotróficas associativas endofíticas

As plantas vêm desenvolvendo ao longo de sua evolução complexos mecanismos de adaptação, interagindo com microrganismos. Dentre esses microrganismos têm-se destacado as bactérias diazotróficas endofíticas, que em pelo menos uma fase de seu ciclo de vida habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar nenhum dano aparente (PEIXOTO NETO *et al.*, 2004).

Os microrganismos do solo são responsáveis por desempenhar papel fundamental na ciclagem de nutrientes, dentre eles a ciclagem do nitrogênio e a sua fixação biológica a partir do N atmosférico, que é realizada por microrganismos procariotes denominados

diazotróficos, podendo ser de vida livre, estar associados a espécies vegetais, ou ainda, estabelecer simbiose, como acontece com as leguminosas (MOREIRA *et al.*, 2010).

As bactérias diazotróficas contribuem estrategicamente na sustentabilidade de diferentes ecossistemas, diretamente pela FBN, promovendo o aumento da solubilização e entrada de nutrientes, produção e liberação de substâncias que regulam o crescimento das plantas, tais como auxinas, giberelinas e citocininas (NERONI; CARDOSO, 2007).

As bactérias diazotróficas possuem a capacidade de sobreviverem em ambientes com baixa disponibilidade de nitrogênio, sendo bastante eficientes no processo de enriquecimento do local em que habitam através da produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas. A associação entre esses microrganismos e as plantas ocorrendo de forma eficiente, o N fixado pode suprir grande parte das necessidades do vegetal, minimizando o uso de fertilizantes nitrogenados e oferecendo vantagens econômicas e ecológicas (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

As bactérias que habitam o interior do tecido vegetal podem contribuir de forma mais eficiente para a FBN, já que a troca ocorre de forma direta e há menos competição por fontes de carbono (BALDANI *et al.*, 1997). Dessa forma as bactérias diazotróficas endofíticas são favorecidas porque o interior da planta representa um habitat mais protegido de outros microrganismos, além do maior acesso aos nutrientes disponibilizados pelas plantas (BALDANI; BALDANI, 2005). Muitos microrganismos podem contribuir para o crescimento de plantas por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, como o aumento da massa radicular, nutrição nitrogenada ou aumento da eficiência de absorção de nutrientes no solo (BASHAN *et al.*, 2004).

2.5 O Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias diazotróficas gram-negativas de vida livre, possuem forma de bastonete e usualmente são uniflageladas. Estão distribuídas principalmente em solos de clima tropical e subtropical, formam associações com raízes de gramíneas de grande importância econômica, como milho, arroz, trigo e diversas forrageiras, além de outras espécies vegetais (QUADROS, 2009).

A inoculação com *Azospirillum* promove ganhos em rendimentos de produção em diferentes culturas nas mais variadas condições de clima e solo. Além de contribuir com a fixação biológica do nitrogênio, essas bactérias produzem hormônios de crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas que estimulam a formação de pêlos radiculares e induz o

desenvolvimento de raízes secundárias, contribuindo com aumento da superfície de absorção das raízes da planta (HARTMAN; ZIMMER, 1994, OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

A princípio acreditava-se que essas bactérias habitavam somente a rizosfera, devido à facilidade em encontra-las colonizando as superfícies das raízes, hoje, sabe-se que essas bactérias associam-se as várias espécies vegetais de diferentes maneiras, sendo capazes de colonizar internamente os tecidos de raízes e da parte aérea das plantas sem causar sintomas de doença (TERVER; HOLLIS, 2002; HUERGO *et al.*, 2008).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são classificadas como associativas quando livres na rizosfera ou endofíticas facultativas quando presentes nos tecidos da planta. Vêm sendo estudadas pela sua interação com gramíneas, excretam o nitrogênio fixado suprimindo, assim, parte da necessidade desse elemento pela planta e por sintetizar ácido indolacético por diferentes vias, além de se comportarem como endofíticos facultativos capazes de colonizar toda a planta (KUSS *et al.*, 2007).

2.6 Respostas do milho à associação com bactérias do gênero *Azospirillum*

As plantas podem ser colonizadas por uma grande diversidade de bactérias endofíticas, sendo consideradas como um micro ecossistema possuindo diferentes habitats (CHELIUS; TRIPLETT, 2001). Para que ocorra a colonização, alguns aspectos devem ser favoráveis como escolha da estirpe, estado fisiológico da planta e da bactéria, genótipo da planta, aspectos físicos e químicos do solo, competição com outros microrganismos, veiculação entre outros (LODEWYCKX *et al.*, 2002).

Bactérias do gênero *Azospirillum* são utilizadas como inoculante em diversas culturas como cereais, algodão (*Gossypium hirsutum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), café (*Coffea* sp.) e forrageiras do gênero *Brachiaria*, influenciando positivamente no crescimento vegetal, no rendimento de safras e no conteúdo de N dessas culturas (REIS *et al.*, 2000).

O uso de inoculantes à base de *Azospirillum* tem sido recomendado na agricultura e ensaios experimentais em diversos países comprovaram que a adoção dessa tecnologia trouxe, na maioria dos casos, resultados positivos, podendo variar significativamente a produtividade entre as culturas (BURDMAN *et al.*, 2000; DOBBERLAERE *et al.*, 2001; LUCY *et al.*, 2004; DALLA SANTA *et al.*, 2004; KENNEDY *et al.*, 2004).

No milho, estudos relatam que a adoção desta tecnologia pode proporcionar redução de até 50% no uso de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA *et al.*, 2010). Moraes,

Brito e Ferreira (2012) em experimentos com e sem inoculação a base de *Azospirillum brasilense*, testando quatro doses de nitrogênio em quatro híbridos de milho em condições de casa de vegetação, constaram que o uso da inoculação pode incrementar a produtividade, verificaram aumento nos teores de clorofila e nutrientes quando utilizados 200 kg ha⁻¹ de nitrogênio e 200 mL ha⁻¹ de solução com *Azospirillum brasilense*.

O gênero *Azospirillum* tem sido bastante estudado dentre as bactérias capazes de fixar N em gramíneas (RADWAN *et al.*, 2004). Hungria *et al.* (2010), avaliando a combinação de duas estirpes de *Azospirillum* (AbV5 e AbV6) e o veículo para aplicação da bactéria na semente, obtiveram aumento na produção que chegou a 27%, isso em comparação com os controles não inoculados. Esse incremento na produção foi atribuído ao aumento da absorção de nutrientes pela cultura, nos tratamentos que receberam a inoculação e não apenas pela FBN.

3 MATERIAL E MÉTODOS

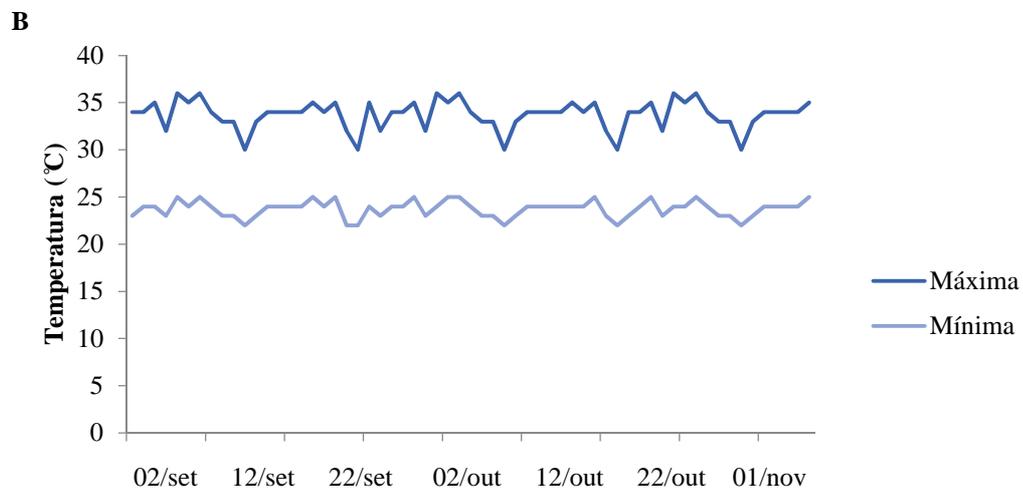
3.1 Localização e clima da área experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brasil, por um período de 90 dias. Segundo a classificação de Köppen a região apresenta um clima do tipo Aw' e estar a uma altitude de 20 m acima do nível do mar, com temperatura média anual de 26°C e precipitação média anual em torno de 1.350,0 mm (FUNCEME, 2013).

Figura 1 - Casa de vegetação (A) e temperaturas mínimas e máximas (B) durante o período de 02 de setembro a 01 de novembro de 2013 na casa de vegetação da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza-CE.



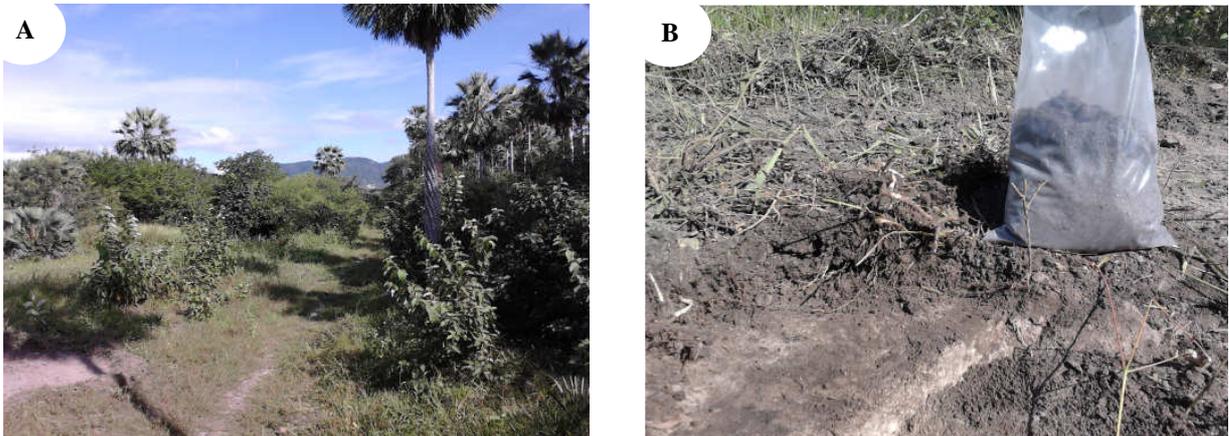
Fonte: Morais (2013)



3.2 Solo utilizado

O solo para preenchimento dos vasos foi coletado em área de mata nativa da Fazenda Experimental Raposa, de propriedade da Universidade Federal do Ceará, localizada no município de Maracanaú-CE (3°50'66" S e 38°38'38" W). Antes da instalação do experimento foi realizada a caracterização química e física do solo e, para análise, amostras simples foram retiradas da camada de 0-20 cm, homogeneizadas, formando uma amostra composta e enviada para o laboratório de análises de solo, água e plantas do Departamento de Ciências do Solo do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará. As características químicas e físicas são apresentadas na TABELA 1.

Figura 2 - Região de mata nativa (A) e amostragem do solo (B) na Fazenda Experimental Raposa, Maracanaú-CE.



Fonte: Morais (2013)

Tabela 1 - Características químicas e físicas do solo da área experimental amostrado na profundidade de 0-20 cm, na fazenda Raposa, Maracanaú-CE, 2013.

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS 0-20 cm																	
pH	CE	Ca²⁺	Mg²⁺	Na⁺	K⁺	H⁺ + Al³⁺	Al³⁺	S	T	V	M	PST	C	N	MO	C/N	P
	dS/m	----- cmol _c kg ⁻¹ -----					----- % -----				----- g kg ⁻¹ -----			mg kg ⁻¹			
4,7	0,24	0,90	0,90	0,07	0,19	3,30	1,40	2,1	5,4	39	40	1	2,88	0,27	4,97	11	4
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS 0-20 cm																	
Composição Granulométrica g kg⁻¹					Classificação Textural												
Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	Argila Natural													
461	318	143	78	24	Franco arenoso												

Análise química e física realizadas pelo laboratório de análises de solo, água e plantas, do Departamento de Ciências do Solo do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, CE.

3.3 Inoculante a base de *Azospirillum brasilense*

Para inoculação das sementes de milho, foi utilizado um produto comercial líquido oriundo de Cosmópolis-SP, contendo as estirpes AbV5 e AbV6 da bactéria *Azospirillum brasilense* em concentração mínima de 2×10^8 células viáveis mL^{-1} . O inoculante a base de bactérias fixadoras de nitrogênio atua fixando o N_2 do ar atmosférico e libera em forma de amônio (NH_4) às raízes das gramíneas. Esse inoculante possui características químicas descritas na TABELA 2.

Tabela 2 - Características químicas do produto comercial líquido contendo estirpes de bactéria *Azospirillum brasilense*.

RESULTADOS ANALÍTICOS										
N	P	P ₂ O ₅	K	K ₂ O	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
----- g L ⁻¹ -----							----- mg L ⁻¹ -----			
0,5	1,2	2,7	5,8	7,1	3,7	0,2	29,3	3,3	1,7	6,6

Análise química realizada pelo laboratório de análises de solo, água e plantas, do Departamento de Ciências do Solo do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, CE.

3.4 Material vegetal utilizado

3.4.1 Híbrido de milho AG 1051

O híbrido de milho AG 1051 é indicado principalmente para a fabricação de silagens e uma de suas características marcantes é apresentar grande quantidade de massa verde com grande poder de digestibilidade, se destacando também na produção de milho verde, sendo um dos híbridos mais plantados para essa finalidade.

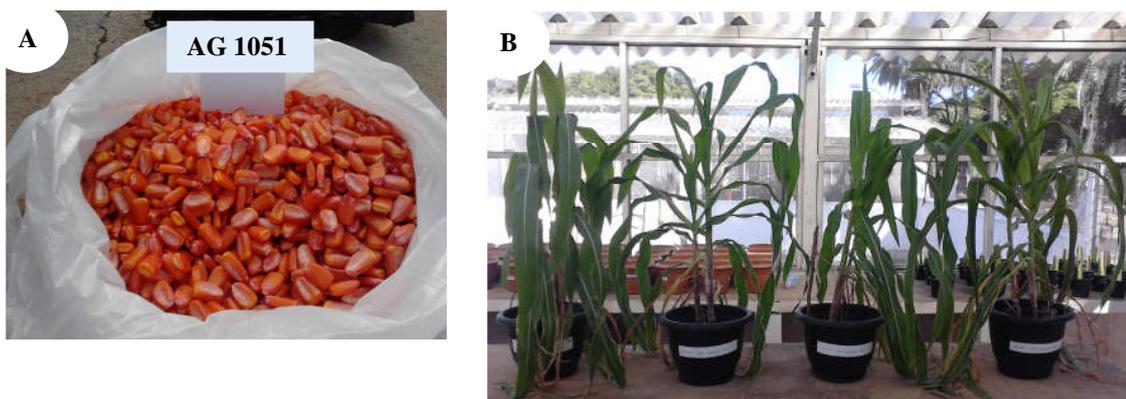
Seu ciclo é caracterizado como semiprecoce, o porte da planta é alto, inserção da espiga também alta, o grão é dentado amarelo, o empalhamento é indicado como excelente, a qualidade de colmo é boa e o sistema radicular é considerado excelente. A recomendação de plantio para regiões de até 500 m de altitude é que sejam plantadas de 45 a 50 mil plantas por hectare. O florescimento varia de acordo com a região de plantio, podendo variar de 60 a 89 dias (AGROCERES, 2014).

Tabela 3 - Características do híbrido de milho AG 1051.

Informações do híbrido AG 1051	
Ciclo	Semiprecoce
Porte da planta	Alto
Inserção da espiga	Alta
Grão	Dentado amarelo
Empalhamento	Excelente
Qualidade de colmo	Boa
Sistema radicular	Excelente
Finalidade de uso	Silagem de planta inteira e milho verde
Recomendação de plantio	45 a 55 mil plantas/há

Fonte: Departamento de Desenvolvimento de Produtos - Sementes Agrocere, (2014).

Figura 3 - Sementes de milho híbrido AG 1051 (A) e plantas com 60 dias após a emergência (B).



Fonte: Morais (2013)

3.4.2 Híbrido de milho BM 3061

É um híbrido de excepcionais resultados em silagens e também indicado na produção de milho verde, possui alto potencial produtivo, surpreende em rendimento de volume de massa verde de qualidade, palhas são macias, espigas cilíndricas e uniformes.

As plantas são de ciclo precoce, com porte alto que proporciona grande volume de massa verde, além de produzir espigas com alto valor nutricional, recomendado para produção de silagens de qualidade, os grãos são dentados permitindo maior período de colheita. Para a produção de silagens, a recomendação de plantio é de 55 a 65 mil plantas por hectare e para produção de milho verde a recomendação é de 35 a 55 mil plantas por hectare, sendo a época de plantio indicada de meados de setembro a fevereiro (BIOMATRIX, 2014).

Tabela 4 - Características do híbrido de milho BM 3061.

Informações do híbrido BM 3061	
Ciclo	Precoce
Porte da planta	Alto
Inserção da espiga	Alta
Grão	Dentado
Empalhamento	Palhas macias
Qualidade de colmo	Boa
Sistema radicular	Excelente
Finalidade de uso	Silagem de planta inteira e milho verde
Recomendação de plantio	35 a 65 mil plantas/há

Fonte: Departamento de Pesquisas e desenvolvimento Biomatrix - Universidade de Wisconsin, (2014).

Figura 4 - Sementes de milho híbrido BM 3061 (A) e plantas com 60 dias após a emergência (B).



Fonte: Morais (2013)

3.5 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, avaliando-se dois híbridos de milho (AG 1051 e BM 3061) os tratamentos foram dispostos no esquema fatorial 2 x 4, com quatro repetições, sendo que os fatores foram: com inoculação e sem inoculação com o produto comercial a base de *Azospirillum brasilense* e o outro quatro diferentes doses de N (0; 0,5; 1,0 e 1,5 g vaso⁻¹). Foram utilizados um total de 64 vasos.

Tabela 5 - Descrição dos tratamentos utilizados no experimento em casa de vegetação.

Tratamentos	Híbridos	Inoculação	Doses de N (g vaso⁻¹)
T1 (controle)	AG 1051	sem	0
T2	AG 1051	com	0
T3	AG 1051	sem	0,5
T4	AG 1051	com	0,5
T5	AG 1051	sem	1,0
T6	AG 1051	com	1,0
T7	AG 1051	sem	1,5
T8	AG 1051	com	1,5
T9 (controle)	BM 3061	sem	0
T10	BM 3061	com	0
T11	BM 3061	sem	0,5
T12	BM 3061	com	0,5
T13	BM 3061	sem	1,0
T14	BM 3061	com	1,0
T15	BM 3061	sem	1,5
T16	BM 3061	com	1,5

Figura 5 - Disposição do arranjo experimental dos tratamentos em casa de vegetação.



Fonte: Morais (2013)

3.6 Instalação e condução do experimento

Este experimento foi realizado em vasos plásticos, na casa de vegetação da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza-CE, durante os meses de agosto, setembro e outubro de 2013.

O solo utilizado no experimento foi coletado a uma profundidade de 0-20 cm, na Fazenda Raposa, localizada no município de Maracanaú-CE. Amostras do solo foram utilizadas para realização de análises físicas e químicas. O solo do experimento foi transportado, destorroado, peneirado e acondicionados cerca de 7 kg por vaso. Com base nos resultados da análise química foi feita a correção da fertilidade do solo conforme recomendação do Manual de adubação e calagem para Estado do Ceará (AQUINO *et al.*, 1993).

Para elevação do nível de Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg) do solo, foram aplicadas 4 g de calcário dolomítico por vaso, o solo apresentou um valor inicial de pH 4,7 (TABELA 1). Após a aplicação incubou-se o solo por um período de reação que durou 30 dias, mantendo-se a umidade do solo em torno da capacidade de campo com irrigações periódicas até quando apresentou valor de pH 6,05. Posteriormente, em cada vaso foram semeadas quatro sementes a 3 cm de profundidade, sendo que os genótipos de milho utilizados foram os híbridos AG 1051 e BM 3061.

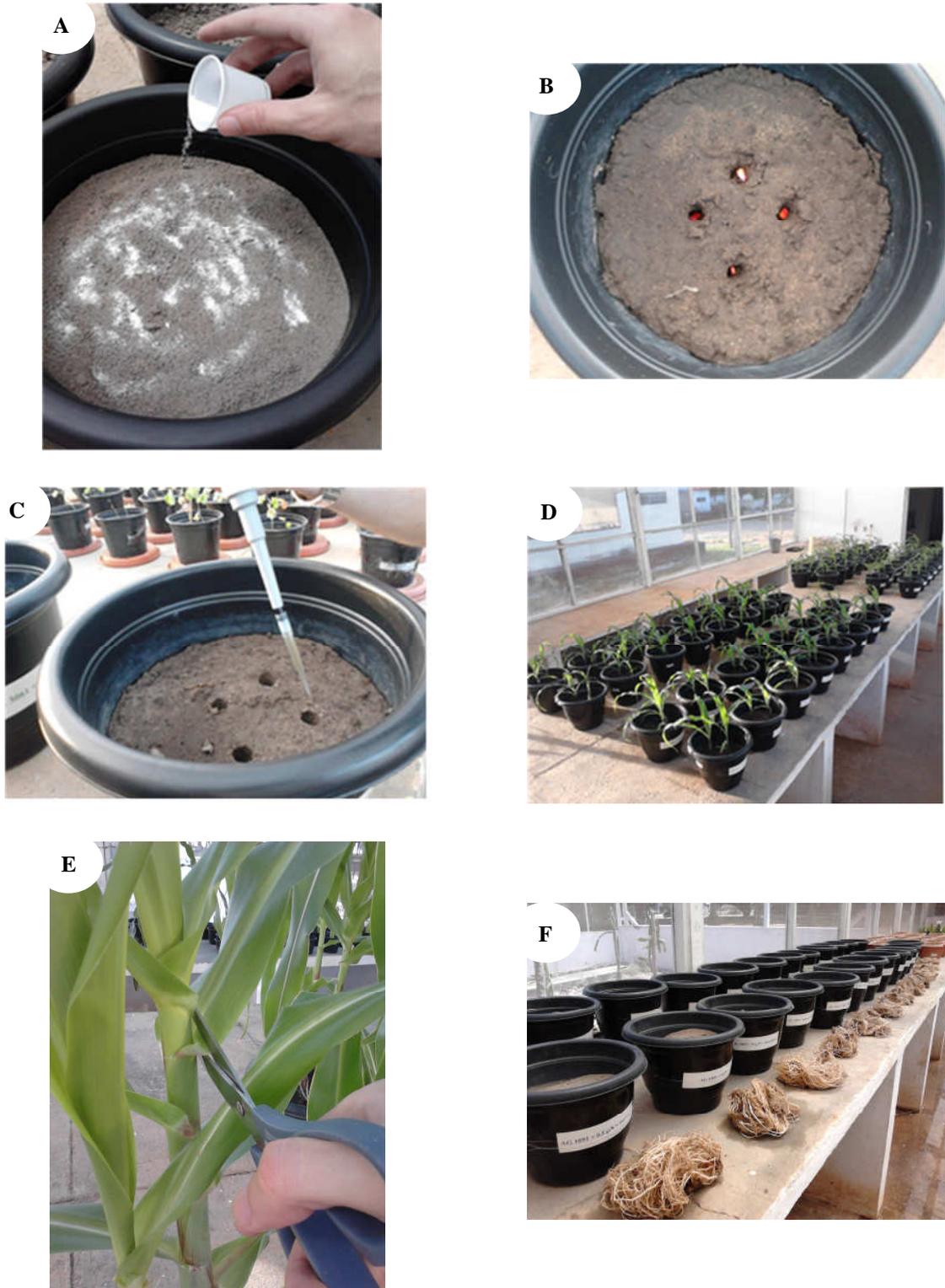
Para inoculação das sementes foi utilizado um produto comercial líquido contendo estirpes de bactéria *Azospirillum brasilense* em concentração mínima de 2×10^8 células viáveis mL^{-1} os tratamentos inoculados receberam aplicação do inoculante na ocasião do plantio e uma reinoculação dez dias após a primeira aplicação, adicionando-se com auxílio de uma pipeta graduada 1 ml do produto diretamente nas sementes e na reinoculação no colo das plantas, mesmo período em que foi realizado o desbaste deixando duas plantas por vaso. Após sete dias do plantio todos os tratamentos foram adubados com 1,77 g de Superfosfato Triplo (37% de P_2O_5), equivalendo a 0,8 g de P_2O_5 por vaso. A adubação com Cloreto de Potássio (58% de K_2O) foi parcelada em duas etapas, a primeira aplicação no dia seguinte a adubação fosfatada e a segunda vinte dias após a primeira, sendo fornecido em cada adubação 0,83 g de Cloreto de Potássio equivalendo a 0,5 g de K_2O , totalizando um valor final de 1g de K_2O por vaso.

Para os tratamentos que receberam adubação nitrogenada, a fonte de N utilizada foi o Sulfato de Amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, aplicado de forma parcelada em até três etapas, de acordo com a quantidade de N requerida pelos tratamentos. Os tratamentos que requeriam 0,5 g de N receberam apenas uma aplicação de 2,77 g de Sulfato de Amônio (20% de N) nove

dias após o plantio. Os tratamentos que requeriam 1 g de N receberam uma segunda aplicação de 2,77 g de Sulfato de Amônio quinze dias após a primeira, enquanto que os tratamentos que requeriam 1,5 g de N receberam uma terceira aplicação de 2,77 g de Sulfato de Amônio, quinze dias após a segunda aplicação.

Após 60 dias do plantio, as plantas foram coletadas na ocasião do aparecimento da inflorescência feminina, período onde a concentração de nutrientes é maior em seu tecido vegetal, conforme metodologia proposta por Ritchie *et al.*, 2003.

Figura 6 - Instalação e condução do experimento: aplicação de calcário dolomítico (A), plantio (B), inoculação das sementes (C), disposição das plantas em casa de vegetação (D), colheita do experimento (E) e retirada das raízes dos vasos (F).



Fonte: Morais (2013)

3.7 Variáveis analisadas

3.7.1 *Determinação do teor relativo de clorofila da folha*

A coleta e as análises biométricas do experimento foram realizadas 60 dias após o plantio, todavia previamente à coleta das plantas foi determinado o teor relativo de clorofila nas folhas, através da leitura SPAD (*Soil Plant Analysis Development*), utilizando-se um clorofilômetro eletrônico, marca Konica Minolta modelo SPAD-502Plus; as leituras foram realizadas na região do terço superior da última folha completamente expandida de cada planta.

Figura 7 - Determinação do teor relativo de clorofila nas folhas de milho com clorofilômetro.

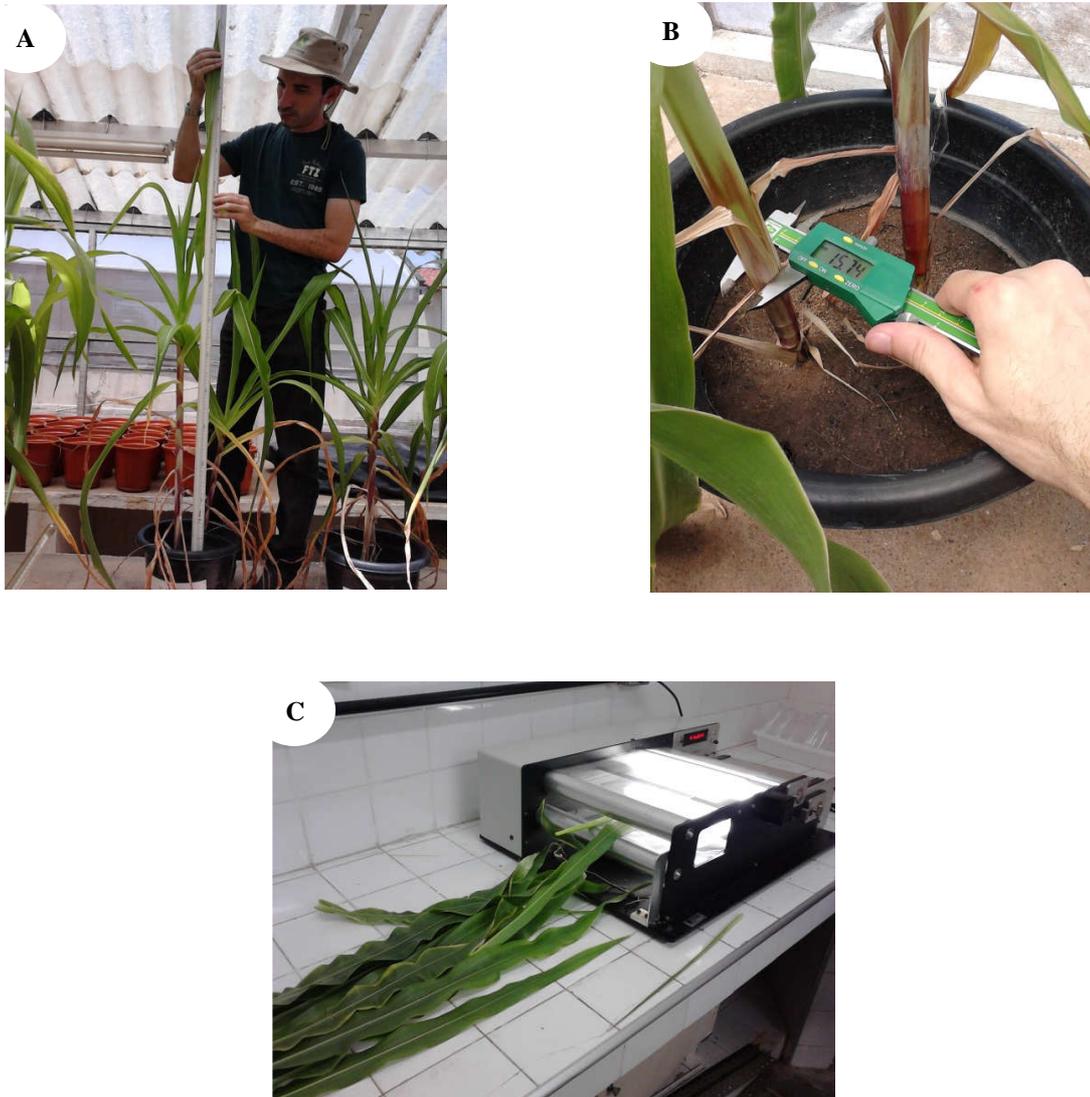


Fonte: Morais (2013)

3.7.2 *Altura, diâmetro do colmo e área foliar das plantas de milho*

Foi mensurada a altura de plantas (cm) e diâmetro dos colmos (mm) com auxílio de uma régua graduada e paquímetro digital, respectivamente. A altura das plantas de milho compreendeu a região do colo e a inserção da última folha completamente desenvolvida, ainda na região do colo determinou-se o diâmetro do colmo com um paquímetro digital, considerando-se o maior diâmetro do colmo. A determinação da área foliar foi realizada por método direto, em que as folhas foram coletadas e medidas, utilizando-se um integrador de área foliar, LI-3100 (LI-COR, inc. Lincoln, Nebraska USA) (LI-COR, 1996).

Figura 8 - Determinação da altura (A), diâmetro do colmo (B) e área foliar (C).



Fonte: Morais (2013)

3.7.3 *Massas da matéria seca da parte aérea e sistema radicular*

As plantas coletadas foram seccionadas em diferentes partes, sendo avaliadas as massas da matéria seca das folhas, do colmo e do sistema radicular. Após posterior separação das partes da planta e lavagem do sistema radicular com água corrente, visando a remoção de quaisquer impurezas do material vegetal, as amostras foram acondicionadas separadamente em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 65-70°C até massa constante para determinação da massa da matéria seca. Foram pesadas separadamente em uma balança com sensibilidade de 0,01 g.

3.7.4 Teores de nutrientes na planta de milho

Para a avaliação do estado nutricional das plantas de milho a coleta deu-se 60 dias após o plantio, no início do aparecimento da inflorescência feminina, seccionou-se as plantas em folhas, colmos e raízes.

Para o diagnóstico nutricional das folhas foi feita a coleta da quarta folha a partir do ápice nas duas plantas de cada vaso, já para os colmos e raízes não houve distinções. Em seguida, o material vegetal foi separado em sacos de papel e levados à estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 65 °C até massa constante, posteriormente, as amostras foram moídas em moinho do tipo Willey e peneiradas em malha de 20 mm. Daí então, parte do material foi submetido à digestão sulfúrica para determinação do conteúdo de nitrogênio e outra parte submetido à digestão nitro-perclórica para se determinar os teores de fósforo e potássio (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

3.7.5 Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo

O carbono da biomassa microbiana do solo estudado foi determinado pelo método da fumigação-extração apresentado por Vance *et al.* (1987) com adaptações propostas por Silva, Azevedo e De-Polli (2007). A relação solo extrator 1:2,5 conforme Tate *et al.* (1998) sendo o fator de correção $K_c = 0,33$ preconizado por Sparling e West (1988), a fumigação sendo realizada com adição de clorofórmio diretamente nas amostras, mantendo-as em local escuro por um período de 24 horas como descrito por Brookes *et al.* (1982) e Witt *et al.* (2000), a extração e quantificação do carbono microbiano do solo procedeu-se conforme o método descrito por Walkley e Black (1934) com adaptação proposta por Tedesco *et al.* (1995) sem o aquecimento externo em chapa.

3.7.6 Respiração basal do solo

A respiração basal do solo foi estimada pelo método desenvolvido por Walter e Haber (1957) com adaptações de Alef (1995), as amostras de solo foram mantidas pré-incubadas por oito dias após terem suas umidades corrigidas para 60% da capacidade de campo. Posteriormente a respiração basal do solo foi monitorada por um período de dez dias.

3.7.7 Quociente metabólico do solo

O quociente metabólico do solo (qCO_2) foi determinado pela razão entre respiração basal do solo (RBS) por quantidade de carbono da biomassa microbiana (CBMS),

estimando-se assim, a eficiência metabólica microbiana no solo, em função dos diferentes tratamentos aplicados.

3.8 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do programa computacional SISVAR-2000, de acordo com Ferreira (2000). Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos às análises de variância e, mediante constatação de diferença significativa, foi aplicado teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação dos fatores qualitativos (inoculação) e análise de regressão para os fatores quantitativos (doses).

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Altura, diâmetro do colmo, área foliar e teor de clorofila das plantas de milho

O resumo da análise de variância para os dados relativos à altura, diâmetro do colmo, área foliar e teor de clorofila das plantas de milho cultivadas em condições de casa de vegetação revela que houve efeitos significativos atribuídos apenas ao fator isolado doses de nitrogênio, independentemente da inoculação com *Azospirillum brasilense*. Para avaliação não foi verificada interação significativa a 5% para os parâmetros avaliados, com isso a interação entre os fatores não apresentou efeitos significativos (TABELA 6).

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para as variáveis: altura, diâmetro do colmo, área foliar e teor relativo de clorofila, avaliado em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D).

Fontes de variação	Testes F (significância)							
	Altura		Diâmetro do colmo		Área foliar		Teor de clorofila	
	AG	BM	AG	BM	AG	BM	AG	BM
Inoculação (I)	2,323 ^{ns}	1,074 ^{ns}	0,115 ^{ns}	2,361 ^{ns}	0,399 ^{ns}	0,010 ^{ns}	0,622 ^{ns}	0,539 ^{ns}
Doses (D)	11,886 ^{**}	12,389 ^{**}	9,326 ^{**}	7,824 ^{**}	67,166 ^{**}	44,211 ^{**}	111,369 ^{**}	23,718 ^{**}
Interação I x D	0,443 ^{ns}	1,394 ^{ns}	0,453 ^{ns}	0,615 ^{ns}	0,923 ^{ns}	0,857 ^{ns}	0,304 ^{ns}	0,754 ^{ns}
Blocos	0,328 ^{ns}	8,495 ^{**}	1,528 ^{ns}	5,410 ^{**}	1,309 ^{ns}	2,045 ^{ns}	0,405 ^{ns}	1,441 ^{ns}
CV (%)	11,60	7,94	9,59	9,35	16,47	15,90	7,90	16,98

^{**}, * e ^{ns}: Significativo a 1, 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente.

Conforme resultados apresentados na TABELA 7, verificou-se que não houve efeito significativo resultante da inoculação ou não com *Azospirillum brasilense* nas sementes dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061. No entanto, comparando-se os híbridos, foi observado que o híbrido BM 3061 promoveu maior crescimento da parte aérea, apresentando, portanto maiores valores para altura 1,26 m, diâmetro do colmo 16,89 mm e área foliar 2620,28 cm², porém o híbrido AG 1051 apresentou-se com maior teor relativo de clorofila 29,69 ICF.

Tabela 7 - Comparação de médias para as variáveis: altura (m), diâmetro do colmo (mm), área foliar (cm²) e teor de clorofila (ICF).

Inoculação	Altura (m)		Diâmetro do colmo (mm)		Área foliar (cm ²)		Teor de clorofila ¹ (ICF)	
	AG	BM	AG	BM	AG	BM	AG	BM
Sem	1,18a	1,26a	15,87a	16,89a	1991,56a	2620,28a	29,69a	24,48a
Com	1,11a	1,22a	15,69a	16,06a	2066,22a	2605,58a	29,62a	25,58a

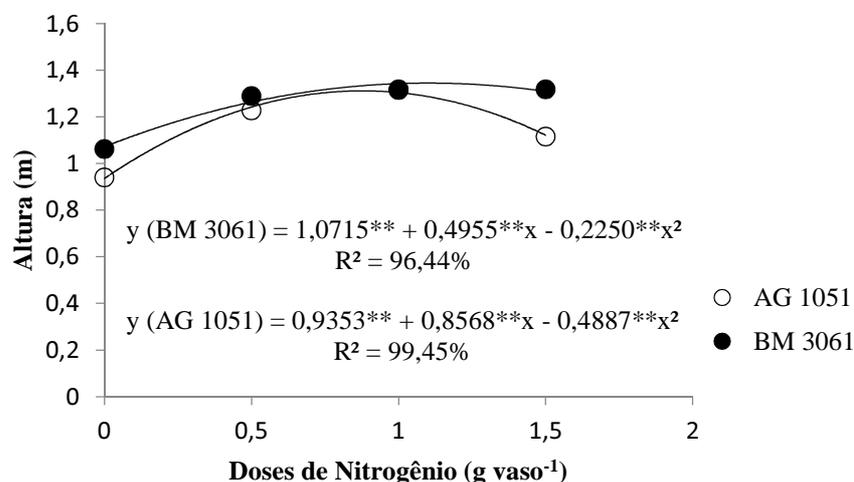
Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

¹médias expressa em ICF (Índice de Clorofila Falker).

Os valores de crescimento em altura de plantas para os híbridos AG 1051 e BM 3061 se ajustaram a um modelo de respostas quadrático (FIGURA 9). As doses de nitrogênio aplicadas nos tratamentos equivalentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em valores médios de alturas de plantas correspondentes à (0,93; 1,24; 1,30 e 1,12 m), respectivamente, para o híbrido AG 1051 e para o híbrido BM 3061 os valores em alturas foram (1,07; 1,26; 1,34 e 1,30 m), respectivamente para cada dose avaliada. Maiores valores em altura de plantas de milho foram correspondentes à dose 1 g de nitrogênio em ambos os híbridos avaliados.

Ausência de resposta à altura de plantas em função da inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* e aplicações de adubação nitrogenada na semeadura e em cobertura na cultura do milho também foi evidenciada por Campos *et al.* (2000) e Cavallet *et al.* (2000). Assim como, Cardoso *et al.* (2008) em estudo avaliando o desenvolvimento de plantas de milho em dosagens crescentes de adubação nitrogenada aplicadas, observaram comportamento quadrático semelhante ao desse estudo, constatando que elevadas doses de N pode prejudicar o crescimento de plantas de milho.

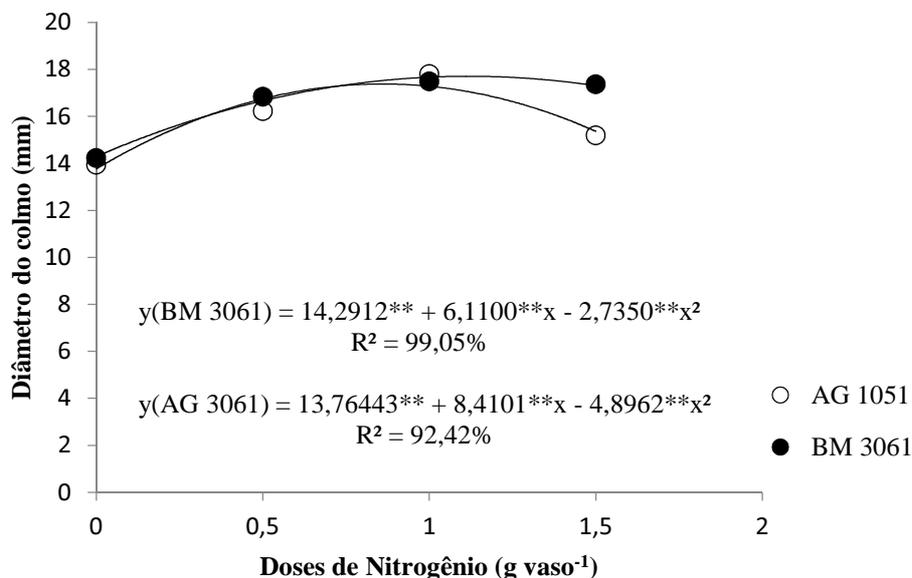
Figura 9 - Altura média dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso⁻¹).



Várias pesquisas relataram que a inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do milho não causaram efeitos em crescimento da planta. Dotto *et al.* (2010) e Bartchechen *et al.* (2010), em experimentos testando diferentes híbridos de milho inoculados ou não com bactérias do gênero *Herbaspirillum* e diferentes doses de adubação nitrogenada em cobertura não constataram influencia decorrente da bactéria, ao mesmo tempo, apresentaram respostas diferenciadas entre os híbridos estudados.

Os valores de diâmetro do colmo para os híbridos AG 1051 e BM 3061 também se ajustaram a um modelo de respostas quadrático (FIGURA 10). As doses de nitrogênio aplicadas nos tratamentos correspondentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em valores médios de diâmetros do colmo correspondentes à (13,76; 16,76; 17,27 e 15,36 mm), respectivamente, para o híbrido AG 1051 e para o híbrido BM 3061 os valores em diâmetro do colmo foram (14,29; 16,66; 17,66 e 17,30 mm), respectivamente para cada dose avaliada. Para o diâmetro do colmo, maiores resultados também foram observados na dose equivalente a 1 g de nitrogênio. No entanto, Meira *et al.* (2009) estudando combinações de doses de nitrogênio na cultura do milho não encontraram diferenças significativas quanto ao diâmetro do colmo.

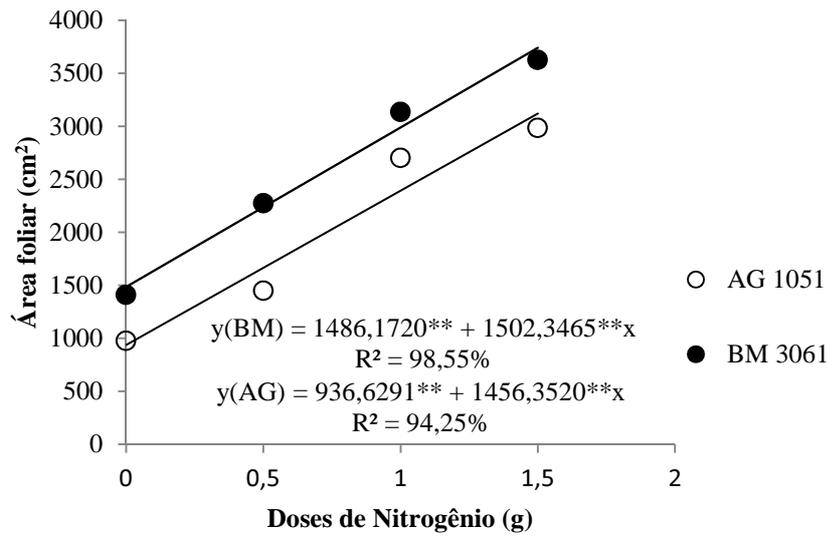
Figura 10 - Diâmetro médio do colmo dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso⁻¹).



Os valores em área foliar para os híbridos AG 1051 e BM 3061 se ajustaram a um modelo de respostas linear (FIGURA 11). As doses de nitrogênio equivalentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em valores médios em área foliar correspondentes à (936,62; 1664,80; 2392,98 e 3121,15 cm²), respectivamente, para o híbrido AG 1051 e para o híbrido

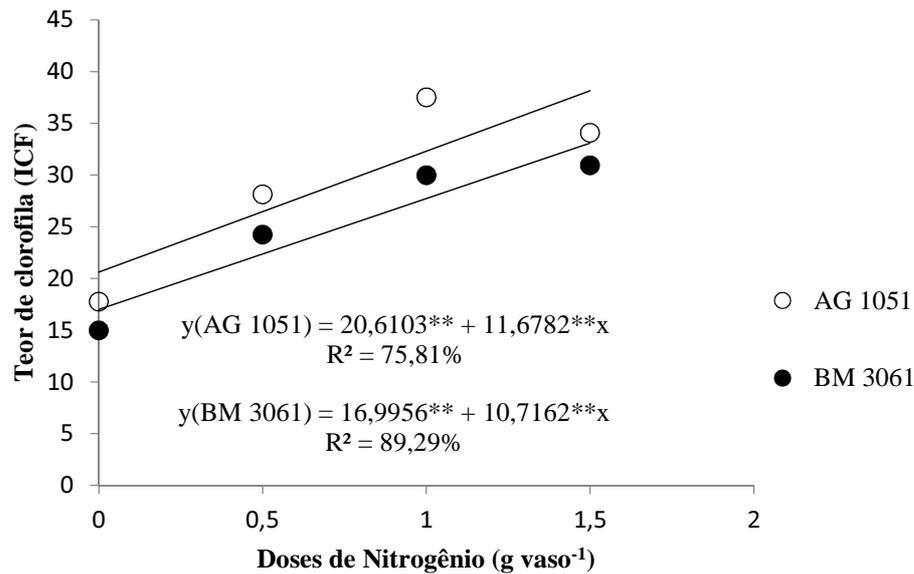
BM 3061 os valores de área foliar foram (1486,17; 2237,34; 2988,51 e 3739,69 cm²), respectivamente para cada dose avaliada. Conseqüentemente, maiores valores de área foliar foram correspondentes à dose 1,5 g de nitrogênio em ambos os híbridos avaliados.

Figura 11 - Área foliar dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso⁻¹).



Para o teor de clorofila nas folhas dos híbridos de milho, os valores encontrados também se ajustaram a um modelo de respostas linear (FIGURA 12). As doses de nitrogênio equivalentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em valores médios de teor de clorofila correspondentes à (20,61; 26,44; 32,28 e 38,12 ICF), respectivamente, para o híbrido AG 1051 e para o híbrido BM 3061 os valores em teor de clorofila foram (16,99; 22,35; 27,71; 33,07 ICF), respectivamente para cada dose avaliada. Para o teor de clorofila, houve aumento crescente mediante maiores doses de nitrogênio aplicadas nos tratamentos, no entanto, observou-se que o híbrido AG 1051 apresentou maior teor de clorofila do que o híbrido BM 3061 para todas as doses estudadas.

Figura 12 - Teor de clorofila dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso^{-1}).



Quanto ao teor relativo de clorofila a inoculação com *Azospirillum* não surtiu efeito, enquanto que houve incremento dessa variável resultante da adição de fertilizante nitrogenado. Martins *et al.* (2008), relataram que a disponibilidade de N no ambiente influenciou diretamente no teor de clorofila em plantas de milho. Esse resultado pode ser justificado pelo papel que o nitrogênio tem sobre o metabolismo das plantas, sendo fundamental no processo de biossíntese de proteínas e clorofilas.

Segundo Schadchina e Dmitrieva (1995), o teor de clorofila da folha se correlaciona positivamente com o teor de N na planta e com o rendimento das culturas. Possivelmente, isso ocorre pelo fato de que 50 a 70% do N das folhas serem integrantes de enzimas que estão associadas aos cloroplastos (CHAPMAN; BARRETO, 1997).

4.2 Massa da matéria seca da parte aérea e sistema radicular

Neste ensaio, o resumo da análise de variância para o acúmulo de massa da matéria seca das diferentes partes das plantas de milho revela que houve efeitos significativos atribuídos apenas ao fator isolado doses de nitrogênio, assim a inoculação com *Azospirillum brasilense* tampouco a interação entre os fatores inoculação e doses de nitrogênio não apresentaram efeitos significativos para a massa da matéria seca das folhas, colmo e raiz nos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061 (TABELA 8).

Tabela 8 - Resumo da análise de variância para as variáveis: massa da matéria seca das folhas, massa da matéria seca do colmo e massa da matéria seca da raiz, avaliadas em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada(D).

Fonte de variação	Testes F (significância)					
	Massa seca das folhas		Massa seca do colmo		Massa seca da raiz	
	AG	BM	AG	BM	AG	BM
Inoculação (I)	0,003 ^{ns}	0,019 ^{ns}	1,789 ^{ns}	0,784 ^{ns}	0,681 ^{ns}	2,608 ^{ns}
Doses (D)	46,880 ^{**}	32,732 ^{**}	456,367 ^{**}	6,804 ^{**}	250,270 ^{**}	201,052 ^{**}
Interação I x D	0,723 ^{ns}	0,458 ^{ns}	0,454 ^{ns}	2,318 ^{ns}	1,423 ^{ns}	0,360 ^{ns}
Blocos	1,824 ^{ns}	3,154 [*]	1,159 ^{ns}	0,210 ^{ns}	0,259 ^{ns}	0,072 ^{ns}
CV (%)	12,11	14,03	3,65	36,70	8,59	6,89

^{**}, ^{*} e ^{ns}: Significativo a 1 e 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente.

Valores apresentados na TABELA 9 apontam que a inoculação com *Azospirillum* não promoveu efeitos significativos no conteúdo de massa da matéria seca das folhas, do colmo e da raiz dos híbridos de milho avaliados. Porém, quanto ao quesito massa seca das diferentes partes da planta de milho, nota-se que o híbrido de milho BM 3061, mesmo não sendo beneficiado pela inoculação apresentou valores superiores em conteúdo de massa da matéria seca das folhas 14,35; colmo 21,51 e raiz 13,81 g planta⁻¹ quando comparado ao híbrido AG 1051 (TABELA 9).

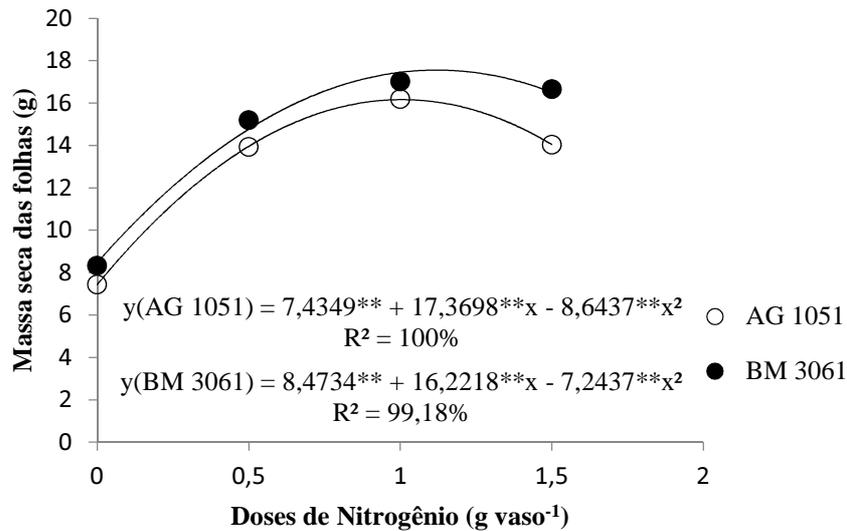
Tabela 9 - Comparação de médias para as variáveis: massa da matéria seca das folhas, massa da matéria seca do colmo e massa da matéria seca da raiz.

Inoculação	Massa seca das folhas (g)		Massa seca do colmo (g)		Massa seca da raiz (g)	
	AG	BM	AG	BM	AG	BM
Sem	12,88a	14,25a	9,45a	21,51a	9,09a	10,20a
Com	12,91a	14,35a	9,62a	19,18a	9,32a	10,61a

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

Para massa da matéria seca das folhas dos híbridos de milho, os valores encontrados se ajustaram a um modelo de respostas quadrático (FIGURA 13). As doses de nitrogênio equivalentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em valores médios de massa seca das folhas correspondentes à (7,43; 13,95; 16,16 e 14,04 g planta⁻¹), respectivamente, para o híbrido AG 1051 e para o híbrido BM 3061 os valores em massa seca das folhas foram (8,47; 14,77; 17,45 e 16,50 g planta⁻¹), respectivamente para cada dose avaliada. Para a massa da matéria seca das folhas os maiores valores foram correspondentes à dose 1 g vaso⁻¹ de N.

Figura 13 - Massa da matéria seca das folhas dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso⁻¹).

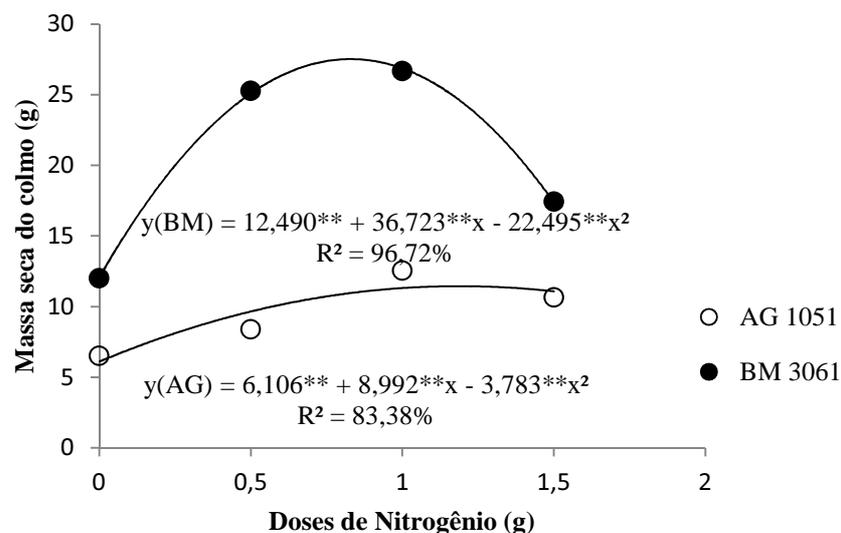


Ausência de respostas à inoculação de sementes de milho com *Azospirillum* sobre a massa da matéria seca da planta, também são relatadas em alguns estudos. Verona *et al.* (2010), não observaram diferença significativa para a massa seca da parte aérea e massa seca de raiz em plantas de milho inoculadas. Assim como, Roberto *et al.* (2010), em estudo de resposta do milho, à aplicação de diferentes doses de inoculante a base de *Azospirillum* nas sementes não encontraram variação sobre o acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca de raiz da planta. Corroborando com resultados observados nesse estudo, onde a inoculação não promoveu efeito sobre a massa da matéria seca da parte aérea e raiz das plantas dos híbridos de milho avaliados.

No entanto, efeitos positivos da inoculação com *Azospirillum* para o acúmulo da massa seca de plantas de milho também são evidenciados. Reis Júnior *et al.* (2008) e Quadros (2009), observaram incremento na massa seca da planta de milho, avaliando inoculação com *Azospirillum* em associação com adubação nitrogenada. Consideraram que o aumento do rendimento da massa seca seja em função à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias.

Para massa da matéria seca do colmo dos híbridos de milho, os valores encontrados se ajustaram a um modelo de respostas quadrático (FIGURA 14). As doses de nitrogênio equivalentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em valores médios de massa seca do colmo correspondentes à (6,10; 9,65; 11,31 e 11,08 g planta⁻¹), respectivamente, para o híbrido AG 1051 e para o híbrido BM 3061 os valores em massa seca do colmo foram (12,49; 25,22; 26,71 e 16,96 g planta⁻¹), respectivamente para cada dose avaliada. Para a massa da matéria seca do colmo os maiores valores foram correspondentes à dose 1 g de nitrogênio. Quanto às diferentes doses, constatou-se diferença significativa entre os tratamentos, enquanto que a inoculação com *Azospirillum* não apresentou resultados estatisticamente significativos quanto à variação em quantidade de massa seca do colmo nos híbridos de milho, mesmo na presença de diferentes doses de adubação nitrogenada.

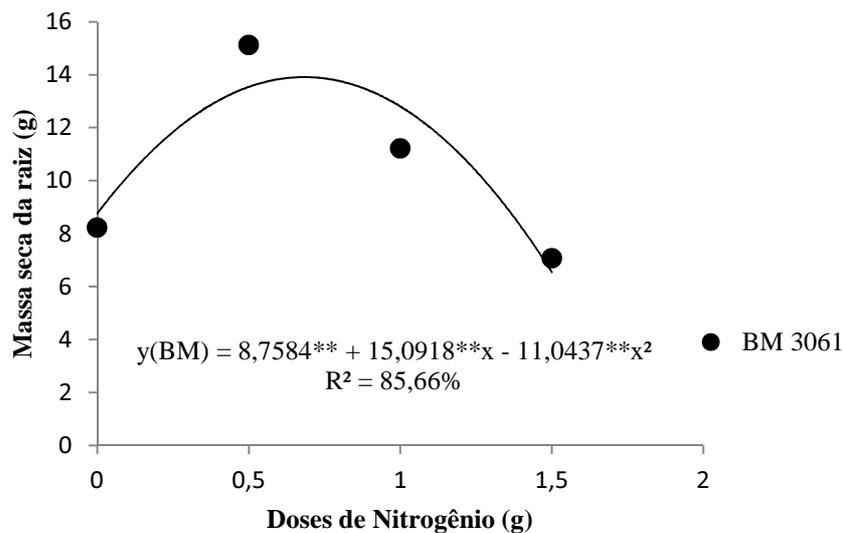
Figura 14 - Massa seca do colmo dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso⁻¹).



Para massa da matéria seca da raiz do híbrido de milho AG 1051 os fatores inoculação, doses de nitrogênio e suas interações não se enquadraram em nenhum dos padrões de respostas linear ou quadrático. No entanto, houve efeitos isolados atribuídos às diferentes doses de nitrogênio aplicadas para esse híbrido, as doses equivalentes à 0,5 e 1 g de nitrogênio resultaram em valores médios de massa seca da raiz correspondentes à 12,40 e 12,29 g planta⁻¹. Em relação ao híbrido de milho BM 3061 valores encontrados se ajustaram a um modelo de respostas quadrático (FIGURA 15). As doses de nitrogênio equivalentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em valores médios de massa seca da raiz correspondente à (8,75; 13,54;

12,80 e 6,54 g planta⁻¹), respectivamente para cada dose avaliada. Para a massa da matéria seca das raízes os maiores valores foram correspondentes às doses 0,5 e 1 g de nitrogênio nos dois híbridos avaliados, o híbrido BM 3061 apresentou maiores valores de massa seca da raiz em relação ao híbrido AG 1051, independentemente das doses de nitrogênio aplicadas.

Figura 15 - Massa da matéria seca da raiz do híbrido de milho BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso⁻¹).



4.3 Teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) na planta de milho

Os resultados da análise de variância revelam efeitos significativos dos fatores isolados da inoculação e doses de adubação nitrogenada sobre o acúmulo de potássio da parte aérea do híbrido AG 1051, já para o híbrido BM 3061 efeitos significativos para o teor de fósforo da parte aérea e do potássio da raiz. O fator isolado doses de nitrogênio apresentou significância para o teor de nitrogênio da parte aérea e da raiz do híbrido BM 3061 e para o híbrido AG 1051 significância somente para o acúmulo de nitrogênio na raiz. Houve interação significativa dos fatores estudados sobre o acúmulo de nitrogênio da parte aérea do híbrido AG 1051, assim como, para o acúmulo de fósforo da parte aérea. Em relação ao híbrido BM 3061 apresentou interação significativa sobre o acúmulo do potássio somente da parte aérea.

Os valores para teor de nitrogênio dos híbridos de milho evidenciam efeito significativo da interação inoculação e doses de nitrogênio apenas para a parte aérea no híbrido AG 1051. Os teores de nitrogênio na parte aérea e nas raízes apresentam-se como efeitos significativos isolados no híbrido BM 3061, somente quando a fonte de variação for doses de nitrogênio, assim como na raiz do híbrido AG 1051 (TABELA 10).

Tabela 10 - Resumo da análise de variância para teor de nitrogênio da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D).

Fonte de variação	Testes F (significância)			
	Parte aérea		Raiz	
	AG	BM	AG	BM
Inoculação (I)	20,368**	0,030 ^{ns}	0,403 ^{ns}	2,522 ^{ns}
Doses (D)	878,603**	194,321**	26,446**	4,362*
Interação I x D	4,705*	1,484 ^{ns}	4,211 ^{ns}	1,064 ^{ns}
Blocos	1,158 ^{ns}	0,378 ^{ns}	0,098 ^{ns}	5,862**
CV (%)	5,36	10,68	21,73	31,35

** , * e ^{ns}: Significativo a 1 e 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente.

Na TABELA 11, resultados apresentados mostram que a inoculação com *Azospirillum brasilense* surtiu efeito significativo apenas para o híbrido AG 1051, no tratamento inoculado o teor médio de nitrogênio presente foi 14,94 g kg⁻¹, enquanto que na ausência da inoculação apresentou apenas 13,72 g kg⁻¹ demonstrando que houve incremento desse nutriente na parte aérea do híbrido estudado em função da inoculação com *Azospirillum brasilense*.

Tabela 11 - Comparação de médias para as variáveis teor de nitrogênio da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* em diferentes doses de adubação nitrogenada.

Inoculação	Parte aérea (g kg ⁻¹)		Raiz (g kg ⁻¹)	
	AG	BM	AG	BM
Sem	13,72b	13,40a	3,15a	2,99a
Com	14,94a	13,49a	3,30a	3,57a

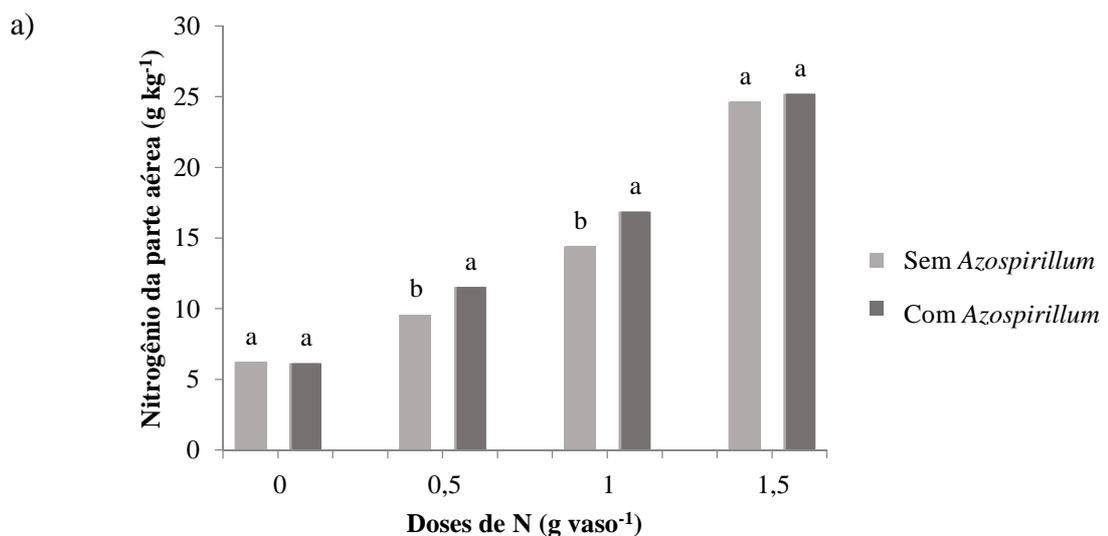
Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os resultados encontrados se ajustaram a um modelo de respostas linear. Foi observado que as doses de nitrogênio equivalentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em valores médios de acúmulo de nitrogênio correspondentes à (5,14; 11,27; 17,39 e 23,52 g kg⁻¹) respectivamente para cada dose avaliada. Pela análise de variância, observa-se que além da significância da inoculação e doses de nitrogênio, a interação entre estes fatores também foram estatisticamente significativas, procedendo assim ao desdobramento de um fator dentro do outro (FIGURA 16a). Portanto, verificou-se incremento no teor de N da parte aérea do híbrido de milho AG 1051 onde maiores doses de adubação nitrogenada proporcionaram consequentemente maiores teores de N na parte aérea das plantas de milho.

Quanto ao desdobramento das doses dentro do fator inoculação, constatou-se diferença significativa entre as doses que se enquadraram em um padrão de respostas linear (FIGURA 16b). Foi observado que a maior dose de adubação nitrogenada aplicada ($1,5 \text{ g vaso}^{-1}$) resultou em maior valor para o teor de nitrogênio acumulado correspondendo à $23,52 \text{ g kg}^{-1}$ na parte aérea do híbrido AG 1051. Com esses resultados, ressalta-se que o híbrido AG 1051 se mostrou mais eficiente na absorção de N do que o BM 3061, fato que pode ter sido resultante da fixação biológica de nitrogênio, também comprovado por Fernandes *et al.* (2005). Por outro lado, no híbrido BM 3061 o teor de N foliar não foi influenciado pela inoculação com *Azospirillum*, resultados também comprovados por Dobbelaere *et al.* (2002) em experimentos com milho e trigo inoculados com diferentes concentrações de *Azospirillum* onde não apresentaram efeitos resultantes da inoculação.

Em estudos utilizando análise de abundância natural de ^{15}N comprovaram-se diferenças significativas na eficiência da fixação biológica de nitrogênio por meio dessas bactérias entre os diferentes genótipos de milho testados. Reis *et al.*, (2006), ressalta que essa eficiência é determinada pela interação planta-bactéria, sendo ponto fundamental para o maior aproveitamento da FBN em gramíneas.

Figura 16 - Teor de nitrogênio na parte aérea do híbrido de milho AG 1051, após inoculação ou não com *Azospirillum brasilense* e aplicação de nitrogênio (a); teor de nitrogênio na parte aérea do híbrido de milho AG 1051, em função de doses de nitrogênio (g vaso^{-1}) (b).



b)

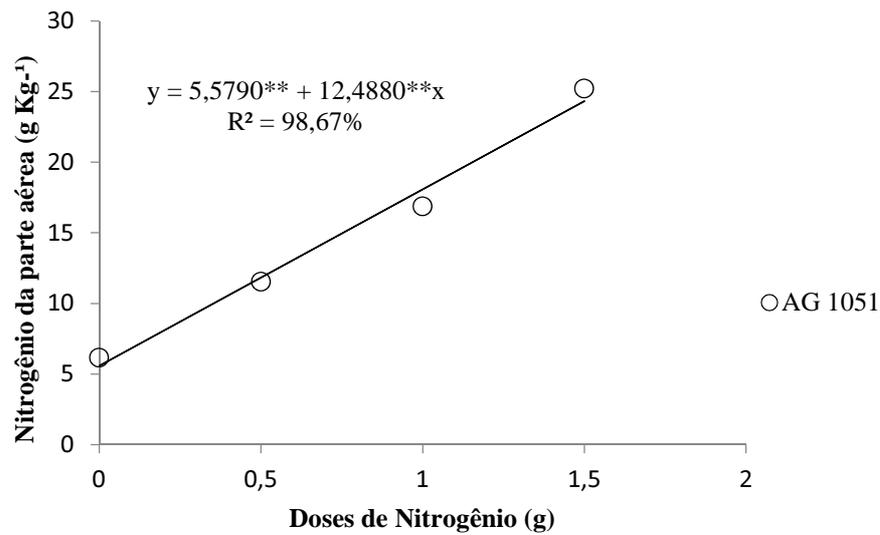
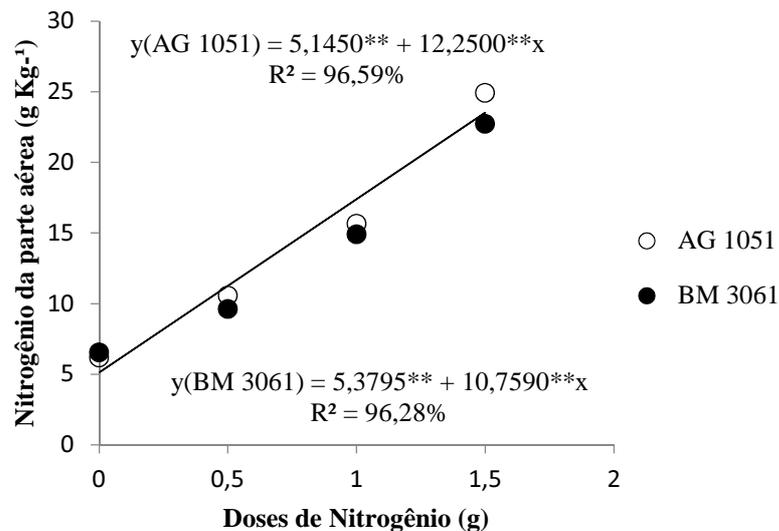
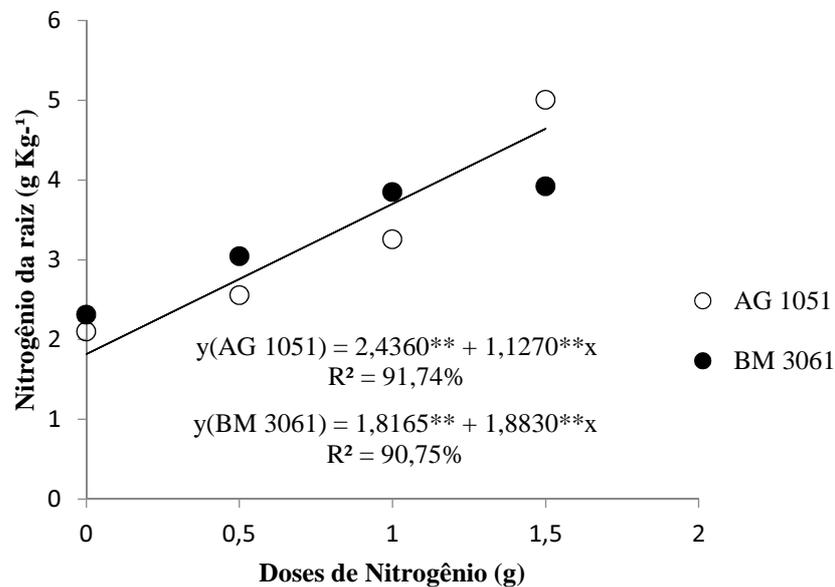


Figura 17 - Teor médio de nitrogênio da parte aérea dos híbridos de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso⁻¹).



Para o teor de nitrogênio acumulado na raiz dos híbridos de milho ocorreu comportamento crescente semelhante ao ocorrido na parte aérea das plantas avaliadas. Como observado na (Figura 18), esse mesmo padrão também foi devido à aplicação crescente de adubação nitrogenada. No caso do nutriente nitrogênio seu teor praticamente dobrou em função de cada incremento adicionado nas diferentes doses de adubações nitrogenadas fornecidas aos tratamentos.

Figura 18 - Teor médio de nitrogênio da raiz do híbrido de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso^{-1}).



Para o teor de fósforo o resumo da análise de variância evidência que aplicação de diferentes doses de adubação nitrogenada e a inoculação promoveram resultados significativos em relação ao híbrido BM 3061 que responderam isoladamente, sendo significativos no teste de médias para o teor de fósforo da parte aérea, enquanto que para a raiz houve significância apenas em função das doses de nitrogênio aplicadas, assim como, para os teores de fósforo da parte aérea e raiz do híbrido AG 1051 (TEBELA 12).

Tabela 12 - Resumo da análise de variância para teor de fósforo da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D).

Fonte de variação	Testes F (significância)			
	Parte aérea		Raiz	
	AG	BM	AG	BM
Inoculação (I)	2,436 ^{ns}	10,439 ^{**}	0,931 ^{ns}	0,009 ^{ns}
Doses (D)	306,142 ^{**}	41,304 ^{**}	15,311 ^{**}	23,118 ^{**}
Interação I x D	4,209 ^{ns}	2,823 ^{ns}	0,779 ^{ns}	2,854 ^{ns}
Blocos	1,929 ^{ns}	2,800 ^{ns}	0,520 ^{ns}	2,014 ^{ns}
CV (%)	6,35	7,96	23,98	16,79

^{**}, * e ^{ns}: Significativo a 1 e 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente.

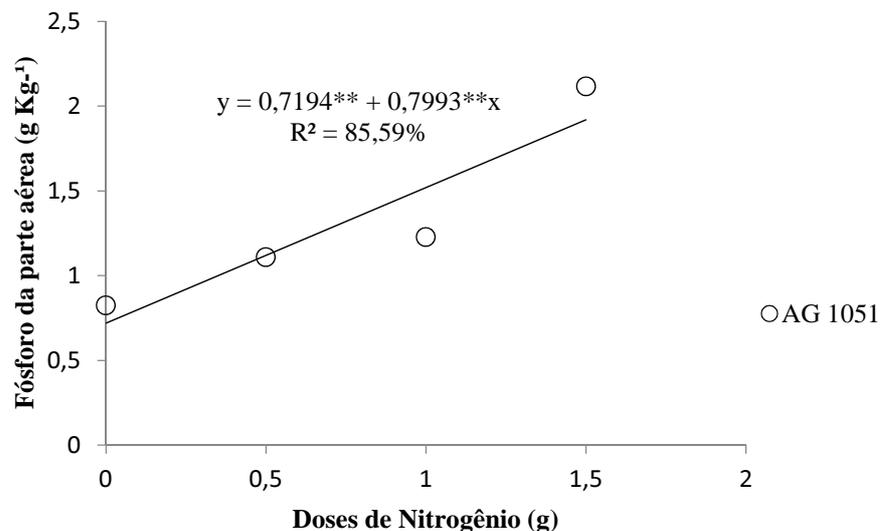
Tabela 13 - Comparação de médias para a variável teor de fósforo da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* em diferentes doses de adubação nitrogenada.

Inoculação	Parte aérea (g kg ⁻¹)		Raiz (g kg ⁻¹)	
	AG	BM	AG	BM
Sem	0,81a	1,06b	1,36a	0,68a
Com	0,75a	1,16a	1,31a	0,68a

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

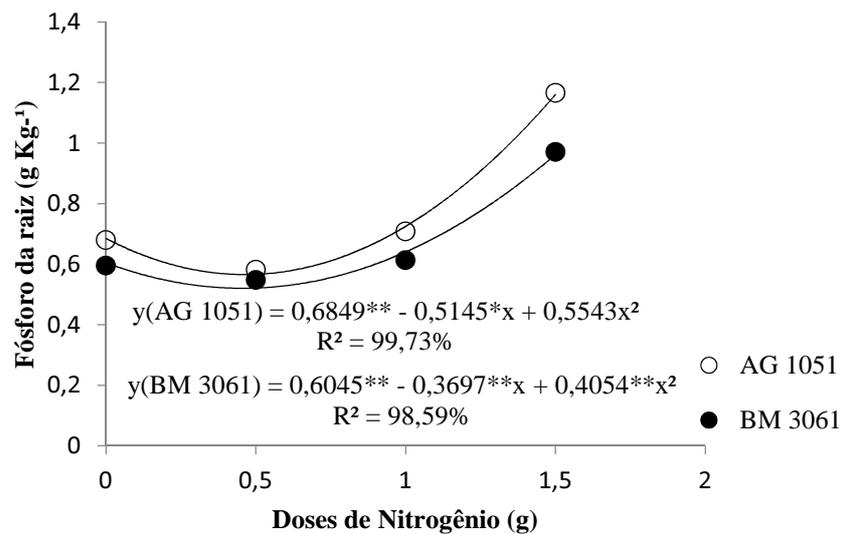
A inoculação com *Azospirillum* contribui significativamente com o conteúdo de fósforo da parte aérea do híbrido BM 3061, mas não se enquadrrou em padrão de respostas linear ou quadrático, sendo que para o tratamento inoculado resultados apontam médias de 1,16 g kg⁻¹ contra, 1,06 g kg⁻¹ para os tratamentos sem a inoculação, mostrando que a inoculação promoveu incremento no teor de fósforo no híbrido de milho. Em relação ao híbrido AG 1051 os valores para teor de fósforo da parte aérea se ajustaram a um modelo de respostas linear, as doses de nitrogênio equivalentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em valores médios de teor de fósforo correspondentes à (0,71; 1,11; 1,51 e 1,91 g kg⁻¹), respectivamente para cada dose avaliada (FIGURA 19). O teor de fósforo da parte aérea aumentou linearmente com o aumento das doses de nitrogênio, conseqüentemente a maior dose (1,5 g vaso⁻¹) proporcionou maior teor do nutriente (1,91 g kg⁻¹) revelando que ocorreu incremento desse nutriente em função do aumento das doses de N aplicadas nos tratamentos.

Figura 19 - Teor de fósforo na parte aérea do híbrido de milho AG 1051, em função de doses de nitrogênio (g vaso⁻¹).



Para o teor de fósforo da raiz nos dois híbridos de milho avaliados, os valores se ajustaram a um modelo de respostas quadrático com ponto de mínimo (FIGURA 20). Foi observado que as doses de nitrogênio equivalentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em valores médios de teor de fósforo correspondentes à (0,68; 0,56; 0,72 e 1,16 g kg⁻¹) para o híbrido AG 1051 e para o híbrido BM 3061 os valores em teor do nutriente foram (0,60; 0,52; 0,64 e 0,96 g kg⁻¹) respectivamente para cada dose avaliada. A dose 0,5 g vaso⁻¹ de nitrogênio não proporcionou maior teor de fósforo quando comparada ao controle (sem adubação nitrogenada), porém as maiores doses de nitrogênio aplicadas (1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em maiores teores de fósforo acumulados na raiz nos dois híbridos de milho.

Figura 20 - Teor de fósforo raiz do híbrido de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso⁻¹).



Conforme observado, o teor de fósforo na parte aérea da planta de milho do híbrido BM 3061 aumentou em função das doses de adubação nitrogenada, assim como os teores de fósforo das raízes nos dois híbridos estudados. Esse resultado sugere que a maior disponibilidade de nitrogênio no solo pode contribuir com o aumento de fósforo na planta. Reis Júnior *et al.* (2008) verificaram que aumentos na dose de N fornecidas na adubação resultaram em maiores teores de nitrogênio e fósforo pelo milho. Resultados também comprovados por Machado *et al.*, (2004) estudando as interações sinérgicas entre esses nutrientes na cultura do milho.

Para o teor de potássio presente na parte aérea e nas raízes dos híbridos de milho estudados, o teste F de significância mostrou-se significativo para a interação inoculação e doses de nitrogênio apenas para o teor de potássio da parte aérea do híbrido BM 3061, enquanto que para os demais parâmetros houve apenas efeitos isolados da inoculação e doses de nitrogênio para ambos os híbridos, exceto para teor de potássio da raiz em função da inoculação no híbrido BM 3061 (TABELA 14).

Tabela 14 - Resumo da análise de variância para teor de potássio da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D).

Fonte de variação	Testes F (significância)			
	Parte aérea		Raiz	
	AG	BM	AG	BM
Inoculação (I)	4,656*	11,722**	4,734*	0,042 ^{ns}
Doses (D)	51,640**	16,824**	32,448**	9,362**
Interação I x D	2,242 ^{ns}	14,223**	1,017 ^{ns}	0,822 ^{ns}
Blocos	1,221 ^{ns}	0,408 ^{ns}	1,498 ^{ns}	3,345*
CV (%)	4,54	5,54	23,45	25,38

**, * e ^{ns}: Significativo a 1 e 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente.

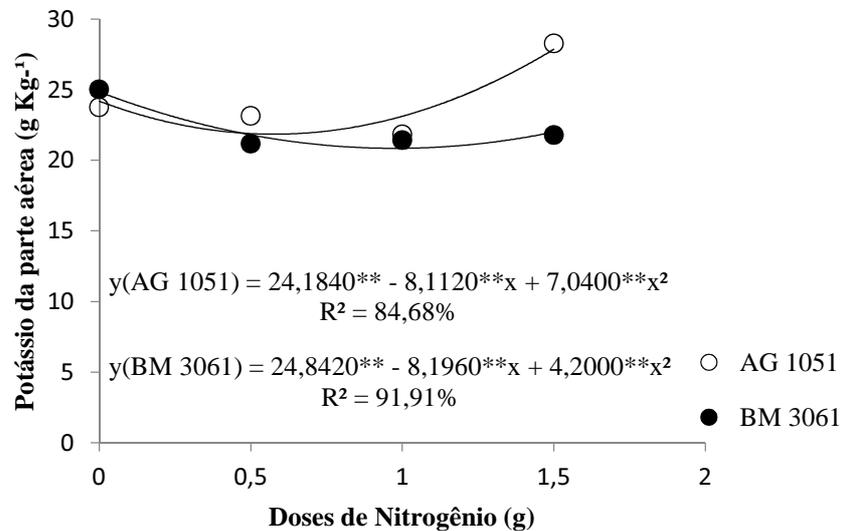
Na TABELA 15, os resultados apontam que a inoculação com *Azospirillum* promoveu uma redução no teor de potássio do híbrido AG 1051, tanto na parte aérea que apresentou 24,68 g kg⁻¹ do nutriente na ausência da inoculação e 23,84 g kg⁻¹ com a presença da inoculação, assim como na raiz, apresentando 3,10 g kg⁻¹ do nutriente na ausência da inoculação e 2,59 g kg⁻¹ com a presença da inoculação. Já o híbrido de milho BM 3061 comportou-se de forma inversa sendo que para a parte aérea a inoculação possibilitou aumento no teor de potássio, trazendo como resultados 23,12 g kg⁻¹ do nutriente e para o tratamento sem a inoculação 21,62 g kg⁻¹, para o acúmulo de potássio na raiz a inoculação não resultou em significância estatística nesse híbrido.

Tabela 15 - Comparação de médias para as variáveis teor de potássio da parte aérea e raiz, avaliados em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* em diferentes doses de adubação nitrogenada.

Inoculação	Parte aérea (g kg ⁻¹)		Raiz (g kg ⁻¹)	
	AG	BM	AG	BM
Sem	24,6800a	21,6200b	3,1050a	2,8387a
Com	23,8400b	23,1200a	2,5912b	2,8912a

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

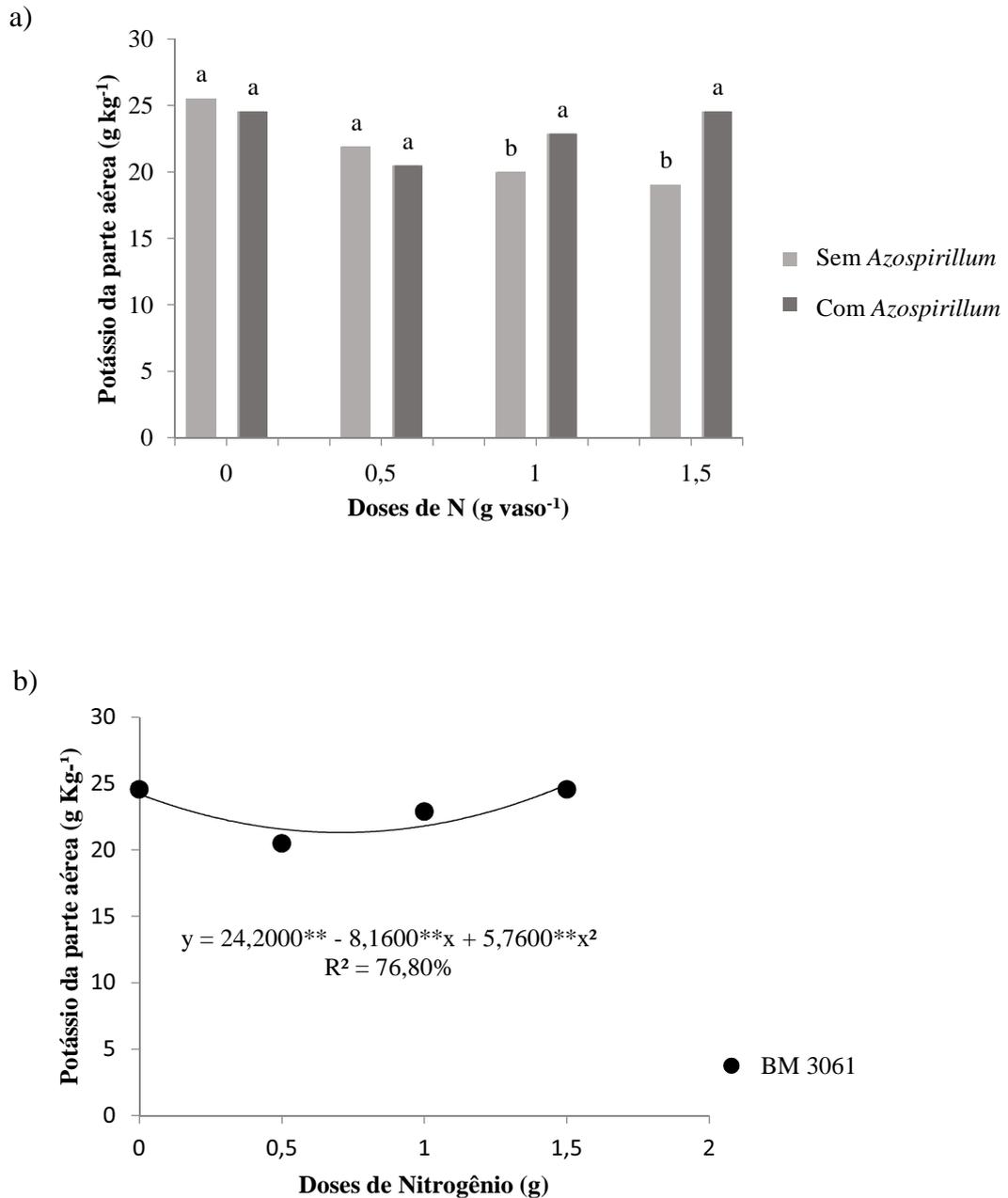
Figura 21 - Teor de potássio da parte aérea do híbrido de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso^{-1}).



Pela análise de variância, observa-se que, além da significância da inoculação e das doses estudadas, a interação entre estes fatores também foram estatisticamente significativa para o teor de potássio da parte aérea do híbrido BM 3061, procedendo assim o desdobramento do estudo de um fator dentro do outro (FIGURA 22a). Verificou-se que o híbrido BM 3061 obteve maior teor de potássio presente na parte aérea da planta em presença da inoculação com *Azospirillum brasilense*.

Quanto ao desdobramento das doses dentro da inoculação (FIGURA 22b), constatou-se diferença significativa entre as doses que se enquadraram em padrão de respostas quadrático. As doses de nitrogênio equivalentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso^{-1}) resultaram em valores médios de teor de potássio correspondentes à (24,20; 21,56; 21,80 e 24,92 g kg^{-1}), respectivamente para cada dose avaliada para o acúmulo do nutriente na parte aérea da planta de milho. As doses 0,5 e 1 g vaso^{-1} de nitrogênio não proporcionaram maiores teores de potássio na parte aérea do híbrido BM 3061 quando comparadas ao controle (sem adubação nitrogenada).

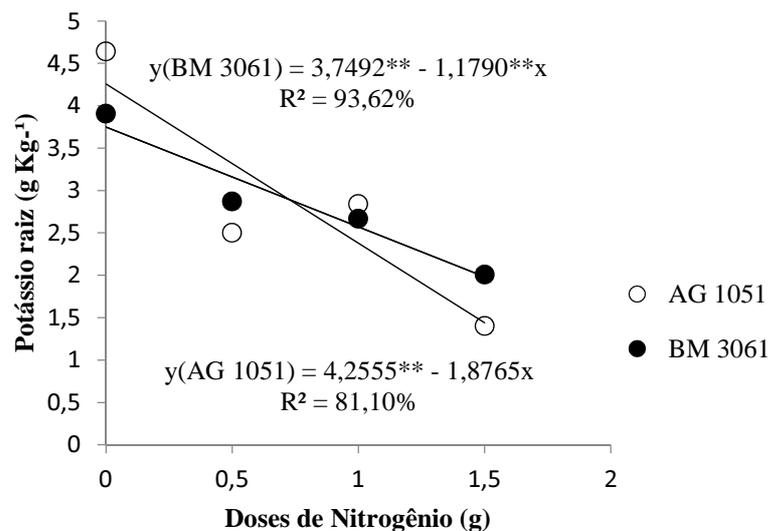
Figura 22 - Teor de potássio da parte aérea do híbrido de milho BM 3061, após inoculação ou não com *Azospirillum brasilense* (a); teor de potássio da parte aérea do híbrido de milho BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso^{-1}) (b).



Para o teor de potássio da raiz dos híbridos estudados observou-se que a inoculação com *Azospirillum* e as doses de adubação nitrogenada proveram decréscimo desse nutriente se enquadrando em um padrão de respostas linear, sendo que para o tratamento inoculado resultados apontam médias de $2,59 \text{ g kg}^{-1}$ contra, $3,10 \text{ g kg}^{-1}$ para os tratamentos sem a inoculação para o híbrido AG 1051, enquanto que para o híbrido BM 3061 não

apresentou efeito significativo pela inoculação. Em relação aos híbridos os valores para teor de potássio da raiz se ajustaram à um modelo de respostas linear (FIGURA 23), as doses de nitrogênio equivalentes à (0; 0,5; 1 e 1,5 g vaso⁻¹) resultaram em valores médios de teor de potássio correspondentes à (4,25; 3,31; 2,37 e 1,44 g kg⁻¹), respectivamente para o híbrido AG 1051 e para o híbrido BM 3061 os valores em teores de potássio acumulado foram (3,74; 3,15; 2,57 e 1,98 g kg⁻¹) respectivamente para cada dose avaliada. O teor de potássio da raiz diminui linearmente conforme ao aumento das doses de nitrogênio, conseqüentemente a maior dose 1,5 g vaso⁻¹ proporcionou menor teor do nutriente (1,44 g kg⁻¹) para o híbrido AG 1051 e (1,98 g kg⁻¹) do nutriente para o híbrido BM 3061, revelando efeito decrescente mediante aumento das doses de adubação nitrogenada.

Figura 23 - Teor de potássio da raiz do híbrido de milho AG 1051 e BM 3061, em função de doses de nitrogênio (g vaso⁻¹).



Levando em consideração apenas o fator doses de nitrogênio e sua influencia para os teores dos nutrientes (N, P e K), observa-se que no tratamento que recebeu a maior dose de nitrogênio (1,5 g vaso⁻¹) apresentou os maiores teores dos nutrientes N e P na raiz (4,64 e 1,16 g kg⁻¹) respectivamente para o híbrido AG 1051, e em relação ao híbrido BM 3061, encontrou-se (4,12 e 0,96 g kg⁻¹) dos nutrientes respectivamente nas plantas de milho. Já o nutriente K se comportou de forma inversa sendo que o tratamento controle, onde não se aplicou adubação nitrogenada, encontrou-se o maior teor de K na raiz da planta de milho

(4,25 e 3,74 g kg⁻¹) e os menores valores para as maiores doses de nitrogênio aplicadas para os híbridos AG 1051 e BM 3061, respectivamente.

Experimentos conduzidos com gramíneas evidenciaram aumento na absorção de N e P em virtude da associação das plantas com bactérias diazotróficas endofíticas (GALAL *et al.*, 2000; ISLAM *et al.*, 2002), comprovando assim os resultados inerentes a esse trabalho, onde observou-se incremento nos teores de N e P da parte aérea no híbrido AG 1051 em condições de casa de vegetação. Hungria *et al.* (2010) trabalhando com inoculação de espécies de *Azospirillum* em milho, verificaram diferenças no conteúdo de nutrientes nas folhas de plantas inoculadas.

Conforme já discutido, os teores de nutrientes também variaram conforme o híbrido de milho, sendo que para o teor de N da parte aérea do híbrido BM 3061 não mostrou-se sensível a inoculação com *Azospirillum brasilense*, assim como, para o teor de fósforo do híbrido AG 1051, desse forma não foram capaz de acumular maiores teores de nutrientes. Por outro lado, a adubação nitrogenada contribuiu com a assimilação desses nutrientes pela planta. Mendonça *et al.* (2006) trabalhando com a inoculação em milho, encontraram que o acúmulo de N na cultura foi decorrente da variabilidade genética das plantas e não devido à inoculação.

4.4 Determinação do carbono da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico do solo

O teste F da análise de variância revelou efeito significativo para variável respiração basal do solo em detrimento ao fator isolado inoculação com *Azospirillum brasilense* apenas nos tratamentos sob influencia do híbrido de milho BM 3061. Em relação ao carbono da biomassa microbiana e ao quociente respiratório do solo, os fatores inoculação e doses de nitrogênio não surtiram efeitos significativos para nenhum dos tratamentos sob influencia dos híbridos de milho estudados, tampouco suas interações (TABELA 16).

Tabela 16 - Resumo da análise de variância para as variáveis: carbono da biomassa microbiana do solo (CBMS), respiração basal do solo (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO_2), avaliadas em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D).

Fonte de variação	Testes F (significância)					
	CBMS		RBS		qCO_2	
	AG	BM	AG	BM	AG	BM
Inoculação (I)	0,059 ^{ns}	2,356 ^{ns}	0,232 ^{ns}	11,653 ^{**}	0,114 ^{ns}	3,807 ^{ns}
Doses (D)	2,677 ^{ns}	1,328 ^{ns}	0,931 ^{ns}	2,095 ^{ns}	0,865 ^{ns}	1,938 ^{ns}
Interação I x D	0,607 ^{ns}	0,319 ^{ns}	2,704 ^{ns}	0,807 ^{ns}	2,078 ^{ns}	1,030 ^{ns}
Blocos	9,413 ^{**}	12,522 ^{**}	15,385 ^{ns}	23,554 ^{**}	4,896 ^{**}	5,445 ^{**}
CV (%)	7,44	5,72	12,43	7,68	12,80	9,45

^{**}, * e ^{ns}: Significativo a 1 e 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente.

Resultados apresentados na TABELA 17 evidenciam que houve significância estatística apenas em função da inoculação do híbrido de milho BM 3061 na variável respiração basal do solo, apresentando para os tratamentos inoculados valor de 264,75 mgC-CO₂.kg⁻¹solo.h⁻¹ e para os não inoculados 241,29 mgC-CO₂.kg⁻¹solo.h⁻¹, constatando que houve aumento dessa variável em função da inoculação com *Azospirillum*.

Tabela 17 - Comparação de médias para as variáveis: carbono da biomassa microbiana do solo (CBMS), respiração basal do solo (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO_2), avaliadas em híbridos de milho AG 1051 (AG) e BM 3061 (BM), em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* (I) em diferentes doses de adubação nitrogenada (D).

Inoculação	CBMS		RBS		qCO_2	
	(mgC.kg ⁻¹ solo)		(mgC-CO ₂ .kg ⁻¹ solo.h ⁻¹)		(mgC-CO ₂ .g ⁻¹ BMS-C.h ⁻¹)	
	AG	BM	AG	BM	AG	BM
Sem	300,71a	301,67a	243,12a	241,29b	0,80a	0,79a
Com	302,64a	311,18a	248,33a	264,75a	0,81a	0,85a

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

Em relação à atividade microbiana, medida pela respiração basal do solo, observou-se que essa sofreu influência da inoculação com *Azospirillum brasilense* entre as doses de nitrogênio utilizadas, mas não se enquadrou em padrão de respostas linear ou quadrático. A respiração basal do solo é um indicativo da qualidade do carbono orgânico disponível aos microrganismos heterotróficos, quanto maior a quantidade de CO₂ liberada por unidade de peso de solo maior é a quantidade de substrato assimilável e conseqüentemente maior será o desenvolvimento da biomassa microbiana. Alguns estudos relatam que a

atividade dos microrganismos podem ser modificadas pelo nível de fertilidade do solo (CHU *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2007). Compant *et al.* (2010) demonstraram que a composição e a liberação de exsudatos pelas raízes das plantas sofre influência da disponibilidade de nutrientes no solo, ocasionando efeitos sobre a microbiota do solo e em sua atividade.

O carbono da biomassa microbiana não foi afetado em função da inoculação com *Azospirillum*, assim como pela dose de adubação nitrogenada aplicada nos tratamentos. No entanto, os híbridos diferiram entre si, o híbrido BM 3061 apresentou maior carbono da biomassa, 311,18 mgC.kg⁻¹solo quando comparado com o híbrido AG 1051 que apresentou 302,64 mgC.kg⁻¹solo. Esse efeito provavelmente foi ocasionado pela diferença nos exsudatos radiculares dos dois híbridos, sendo que o híbrido BM 3061 possibilitou maior crescimento do carbono da biomassa do que o AG 1051, quando avaliados com a inoculação.

Na análise do quociente metabólico, não foi observada influência da inoculação com *Azospirillum* e nem das doses de adubação nitrogenada. O quociente metabólico corresponde à quantidade de CO₂ liberado por unidade de biomassa produzida, indica a eficiência da comunidade microbiana em incorporar carbono da biomassa ou em emití-lo para a atmosfera na forma de CO₂. Maiores valores do quociente metabólico implica em maiores perdas de carbono à atmosfera na forma de CO₂ por unidade de biomassa microbiana produzida, sendo que um menor quociente metabólico sugere maior eficiência na utilização do carbono do solo.

CONCLUSÃO

A inoculação com *Azospirillum brasilense* nesse estudo pouco contribuiu com as variáveis avaliadas, o híbrido de milho AG 1051 se mostrou mais sensível à inoculação do que o BM 3061. Elevadas temperaturas registradas no ambiente onde foi conduzido o experimento pode ter inviabilizado o inoculante afetando a sobrevivência desses microrganismos no solo.

Dentre os parâmetros microbiológicos, houve efeitos resultantes da inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre a respiração basal do solo.

A adição de doses crescentes de fertilizantes nitrogenados promove maior desenvolvimento das plantas de milho, incrementa os teores de clorofila, de nitrogênio, de fósforo e potássio da parte aérea.

REFERÊNCIAS

- ALEF, K. **Soil Respiration**. In: ALEF, K.; NANNPIERI, P. (Eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, p. 234-245, 1995.
- AQUINO, A. B. *et al.* **Recomendações de adubação e calagem para o Estado do Ceará**. Fortaleza: UFC, 1993. 248 p.
- ARGENTA, G. *et al.* Parâmetros de planta como indicadores do nível de nitrogênio na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 519-527, 2002.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622p.
- BALDANI, J.I. *et al.* Recent advances in BNF with non legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.922-928, 1997.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.
- BARTCHECHEN, A. *et al.* 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.56-9, dez. 2010.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum* plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.
- BIOMATRIX. BM 3061: Características. Disponível em:<
<http://www.biomatrix.com.br/pt/BM3061.php>> Acesso em 02/07/2014.
- BROOKES, P. C.; POWLSON, D. S.; JENKINSON, D. S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, v. 14, p. 319-329, 1982.
- BURMAN, S.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. In: SUBBA RAO, N.S.; DOMMERGUES, Y.R. (eds.) **Microbial interaction in agriculture and forestry**. Enfield: Science Publishers, 2000. v.3. p.229-250.
- CAMPOS, B.C.; THEISEN, S; GNATTA, V. Avaliação do inoculante “Graminante” na cultura de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.4, p.713-715, 2000.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.42, p.669-678, 2010.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: 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., eds. **Tecnologia de produção de milho**. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, p. 139-182, 2004.

CARDOSO, M.J. *et al.* Performance produtiva do milho em relação a doses de nitrogênio e a população de plantas no sistema semeadura direta nos cerrados do município de Baixa Grande do Ribeiro, PI. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SÍMPÓSI INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008. Brasília. **Anais...** Brasília: ParlaMundi, 2008.

CAVALLET, L.E. *et al.* 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.4.557-562,1997.

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

CHU, H. *et al.* Soil microbial biomass, dehydrogenase activity community structure in response to long-term fertilizer management. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.39, n.11, p.2971-2976, 2007.

COELHO, A. M. *et al.* Nutrição e adubação do milho: In: CRUZ, J. C. (eds.) **Sistema de Produção**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010. Versão eletrônica. (Documentos EMBRAPA-CNPMS). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicações/milho_6_ed/feraduba.htm>. Acesso em: 21 out. 2011.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira de grãos: Safra 2013/2014 - Oitavo Levantamento - Maio/2014**. Brasília: CONAB, 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_05_08_10_11_00_boletim_graos_mai_2014.pdf>. Acesso em 29 mai. 2014.

CONDOR AGRONEGÓCIOS. Inoculante: Masterfix Gramíneas Emb. 1,5L. Disponível em:<<http://www.sementescondor.com.br/produtos/inoculantes/item/18-masterfix-gram%C3%ADneas.html>> Acesso em 02/07/2014.

DALLA SANTA, O.R. *et al.* *Azospirillum* sp. Inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n.6, p.843-850, 2004.

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

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

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

DOTTO, A.P. *et al.* 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. 376-82, 2010.

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

FANCELLI, A. L. Milho. In: PROCHNOW; L. I.; CASARIN, V.; STIPP, S. R. (Eds.) **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes: culturas**. Anais do simpósio sobre boas práticas para uso eficiente de fertilizantes (2009: Piracicaba, SP). Piracicaba: IPNI, v.3, p.43-93, 2010.

FERNANDES, F. C. S. *et al.* Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 4, n. 2, p. 195-204, 2005.

FERREIRA, D. F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0**. In: 45ª Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p. 255-258, 2000.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, v.20, p.68-74, 1994.

FUNCEME - Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos: **Dados pluviométricos do Ceará**, 2013.

GALAL, Y. G.M. *et al.* Non-isotopic method for the quantification of biological nitrogen fixation and wheat production under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.32, p.47-51, 2000.

HARTAMAN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: *Azospirillum-Plant Associations* (Y. OKON, Ed.), p. 15-39. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, 1994.

HE, J.Z. *et al.* Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.9, n.9, p.2364-2374, 2007.

HUERGO, L. F. *et al.* Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSAN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (eds.) ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.17-35.

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a

competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M. *et al.* Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, v.331,p.413-425,2010.

ISLAM, N.; RAO, C.V.S.; KENNEDY, I.R. Facilitating a N₂-fixing symbiosis between diazotrophs and wheat. In: KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A. (eds.) **Biofertilisers in action**. Canberra: Rural Industries Research and Development Corporation, 2002.p.84-93.

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

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

KUSS, A. V.; KUSS, V.; V. V.; HOLTZ, É. K. et al. Inoculação de bactérias diazotróficas e desenvolvimento de plântulas de arroz irrigado em solução nutritiva e câmara de crescimento. **Revista da FZVA**, v.14, n.2, p.23-33. 2007.

LI-COR. **LI 3100 area meter instruction manual**. Lincoln: LICOR, 1996. 34p.

LODEWYCKX, C. *et al.* Endophytic bacteria and their potential applications. **CRC Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v.21, n.6, p.583-606, 2002.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B.R. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.86, p.1-25, 2004.

MACHADO, C.T.T. *et al.* Acumulação de nitrogênio, fósforo e zinco e índices de eficiência de utilização e translocação de nutrientes em milho submetido a dois níveis de adubação nitrogenada. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 26.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 10., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 7.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO: AVALIAÇÃO DAS CONQUISTAS: BASE PARA ESTRATÉGIAS FUTURAS, 5., 2004. Viçosa. Anais... Viçosa: SBCS/UDESC. 2004, CD-ROM.

MACNEISH, R. S.; EUBANKS, M. E. Comparative analysis of the Rio Balsas and Tehuacán models for the origins of maize. **Latin American Antiquity**, Washingt, v. 11, p. 3-20, 2000.

MAGALHÃES, P.C. *et al.* **Fisiologia do milho**. Sete lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. 23p (EMBRAPA-CNPMS. Circular técnica, 22).

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997.

MARTINS, A.O. *et al.* Nitrogen-use efficiency of maize genotypes in contrasting environments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.8, p.291-298, 2008.

MEIRA, F.A. *et al.* Fontes e Épocas de Aplicação do Nitrogênio na Cultura de Milho Irrigado. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, V.30, n.2, p.275-284, abr/jun. 2009.

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

MORAES, T. P.; BRITO, C.H.; FERREIRA, A. S. **Adubação nitrogenada e inoculação com Azospirillum brasilense em híbridos de milho**. 2012. 82f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 729 p.

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

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

NERONI, R.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Science Agriculture (Piracicaba, Braz.)**, v.64, n.3, p.303-304, 2007.

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

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

PEIXOTO NETO, P.A.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, n.4, p.69-70, 2004.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University press, 1982. P. 375-85.

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

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

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

REIS, V.M. *et al.* Biological nitrogen fixation in graminaceae and palm trees. **CRC Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v.19, p.227-247, 2000.

REIS, V. M *et al.* Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 153-174.

REIS JÚNIOR, F.B. *et al.* Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, n.3, p.1139-1146, 2008.

REVISTA RURAL. **Inoculante raiz mais forte**, 2009. Disponível em: <http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2009/Artigos/rev140_inoculante.htm> Acesso em: 4 jan. 2012.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **Como a planta de milho se desenvolve**. Piracicaba: Potafos, 2003. 20 p. (Arquivo de Agrônomo, 15).

ROBERTO, V.M.O.; SILVA, C.D.; LOBATO, P.N. Resposta da cultura do milho à aplicação de diferentes doses de inoculante (*Azospirillum brasiliense*) via semente. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010. Goiânia. **Anais...**Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. p.2429-2434. 2010, CR-ROM.

ROESCH, L. F. W. *et al.* Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v Z3; p. 1377-1383, 2007.

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

SANTOS, M. M. *et al.* Épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em plantio direto, e alocação do nitrogênio (15N) na planta. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 34, p. 1185-1194, 2010.

SCHADCHINA, T.M.; DIMITRIEVA, V.V. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.18, p. 1427-1437, 1995.

SEMENTES AGRO CERES. AG1051: Características. Disponível em:<http://www.sementesagrocere.com.br/?page_id=426> Acesso em 02/01/2014.

SILVA, E. E. da; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. **Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (BMS-C)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 6 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 96).

SPARLING, G. P.; WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: calibration in situ using microbial an ¹⁴C labeled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, 195-207, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Assimilação de nutrientes. In: TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 286-98.

TATE, K. R.; ROSS, D. J.; FELTHAM, C. W. A direct extraction method to estimate soil microbial-C – effects of experimental – variables and some diferente calibration procedures. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 329-335.

TEDESCO, M. J. *et al.* **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre, Departamento de Solos: UFRGS, 1995. 174 p.

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

TEXEIRA, F. F. *et al.* Diversidade no germoplasma de milho coletado na região nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.1, n.3, p.59-67,2002.

TOLLENAAR, M.; DWYER, L. M. Physiology of maize. In: SMITH, D. L.; HAMEL, C.(Ed). **Crop yield, physiology and processes**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. cap. 5. P.169-201.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World corn production, consumption, and stocks**. 2014. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=World+Corn+Production%2c+Consumption%2c+and+Stocks+&hidReportRetrievalID=459&hidReportRetrievalTemplateID=7>>. Acesso em: 19 mai. 2014.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

VERONA, D. A. *et al.* Tratamento de sementes de milho com Zeavit[®], Stimulate[®] e inoculação com *Azospirillum* sp. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010. Goiânia. **Anais...** Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. p.3731-3737.2010, CD-ROM.

WALKLEY, A.; BLACK, I. A. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science, Baltimore**, v. 37, p. 29-38, 1934.

WALTER, H.; HABER, W. Uber die Intensitat der Bodenamtung mit Beuerkingen zu den lundegardschen Werten. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 70, p. 275-282, 1957.

WIETHOLTER, S. **Adubação nitrogenada no sistema de plantio direto**. EMBRAPA-CNPT, Passo Fundo, 1996, 44p.

WITT, C. *et al.* A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5-6, p. 510-519, 2000.

YAMADA, T.; ABDALLA, S, R, S.; VITTI, G, C. Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira. **International Plant Nutrition Institute**, Piracicaba, 2007, 722p.

ZHANG, F.; MACKENZIE A.F.; SMITH, D.L. Nitrogen fertilizer and protein, lipid, and non-structural carbohydrate concentrations during the course of maize kernel filling. Amsterdam **Journal of Agronomy & Crop Science**, v. 172, p.171-81,1994.