

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
MESTRADO EM AGRONOMIA

Lucymara Merquides Contardi

Manejo de nitrogênio e modo de aplicação de *Azospirillum brasilense* em milho

CHAPADÃO DO SUL – MS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
MESTRADO EM AGRONOMIA

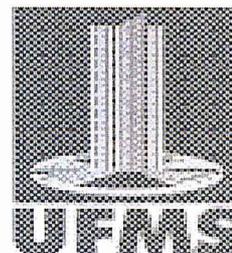
Lucymara Merquides Contardi

Manejo de nitrogênio e modo de aplicação de *Azospirillum brasilense* em milho

Orientadora: Prof^a. Dra. Rita de Cassia Félix Alvarez

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, para obtenção do
título de Mestre em Agronomia,
área de concentração: Produção
Vegetal.

CHAPADÃO DO SUL – MS
2014



Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Câmpus de Chapadão do Sul

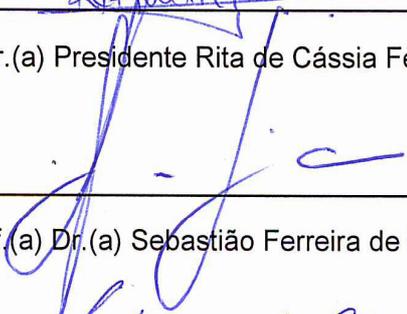
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

DISCENTE: Lucymara Merquides Contardi
ORIENTADOR (A): Prof. (a) Dr. (a) Rita de Cássia Félix Alvarez

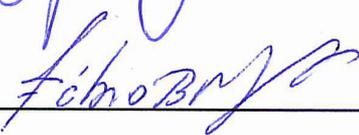
**MANEJO DE NITROGÊNIO E MODO DE APLICAÇÃO DE
AZOSPERILLUM BRASILENSE EM MILHO**



Prof.(a) Dr.(a) Presidente Rita de Cássia Félix Alvarez



Prof.(a) Dr.(a) Sebastião Ferreira de Lima



Prof.(a) Dr.(a) Fábio Bueno dos Reis Júnior

Chapadão do Sul, 11 de março de 2014.

Aos meus pais,
Dedico e Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me amparar nos momentos de dificuldades e nas horas incertas, dando-me força interior para superá-las.

À minha orientadora professora Dra. Rita de Cássia Feliz Alvarez pelos valiosos ensinamentos acadêmicos, amizade, correções e paciência.

Ao professor Dr. Sebastião Ferreira de Lima pela participação e orientação em todas as etapas deste trabalho, pelas inúmeras conversas que tivemos, pelas dúvidas esclarecidas, sugestões, correções, conhecimentos passados, também pela paciência durante os momentos de estresse e principalmente pela amizade. Obrigada por tudo.

À professora Dra. Ana Paula Leite de Lima pelo incentivo, amizade e pelos bons conselhos.

A professora Dra Marivaine da Silva Brasil, por ter compartilhado seus conhecimentos da microbiologia agrícola.

Aos professores e técnicos dos Laboratórios de Biotecnologia, Fertilidade do Solo, Diagnose de Doenças de Plantas e Entomologia Agrícola por nos auxiliarem e emprestarem alguns aparelhos e reagentes necessários para realização de algumas análises.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Agronomia do campus de Chapadão do Sul, que foram indispensáveis para o meu crescimento profissional e intelectual.

Aos técnicos agrícolas Thiago e Kenio, pela ajuda na montagem do experimento no campo e os estagiários do grupo da fitotecnia pela ajuda na execução e avaliação do experimento.

A Roberta, Regiane e Jamile pelo companheirismo, sempre dispostas a ajudar, independente da atividade, do horário e do dia da semana.

Ao Paulo Fabiani Filho, pelo incentivo.

As pessoas mais importantes de minha vida: José Luis Contardi, Cícera Merquides Contardi, Douglas Merquides Contardi e André Luis Merquides Contardi. Obrigada por existirem!

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus de Chapadão do Sul (CPCS) e ao curso de pós-graduação em Agronomia pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que, de uma maneira ou outra, prestaram o seu apoio e incentivo para realização desse trabalho. Meu muito obrigado!

RESUMO

Contardi, Lucymara Merquides. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Manejo de nitrogênio e modo de aplicação de *Azospirillum brasilense* em milho.
Professora Orientadora: Rita de Cassia Félix Alvarez.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do manejo do nitrogênio associado ao modo de aplicação de *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento agrônomico do milho. O experimento foi realizado na área experimental pertencente a Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul, Campus de Chapadão do Sul, MS. Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, com 19 tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos de modos de aplicação de *Azospirillum brasilense* (sementes e sulco de plantio) associado à adubação nitrogenada de semeadura e cobertura. Foram avaliados: altura de plantas, altura de inserção de primeira espiga, diâmetro de colmo, número de espiga por planta, número total de espigas, população final de plantas, comprimento da espiga, diâmetro da espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileira, diâmetro do sabugo, comprimento de grãos, massa de grãos por espiga, massa de cem grãos, número de grãos por espiga, produtividade de grãos, teor de nitrogênio total e quantificação das bactérias diazotróficas. A aplicação de *Azospirillum brasilense* no sulco de plantio na dose de 100 mL ha⁻¹ associado a 30 kg ha⁻¹ de nitrogênio (N) na semeadura e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura foram que apresentou melhores médias para os componentes de produção. A inoculação de sementes na presença de adubação nitrogenada teve maior população de bactérias diazotróficas por grama de raiz. A aplicação da dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ do inoculante no sulco de plantio associado a 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura proporcionaram a maior produtividade de grãos.

PALAVRAS-CHAVE: *Zea mays*. Adubação nitrogenada. Bactérias diazotróficas

ABSTRACT

Contardi, Lucymara Merquides. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Nitrogen management and mode of application of *Azospirillum brasilense* in maize. Adviser: Rita de Cassia Félix Alvarez.

The objective of this study was to evaluate the effects of nitrogen associated with the mode of application of *Azospirillum brasilense* in the development of maize agronomic management. The experiment was conducted in the experimental area belonging to the Mato Grosso do Sul Federal University, Campus of Chapadão do Sul, MS. We used the experimental design of randomized blocks with 19 treatments and four replications. The treatments consisted of application modes of *Azospirillum brasilense* (seeds and planting furrow) associated with nitrogen fertilization of seeding and coverage. Were evaluated: plant height, height of insertion of first, stem diameter, number of spikes per plant, total number of spikes, plant population, spike length, spike diameter, number of rows of kernels per spike, number of kernels per row, cob diameter, length of grain, grain weight per spike, weight of hundred grains, number of grains per spike, grain yield, total nitrogen and quantification of diazotrophs. The application of *Azospirillum brasilense* in the planting furrow at a dose of 100 mL ha⁻¹ associated with 30 kg ha⁻¹ of nitrogen (N) at sowing and 180 kg ha⁻¹ of N in covering were presented the best medium for the components of production. Inoculation of seeds in the presence of nitrogen fertilization had a greater population of diazotrophic bacteria per gram of root. The application dose of 300 mL ha⁻¹ inoculant in the planting furrow associated with 20 kg ha⁻¹ at sowing and 120 kg ha⁻¹ N in coverage provided the highest yield.

KEY-WORDS: Zea mays. Nitrogen fertilization. Diazotrophs.

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por grama de matéria fresca de raiz. Chapadão do Sul, 2013..... | 41 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | Página |
|---|--------|
| 1 Fenologia da cultura de milho..... | 16 |
| 2 Análise química do solo da área experimental na camada de 0 – 20 cm, Chapadão do Sul, 2012..... | 23 |
| 3 Tratamentos utilizados no experimento. Chapadão do Sul, MS, 2013..... | 24 |
| 4 Resumo da análise de variância para altura de planta (ALT), altura de inserção de primeira espiga (AIE), diâmetro basal do colmo (DC). Chapadão do Sul, 2013..... | 29 |
| 5 Resumo da análise de variância para número de espigas por planta (NEP), número total de espigas (NTE) e população final de plantas (POP). Chapadão do Sul, 2013..... | 29 |
| 6 Altura de plantas, altura da inserção da primeira espiga, diâmetro do colmo, número de espigas por planta, número total de espigas e população final de plantas, em função da associação de nitrogênio e <i>Azospirillum brasilense</i> | 32 |
| 7 Resumo da análise de variância para comprimento de espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras de grãos por espiga (NF), número de grãos por fileira (NGF). Chapadão do Sul, 2013..... | 33 |
| 8 Comprimento de espiga, diâmetro de espiga, número de fileiras de grãos por espiga e número de grãos por fileira, em função da associação de nitrogênio e <i>Azospirillum brasilense</i> | 35 |
| 9 Resumo da análise de variância para diâmetro de sabugo (DS), comprimento de grãos (CG) e número de grãos por espiga (NGE). Chapadão do Sul, 2013..... | 36 |
| 10 Diâmetro de sabugo, comprimento de grãos e número de grãos por espiga, em função da associação de nitrogênio e <i>Azospirillum brasilense</i> | 37 |

| | | |
|----|--|----|
| 11 | Resumo da análise de variância para massa de grãos por espiga (MGE), massa de cem grãos (MCG), produtividade de grãos (PG) e teor de N nos grãos (TNG). Chapadão do Sul, 2013..... | 37 |
| 12 | Massa de grãos por espiga, massa de 100 grãos, produtividade de grãos e teor de N nos grãos em função da associação de nitrogênio e <i>Azospirillum brasilense</i> | 40 |

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 14 |
| 2.1. A cultura do Milho..... | 14 |
| 2.2. O elemento Nitrogênio..... | 19 |
| 2.3. Bactérias diazotróficas associadas ao Milho..... | 20 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 23 |
| 3.1. Descrição da área..... | 23 |
| 3.2. Delineamento experimental e tratamentos..... | 23 |
| 3.3. Semeadura e tratos culturais..... | 25 |
| 3.4. Avaliações..... | 25 |
| 3.4.1 Quantificação do NMP de bactérias diazotróficas..... | 26 |
| 3.4.2 Características de crescimento..... | 26 |
| 3.4.3 Componentes da produção e outras características..... | 26 |
| 3.4.4 Produtividade de grãos..... | 28 |
| 3.4.5 Teor de nitrogênio nos grãos..... | 28 |
| 3.5. Análise estatística..... | 28 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 29 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 43 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 44 |

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) está entre os principais cereais produzidos no mundo, sua diversidade de utilização e seu potencial produtivo são características que contribuem para sua ampla distribuição geográfica. O Brasil, no ano agrícola de 2012/2013, considerando o somatório da safra e safrinha, atingiu a produção de 78,5 milhões de toneladas em uma área de 15,8 milhões de hectares cultivados, com produtividade média de grãos de 4.961 kg ha⁻¹ (Conab, 2013). Apesar do volume expressivo da produção nacional, a produtividade pode ser considerada baixa diante do potencial da cultura.

Em países de clima tropical como o Brasil, o nitrogênio (N) é um dos elementos minerais mais importantes para produção das culturas. Apesar das inovações tecnológicas que surgem a cada ano agrícola, a adubação nitrogenada ainda é um dos principais limitantes para o alcance da máxima produtividade da cultura do milho (MORAIS, 2012).

A deficiência de N pode reduzir a produtividade de grãos entre 10 e 22% na cultura do milho (SUBEDI E MA, 2009), sem considerar as perdas que também ocorrem na produção de biomassa e que são fundamentais para a manutenção da cobertura morta em rotação de cultura, quando se trata de cultivos em semeadura direta.

A fonte nitrogenada predominantemente utilizada hoje na agricultura tem origem sintética, com altos custos para obtenção e grandes riscos ambientais no retorno ao meio ambiente, quando utilizado de forma não adequada. De acordo com Hungria (2011) o Brasil importa 73% do N utilizado na agricultura.

Uma das alternativas para reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados de produção industrial na cultura do milho é o aproveitamento do processo natural de fixação biológica do nitrogênio, realizada por um grupo de bactérias, denominadas diazotróficas (KAPPES et al., 2013).

Estas bactérias convertem o nitrogênio atmosférico em amônia, tornando-o então disponível para a planta. As bactérias diazotróficas também são consideradas promotoras de crescimento vegetal (KUSS et al., 2007). Dentre as bactérias diazotróficas, as do gênero *Azospirillum*, principalmente a

espécie *Azospirillum brasilense*, têm sido usadas como inoculante em diversas culturas (REIS, 2007). Especificamente para o milho, *Azospirillum brasilense* vem proporcionando resultados positivos (BALDANI e BALDANI, 2005; KAPPES et al., 2013), entretanto, existem outros relatos em que não foram verificados efeitos da inoculação (DARTORA et al., 2013).

Com a adoção da técnica de inoculação com *Azospirillum brasilense*, o Brasil tem potencial para gerar economia de 30 a 50 kg ha⁻¹ de fertilizantes minerais nitrogenados na safra e safrinha da cultura do milho (FANCELLI, 2010).

O método mais comum utilizado para a aplicação do inoculante é via sementes. No entanto, de acordo com Croes et al. (1993), a inoculação via sulco de semeadura vêm sendo estudada como uma forma de evitar toxidez dos produtos utilizados no tratamento de sementes sobre a bactéria, já que alguns produtos químicos podem desestruturar o flagelo usado pela *Azospirillum brasilense* na associação com a planta.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o manejo de nitrogênio e os modos de aplicação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta de origem americana, cujos primeiros registros de cultivo foram encontrados no México há mais de 7.300 anos (GARCIA et al., 2006). É uma gramínea anual, de metabolismo C4, alógama e alotetraplóide, com $2n = 4x = 20$ cromossomos (GAUT et al., 2000).

Quanto às características morfológicas, o milho apresenta três sistemas radiculares, o primeiro é provisório, proveniente da germinação da semente, o qual é substituído pelo sistema radicular definitivo, este, pode atingir até 3 m de comprimento, no entanto, a maior parte das raízes fasciculadas encontra-se nos primeiros 30 cm do solo, posteriormente, desenvolvem-se os esporões que auxiliam na sustentação da planta, absorção de água e de nutrientes (MAGALHÃES et al., 1994). Os autores relatam também que o caule do milho é do tipo colmo, constituído por nós e entrenós, no qual estão inseridas, alternadamente, as folhas paralelinérveas. É uma planta monóica, apresentando uma inflorescência masculina (pendão) e uma feminina (espiga), cuja semente é um tipo de fruto classificado como cariopse.

De acordo com Fancelli e Dourado-Neto (2000), o ciclo da cultura compreende cinco etapas de desenvolvimento: (i) germinação e emergência: ocorre entre a semeadura e o aparecimento da plântula, cujo período varia entre quatro e 12 dias, em função da temperatura e umidade do solo; (ii) crescimento vegetativo: iniciado a partir da emissão da segunda folha, até o início do florescimento, cuja extensão varia em função do genótipo e de fatores climáticos, caracterizando e classificando diferentes genótipos entre ciclos superprecoces, precoces e normais; (iii) florescimento, estabelecido entre o início da polinização e o início da frutificação; (iv) frutificação, compreendida entre a fecundação e o enchimento completo dos grãos, cuja duração varia entre 40 e 60 dias; (v) maturidade: período compreendido entre o final da frutificação e o aparecimento da camada negra, sendo este relativamente curto e indicativo do final do ciclo de vida da planta.

Entretanto para maior facilidade de manejo e estudo do ciclo da cultura do milho divide-se o desenvolvimento da planta em vegetativo (V) e reprodutivo (R), as subdivisões dos estádios vegetativos são designados numericamente

como V1, V2, V3 até Vn; em que (n) representa a última folha emitida antes do pendoamento (VT). O primeiro e o último estágio V são representados, respectivamente, por (VE, emergência) e (VT, pendoamento), conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Fenologia da cultura de milho

| Estádio | Descrição |
|---------|------------------------|
| VE | Emergência |
| V1 | 1ª folha desenvolvida |
| V2 | 2ª folha desenvolvida |
| V3 | 3ª folha desenvolvida |
| V4 | 4ª folha desenvolvida |
| V (n) | nª folha desenvolvida |
| VT | Pendoamento |
| R1 | Embonecamento |
| R2 | Bolha d'água |
| R3 | Grão leitoso |
| R4 | Grão Pastoso |
| R5 | Formação de dente |
| R6 | Maturidade Fisiológica |

FONTE: MAGALHÃES; DURÃES (2006)

O milho é considerado uma planta plástica, ou seja, com capacidade de adaptar-se a diferentes condições ambientais, desde as baixas altitudes até as superiores a 2500 m (TEIXEIRA et al., 2002). Também é caracterizado pela sua versatilidade de utilização, indo desde a alimentação animal e humana até a indústria de alta tecnologia, com isso, o milho passou a ser o cereal mais produzido no mundo (DUARTE, 2000).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China (FAOSTAT, 2012), no entanto, o nível médio nacional de produtividade é considerado baixo, já que as características fisiológicas da cultura permitem alto potencial produtivo, demonstrando que os diferentes sistemas de produção de milho devem ser aprimorados para alcançar o aumento na produtividade e rentabilidade que a cultura pode

proporcionar (CRUZ, et al., 2008). Apesar das inovações tecnológicas que são introduzidas a cada ano ao setor agrícola, o manejo inadequado da adubação ainda é um dos principais entraves ao crescimento e produção desta cultura (MORAIS, 2012), sendo necessárias grandes quantidades de adubo, principalmente nitrogenados, para se alcançar rendimentos máximos no cultivo do milho (CAVALLET et al., 2000).

O nitrogênio é considerado um nutriente essencial para a planta, pois é parte constituinte de todos os aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos, além de participar direta ou indiretamente de vários processos bioquímicos e também da energia necessária à produção de carboidratos e esqueletos carbônicos, o que se reflete diretamente no desenvolvimento e rendimento da cultura (MALAVOLTA et al., 1997).

O nitrogênio também é o elemento considerado de manejo e recomendação mais complexos, em virtude da multiplicidade de reações químicas e biológicas que o afetam, além disso, também está sujeito as variações edafoclimáticas, podendo ocorrer perdas por lixiviação, volatilização, desnitrificação e erosão, quando manejado inadequadamente (RAMBO et al., 2008).

Com isso, a adubação nitrogenada possui um papel importante para a cultura do milho, pois além de ser o nutriente exigido e absorvido em maiores quantidades é o que tem manejo e recomendação de adubação mais complexa (CANTARELLA; DUARTE, 2012). Os autores ainda ressaltam que as recomendações oficiais de adubação para cultura do milho evoluíram sensivelmente no Brasil na década de 1990, entre as inovações mais importantes está a segmentação de doses de nutrientes conforme a produtividade esperada, podendo ser bastante elástica para a cultura do milho devido as diferenças de solo, manejo, material genético e época de plantio.

Segundo Coelho (2007), a quantidade média de N utilizada em lavouras comerciais de milho, no Brasil, é de 60 kg ha⁻¹, enquanto, nos Estados Unidos e na China, é de 150 kg ha⁻¹ e 130 kg ha⁻¹, respectivamente.

Segundo Ritchie et al. (2003) é no estágio V4 da cultura do milho onde ocorre a definição do número de óvulos e ovários que estarão na espiga, portanto, esse evento necessita no mínimo de 25 kg ha⁻¹ de N.

Para Sousa e Lobato (2004) a recomendação de adubação nitrogenada de cobertura é em função da expectativa de rendimento da cultura, e o teor de argila, influenciará no parcelamento da dose de N aplicada. .

Sabe-se que a absorção de N ocorre durante todo o ciclo vegetativo do milho e, apesar das exigências nutricionais serem menores nos estádios iniciais de crescimento, pesquisas indicam que altas concentrações de N na zona radicular são benéficas para promover o rápido crescimento inicial da planta e o aumento na produtividade de grãos (SILVA et al., 2005).

De acordo com Vitti e Barros Junior (2001) nos estádios entre V4 e V12 (doze folhas expandidas) ocorre a definição do número de fileiras e do tamanho da espiga, estes são componentes de rendimento de grãos do milho, sendo necessário que o N seja disponibilizado para estes estádios.

Resultados experimentais obtidos por vários autores, sob diversas condições de solo, clima e sistemas de cultivo, mostram respostas generalizadas do milho à adubação nitrogenada, sendo que 70 a 90% dos ensaios de adubação com milho realizado em campo, no Brasil, respondem à aplicação de nitrogênio (CRUZ et al., 2005). Em um desses trabalhos, Araujo et al. (2004) testaram à aplicação de nitrogênio nas doses de 0, 60, 120, 180 e 240 kg ha⁻¹ em cobertura e verificaram que a maior dose de N aplicada proporcionou a maior produtividade de grãos, um aumento de 2448 kg ha⁻¹ (28%) em relação à testemunha.

Entretanto, o excesso de nitrogênio pode interferir no desenvolvimento da cultura, causando maior desenvolvimento vegetativo da parte aérea em detrimento do produtivo, diminuindo o sistema radicular e a capacidade de resistência das plantas a períodos secos, tendo como um sintoma os cabelos da espiga com coloração verde no final da fase reprodutiva (PRADO, 2008).

Assim como o excesso de N interfere no desenvolvimento na cultura, a sua deficiência também é prejudicial, levando ao amarelecimento da folha da ponta para a base em forma de "V"; começando na ponta das folhas mais velhas e progredindo ao longo da nervura principal; causando abscisão foliar e colmos finos (COELHO; FRANÇA, 2001). A deficiência de N provoca o retardamento do crescimento da parte aérea, interferindo na translocação de nutrientes no processo de enchimento de grãos (MALAVOLTA et al., 1997).

Também é importante destacar que altas doses ($> 60 \text{ kg ha}^{-1}$) de N na semeadura podem causar salinização da região próxima a raiz, podendo prejudicar a germinação das sementes (FANCELLI, 2001).

Assim, a dose, a época de aplicação e as condições do solo devem ser analisadas com o intuito de suprir a planta nas fases críticas, para reduzir as perdas de N e minimizar os custos de adubação (HOEFT, 2003).

2.2 O elemento Nitrogênio

A maioria dos ecossistemas naturais e agrários apresentam expressivos ganhos em produtividade após serem fertilizados com nitrogênio inorgânico, comprovando a importância deste elemento (TAIZ; ZEIGER, 2006). Os autores ressaltam também que embora a atmosfera seja constituída por cerca de 78% de nitrogênio molecular (N_2), essa grande quantidade de N_2 não está diretamente disponível para os organismos vivos, pois a utilização do nitrogênio atmosférico requer a quebra de uma estável tripla ligação entre os dois átomos de nitrogênio para produção de amônia (NH_3) ou nitrato (NO_3^-). Segundo Prado (2008), para a nutrição das plantas, é necessária que haja a transformação do N_2 atmosférico para as formas assimiláveis, podendo ser utilizados para isto três processos de fixação de nitrogênio: a fixação industrial, a fixação atmosférica e a fixação biológica.

A fixação industrial é o processo desenvolvido por Haber-Bosh de síntese de amônia a partir do N_2 empregando temperaturas de 300 a 500°C e pressões acima de 300 atm, utilizando catalisadores a base de ferro (KIM; REES, 1994). Esse processo consome muita energia e encarece o preço do fertilizante nitrogenado (BUCHANAN et al., 2000), visto que, o Brasil importa praticamente 73% do N utilizado na agricultura (HUNGRIA, 2011).

A principal fonte de nitrogênio utilizada no país é a uréia, que apresenta como vantagens a alta concentração de N (45%) e o menor preço de N por unidade, possuindo alta solubilidade, entretanto, apresenta desvantagens, como a possibilidade de perdas de N por volatilização de NH_3 , fitoxidez de biureto, perdas por lixiviação, contaminação dos lençóis freáticos e aquecimento global proveniente da queima de derivados do petróleo (HARDY, 1993; CANTARELLA, 2007).

O segundo processo de fixação de N é a fixação atmosférica, que refere-se as descargas elétricas, que unem o N e o O₂ formando óxidos que podem ser decompostos ou unidos à água, atingindo o solo pela ação da chuva, no entanto, essa fixação de nitrogênio é considerada baixa, pois é dependente de fatores como precipitação, frequência de descargas elétricas e proximidade de indústrias que liberam gases nitrogenados para atmosfera (PRADO, 2008).

O terceiro processo de fixação de nitrogênio é conhecido como fixação biológica do nitrogênio, o N₂ atmosférico se difunde para o espaço poroso do solo e consegue ser aproveitado por alguns microrganismos que ali habitam, reduzindo-o a amônia, a mesma forma obtida no processo industrial (HUNGRIA, 2011). A possibilidade de uso desse processo associado à cultura do milho representa um grande potencial para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos e, conseqüentemente, a poluição ambiental e os custos de produção da lavoura (MORAIS, 2012).

Para Prado (2008), dentre os processos existentes de fixação de nitrogênio descritos anteriormente, o que apresenta melhores resultados quanto ao potencial de adição de nitrogênio ao solo e também a maior taxa de custo benefício é o processo de fixação biológica.

2.3 Bactérias diazotróficas associadas ao Milho

São chamados de bactérias diazotróficas, os microrganismos capazes de realizar a conversão enzimática do N₂ em formas assimiláveis aos demais eucariotos (ROESCH, 2003).

Estes microrganismos promovem a redução do nitrogênio atmosférico à amônia (NH₃⁺), através da quebra da ligação tripla do N pela enzima nitrogenase, utilizando para esta quebra de ligação energia na forma de ATP (adenosina trifosfato), em condições de temperatura ambiente e pressão adequada. Esta enzima é muito sensível ao oxigênio, podendo destruí-la irreversivelmente (REIS; TEIXEIRA, 2005).

Na agricultura, a maior contribuição do processo de fixação biológica do N₂ ocorre pela associação simbiótica de plantas da família Leguminosae (Fabaceae) com bactérias pertencentes a diversos gêneros sendo conhecidas como rizóbios (HUNGRIA, 2011). A extensão da fixação biológica de nitrogênio

(FBN) para plantas não leguminosas, principalmente cereais e gramíneas, tornou-se uma um dos maiores desafios dos últimos anos (DOBEREINER, 1997).

O milho possui uma via fotossintética (C4), sendo mais eficiente em relação a luz do que as leguminosas, sendo capaz de converter intensidades de energia solar duas vezes maiores, além disso, apresenta um sistema radicular fasciculado, tendo vantagens sobre o sistema pivotante das leguminosas para extrair água e nutrientes do solo (QUADROS, 2009). Este tipo de planta pode mais facilmente dispensar fontes energéticas para a alimentação de bactérias diazotróficas e para o processo energeticamente caro da conversão do N₂ atmosférico em formas combinadas utilizáveis pelas plantas (DÖBEREINER, 1992).

Dentre as bactérias diazotróficas, as do gênero *Azospirillum*, principalmente a espécie *A. brasilense*, tem sido usada como inoculante em diversas culturas de importância agrícola (REIS, 2007).

Azospirillum spp. são bactérias Gram negativas, curvas, móveis e de várias origens geográficas. A temperatura ótima de crescimento varia entre 28 e 41 °C, dependendo da espécie (ECKERT et al., 2001).

De acordo com Baldani et al. (1997), bactérias do gênero *Azospirillum* são classificadas como endofíticas facultativas, sendo o grupo mais promissor associado a gramíneas e não leguminosas, devido sua capacidade de colonizar todo o interior da planta, localizando-se dentro de habitats protegidos do oxigênio. Segundo Bashan e Levanony (1990); Baldani et al.(1997), no solo, as bactérias do gênero *Azospirillum* podem ser encontradas no mucigel presente na rizosfera de plantas, caracterizando uma colonização externa das raízes, enquanto na colonização interna, as células de *Azospirillum* podem penetrar nos espaços intercelulares e lá se alojarem. Para Döbereiner (1992), quando uma população se estabelece na rizosfera, uma população interna também se desenvolve, onde as concentrações de oxigênio são mais baixas e, assim, favorecem a atividade da fixação do nitrogênio.

Na rizosfera, os nutrientes exsudados pelas raízes das plantas, estimulam os microrganismos presentes no solo a se moverem em direção às raízes, devido a motilidade e a quimiotaxia (HARTMANN; BALDANI, 2006). A

alta motilidade exibida pelas células, aliada à quimiotaxia positiva para certos ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos provavelmente, confere a *Azospirillum* uma vantagem seletiva importante sobre outros microrganismos na rizosfera, onde a disponibilidade de nutrientes é muitas vezes limitada. (BARAK et al, 1983).

O processo de ligação da bactéria à radícula ou raiz da planta é realizado em duas etapas: a primeira (fase de adsorção) com duração de aproximadamente duas horas, é reversível, e provavelmente envolve apenas proteínas; a segunda (fase de ancoramento) dura de 8 a 16 h, é irreversível e provavelmente envolve polissacarídeos de superfície, ambas as fases são mediadas pela ação do flagelo polar, cuja participação na fase de adsorção é decisiva (MICHIELS et al, 1991), podendo tornar-se um problema, já que o método mais utilizado de inoculação com *Azospirillum brasilense* é via sementes, e segundo Croes et al. (1993) os produtos utilizados no tratamento de semente podem causar toxidez aos microrganismos, podendo desestruturar o flagelo usado pela *Azospirillum brasilense* na associação com a planta.

As bactérias do gênero *Azospirillum* também são conhecidas pela sua capacidade de produzir hormônios de crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas “*in vitro*” (HARTMAN; ZIMMER, 1994). Para Dobbelaere et al. (2003) as respostas positivas à inoculação, inclusive quando cultivadas com altos níveis de nitrogênio, indica que as respostas da planta não ocorrem apenas em razão do N₂ fixado, mas, também, da produção de outras substâncias. Bashan e Holguin (1997) relataram ser óbvio que os fitormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA), excretados por *Azospirillum* desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas.

A interação positiva entre estas bactérias e o milho tem sido demonstrada por vários autores, dados avaliados por Okon e Labandera-Gonzalez (1994), durante 20 anos de experimentos de inoculação com *Azospirillum*, concluíram que esses organismos são capazes de promover incrementos na produtividade de diversas culturas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da área

O experimento foi conduzido na área experimental da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus de Chapadão do Sul, localizada nas coordenadas 18° 46'17,8'' de latitude sul, 52° 37'27,7'' de longitude oeste e com altitude de 813 m. O clima da região, segundo Köppen é do tipo tropical úmido (Aw), com estação chuvosa no verão e seca no inverno e precipitação média anual de 1.850 mm com temperatura média anual variando de 13°C a 28°C.

O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico argiloso (Embrapa, 2006), cujas características químicas encontram-se na Tabela 2.

Na adubação mineral de semeadura da área experimental foram aplicados 412 kg ha⁻¹ do formulado 0-20-20 + 11% Ca + 4% S.

Tabela 2. Análise química do solo da área experimental na camada de 0 – 20 cm, Chapadão do Sul, 2012

| pH | M.O | P | H+Al | K | Ca | Mg | CTC | V |
|-------------------|--------------------|---------------------|------------------------|------|-----|-----|-----|------|
| CaCl ₂ | g dm ⁻³ | mg dm ⁻³ | cmolc dm ⁻³ | | | | % | |
| 4,7 | 29,5 | 11,6 | 5,3 | 0,26 | 2,3 | 0,5 | 8,4 | 36,6 |

A adubação nitrogenada foi feita manualmente de acordo com os respectivos tratamentos.

3.2 Delineamento experimental e tratamentos

Para realização do experimento, foram estabelecidos 19 tratamentos com quatro repetições, distribuídos em blocos ao acaso compostos da combinação entre formas de inoculação de *A. brasilense* associado a adubação nitrogenada, conforme a Tabela 3.

As parcelas foram constituídas por cinco linhas de cinco metros de comprimento, espaçadas de 0,45 cm entre si, distribuindo-se três sementes por metro de sulco, totalizando 66.667 sementes ha⁻¹.

Tabela 3. Tratamentos utilizados no experimento. Chapadão do Sul, MS, 2013

| Tratamentos | Descrição |
|-------------|--|
| SI | Sem inoculação |
| IS | Inoculação de Semente |
| D1 | Aplicação do Inoculante no sulco de plantio, 100 mL p.c. ha ⁻¹ |
| D2 | Aplicação do Inoculante no sulco de plantio, 200 mL p.c. ha ⁻¹ |
| D3 | Aplicação do Inoculante no sulco de plantio, 300 mL p.c. ha ⁻¹ |
| A0 | Ausência de adubação nitrogenada |
| A1 | 10 kg ha ⁻¹ de N na semeadura+ 60 kg ha ⁻¹ de N em cobertura |
| A2 | 20 kg ha ⁻¹ de N na semeadura+ 120 kg ha ⁻¹ de N em cobertura |
| A3 | 30 kg ha ⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha ⁻¹ de N em cobertura |

A combinação dos 19 tratamentos ficou da seguinte forma: 1) sem inoculação + 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 2) sem inoculação + 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 3) sem inoculação + 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 4) inoculação de sementes, sem adubação nitrogenada 5) inoculação de sementes + 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 6) inoculação de sementes + 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 7) inoculação de sementes + 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 8) 100 mL do produto comercial (p.c.) ha⁻¹ de inoculante no sulco, sem adubação nitrogenada; 9) 100 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante no sulco + 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 10) 100 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante no sulco + 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 11) 100 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante no sulco + 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 12) 200 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante no sulco, sem adubação nitrogenada; 13) 200 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante no sulco + 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 14) 200 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante no sulco + 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 15) 200 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante no sulco + 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 16) 300 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante no sulco, sem adubação nitrogenada; 17) 300 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante no sulco + 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura; 18) 300 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante

no sulco + 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura e 19) 300 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante no sulco + 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura + 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura.

3.3 Semeadura e tratos culturais

A semeadura foi realizada manualmente no dia 05 de dezembro de 2012, utilizando o híbrido comercial CD 384 HX. Esse híbrido é de ciclo precoce, atinge a altura média de plantas de 215 a 230 cm com massa de 1000 grãos em média de 352 g. As sementes foram inoculadas no momento da semeadura, utilizando-se o inoculante Masterfix Gramíneas® com as estirpes AbV5 e AbV6 de *Azospirillum brasilense* (2×10^8 células viáveis mL⁻¹), na dose recomendada pelo fabricante de 100 mL p.c. ha⁻¹. As sementes foram colocadas em saco plástico e após a aplicação do inoculante, foram agitadas por cerca de dois minutos para uniformização do produto sobre a semente.

Para a aplicação do inoculante no sulco de plantio, foram utilizadas três doses: 100, 200 e 300 mL p.c. ha⁻¹, diluídas em 10 L de água e aplicadas com auxílio de um pulverizador costal com jato dirigido diretamente no sulco de semeadura. Após a semeadura manual do milho nos sulcos, foram pulverizadas as doses do inoculante diretamente sobre as sementes, e em seguida, o sulco foi fechado.

No estágio V5 foi realizada a adubação de nitrogênio em cobertura. A aplicação foi realizada manualmente, distribuindo uréia como fonte de N, sobre a superfície do solo, sem incorporação, em uma única vez.

Durante a condução do experimento não foi necessário realizar o controle de doenças e pragas. Para plantas daninhas foi feita uma pulverização, 20 dias após a emergência com 108,8 g ha⁻¹ de Tembotriona + 1000 g ha⁻¹ de Atrazina.

A colheita do experimento foi realizada manualmente, no dia 10 de maio de 2013, coletando-se todas as espigas da área útil da parcela.

3.4 Avaliações

Foram consideradas como área útil para avaliações três linhas centrais, sendo que uma linha foi utilizada para a contagem das bactérias diazotróficas e as duas linhas restantes foram utilizadas para as demais avaliações.

Foram realizadas as seguintes avaliações:

3.4.1 Quantificação do Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas

Para quantificação das bactérias diazotróficas, aos 55 dias após a emergência da cultura, foram coletadas amostras de raízes de três plantas de uma linha da área útil de cada parcela. As raízes foram lavadas em água corrente, depois foram pesadas 10 g (matéria fresca) e trituradas no liquidificador com 90 mL de solução salina e diluídas serialmente nas diluições de 10^{-2} a 10^{-6} . De cada diluição foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e inoculadas em triplicata nos frascos contendo 5 mL do meio de cultivo semi-sólido NFb. Os frascos foram incubados a 30°C e após cinco dias o crescimento bacteriano foi avaliado pela contagem dos frascos negativos e positivos, considerando frascos com crescimento positivo aqueles que apresentavam o aparecimento de película característica. Os dados da contagem foram utilizados na quantificação do número mais provável (NMP) utilizando a tabela Mc Crady para 3 tubos/diluição (DÖBEREINER et al., 1995).

3.4.2 Características de crescimento

No estádio R3, foram mensuradas 10 plantas da área útil por parcela para as avaliações de altura de planta (medição do colo até a inserção da folha “bandeira”), altura da inserção da primeira espiga (medição do colo até a inserção da primeira espiga viável com o colmo), diâmetro de colmo (diâmetro do segundo internódio, a partir da base da planta).

3.4.3 Componentes da produção e outras características

a) População final de plantas, número total de espiga e número de espigas por planta

A população final de plantas foi obtida pela contagem das plantas na área útil da parcela, considerando-se inclusive as plantas acamadas e/ou quebradas, transformando-se a população obtida para a correspondente por hectare. O número de total de espiga (ha) foi obtido pela contagem de todas as espigas na área útil da parcela, calculando-se para hectare. O número de espiga por planta foi determinado pela razão entre número de espigas produtivas e a população final de plantas.

b) Comprimento de espiga

Para o comprimento de espiga foram separadas cinco espigas ao acaso proveniente da área útil de cada parcela, medindo cada espiga com auxílio de uma régua.

c) Diâmetro da espiga

O diâmetro da espiga foi mensurado com o auxílio de um paquímetro digital e correspondeu ao diâmetro médio, em milímetros, da porção central de cinco espigas por parcela.

d) Número de fileira de grãos por espiga

Para o número médio de fileiras de grãos por espiga, foram contados em cinco espigas de cada parcela, todas as suas fileiras.

e) Número de grãos por fileira

Foram contados todos os grãos de cada fileira de cinco espigas por parcela.

f) Diâmetro do sabugo

Depois de debulhado a espiga, foi feita a medição utilizando um paquímetro digital da porção central de cada sabugo, em cinco espigas por parcela.

g) Comprimento de grãos

Em cada uma das cinco espigas avaliadas por parcela, foram separados cinco grãos que foram medidos com o auxílio de um paquímetro.

h) Massa de grãos por espiga

Após a debulha das cinco espigas avaliadas por parcela, foi determinada sua massa individualmente, com o auxílio de uma balança analítica com precisão de 0,01 g.

i) Massa de 100 grãos

Das cinco espigas avaliadas por parcela, foram contados cem grãos, colocados em cápsulas e pesados em balança analítica, depois seguiram para estufa de ventilação forçada a 105 °C até atingirem peso constante. O teor de água dos grãos foi corrigido para 13%.

j) Número de grãos por espiga

Foi calculado considerando o número de grãos por fileira e o número de fileiras por espiga.

3.4.4 Produtividade de grãos

A produtividade de grãos por hectare foi obtida a partir da colheita e pesagem de grãos provenientes das espigas da área útil de cada parcela, após a correção da umidade dos grãos para 13%.

3.4.5 Teor de N nos grãos

Para quantificação do teor de nitrogênio nos grãos, após a colheita, foram separadas amostras de cada parcela, que passaram pelos processos de digestão sulfúrica, destilação e titulação (N-Kjeldahl), adaptado por Embrapa (2009).

3.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito dos tratamentos de aplicação de *Azospirillum brasilense* associado ao nitrogênio sobre as características altura de plantas, altura de inserção da primeira espiga e diâmetro basal do colmo (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância para altura de planta (ALT), altura de inserção de primeira espiga (AIE), diâmetro basal do colmo (DC). Chapadão do Sul, 2013

| F.V | G.L. | Quadrados Médios | | |
|-------------|------|------------------|-----------|-----------|
| | | ALT | AIE | DC |
| Blocos | 3 | 0,00369 | 0,00115 | 0,00827 |
| Tratamentos | 18 | 0,00528** | 0,00397** | 0,03147** |
| Resíduo | 54 | 0,00072 | 0,00036 | 0,00116 |

Teste F: ** – significativo a 5% de probabilidade.

As variáveis número total de espigas e população final de plantas tiveram efeito significativo dos tratamentos, enquanto o número de espigas por planta não foi afetada pela aplicação de *Azospirillum brasilense* associado ao nitrogênio (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da análise de variância para número de espigas por planta (NEP), número total de espigas (NTE) e população final de plantas (POP). Chapadão do Sul, 2013

| F.V. | G.L. | Quadrados Médios | | |
|-------------|------|------------------|-----------------|-----------------|
| | | NEP | NTE | POP |
| Blocos | 3 | 0,04009 | 58925795.5582 | 15649247,8498 |
| Tratamentos | 18 | 0,00644 | 76478494,9694** | 74117840,0930** |
| Resíduo | 54 | 0,00616 | 224663689.9640 | 5375334,44529 |

Teste F: ** – significativo a 5% de probabilidade.

Para altura de plantas (Tabela 6), os tratamentos com inoculação de semente associado as aplicações de 10 e 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente, e os tratamentos com aplicação no sulco de plantio na dose de 100 mL p.c ha⁻¹ associado as doses de 10 e 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura com 60 e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente, foram os que proporcionaram a maior altura de plantas.

As plantas com menor porte foram observadas no tratamento com inoculação de semente na ausência de nitrogênio, não diferindo estatisticamente dos tratamentos com inoculação no sulco de plantio na dose de 200 mL p.c ha⁻¹ em todas as doses de N e nos tratamentos na dose de 300 mL p.c ha⁻¹ com as doses de 20 kg ha⁻¹ de N em semeadura com 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura e 30 kg ha⁻¹ de N em semeadura com 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura tiveram as menores alturas. Cabe ressaltar, que mesmo os tratamentos que tiveram as menores alturas, estes ainda foram superiores à altura média esperada para o híbrido utilizado.

A máxima altura de inserção da primeira espiga (Tabela 6) foi observada nos tratamentos com inoculação de semente associado a 10 e 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente, também, os tratamentos que tiveram aplicação do inoculante no sulco de plantio na dose de 100 mL p.c. ha⁻¹ na ausência de N e associado a 10 e 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura com 60 e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente, e o tratamento na dose 300 ml p.c. ha⁻¹ na ausência de N, não diferiram estatisticamente do tratamento controle (sem inoculação) associado a 10 kg ha⁻¹ de N.

Os resultados obtidos para altura da primeira espiga foram muito semelhantes aos obtidos para altura de planta, onde se observou que as maiores alturas da primeira espiga foram obtidas com inoculação de semente e presença de N e na menor dose do inoculante na ausência e presença de N. Duas situações que fugiram a comparação com a altura de plantas foram ausência de inoculação da semente com menor dose de N e maior dose de inoculação na ausência de N.

O diâmetro de colmo, considerado uma característica de grande importância para a obtenção de alta produtividade, pois quanto maior o seu diâmetro, maior a capacidade da planta em armazenar fotoassimilados que

contribuirão com o enchimento dos grãos (KAPPES et al., 2011), teve os maiores resultados nos seguintes tratamentos: sem inoculação associado a 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura; nas doses de 100 mL p.c. ha⁻¹ de inoculante no sulco associado a 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura; dose de 200 mL p.c. ha⁻¹ em todas as doses de N, exceto no tratamento que não recebeu adubação nitrogenada; dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ associado a 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura.

Os maiores diâmetros de colmo foram obtidos sempre na presença de N e apenas em uma situação obteve-se maior diâmetro de colmo sem a presença do inoculante.

Resultados semelhantes foram encontrados por Kappes et al. (2013) que verificaram que a inoculação das sementes com *A. brasilense* proporcionou maior altura de planta e de inserção de espiga, mas não afetou o diâmetro de colmo. Já Lana et al. (2012) avaliando o efeito da presença e ausência de adubação nitrogenada de semeadura (0 e 20 kg ha⁻¹), com e sem inoculação de *A. brasilense* nas sementes e aplicação de nitrogênio em cobertura (0 e 100 kg ha⁻¹) na cultura do milho, verificaram que a altura de inserção da espiga e de planta não sofreram efeito de nenhum destes três fatores analisados.

Observou-se que para estas três características avaliadas a aplicação do inoculante no sulco de plantio na dose de 100 mL p.c. ha⁻¹ associado a 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, proporcionou as maiores médias.

Quanto ao número de espigas por planta, também conhecido como prolificidade, não foi verificado efeito significativo dos tratamentos (Tabela 6), embora, o acréscimo em espigas por planta não resulte diretamente em aumento de produtividade de milho, pois quando a prolificidade é alta, o tamanho da espiga, principalmente o da segunda espiga, muitas vezes torna-se muito pequeno, além de poder ficar desgranada e deformada (VELOSO et al., 2006).

O número total de espiga (Tabela 6) teve os maiores valores nos tratamentos que tiveram inoculação de sementes na ausência de adubação nitrogenada e associado a 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 30 kg ha⁻¹ de N em

cobertura; também os tratamentos com aplicação no sulco de plantio na dose de 100 ml p.c. ha⁻¹ na ausência de N; dose de 200 ml p.c. ha⁻¹ com 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura e dose de 300 mL p.c ha⁻¹ na ausência de N e associado a adubação nitrogenada de 20 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura, não diferindo estatisticamente dos tratamentos sem inoculação associados a 10 e 20 kg ha⁻¹ de N em semeadura com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente. De toda forma, esses resultados não diferiram dos tratamentos sem inoculação e com adubação de 10 e 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 60 e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente.

Quanto a população final de plantas (Tabela 6), os tratamentos com inoculação na semente na ausência de N e associado a aplicação de 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura, proporcionaram maior população de plantas, já o tratamento com inoculação na semente que recebeu a maior quantidade de adubação nitrogenada teve a menor população de plantas, sendo inferior até aos tratamentos controle (sem inoculação). Resultados obtidos por Novakowski et al. (2011), quanto a inoculação de sementes com *A. brasilense* cepa BR 11005 (Sp 245), verificaram que a inoculação proporcionou menor população de plantas em relação ao tratamento controle.

Tabela 6. Altura de plantas (ATP), altura da inserção da primeira espiga (AIE), diâmetro do colmo (DC), número de espigas por planta (NEP), número total de espigas (NTE) e população final de plantas (POP), em função da associação de nitrogênio e *Azospirillum brasilense*⁽¹⁾.

| Tratamentos | Características avaliadas | | | | | |
|-------------|---------------------------|------|-------|-------|------------|------------|
| | ATP | AIE | DC | NEP | NTE | POP |
| | cm | | | | | |
| SI + A1 | 247b | 135a | 2,28c | 0,98a | 58779,55 a | 59444,50 c |
| SI + A2 | 245b | 131c | 2,37b | 1,03a | 59585,86 a | 57777,75 c |
| SI+ A3 | 245b | 128d | 2,43a | 0,94a | 50649,65 b | 53888,50 d |
| IS + A0 | 238c | 127d | 2,23d | 0,99a | 64760,12 a | 65000,05a |
| IS+ A1 | 250a | 138a | 2,34b | 1,00a | 63030,92 a | 62778,05 a |
| IS + A2 | 250a | 136a | 2,31c | 0,97a | 54527,66 b | 56111,00 c |

Continuação Tabela 6

| | | | | | | |
|---------|------|------|-------|-------|------------|------------|
| IS + A3 | 246b | 133b | 2,36b | 1,04a | 49822,32 b | 47777,89 e |
| D1 + A0 | 247b | 136a | 2,28c | 1,00a | 61720,65 a | 61666,80 b |
| D1 + A1 | 248a | 137a | 2,36b | 0,95a | 54038,90 b | 56666,69 c |
| D1 + A2 | 246b | 134b | 2,35b | 1,04a | 55056,93b | 52777,88 d |
| D1 + A3 | 249a | 135a | 2,46a | 1,04a | 53871,76 b | 51666,80 d |
| D2 + A0 | 240c | 133b | 2,10e | 0,97a | 55501,18 b | 56666,63 c |
| D2 + A1 | 243c | 128d | 2,41a | 1,03a | 59101,12 a | 57222,33 c |
| D2 + A2 | 240c | 128d | 2,40a | 0,94a | 55026,40 b | 58333,44 c |
| D2 + A3 | 242c | 133b | 2,44a | 0,97a | 52222,22 b | 53333,33 b |
| D3 + A0 | 243c | 135a | 2,24d | 1,03a | 61835,39 a | 60000,00 b |
| D3 + A1 | 247b | 133b | 2,42a | 0,91a | 55555,55 b | 60555,55 b |
| D3 + A2 | 240c | 133b | 2,27c | 1,04a | 60183,50 a | 57777,83 c |
| D3 + A3 | 243c | 131c | 2,36b | 1,00a | 51702,60 b | 5666,88 d |
| CV (%) | 1,10 | 1,42 | 1,46 | 7,87 | 8,36 | 4,07 |

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 7, observa-se que todas as características avaliadas, comprimento de espiga, diâmetro da espiga, número de fileira por espiga e número de grãos por fileira sofreram efeito da aplicação de *Azospirillum brasilense* associado ao nitrogênio.

Tabela 7. Resumo da análise de variância para comprimento de espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), número de fileiras de grãos por espiga (NF), número de grãos por fileira (NGF). Chapadão do Sul, 2013

| F.V. | G.L. | Quadrados Médios | | | |
|-------------|------|------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | CE | DE | NF | NGF |
| Blocos | 3 | 0,56041 | 1,53208 | 0,25509 | 0,41556 |
| Tratamentos | 18 | 1,24882** | 2,40836** | 0,40649** | 3,69867** |
| Resíduo | 54 | 0,16134 | 0,53146 | 0,15546 | 0,32405 |

Teste F: ** – significativo a 5% de probabilidade.

Para a característica comprimento de espiga observou-se na Tabela 8 os maiores comprimentos nos seguintes tratamentos: inoculação de sementes associado a 20 e 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura com 120 e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente; todos os tratamentos com aplicação de inoculante no sulco de plantio na dose de 100 mL p.c ha⁻¹ na presença de adubação nitrogenada; inoculação no sulco de plantio na dose de 200 mL p.c ha⁻¹ com adubação nitrogenada de 20 e 30 kg ha⁻¹ na semeadura e 120 e 180 kg ha⁻¹ em cobertura, respectivamente, não diferindo estatisticamente dos tratamentos que não foram inoculados, mas receberam adubação de 10 e 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 60 e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente.

O comprimento de espiga também foi influenciado pela inoculação de sementes com *Azospirillum spp* em um experimento realizado por Cavaletti et al. (2000), onde verificaram que com a inoculação de sementes na presença de 70 kg ha⁻¹ de N para semeadura e cobertura, o comprimento de espiga foi de 14,7 cm, e no tratamento sem adubação nitrogenada o comprimento foi de 13,8 cm, ainda quando observou-se o tratamento controle (sem inoculação e sem adubação nitrogenada) o comprimento de espiga foi de 13,2 cm. Corroborando com os resultados obtidos por Kappes et al. (2013), que inoculação de sementes com *A. brasilense* proporcionou incremento no comprimento de espiga de 6,7 cm em relação ao tratamento sem inoculação.

Os maiores diâmetros de espiga (Tabela 8) foram observados nos tratamentos que receberam adubação nitrogenada de 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura sem inoculação e com inoculação no sulco na dose de 100 e 200 mL p.c. ha⁻¹.

Quanto ao número de fileiras de grãos por espiga, embora tenha-se apresentado diferença estatística, o número de fileira ficou na média de 16 fileiras por espigas.

Para o número de grãos por fileira observa-se que os tratamentos com inoculação na semente e inoculação no sulco de plantio na dose de 100 mL p.c ha⁻¹ ambos com adubação nitrogenada de 30 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, tiveram a maior quantidade de grãos por fileira. De modo inverso, os tratamentos com inoculação de semente com 10 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura e inoculação no sulco na

dose de 200 mL p.c. ha⁻¹ na ausência de N e com aplicação de 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura tiveram as menores quantidades de grãos por fileira (Tabela 8).

Tabela 8. Comprimento de espiga (CE), diâmetro de espiga (DE), número de fileiras de grãos por espiga (NF) e número de grãos por fileira (NGF), em função da associação de nitrogênio e *Azospirillum brasilense*⁽¹⁾

| Tratamentos | Características avaliadas | | | |
|-------------|---------------------------|---------|---------|---------|
| | CE | DE | NF | NGF |
| | (cm) | (mm) | | |
| SI + A1 | 15,74 a | 50,88 b | 16,5 b | 36,75 b |
| SI + A2 | 15,46 a | 52,16 a | 16,8 a | 36,30 b |
| SI+ A3 | 14,98 b | 50,26 b | 16,2 b | 35,58 c |
| IS + A0 | 14,58 c | 49,50 b | 16,9 a | 35,15 c |
| IS+ A1 | 14,55 c | 50,02 b | 16,5 b | 34,41 d |
| IS + A2 | 15,66 a | 50,47 b | 16,3 b | 35,83 c |
| IS + A3 | 16,06 a | 50,79 b | 16,2 b | 37,61 a |
| D1 + A0 | 14,78 c | 49,41 b | 16,4 b | 35,61 c |
| D1 + A1 | 15,74 a | 50,25 b | 17,05 a | 35,64 c |
| D1 + A2 | 15,86 a | 51,94 a | 16,1 b | 36,70 b |
| D1 + A3 | 15,92 a | 50,58 b | 16,7 a | 37,48 a |
| D2 + A0 | 14,56 c | 49,63 b | 16,6 a | 34,21 d |
| D2 + A1 | 15,11 b | 50,16 b | 16,8 a | 34,53 d |
| D2 + A2 | 16,42 a | 51,88 a | 17,2 a | 35,80 c |
| D2 + A3 | 16,42 a | 50,80 b | 16,5 a | 37,05 b |
| D3 + A0 | 15,31 b | 50,43 b | 16,75 a | 35,25 c |
| D3 + A1 | 15,10 b | 50,33 b | 16,60 a | 35,38 c |
| D3 + A2 | 15,05 b | 50,59 b | 16,60 a | 35,51 c |
| D3 + A3 | 15,26 b | 49,96 b | 16 b | 35,98 c |
| CV (%) | 2,61 | 1,44 | 2,38 | 1,59 |

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Verifica-se na Tabela 9 que as características diâmetro de sabugo e número de grãos por espiga foram influenciadas pela aplicação de *Azospirillum*

brasiliense associado ao nitrogênio. Para a característica de comprimento de grãos não foi observado efeito estatístico significativo.

Tabela 9. Resumo da análise de variância para diâmetro de sabugo (DS), comprimento de grãos (CG) e número de grãos por espiga (NGE). Chapadão do Sul, 2013

| F.V. | G.L. | Quadrados Médios | | |
|-------------|------|------------------|-----------------------|--------------|
| | | DS | CG | NGE |
| Blocos | 3 | 0,12259 | 0,57808 | 92,86246 |
| Tratamentos | 18 | 1,75270** | 0,36466 ^{ns} | 1097,64259** |
| Resíduo | 54 | 0,42461 | 0,22808 | 83,56781 |

Teste F: ** – significativo a 5% de probabilidade.

Os maiores diâmetros para sabugos foram alcançados sempre na presença de nitrogênio, tanto sem inoculação, como para inoculação das sementes e aplicação do inoculante nas doses de 100, 200 e 300 mL p.c. ha⁻¹, sendo a única exceção a dose de 300 mL p.c. ha⁻¹, que obteve alto valor para diâmetro de sabugo na ausência de N. O menor diâmetro de sabugo constatado foi no tratamento com aplicação da dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ associado a adubação nitrogenada de 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura.

O tratamento com aplicação de inoculante no sulco de plantio na dose de 100 mL p.c. ha⁻¹ associado a maior quantidade de adubação nitrogenada proporcionou maior número de grãos por espiga (Tabela 10), enquanto que os tratamentos com inoculação de semente com adubação nitrogenada de 10 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura, e aplicação no sulco de plantio nas doses de 200 e 300 mL p.c. ha⁻¹ associado a 10 e 30 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 60 e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente, tiveram os menores resultados, não diferindo estatisticamente do tratamento sem inoculação associado a 30 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura.

Tabela 10. Diâmetro de sabugo (DS), comprimento de grãos (CG) e número de grãos por espiga (NGE), em função da associação de nitrogênio e *Azospirillum brasilense*⁽¹⁾

| Tratamentos | Características avaliadas | | |
|-------------|---------------------------|---------|-----------|
| | DS | CG | NGE |
| | (mm) | | |
| SI + A1 | 32,10 a | 10,79 a | 606,42 b |
| SI + A2 | 31,51 a | 10,88 a | 609,25 b |
| SI+ A3 | 32,22 a | 10,88 a | 576,96 d |
| IS + A0 | 31,18 b | 10,48 a | 592,96 c |
| IS+ A1 | 30,86 b | 10,68 a | 567,83 d |
| IS + A2 | 31,00 b | 11,07 a | 584,37 c |
| IS + A3 | 32,55 a | 11,06 a | 609,57 b |
| D1 + A0 | 30,82 b | 10,69 a | 588, 65 c |
| D1 + A1 | 31,54 a | 11,38 a | 606,97 b |
| D1 + A2 | 31,50 a | 10,88 a | 591,47 c |
| D1 + A3 | 31,73 a | 10,64 a | 625,99 a |
| D2 + A0 | 30,79 b | 10,67 a | 568,72 d |
| D2 + A1 | 30,85 b | 10,67 a | 579,18 d |
| D2 + A2 | 32,12 a | 10,50 a | 615,43 b |
| D2 + A3 | 32,05 a | 10,82 a | 610,84 b |
| D3 + A0 | 31,78 a | 11,44 a | 589,85 c |
| D3 + A1 | 29,77 c | 10,69 a | 590, 23 c |
| D3 + A2 | 31,53 a | 10,95 a | 590,35 c |
| D3 + A3 | 31,52 a | 11,26 a | 575,47 d |
| CV (%) | 2,07 | 4,38 | 1,54 |

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Todas as características encontradas na Tabela 11, massa de grãos por espiga, massa de cem grãos, produtividade de grãos e teor de nitrogênio nos grãos foram influenciados pela aplicação de *Azospirillum brasilense* associado ao nitrogênio.

Tabela 11. Resumo da análise de variância para massa de grãos por espiga(MGE), massa de cem grãos (M100G), produtividade de grãos (PG) e teor de N nos grãos (TNG). Chapadão do Sul, 2013

| F.V. | G.L. | Quadrados Médios | | | |
|-------------|------|------------------|-----------|-----------------|-----------|
| | | MGE | M100G | PROD | TNG |
| Blocos | 3 | 368.59537 | 3,57538 | 29579,85463 | 0.00076 |
| Tratamentos | 18 | 364.2536** | 8,79014** | 1328856,77042** | 0.02088** |
| Resíduo | 54 | 187.71779 | 25,62933 | 40706,08037 | 0.00144 |

Teste F: ** – significativo a 5% de probabilidade.

A massa de grãos por espiga (Tabela 12) foi pouco influenciada pelos tratamentos, apresentando menor peso de grãos apenas nos tratamentos que tiveram inoculação de semente na ausência de adubação nitrogenada e na quantidade de 10 kg ha⁻¹ de N em semeadura com 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura e no tratamento com aplicação do inoculante no sulco de plantio na dose de 100 mL p.c. na ausência de nitrogênio.

A massa de 100 grãos (Tabela 12) importante componente da produtividade do milho, teve os maiores resultados nos tratamentos que tiveram inoculação de sementes associado a 30 kg ha⁻¹ em semeadura e 180 kg ha⁻¹ em cobertura e nos tratamentos com aplicação das bactérias no sulco de plantio nas doses de 100 mL p.c. ha⁻¹ associado a 10 e 30 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 60 e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente. O menor peso de cem grãos foi obtido nos tratamento com inoculação de semente na ausência de nitrogênio. Embora se tenha verificado diferença estatística para esta característica, este é o componente da produção menos afetado por variações nas práticas de manejo e adubação BORRÁS e OTEGUI (2001). A massa de 100 grãos é uma característica influenciada pelo genótipo da planta, pela disponibilidade de nutrientes e pelas condições climáticas durante os estádios de enchimento dos grãos (CRUZ et al., 2008).

A máxima produtividade de grãos (10370 kg ha⁻¹) foi atingida com a aplicação de *A. brasilense* no sulco de plantio na dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ associado a 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 120 kg ha⁻¹ em cobertura (Tabela 12). Este rendimento foi superior em 9,35 % (887 kg ha⁻¹) em relação a maior produtividade de grãos de milho obtida em relação ao tratamento sem inoculação. Quando se procedeu a aplicação das bactérias na dose de 300 mL

p.c. ha⁻¹ sem adubação nitrogenada esse incremento foi de aproximadamente 4,77% (449 kg ha⁻¹) comparado ao tratamento sem inoculação associado a menor dose de N mineral. De acordo com Dobbelaere et al. (2003) a contribuição das bactérias diazotróficas torna-se maior quando as plantas recebem doses variáveis de fertilizantes nitrogenados. Corroborando com Cavallet et al. (2000) onde constataram que a aplicação de nitrogênio em cobertura proporcionou aumento de 856 Kg ha⁻¹ na produtividade do milho quando as sementes foram inoculadas com *Azospirillum* spp. Resultados semelhantes também foram constatados por Hungria et al. (2010), que avaliaram estirpes de *A. brasilense* (Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7) com adubação nitrogenada de semeadura de 24kg ha⁻¹ e observaram aumento no rendimento de grãos de milho de 662-823 kg ha⁻¹ (24-30%) em relação ao tratamento controle (não inoculado). Por outro lado, Bassi (2009), avaliou as duas formas de aplicação de *A. brasilense* (sulco e semente) e doses de nitrogênio em cobertura na cultura de milho, e não verificaram incrementos estatisticamente significativos na produtividade do milho em nenhum das formas de aplicação do inoculante.

Nos tratamentos onde foram aplicadas as maiores doses de N (30 kg ha⁻¹ em semeadura e 180 kg ha⁻¹ em cobertura) tiveram em média as menores produtividades. Isto pode ser explicado devido a volatilização da amônia, resultante da aplicação da uréia no solo. A hidrólise deste fertilizante eleva o pH ao redor dos grânulos e converte todo o conteúdo de N em NH₄⁺, que reage com o OH⁻ e NH₃⁺ volátil (Ernani, 2008) podendo causar toxidez as plantas e prejudicar a produtividade de grãos. Provavelmente neste experimento a aplicação de 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, pode ter influenciado nas menores médias de produtividade, embora para os outras características avaliadas não foi verificado o mesmo comportamento. Segundo recomendações de Fancelli (2010) doses de N superiores a 150 kg ha⁻¹ devem ser parceladas.

Em relação ao teor de nitrogênio nos grãos (Tabela 12), foi possível observar que os maiores teores de nitrogênio foram obtidos nos tratamentos com inoculação de semente associado a 20 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura; aplicação da bactéria no sulco de plantio nas doses de 100 mL p.c. ha⁻¹ associado a 20 e 30 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 120 e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente; na dose de 200 mL p.c. ha⁻¹

para todas as doses de N, exceto na sua ausência e na dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ associado a 10 e 20 kg ha⁻¹ de N em semeadura com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura, respectivamente. A menor média foi obtida no tratamento sem inoculação associado a 20 kg ha⁻¹ em semeadura e 120 kg ha⁻¹ em cobertura.

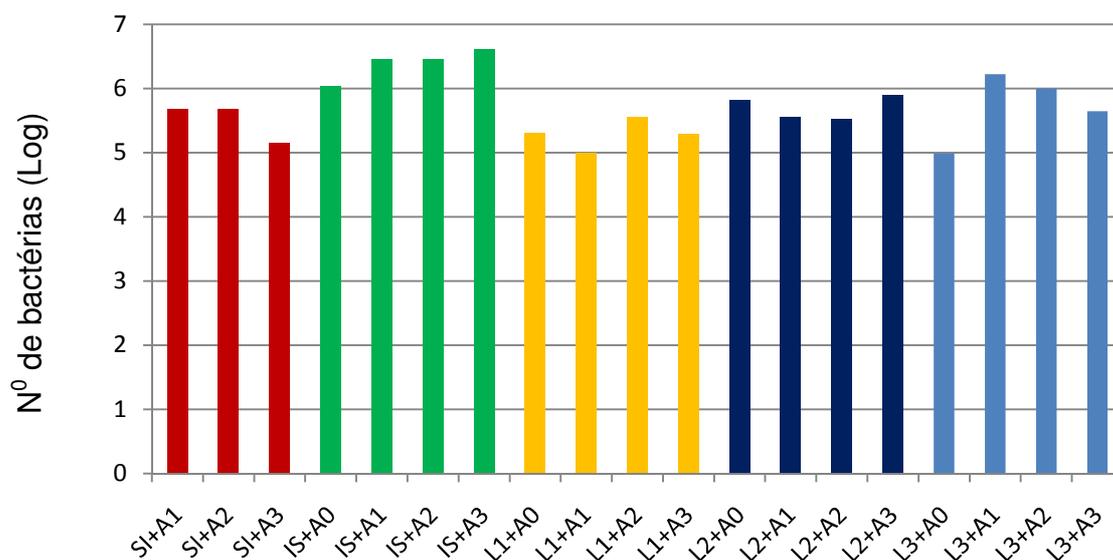
Tabela 12. Massa de grãos por espiga (MGE), massa de 100 grãos (M100G), produtividade de grãos e teor de N nos grãos em função da associação de nitrogênio e *Azospirillum brasilense*⁽¹⁾

| Tratamentos | Características avaliadas | | | |
|-------------|---------------------------|--------------|------------------------------|------------|
| | MGE | M100G (g) | PG (Kg ha ⁻¹) | TNG (%) |
| SI + A1 | 160,65 a | 30,81 c | 9403c | 1,06b |
| SI + A2 | 159,22 a | 29,56 d | 9483c | 0,91d |
| SI+ A3 | 165,72 a | 30,72 c | 8358e | 1,09b |
| IS + A0 | 140,19 b | 27,64 f | 8793d | 0,98c |
| IS+ A1 | 144,74b | 30,16 c | 9097d | 1,16a |
| IS + A2 | 164,55 a | 32,17 b | 8952d | 1,07b |
| IS + A3 | 160,66 a | 33,20 a | 7963f | 1,05b |
| D1 + A0 | 144,37 b | 29,93 d | 8907d | 1,02c |
| D1 + A1 | 159,31 a | 29,90 d | 8598e | 1,10b |
| D1 + A2 | 174,00 a | 32,89 a | 9528c | 1,13a |
| D1 + A3 | 156,36 a | 32,53 a | 8388e | 1,15a |
| D2 + A0 | 165,82 a | 29,18 d | 9194c | 0,98c |
| D2 + A1 | 159,68 a | 31,54 b | 9422c | 1,19a |
| D2 + A2 | 164,01 a | 30,40 c | 8992d | 1,11a |
| D2 + A3 | 164,13 a | 31,50 b | 8563e | 1,15a |
| D3 + A0 | 161,35 a | 29,64 d | 9852b | 1,06b |
| D3 + A1 | 171,64 a | 29,54 d | 9489c | 1,13a |
| D3 + A2 | 174,85 a | 28,65 e | 10370a | 1,13a |
| D3 + A3 | 170,20 a | 29,60 d | 8799d | 1,10b |
| CV (%) | 8,50 | 2,26 | 2,23 | 3,53 |

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para o NMP de bactérias presentes nas raízes frescas das plantas (Figura 1), observou-se que o tratamento com inoculação de sementes associado a 30 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 180 kg ha⁻¹ em cobertura, houve valor aproximadamente de 1,5 Log superior em relação ao tratamento com menor crescimento de bactéria, que foram os tratamentos com aplicação das bactérias no sulco de plantio nas doses de 100 mL p.c. ha⁻¹ associado a 10 kg ha⁻¹ em semeadura com 60 kg ha⁻¹ em cobertura e a dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ sem adubação nitrogenada. Todos os tratamentos com inoculação de sementes e o tratamento com aplicação no sulco de plantio na dose de 300 mL p.c. ha⁻¹ com aplicação de 10 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura se destacaram das demais, apresentando NMP superiores a Log₁₀=6. Ainda, quando se compara a média dos tratamentos em relação aos tratamentos controle (sem inoculação), observa-se que os tratamentos que foram inoculados nas sementes, tiveram um crescimento de bactérias 16,84% superior em relação aos tratamentos que não tiveram inoculação. A aplicação de inoculante no sulco de plantio na dose de 100 mL não teve o mesmo comportamento, a população de bactérias foi 3,30% inferior ao tratamento sem inoculação. Para a aplicação de inoculante no sulco de plantio, na dose de 200 mL e 300 mL, o acréscimo no crescimento da população de bactérias foi de 4,21% e 7,51%, respectivamente, em relação ao tratamento sem inoculação.

Figura 1. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por grama de matéria fresca de raiz. Chapadão do Sul, 2013



Existe uma forte relação entre genótipo e bactéria, onde dependendo do híbrido utilizado, o efeito da inoculação pode ser positivo, nulo ou até mesmo negativo. Braccini et al. (2012) notaram que a inoculação das sementes com estirpes Abv5 e Abv6 de *A. brasilense* proporcionou incremento de produtividade do milho quando comparado aos tratamentos sem inoculação. As respostas quanto a inoculação com bactérias diazotróficas podem variar devido as condições de condução dos ensaios, à técnica de inoculação, características físicas e químicas do solo e competição com microrganismos nativos do solo (CHOTTE et al., 2002) Segundo Dobbelaere et al. (2003) provavelmente bactérias do gênero *Azospirillum* não tenham um rendimento satisfatório em solos que tenham altos níveis de fertilizantes. Reis Junior et al. (2008) já relataram efeito negativo de elevadas doses de fertilizantes nitrogenados sobre a população de bactérias diazotróficas associadas à cultura do milho. Neste experimento não foi verificado que a adubação nitrogenada influenciou negativamente a população de bactérias, e também pode-se observar que a maior população de bactérias não teve relação com a maior produtividade de grãos.

5 CONCLUSÕES

A aplicação no sulco de plantio na dose de 100 mL p.c ha⁻¹ de inoculante contendo *Azospirillum brasilense*, associado a 30 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura, resultou em maiores médias para maioria dos parâmetros avaliados, exceto para o número total de espiga, população de plantas por hectare, diâmetro de espiga e produtividade de grãos.

A maior produtividade de grãos foi atingida com inoculação no sulco de plantio na dose de 300 mL p.c ha⁻¹ associado a 20 ha⁻¹ de N em semeadura e 120 kg ha⁻¹ de N em cobertura;

A aplicação de 30 kg ha⁻¹ de N em semeadura e 180 kg ha⁻¹ de N em cobertura interferiu negativamente na produtividade do milho;

A inoculação de sementes resultou em maiores quantidades de bactérias por grama de raiz.

6 REFERÊNCIAS

- ARAUJO, L. A. N. de.; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. da. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 771-777, 2004.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 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.
- BARAK, R.; NUR, I.; OKON, Y. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 152, p. 643-649, 1983.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 591-603, 1990.
- BASSI, S. **Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho**. 2013. 50p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava.
- BRACCINI, L. A.; DAN, L. G. M.; PICCININ, G. G.; ALBRECHT, L. P.; BARBOSA, M. C.; ORTIZ, A. H. T. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associate with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, v. 25, p. 58-64, 2012.
- BORRÁS, L.; OTEGUI, M. E. Maize kernel weight response to post-flowering source-sink ratio. **Crop Science**, v. 41, n. 6, p. 1816-1822, 2001.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2000. 1367p.
- CANTARELLA, H.; DUARTE, A.P.; Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed). **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2012. p. 139-182.
- CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C.; VITTI, A.C. Nitrogênio e enxofre na cultura da cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO SOBRE NITROGÊNIO E ENXOFRE NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2007, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, 2007, p. 355-392.

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, nono levantamento junho 2013**. Brasília: Conab, 2013, 31p.

CHOTTE, J.; SCHWARTZMANN, A.; BALLY, R.; MONROZIER, L.J. Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 1083-1092, 2002.

CROES, C.L.; MOENS, S.; VAN BASTELAERE, E.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, K. W. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 2261-2269, 1993.

CRUZ, J. C.; PEREIRA, F. T. F. P.; PEREIRA FILHO, I. A.; COELHO, A. M. **Resposta de cultivares de milho à adubação nitrogenada em cobertura**. Sete Lagoas: Embrapa. 2005. p. 65 (Comunicado Técnico 116).

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

COELHO, A. M. **Manejo da adubação nitrogenada na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Circular técnica, 96).

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

DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 1992.

DÖBEREINER, J. (1997), A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. **Biociência**, v. 1, p. 2-3.

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.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, EMBRAPA SPI; Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

Duarte, O. J.; Mercado e Comercialização do milho. In: **Cultivo do Milho**. Sete Lagoas: Empresa Milho e Sorgo, 2000. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção, 1) Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/mercado.htm>> Acesso em: 06 fev. 2014.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627p.

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

ERNANI, P. R. **Química do solo e disponibilidade de nutrientes**. Lages: Graphel, 2008. 230p.

FANCELLI, A. L. **Boas práticas para o uso eficiente de fertilizantes na cultura do milho**. Piracicaba: IPNI - International Plant Nutrition Institute Brazil, 2010. 16p. (IPNI.Informações Agronômicas, 131).

FANCELLI, A. L. Nutrição e adubação do milho. In: **Curso de atualização em manejo racional do solo e nutrição de plantas**. Módulo III. 11ª aula. 18p. 2001.

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

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization – FAO, 2012 – Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S>. Acesso em: 24 de fev. 2014.

GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J.; DUARTE, J. O. Importância do milho em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 233, p. 7-12, 2006.

GAUT, B. S.; D'ENNEQUIN, M. L. T.; PEEK, A. S.; SAWKIMS, M. C. Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 97, n. 13, p. 7008-7015, 2000.

HARDY, R. W. F. Biological nitrogen fertilization: Present and future applications. In: SRIVASTAVA JP & ALDERMANS H (Eds): Agriculture and environmental challenges. **Proceedings of the 13th Agricultural Sector Symposium**, Washington, DC: **The World Bank**, p. 109-117, 1993.

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

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.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: EMBRAPA SOJA, 2011. 37p. (EMBRAPA SOJA. Documentos, 325).

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

HOEFT, R. G. **Desafios para a obtenção de altas produtividades de milho e de soja nos EUA**. Piracicaba, p. 1-4, 2003 (Informações Agronômicas, 104).

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

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

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLORES, L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1459-1465, 2007.

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

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

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

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia produção de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006). 10p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 76).

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

MICHIELS, K.; CROES C. L.; VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2241-2246, 1991.

MORAIS, T. P. de. **Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense* em híbridos de milho**. 2012. 71f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

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

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

PRADO, R. M. **Nutrição de Plantas**. 1.ed. São Paulo: Editora UNESP, 2008. v. 1. 300p.

QUADROS, P. D. de. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. 2009. 64p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RAMBO, L.; SILVA, P. R. F.; STRIEDER, M. L.; DELATORRE, C. A.; BAYER, C.; ARGENTA, G. Adequação de doses de nitrogênio em milho com base em indicadores de solo e de planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 3, p. 401-409, 2008.

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

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

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Fixação biológica de nitrogênio - estado de arte. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**. 2005. p. 151- 180.

REIS JÚNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; MENDES, C. I.; MEHTA, A. **Isolamento, caracterização e seleção de estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* associadas a diferentes variedades de milho cultivadas no Cerrado**. Planaltina: Embrapa-Cerrados, 2008. 36p. (Embrapa-Cerrados. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 206).

ROESCH, L. F. W. **Ocorrência e distribuição de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de milho**. 2003. 78p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

SOUZA, D. M. G. de.; LOBATO, E. Calagem e adubação para culturas anuais e semiperenes. In: SOUZA, D. M. G. De.; LOBATO, E.(Ed). **Cerrado: Correção do solo e adubação**. Brasília: Embrapa Cerrado; Embrapa Informações Tecnológicas, 2004. p. 283 – 315.

SUBEDI, K. D.; MA, B. L. Assessment of some major yield-limiting factors on maize production in a humid temperate environment. **Field Crops Research**, v. 110, p. 21-26.2009.

TEIXEIRA, F. F.; ANDRADE, R. V. de.; OLIVEIRA, A. C. de.; FERREIRA, A. da, S.; SANTOS, M. X. dos. Diversidade no germoplasma de milho coletado na região nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 3, p. 59-67, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 722p.

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

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