

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DE
NITROGÊNIO EM COBERTURA NA CULTURA
DO MILHO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SIMONE BASI

GUARAPUAVA-PR

2013

SIMONE BASI

**ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DE NITROGÊNIO EM
COBERTURA NA CULTURA DO MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Itacir Elói Sandini

Orientador

Mikael Neumann

Co-orientador

Luciano Farinha Watzlawick

Co-orientador

GUARAPUAVA-PR

2013

Catálogo na Publicação
Biblioteca da UNICENTRO, Campus CEDETEG

Basi, Simone

B311a Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura de milho / Simone Basi. -- Guarapuava, 2013
xiii, 50 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, 2013

Orientador: Itacir Eloi Sandini

Co-orientadores: Mikael Neumann e Luciano Farinha Watzlawick

Banca examinadora: Laércio Sartor, Tangriani Simioni Assmann

Bibliografia

1. Agronomia. 2. Produção vegetal. 3. Adubação nitrogenada. 4. Bactéria diazotrófica. 5. Fixação biológica de nitrogênio. 6. *Zea mays* L.. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

CDD 633.15

SIMONE BASI

**ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DE NITROGÊNIO EM
COBERTURA NA CULTURA DO MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Laércio Sartor - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Tangriani Simioni Assmann - UTFPR

Prof. Dr. Itacir Elói Sandini

Orientador

GUARAPUAVA-PR

2013

Ao meu filho Arthur e ao meu esposo Mauro,
Por sempre estarem ao meu lado, me dando forças,
apoiando, compreendendo... Estas pessoas foram a razão
para que eu pudesse prosseguir e concluir este mestrado.
Com muito amor, eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Redigir os agradecimentos com certeza foi uma das partes mais difíceis desta dissertação.

Agradeço a Deus por ter guiado o meu caminho e colocado em minha trajetória pessoas tão importantes, que foram essenciais para a realização e conclusão deste mestrado, a quem quero agradecer:

Primeiramente agradeço ao meu esposo Mauro Hahn, por ter me ajudado a superar os momentos difíceis, por acreditar em mim, pela confiança depositada, pela paciência, pelo amor e compreensão. Também agradeço ao meu pequeno Arthur, meu maior tesouro, que foi muito querido, mesmo nos momentos em que não pude dar a atenção merecida, o colo de mãe. O orgulho que vocês sentem por mim será convertido na obrigação de ser digna deste sentimento.

Aos meus pais, Nairo e Eva Basi, por me darem carinho, educação e suporte para vencer os desafios da vida de cabeça erguida e também pelo amor incondicional. A minha irmã Silvane, meu irmão Thiago, meu avô Vitório e ao meu cunhado Juares pelo apoio e incentivo durante este período importante da minha vida. “A família é o bem mais precioso que possuímos”. Obrigada por existirem!

Agradeço de forma especial ao professor orientador Itacir Elói Sandini, pelas inúmeras conversas que tivemos, pelas dúvidas esclarecidas, também pelos puxões de orelha, sugestões, correções, dicas, conhecimentos passados e principalmente pela amizade. Professor, obrigada por tudo.

Os meus co-orientadores: Professor Mikael Neumann pelas dicas, pela ajuda, disponibilidade, sempre auxiliando de forma prestativa em todas as vezes que precisei. Também, Professor Luciano Farinha Watzlawick, pessoa intelectual e humilde, sempre com bons conselhos e pronto para ajudar.

Agradeço imensamente a todos os meus queridos colegas e amigos do grupo de pesquisas do Laboratório de Plantas e Lavouras. Os companheiros de jornada, das horas tristes e felizes. Àqueles que sempre se dispuseram a ajudar, independente da atividade, do horário, dia da semana ou calor que fizesse ao relento do sol: Alex Natã Bazanezzi, Édina Cristiane Pereira Lopes, Fabiano Pacentchuk, Fernando Pacentchuk, Jaqueline Huzar Novakowiski, Jackson Huzar Novakowiski, Rodrigo, Tânia Maria Muller, Tatyanna Hyczy

Kaminski e Valmiler Vidal. Sem a ajuda destes amigos, seria impossível desenvolver este projeto. Muito obrigada a todos.

Deixo aqui meu sincero agradecimento a Jaqueline Huzar Novakowiski, pelo seu exemplo de humildade, dedicação, inteligência e garra. Esta pessoa me ajudou sempre e me ensinou muito. Obrigada Jaqueline pelas inúmeras correções dos meus trabalhos, pela ajuda no campo, pelo tempo que gastou em função das minhas dúvidas, por ser minha amiga. Sempre lhe serei grata.

Em especial, agradeço a empresa Nitral Urbana que foi quem me auxiliou financeiramente durante um grande período deste mestrado. Agradeço também a CAPES pela bolsa de estudos que me foi concedida neste último ano.

Obrigado a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Agronomia da UNICENTRO que foram indispensáveis para o meu crescimento profissional e intelectual. Também sou grata aos membros da banca pelas considerações e argumentações.

Quero agradecer a todos do Laboratório de Nutrição de Ruminantes (NUPRAN) pela concessão do espaço, principalmente a Cecília e a Danúbia, pelos ensinamentos e auxílio durante as análises.

Não posso deixar de agradecer aos colegas do Programa de Mestrado e da Graduação em Agronomia da Unicentro pelos materiais emprestados, pelas conversas trocadas e pelos momentos de alegria durante este tempo de convívio.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos e abreviaturas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos específicos.....	4
3. REFERENCIAL TEÓRICO	5
3.1. Exigências da cultura.....	5
3.2. Manejo da adubação nitrogenada.....	6
3.3. A inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i>	7
3.4. Benefícios da inoculação para a cultura do milho.....	9
3.5. Relação da bactéria com o nitrogênio.....	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1. Descrição da área.....	12
4.2. Implantação do experimento.....	13
4.3. Avaliações e metodologia.....	15
4.4. Análises estatísticas.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<i>ha</i>	Hectare
<i>N</i>	Nitrogênio
<i>NO₃</i>	Nitrato
<i>ATP</i>	Trifosfato de Adenosina
<i>mL kg⁻¹</i>	Mililitro por quilograma
<i>GL</i>	Graus de liberdade
<i>TS</i>	Tratamento de sementes
<i>HX</i>	Tecnologia de transgenia <i>Herculex</i>
<i>Kg ha⁻¹</i>	Quilogramas por hectare
<i>MAPA</i>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<i>FBN</i>	Fixação Biológica de Nitrogênio
<i>g i.a. ha⁻¹</i>	Gramas de ingrediente ativo por hectare
<i>u.f.c mL⁻¹</i>	Unidades formadoras de colônia por mililitro.
<i>L</i>	Litro
<i>CO₂</i>	Gás carbônico
<i>Y</i>	Tecnologia de transgenia <i>Yieldgard</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Temperatura média, mínima e máxima por decêndio em Guarapuava-PR, durante a safra 2011/12 (Fonte: Estação Meteorológica do IAPAR/CEDETEG).	12
Figura 2. Balanço hídrico correspondente à safra 2011/2012 (Fonte: Estação Meteorológica do IAPAR/CEDETEG).	13
Figura 3. Fluxograma relativo às variáveis analisadas no experimento de acordo com os eventos da cultura. Guarapuava, 2013.....	18
Figura 4. Altura de planta de milho em função da interação entre as doses de nitrogênio em cobertura e da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> nas sementes, no sulco e sem inoculação. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. ^{ns} Não significativo. (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.....	22
Figura 5. Altura de inserção da espiga de milho em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.....	23
Figura 6. Índice de área foliar da cultura do milho em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.....	24
Figura 7. Teor relativo de clorofila A, B e Total da cultura do milho em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.....	25
Figura 8. Teor de nitrogênio foliar função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.....	26
Figura 9. Índice de espigamento em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. * Significativo a 5% de probabilidade. (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.....	29
Figura 10. Número de grãos por espiga em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.....	30
Figura 11. Incidência de grãos ardidos em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.....	31
Figura 12. Teor de proteína nos grãos em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.....	32
Figura 13. Massa de mil grãos em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.....	32
Figura 14. Produtividade de grãos em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados correspondentes aos atributos químicos de solo da área experimental, Guarapuava, PR, 2013.....	13
Tabela 2 . Tratamentos realizados no experimento. Guarapuava, PR, 2013.....	14
Tabela 3. Resumo da análise de variância com os fatores de variação, graus de liberdade (GL) e quadrados médios para as variáveis avaliadas no experimento. Guarapuava, PR, 2013.....	20
Tabela 4. Altura de planta, altura de inserção, diâmetro de colmo, índice de área foliar, teores de clorofila A, B e Total do milho sob diferentes doses de nitrogênio em cobertura, com e sem inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> . Guarapuava, PR, 2013.....	21
Tabela 5. Teor de N foliar, índice de espigamento, número de fileiras por espiga, grãos por espiga, grãos ardidos, teor de proteína nos grãos e massa de mil grãos da cultura do milho sob diferentes doses de nitrogênio em cobertura, com e sem inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> . Guarapuava, PR, 2013.....	27
Tabela 6. Correlação linear entre as variáveis analisadas.....	35
Tabela 7. Incremento de produtividade do milho em relação à testemunha em função das doses crescentes de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013.	36
Tabela 8. Incremento médio de produtividade do milho em relação à testemunha em função da inoculação nas sementes e no sulco de semeadura. Guarapuava, PR, 2013.....	37

RESUMO

Simone Basi. Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho.

A bactéria *Azospirillum brasilense* além de produzir hormônios para as plantas também é capaz de fixar nitrogênio atmosférico, que quando inoculada na cultura milho torna-se uma técnica promissora para o desenvolvimento da planta e para o incremento de produtividade. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos e formas de inoculação de *A. brasilense* (estirpe BR11005 - Sp 245) e de doses nitrogênio em cobertura na cultura do milho. O experimento foi conduzido em Guarapuava (PR) na safra 2011/2012, com delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições, em arranjo fatorial 3 x 5 sendo duas formas de inoculação (sementes e sulco de semeadura) e o controle sem inoculação e o uso de 0; 75; 150, 225; 300 kg ha⁻¹ de N em cobertura, totalizando 15 tratamentos. Foram avaliados: altura de inserção de espiga, altura de planta, diâmetro de colmo, teor relativo de clorofila A, B e total, índice de área foliar, índice de espigamento, número de fileiras por espigas, número de grãos por espiga, massa de mil grãos, incidência de grãos ardidos e produtividade. Concluiu-se que a inoculação com *A. brasilense* independente do método de aplicação (via semente ou sulco) não proporcionou incrementos estatisticamente significativos na produtividade do milho, influenciando apenas na altura de plantas. A máxima eficiência de 11879 kg ha⁻¹ de grãos de milho seria alcançada com a dose de 222 kg ha⁻¹ de nitrogênio. Nas condições deste experimento, a inoculação com *Azospirillum brasilense* pode gerar economia no uso de fertilizantes minerais nitrogenados em cobertura.

Palavras-Chave: adubação nitrogenada, bactéria diazotrófica, fixação biológica de nitrogênio, *Zea mays* L..

ABSTRACT

Simone Basi. Association of *Azospirillum brasilense* and topdressing broadcast coverage nitrogen in fertilization in corn.

The bacterial *Azospirillum brasilense* also produce hormones to plants is also capable of fixing atmospheric nitrogen which corn when inoculated into the culture becomes a promising technique for the development of the plant and to increase productivity. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects and ways of inoculation of *A. brasilense* (strain BR11005 - Sp 245) and doses of nitrogen topdressing in corn. The experiment was carried out in Guarapuava (PR) in the 2011/2012 season with a randomized block design with four replications in a factorial 3 x 5 with two ways of inoculation (seed and furrow) and non-inoculated controls and use of 0, 75, 150, 225, 300 kg ha⁻¹ N in coverage, totaling 15 treatments. Were evaluated: height of insertion of spike, plant height, stem diameter, relative content of chlorophyll A, B and total leaf area index, index silking, number of rows per ear, number of kernels per row, number of grains per spike, thousand grain weight, incidence of grains and productivity. It was concluded that inoculation with *A. brasilense* regardless of the method of application (via seed or furrow) did not provide statistically significant increases in corn yield only in influencing plant height. The maximum efficiency of 11879 kg ha⁻¹ of corn grains would be achieved with a dose of 222 kg ha⁻¹ nitrogen. Inoculation with *Azospirillum brasilense* can generate savings in the use of broadcast coverage nitrogen.

Keywords: broadcast nitrogen, diazotrophic bacteria, nitrogen fixation, *Zea mays* L..

1. INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo devido suas diversas formas de utilização e seu potencial produtivo. Na safra 2011/12, 15,1 milhões de hectares foram cultivados com milho no Brasil com produtividade média de 4598 kg ha⁻¹. As regiões Sul e Centro-Oeste do país se destacam na produção deste cereal, apresentando produtividade média de 4974 kg ha⁻¹, acima, portanto da média nacional (CONAB, 2012). No entanto, esses valores são considerados baixos diante do potencial da cultura e da crescente demanda por alimentos. Isso demonstra a necessidade de buscar técnicas de manejo para obter incremento de produtividade e por consequência garantir lucros ao produtor.

Uma das principais limitações para alcançar altos rendimentos com a cultura do milho está relacionada ao manejo da adubação nitrogenada. Isso se deve ao fato do nitrogênio (N) ter um papel importante em vários processos essenciais para a manutenção da vida da planta, como constituinte da molécula de clorofila (ANDRADE et al., 2003), aminoácidos, bases nitrogenadas, coenzimas, enzimas e ácidos nucleicos (TAIZ E ZEIGER, 2004) e dessa forma, é considerado o nutriente que mais limita a produção (ROBERTO et al., 2010).

Atualmente, o manejo da adubação nitrogenada é realizado com o intuito de garantir boa produtividade e em função da dinâmica do N no solo são adicionadas grandes quantidades deste nutriente. Tendo em vista a crescente demanda por fertilizantes nitrogenados e a preocupação com as possíveis perdas e contaminação do ambiente (FERNANDES e LIBARDI, 2007), torna-se necessária aplicação de N na forma parcelada em cobertura (YAMADA e ABDALA, 2000) como também, buscar alternativas de suprimento de N via fixação biológica.

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em gramíneas ocorre por meio de bactérias diazotróficas. Especificamente para o milho, a *Azospirillum brasilense* é uma das bactérias que vem proporcionando resultados positivos. Esta bactéria é caracterizada pelo formato de bastonetes, as quais comumente são uniflageladas, Gram-negativas, com movimento vibratório característico e padrão flagelar misto (HALL e KRIEG, 1984).

Essas bactérias podem atuar no crescimento da planta através da produção de substâncias promotoras de desenvolvimento (auxinas, giberelinas e citocininas) as quais proporcionam melhor crescimento radicular (OKON e VANDERLEYDEN, 1997) e por consequência maior absorção de água e nutrientes (CORREA et al., 2008) resultando em uma

planta mais vigorosa e produtiva (BASHAN et al., 2004; HUNGRIA, 2011)

Usualmente a inoculação com *A. brasilense* proporciona incremento de massa seca, de acúmulo de N nas plantas e produtividade de grãos, principalmente se a associação for entre bactéria e genótipos não melhorados e em condições de baixa disponibilidade de N (OKON e VANDERLEYDEN, 1997). Além destes fatores, o estado nutricional da planta, qualidade dos exsudatos, a existência de microorganismos competidores e a escolha da estirpe também são fatores que podem influenciar na interação entre a planta de milho e a bactéria e afetar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (QUADROS, 2009).

Devido à incompatibilidade da *A. brasilense* com os produtos químicos utilizados do tratamento de sementes (CROES et al., 1993) há necessidade de estudo de métodos alternativos de inoculação. Assim, um método que vem sendo estudado é a inoculação no sulco de semeadura. Conforme Basi et al. (2011) a inoculação com *A. brasilense* (estirpes Abv5/Abv6) nas sementes ou no sulco de semeadura incrementou a produtividade da cultura do milho independentemente da dose de N aplicada em cobertura.

Em trabalho desenvolvido por Hungria (2011) foi verificado que a inoculação das sementes com *A. brasilense* mais 24 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 30 kg ha⁻¹ de N no florescimento proporcionou o rendimento médio de grãos de 7000 kg ha⁻¹ de milho o que poderia viabilizar a segunda safra anual em algumas regiões. Barros Neto (2008) observou que a inoculação das sementes com *A. brasilense* aumentou em 9% (793 kg ha⁻¹) a produtividade do milho. Já Cavallet et al. (2000), verificaram que o uso de inoculante no milho além de aumentar em 17% o comprimento médio das espigas também proporcionou incremento significativo na produtividade da cultura. Da mesma forma, Sandini e Novakowski (2011) constataram que a inoculação de *A. brasilense* sem aplicação de nitrogênio de base aumentou em 2048 kg ha⁻¹ (14,98%) a produtividade do milho.

Além do incremento na produtividade do milho, há relatos na literatura sobre a economia de fertilizantes nitrogenados quando a cultura é submetida à inoculação com *A. brasilense* (SANDINI e NOVAKOWISKI, 2011; CHENG et al., 2011). Segundo Fancelli (2010) o Brasil tem potencial para gerar economia de 30 a 50 kg ha⁻¹ de fertilizantes minerais nitrogenados com adoção da técnica de inoculação com *A. brasilense* no milho na safra e safrinha.

As pesquisas relacionadas à eficiência do uso de inoculantes a base de *A. brasilense* foram negligenciadas por muitos anos devido à inconsistência dos resultados que vinham

sendo obtidos, sendo que recentemente voltaram a ser o foco de muitos pesquisadores em função da necessidade do desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável. As gramíneas apresentam algumas vantagens quando comparadas as leguminosas. Possuem um sistema radicular fasciculado, tendo vantagens sobre o sistema pivotante das leguminosas para extrair água e nutrientes do solo, que aliado a outros fatores fisiológicos, promove maior atividade fotossintética (C4). Por isso, o interesse na fixação biológica em gramíneas é grande. Nem todo o nitrogênio necessário na cultura do milho é fornecido pela associação com a bactéria, fazendo da técnica uma forma de suplementação de N para a cultura. No entanto, esta alternativa pode propiciar redução no uso de fertilizantes minerais nitrogenados, e esta economia, pode ser igual ou superior àquela verificada com as leguminosas que podem ser auto-suficientes em nitrogênio (DÖBEREINER, 1992).

Este contexto demonstra a importância do desenvolvimento de pesquisas avaliando a viabilidade da inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas, na tentativa de verificar os benefícios desta tecnologia para a cultura do milho.

2. OBJETIVOS

Avaliar a forma de inoculação e a associação de *Azospirillum brasilense* com nitrogênio sob o desempenho produtivo da cultura do milho.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o teor de N foliar, teor de clorofila, teor de proteína e índice de área foliar das plantas de milho inoculadas ou não, nas diferentes doses de N em cobertura;
- Verificar a influência dos tratamentos com nitrogênio e com *A. brasilense* sob os componentes de rendimento e a produtividade da cultura do milho.
- Verificar a correlação entre os componentes de rendimento e a produtividade do milho.
- Realizar comparativo entre as formas de inoculação com *A. brasilense* a fim de verificar qual proporcionaria maior incremento de produtividade na cultura do milho.
- Analisar a existência ou não de economia de fertilizante mineral nitrogenado quando na presença da bactéria *A. brasilense*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

O milho é umas das principais culturas devido ao seu potencial produtivo e sua grande importância na alimentação humana e animal. No Brasil, a área total cultivada entre a primeira e segunda safra 2011/12 foi de 15111,4 mil hectares, o que representa 9,5% a mais do que no ano anterior. No entanto, a produtividade média nacional (4598 kg ha⁻¹) (CONAB, 2012) ainda é muito aquém do potencial de produção da cultura, uma vez que valores de 28391 kg ha⁻¹ são obtidos em Israel que é o maior produtor mundial de milho por área (FAO, 2010). Logo, isso demonstra a necessidade de testar novas técnicas de manejo para as grandes culturas agrícolas a fim de obter alimento de qualidade, atender a demanda pelo produto, incrementar a produtividade e aumentar os lucros para o agricultor.

Um dos principais entraves para a cultura milho está relacionado à adubação, sendo o nitrogênio (N) o nutriente que mais limita a produção (ROBERTO et al., 2010), uma vez que ele exerce funções essenciais para o metabolismo vegetal. Este nutriente é determinante do rendimento da cultura, estando associado principalmente ao crescimento e desenvolvimento dos drenos reprodutivos e participando na molécula de clorofila, a qual é indispensável para a manutenção da atividade fotossintética da planta (MARTIN et al., 2011).

3.1. Exigências da cultura

Recomenda-se aplicar 35 a 50 kg ha⁻¹ de N na semeadura do milho, ao passo que em cobertura sugere-se aplicar em dose total ou parcelada o restante da quantidade do nutriente calculada a partir da análise de solo e a expectativa de produtividade. Essa aplicação deverá ocorrer entre os estádios de quatro folhas completamente expandidas (V4) e de oito folhas completamente expandidas (V8). No entanto, a textura do solo (< 35% de argila), a disponibilidade hídrica e a dose de N (> 150 kg ha⁻¹) são indicadores de que se deve realizar o parcelamento da adubação nitrogenada (FANCELLI, 2010). Algumas recomendações de adubação nitrogenada também se baseiam no teor de matéria orgânica do solo, devido ao teor de nitrogênio no solo ter alta relação com a matéria orgânica (MELLO *et al.*, 1989), apresentar alta estabilidade nos valores e facilidade na sua determinação.

No estágio V4 da cultura do milho é onde ocorre a definição do número de óvulos e ovários que vão conter na espiga (RITCHIE et al., 2003) evento este que necessita de pelo

menos 25 kg ha⁻¹ de N. Além disso, entre V4 e V12 (doze folhas expandidas) ocorre a definição do número de fileiras e do tamanho da espiga, que são componentes de rendimento de grãos do milho (VITTI E BARROS JUNIOR, 2001). Diante disso, é indispensável que o N seja disponibilizado para estes estágios, sendo que é entre os 40 e 60 dias após a emergência que acontece a absorção mais intensa do nutriente (CANTARELLA, 1993) equivalendo a mais de 50% do total requerido pela planta de milho (SOUZA e LOBATO, 2004).

3.2. Manejo da adubação nitrogenada

Para o planejamento dessa adubação deve-se levar em conta que o N aplicado fica retido pelos microrganismos do solo por até três semanas, somente depois é liberado para a solução onde as plantas conseguem absorver (YAMADA, 1996). Também é importante destacar que altas doses (> 60 kg ha⁻¹) de N na semeadura podem causar salinização da região próxima a raiz, que além de prejudicar a germinação das sementes (FANCELLI, 2001) também gera prejuízos financeiros pela necessidade de ressemeadura. Também se faz necessário considerar que o N é um nutriente dinâmico, que sofre transformações e pode ser facilmente perdido por lixiviação, volatilização na forma amoniacal (N-NH₃), nitrificação, desnitrificação, mineralização, imobilização e mobilização (RAMBO et al., 2004), demonstrando que o parcelamento do N é uma alternativa para tentar diminuir as perdas e melhorar o fornecimento do nutriente para a cultura.

Essas melhorias para a cultura ficaram demonstradas no trabalho de Von Pinho et al. (2006), onde foi verificado que no sistema de semeadura direta a adubação nitrogenada em cobertura tanto em dose única ou parcelada influenciou na altura das plantas e incrementou significativamente a produtividade da cultura do milho no estado de Minas Gerais. Similarmente, Gomes et al. (2007) testou épocas de aplicação de N no milho e verificou que a aplicações de cobertura em dose total (30 dias após a semeadura) e o parcelamento (antecipada, semeadura e 30 dias após) foram as épocas que proporcionaram o maior massa de mil grãos e de grãos por espiga.

Segundo Bortolini et al. (2002) a aplicação de 150 kg ha⁻¹ de N em cobertura proporcionou ganho de 3030 kg ha⁻¹ de produção de grãos em relação a testemunha (0 kg ha⁻¹) e ainda incrementa 38,7 g planta⁻¹ de produção de massa seca (MS) no espigamento quando comparado com o tratamento controle, devido a adubação nitrogenada em cobertura.

Contudo, o manejo dos fertilizantes nitrogenados deve ser realizado de maneira adequada para garantir a produtividade da cultura, pois o excesso pode provocar perdas e a contaminação do ambiente (FERNANDES e LIBARDI, 2007) além de caracterizar um gasto desnecessário. Assim, a dose, a época de aplicação e as condições do solo devem ser realizadas com o intuito de suprir a planta nas fases críticas, para reduzir as perdas de N e minimizar os custos de adubação (HOEFT, 2003).

Diante da crescente demanda por fertilizantes nitrogenados, surge a necessidade de buscar alternativas para diminuir as perdas através do parcelamento da adubação de cobertura, assim como buscar alternativas de suplementação de N, sendo a FBN uma opção para incrementar o rendimento da cultura do milho e sem prejuízos aos recursos naturais.

3.3. A inoculação com *Azospirillum brasilense*

Vários estudos têm sido realizados buscando identificar microrganismos que tenham simbiose com gramíneas, como acontece na cultura da soja com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*. Entretanto, a bactéria em estudo é *Azospirillum brasilense*, a qual tem grande potencial de resposta em associação com a cultura do milho. O interesse na utilização dessa bactéria promotora de desenvolvimento capaz de contribuir para a nutrição de plantas tem aumentado e tende a aumentar nos próximos anos, devido ao alto valor financeiro investido anualmente com fertilizantes e em relação ao que se chama de Agricultura Sustentável (HUNGRIA et al., 2010).

Pesquisadores do estado do Paraná testaram e selecionaram estirpes de *Azospirillum* que melhor sobreviviam no solo, se adaptavam as tecnologias empregadas em milho e promoviam maior crescimento de planta. Estes estudos foram promissores para a autorização pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) das estirpes de *A. brasilense* Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 na a produção de inoculantes comerciais para a cultura do milho. Trabalhos realizados por essas entidades demonstraram que há incremento médio de 24% a 30% no rendimento de grãos de milho quando inoculados com *A. brasilense* (HUNGRIA, 2011).

Essas bactérias que se apresentam na forma de bastonetes usualmente uniflagelados, são Gram-negativas e apresentam movimento vibratório característico. A *A. brasiliense* possui um padrão flagelar misto, sendo um polar que é sintetizado no crescimento em meio

líquido e vários outros laterais que são sintetizados no meio sólido (HALL e KRIEG, 1984).

Bactérias do gênero *Azospirillum* podem atuar no crescimento vegetal por meio da redução do nitrato até amônia, podendo essa energia ser disponibilizada a outros processos vitais do metabolismo (FERREIRA et al. 1987), no entanto, este processo de fixação biológica também necessita de energia na forma de adenosina-tri-fosfato (ATP) para acontecer (HOFFMANN, 2007).

A FBN é um processo que depende de vários fatores. Para que a bactéria estabeleça uma interação positiva com a planta é indispensável a utilização de estipes de *Azospirillum brasilense* selecionadas (HUNGRIA, 2011) capazes de competir com os microorganismos já presentes no solo. Outro fator a ser levado em consideração é a escolha do genótipo a ser inoculado, pois a relação benéfica de simbiose entre o híbrido e a bactéria é determinada pela qualidade dos exsudatos liberados pelas raízes da planta (NEHL et al., 1996). Esse fenômeno é conhecido por quimiotaxia, onde cada genótipo libera uma quantidade de exsudato diferente, com composição química distinta, que pode ou não ser atrativo e servir de fonte de carbono (malato, piruvato, succinato e frutose) para as bactérias inoculadas (QUADROS, 2009).

Quanto à sobrevivência deste microorganismo, sabe-se que a *A. brasilense* tem baixa capacidade de sobreviver por períodos prolongados de tempo na maioria dos solos. As condições físico-químicas do solo e a ausência da planta hospedeira podem afetar diretamente a população da bactéria (BASHAN et al., 1995). Entretanto, em situações desfavoráveis essas bactérias desenvolvem mecanismos de proteção como formação de cistos, produção de poli- β -hidroxibutirato e de melanina, favorecendo sua sobrevivência (DEL GALLO e FENDIRIK, 1994).

A inoculação com *Azospirillum* é realizada de maneira similar a inoculação de sementes de soja com *Bradyrhizobium*. O produto pode ser aplicado na forma sólida (como turfa) ou na forma líquida. Também, é necessário ser cauteloso às condições de temperatura, não deixando exposto ao sol e sem aplicação conjunta com agroquímicos, já que trata-se de microrganismos vivos (HUNGRIA et al., 2010; JORNAL COOPERCAMPOS, 2009).

O método de aplicação do inoculante mais comum é via sementes. Devido a necessidade do tratamento de sementes e da comodidade quando este é feito industrialmente, 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 *A. brasilense* na associação com a planta (CROES et al., 1993). Conforme Basi et al. (2011) a aplicação de *A. brasilense* (estirpes Abv5 e Abv6) proporcionou incremento na produtividade do milho, sendo que a inoculação via sulco de semeadura não diferiu da realizada nas sementes, mostrando-se um método de aplicação eficiente.

Nas associações de gramíneas com bactérias fixadoras de N, não há formação de nódulos como acontece nas leguminosas. O que ocorre é a colonização da superfície e/ou do interior das raízes e interior da parte aérea da planta. Essas bactérias fixam o nitrogênio atmosférico e posteriormente o disponibilizam para a planta. No entanto, a seleção de estirpes para fabricação de inoculantes ainda precisa de muita pesquisa. Existem atualmente, pacotes tecnológicos utilizando variedades de plantas e estirpes bacterianas eficientes, que podem suprir mais de 50% do N necessário à planta (BÁRBARO et al., 2008).

3.4. Benefícios da inoculação para a cultura do milho

As características benéficas destas bactérias podem se resumir em: capacidade de penetrar na raiz das plantas, antagonismo a agentes patogênicos, associação com várias gramíneas e com não gramíneas (morango, tabaco, café e outras), produção de hormônios promotores de crescimento e desenvolvimento, baixa sensibilidade às variações de temperatura e ocorrência em todos os tipos de solo e clima (ARAÚJO, 2008).

Na maioria dos casos, a inoculação com *Azospirillum* proporciona aumento de massa seca, de produção de grãos e de acúmulo de N nas plantas, particularmente quando relacionada a genótipos não melhorados em presença de baixa disponibilidade de N (OKON e VANDERLEYDEN, 1997). Mas as contribuições da FBN são questionadas devido a transferência do N fixado ocorrer lentamente, tornando disponível para a planta ao uma pequena proporção (DOMMELEN et al., 1998).

Com o uso de produtos inoculantes a base de *Azospirillum* spp., Hungria et al. (2010) afirmaram que há aumento na produtividade de grãos de milho. Cavallet et al. (2000) por sua vez, constatou aumento no comprimento médio das espigas, sem alteração na altura da planta e no número de fileiras de grãos por espiga. Além disso, no mesmo experimento, esses autores constataram aumento da superfície de absorção das raízes da planta.

Plantas inoculadas com *Azospirillum* spp. tem a morfologia do sistema radicular

alterados como o aumento do número de radículas, do diâmetro médio das raízes laterais e de adventícias, o que possibilita a exploração de maior volume de solo, e aumenta a superfície de absorção das raízes da planta (OKON e VANDERLEYDEN, 1997; BERGAMASCHI, 2006; QUADROS, 2009).

Verona et al. (2010) observaram que a inoculação proporcionou maior diâmetro de caule e maior peso em relação à massa seca de parte aérea mesmo em estresse hídrico. Sabe-se que além das folhas, grande parte das reservas produzidas pela planta são armazenadas nos colmos, fazendo com que esta relação de maior massa de parte aérea e maior diâmetro de caule produzam melhores condições de armazenagem e uma possível maior produção final, já que essas reservas são indispensáveis para o bom desenvolvimento da planta, principalmente na fase reprodutiva, para suprir os drenos representados pelas espigas.

Hungria (2011) constatou que a inoculação das sementes com *A. brasilense* associada a aplicação de 24 kg ha⁻¹ de N na semeadura e 30 kg ha⁻¹ de N no florescimento pode proporcionar rendimento médio de 7000 kg ha⁻¹, resultado interessante para as regiões onde é possível realizar duas safras pro ano. Além disso, Fancelli (2010) reportaram que a inoculação de *Azospirillum* do milho no Brasil tem potencial para gerar a economia de 30 a 50 kg ha⁻¹ de fertilizantes minerais nitrogenados.

Por estes motivos, faz-se necessário utilizar estirpes eficientes na FBN e na produção de hormônios de crescimento e desenvolvimento, capazes de competir com as bactérias nativas bem como, selecionar genótipos de milho responsivos ou aptos a esta associação.

3.5. Relação da bactéria com o nitrogênio

Os resultados experimentais com a inoculação de *A. brasilense* são divergentes, uma vez que os estudos testando os efeitos dessa bactéria no desempenho do milho são inconsistentes devido ao relativo abandono desta linha de pesquisa por vários anos no Brasil, sendo retomada a pouco tempo.

Barros Neto (2008) pode concluir com sua pesquisa que, os níveis de N não influenciaram na resposta a inoculação. Assim como Barraco et al., (2009), em seus estudos em três sítios experimentais em Buenos Aires ocidental cultivando milho tratado com *Azospirillum* detectou uma melhoria de 6% na produção de grãos em relação ao controle sem inoculação. Este comportamento foi independente da aplicação de N.

Os benefícios da inoculação de *Azospirillum brasilense* podem ser verificados em outras culturas. Um exemplo disso, é o trabalho de Sala et al. (2008). Quando os autores inocularam sementes de trigo (*Triticum aestivum hard* L. e *Triticum durum* L.) e forneceram 0, 60 e 120 kg ha⁻¹ de uréia (70 % na semeadura e 30 % 30 dias após a semeadura) puderam perceber que há uma interação da resposta das bactérias endofíticas com a adubação nitrogenada. Como resultado da pesquisa, obteve-se a maior quantidade acumulada de N com a inoculação da estirpe IAC-AT-8 de *A. brasilense* e com a adição de 60 kg ha⁻¹ de N, quando comparado a testemunha. Também puderam comprovar que quando a dose de N passou de 60 para 120 kg ha⁻¹, houve um decréscimo linear no índice de eficiência de utilização do nutriente. Isto demonstrou que o incremento na produção de MS da parte aérea diminuiu conforme foi aumentada a dose de N.

No entanto, nem todo o N necessário na cultura do milho é fornecido pela associação com a bactéria. Trata-se de uma alternativa capaz de permitir que o produtor diminua o uso de adubos nitrogenados alcançando uma economia igual ou superior àquela verificada em leguminosas, que podem ser auto-suficientes em N (DÖBEREINER, 1992).

Barros Neto (2008), em um experimento realizado em Ponta Grossa-PR, considerou que no cultivo de milho na presença de *A. brasilense* pode ocorrer a redução de 50 kg de N ha⁻¹. Além disso, verificou incremento na produtividade na ordem de 793 kg ha⁻¹ pela prática de inoculação. Esses valores são altamente significativos, principalmente em um cenário de aumento no custo de produção que se anuncia para as próximas safras.

Diante dessa possibilidade de obter ganhos significativos de produtividade com a técnica de inoculação de *A. brasilense* na cultura do milho e da probabilidade de reduzir os custos com fertilizantes nitrogenados, buscou-se com este trabalho avaliar os efeitos de diferentes formas de inoculação de *A. brasilense* (estirpe BR11005 - Sp 245) e de doses de nitrogênio em cobertura no desempenho da cultura do milho.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Descrição da área

O experimento foi conduzido a campo, na Fazenda Galo Vermelho, em Guarapuava no estado do Paraná. O campo experimental está sob as coordenadas geográficas 25° 33' 26" Sul, 51° 29' 15" Oeste e altitude de 1100m. O clima da região é classificado como Cfb (Subtropical mesotérmico úmido) sem estação seca (MAAK, 1968). A precipitação média anual é de 1944 mm, com temperatura média anual mínima e máxima de 12,7°C e 23,5°C, respectivamente (IAPAR, 2000). No período entre setembro de 2011 até março de 2012, as temperaturas máxima, mínima e média comportaram-se conforme mostra a Figura 1. O balanço hídrico para o período estão expressos na Figura 2.

O solo da área experimental é do tipo Latossolo Bruno Distroférrico Típico (EMBRAPA, 2006a). A área vem sendo cultivada em sistema de semeadura direta há 15 anos. As características químicas do solo por ocasião da pré-semeadura do milho estão expressas na Tabela 1:

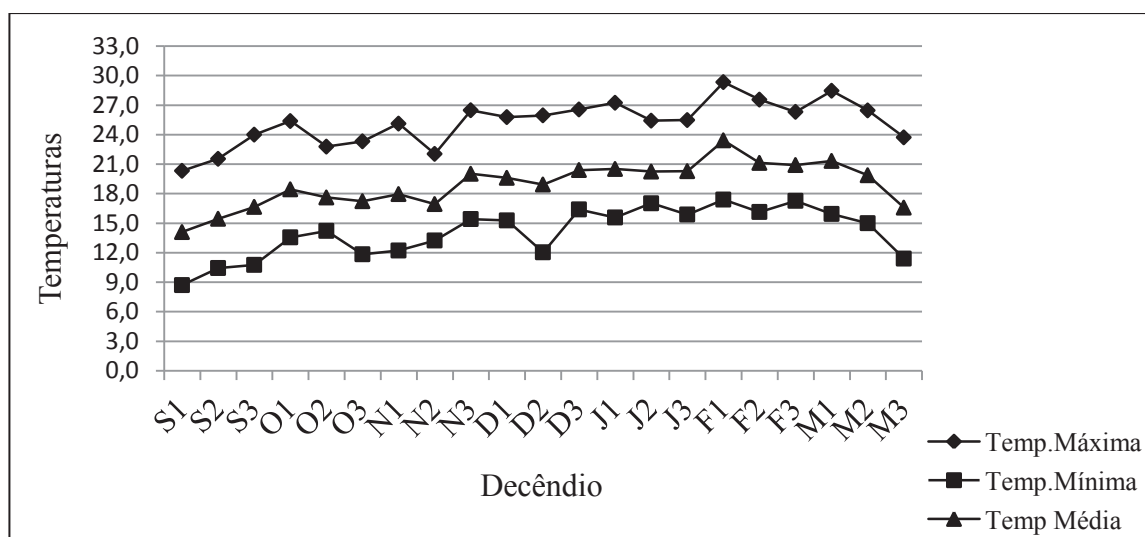


Figura 1. Temperatura média, mínima e máxima por decêndio em Guarapuava-PR, durante a safra 2011/12 (Fonte: Estação Meteorológica do IAPAR/CEDETEG).

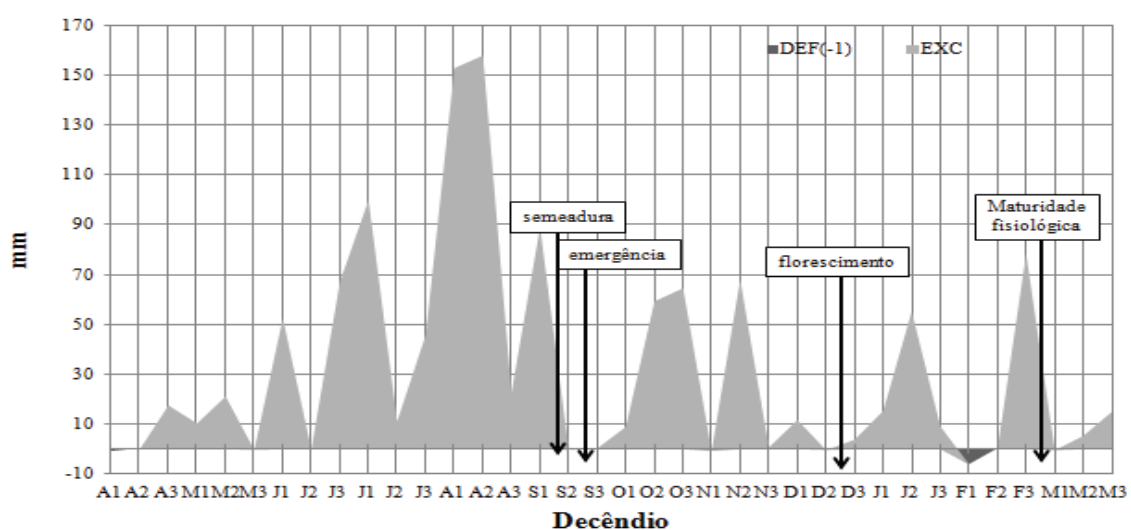


Figura 2. Balanço hídrico correspondente à safra 2011/2012 (Fonte: Estação Meteorológica do IAPAR/CEDETEG).

Tabela 1. Dados correspondentes aos atributos químicos de solo da área experimental, Guarapuava, PR, 2013.

Gleba	pH em CaCl ₂	Saturações (%)					Relação Entre Cátions		
		Bases V%	Al M%	Ca	Mg	K	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K
0-10 cm	4,83	53,34	0,00	29,85	18,10	5,40	1,65	5,53	3,35
10-20 cm	4,53	45,31	3,33	19,81	21,21	4,29	0,93	4,62	4,95

Gleba	M. O. g/dm ³	P Mehlich mg/dm ³	Complexo Sortivo (cmol/dm ³)							CTC (pH 7,0)
			K	Ca	Ca + Mg	Mg	Alumínio	H + Al	SB	
0-10 cm	40,94	9,27	0,80	4,42	7,10	2,68	0,00	6,91	7,90	14,81
10-20 cm	35,57	3,39	0,55	2,54	5,26	2,72	0,20	7,01	5,81	12,82

4.2. Implantação do experimento

O experimento foi implantado em sucessão a aveia preta (*Avena strigosa* L.) e azevém (*Lolium multiflorum*) em ausência de adubação nitrogenada, onde no período de inverno foram utilizados para produção de forragem para pastejo. O manejo das plantas daninhas foi efetuado com o herbicida *Glifosato* (Roundup®) utilizando-se 720 g i.a. ha⁻¹ antes da semeadura.

A semeadura do milho ocorreu no dia 19 de setembro de 2011, em sistema de semeadura direta, utilizando-se do híbrido P30F53 RR tratado industrialmente com inseticida *Thiametoxam* (Cruizer 350 FS) e *Fipronil* (Standak) mais o fungicida *Fludioxonil* +

Metalaxyl-M (Maxin XL).

A fertilização da área foi realizada com aplicação, a lanço, de 60 kg ha⁻¹ de K₂O na forma de Cloreto de Potássio. Como adubação de base utilizou-se 350 kg ha⁻¹ da fórmula 12-31-17 + 0,4% Zn na linha, representando 42 kg ha⁻¹ de N, 108 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 60 kg ha⁻¹ de K₂O. A adubação nitrogenada em cobertura ocorreu de acordo com os tratamentos estabelecidos, sendo metade da dose no estágio V4 e o restante em V6, utilizando-se de uréia (45% de N) como fonte de nitrogênio.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC) e os tratamentos compostos da combinação entre formas de inoculação de *A. brasilense* e doses de N, em arranjo fatorial 3 x 5. O primeiro fator foi correspondente a forma de inoculação com *A. brasilense* (inoculação na semente; no sulco e sem inoculação) e o segundo fator referente as doses de N em cobertura (0; 75; 150; 225 e 300 kg ha⁻¹), totalizando 15 tratamentos (Tabela 2) com quatro repetições. Cada parcela experimental foi composta por seis linhas com espaçamento de 0,60 m entre linhas e comprimento de 7 m. Para as avaliações, foi descartado 1 m de cada extremidade da linha (bordadura), sendo analisada apenas a área útil de 2,96 m².

Tabela 2 . Tratamentos realizados no experimento. Guarapuava, PR, 2013.

<i>Azospirillum brasilense</i>	Dose de inoculante (mL kg ⁻¹ de semente)	Doses de nitrogênio em cobertura (kg ha ⁻¹)	Nitrogênio na adubação de base (kg ha ⁻¹)
Semente	5	0; 75; 150; 225 e 300	42
Sulco	20	0; 75; 150; 225 e 300	42
Controle (Sem)	-	0; 75; 150; 225 e 300	42

Para a inoculação com a bactéria *Azospirillum brasilense* nas sementes aplicou-se 100 mL do inoculante por hectare milho, distribuídos de maneira uniforme às sementes e que foram semeadas no mesmo dia. Para a inoculação no sulco foi utilizada quatro vezes a dose de inoculante na semente, correspondendo a 400 mL aplicados diretamente no sulco de semeadura com auxílio de uma máquina de pulverização costal com jato dirigido por bico cônico. A estirpe BR 11005 foi veiculada no meio líquido, na concentração de 1,1x10⁹ u.f.c mL⁻¹. A metodologia para avaliação da concentração do número de células viáveis por mL do produto foi efetuada através do método da diluição seriada e contagem de colônias em meio de cultivo em placas de Petri.

O controle das plantas daninhas foi realizado com o herbicida *Mesotriona* (Callisto®) na dosagem de 0,4 L do i.a. ha⁻¹, mais 1750 L i.a ha⁻¹ de *Atrazina* (Atrazinax®) quando a planta de milho apresentou quatro folhas totalmente expostas e as plantas daninhas estavam com duas a seis folhas ou até dois perfilhos (EMBRAPA, 2006b).

Para o ajuste populacional das plantas, utilizou-se da técnica de desbaste, aproximadamente 20 dias após a semeadura entre os estádios de duas e três folhas da escala de Ritchie et al. (2003), objetivando obter a população de 70.833 plantas por hectare ou 34 plantas por linha.

O controle das doenças fúngicas foi realizado preventivamente com a aplicação do fungicida *Pyraclostrobin + Epoxiconazole* (Opera®) na dosagem de 0,75 mL ha⁻¹ mais óleo mineral (Assist®) na dose de 0,5% do volume da calda de 200 L ha⁻¹ no florescimento da cultura.

4.3. Avaliações e metodologia

As variáveis analisados no experimento foram: altura de inserção de espiga, altura de planta, diâmetro de colmo, teor relativo de clorofila A, B e total, índice de área foliar, teor e N foliar, índice de espigamento, número de fileiras por espigas, número de grãos por espiga, massa de mil grãos, teor de proteína no grão, incidência de grãos ardidos e produtividade (Figura 3).

Por ocasião do florescimento do milho foi determinada a área foliar de acordo com a metodologia de Tollenaar (1992) através da medida do comprimento (C) e a maior largura (L) de todas as folhas fotossinteticamente ativas (pelo menos 50% da sua área verde). Foram avaliadas quatro plantas da parcela que apresentavam homogeneidade fenológica e morfológica. Estimou-se a área foliar (A) de cada folha em cm² através da fórmula $A=C \times L \times 0,75$, considerando 0,75 como um coeficiente de correção para as folhas de milho que não apresentam formato retangular. Somando a área de todas as folhas, obteve-se a área foliar por planta (BORRÁS et al, 2003). Em seguida determinou-se o IAF (índice de área foliar) por meio da relação entre a área foliar das plantas e do espaço ocupado por elas em um metro quadrado (SANGÓI, 2011). Para avaliar o diâmetro do colmo, fez-se uso de paquímetro digital, realizando a medição no segundo entrenó visível de 10 plantas da parcela, no estádio R4 (grão farináceo) da cultura.

No estágio de florescimento foram realizadas leituras do teor relativo de clorofila A, B e total, de acordo com a metodologia descrita por Argenta (2003). Foram escolhidas cinco plantas aleatórias na parcela para realizar a medição. As leituras foram feitas na folha índice de cada planta, sendo duas leituras por folha (uma em cada lado da nervura) entre nos dois terços a partir da base do comprimento e a 1 cm da margem da folha. Para tanto, fez-se uso do clorofilômetro eletrônico da marca ClorofiLOG modelo Falker CFL1030. Este aparelho mede de maneira óptica, a quantidade de radiação transmitida através das folhas, em três comprimentos de onda, sendo eles: dois na faixa do vermelho (próximos aos picos de absorção da clorofila) e um no infravermelho próximo. A combinação destes valores de transmitâncias nos três diferentes comprimentos de onda gera o Índice de Clorofila Falker (IFC) que é a unidade de medida em índice adimensional do ClorofiLOG (FALKER, 2012), que em alguns aparelhos é chamada de SPAD.

Em seguida, foram amostradas as folhas índice das cinco plantas selecionadas a fim de verificar o teor de nitrogênio foliar. Essas folhas índice foram cortadas rente ao colmo e levadas para estufa de secagem por ventilação forçada de ar a 55°C até obter peso constante. Após, as amostras foram moídas em moinho tipo “Wiley” com peneira de 1mm de diâmetro e conduzidas para a análise química do nutriente. Os teores de nitrogênio foliar foram determinados de acordo com a metodologia do Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes da Embrapa (SILVA, 2009).

O índice de espigamento foi obtido pela relação entre o número de espigas e de plantas. Em três plantas de cada parcela realizou-se a medição do nível do solo até o nó da espiga superior e até a lígula da folha bandeira, para determinar a altura de inserção e de planta, respectivamente.

Quando a massa dos grãos apresentou aproximadamente 20% de umidade foi efetuada a colheita das espigas do milho para avaliação da produção de grãos secos. Para obtenção da produtividade, após a pesagem dos grãos de cada parcela e correção da umidade para 14 %, o valor obtido foi convertido para kg ha^{-1} .

Para estimar o número de grãos por espiga, multiplicou-se o número de fileiras por espiga e de grãos por fileira, obtidos pela contagem de dez espigas representativas da parcela (pequenas, médias e grandes). A massa de mil grãos foi determinada a partir da pesagem de 300 grãos de cada parcela e o teor de grãos ardidos pela análise visual de uma amostra de 250 g de grãos de milho. Foram considerados ardidos os grãos que apresentaram perda da

coloração característica por ação de umidade, calor ou fermentação por fungos em mais de um quarto do seu tamanho.

A partir de uma amostra de 250g de grãos por parcela, livre de impurezas e ardidos, determinou-se o teor de proteína dos grãos em ponto de colheita mecanizada. A amostra foi secada em estufa de secagem por ventilação forçada a 50°C até obter peso constante. Procedeu-se da moagem das amostras em moinho tipo “Wiley” com peneira de 1 mm de diâmetro e após, foi realizada a análise química de proteína. Os teores de proteína dos grãos foram determinados por digestão sulfúrica, de acordo com a metodologia do Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes da Embrapa (SILVA, 2009).

4.4. Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos ao Teste de Bartlett para testar a homogeneidade das variâncias e em seguida aplicou-se a análise de variância. As médias dos fatores qualitativos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa estatístico Sisvar e por análise de regressão para os fatores quantitativos buscando-se o modelo matemático que melhor se ajustasse ao comportamento das variáveis dependentes. Foram testados os modelos linear e quadrático sendo a escolha baseada no valor do coeficiente de determinação mais próximo a 1. Em todos os gráficos foi demonstrado o desvio padrão. Quando a equação foi quadrática, estimou-se a dose de N para obter a máxima eficiência técnica e econômica, onde:

- Dose Agronômica (kg ha^{-1}) = $-\beta_1/2\beta_2$

- Dose Econômica (kg ha^{-1}) = $(t/w) - \beta_1/2\beta_2$, onde t/w é a relação do preço do insumo (R\$ por kg de N) e do produto (R\$ por kg de milho) (Raij, 1991; Natale et al., 1996).

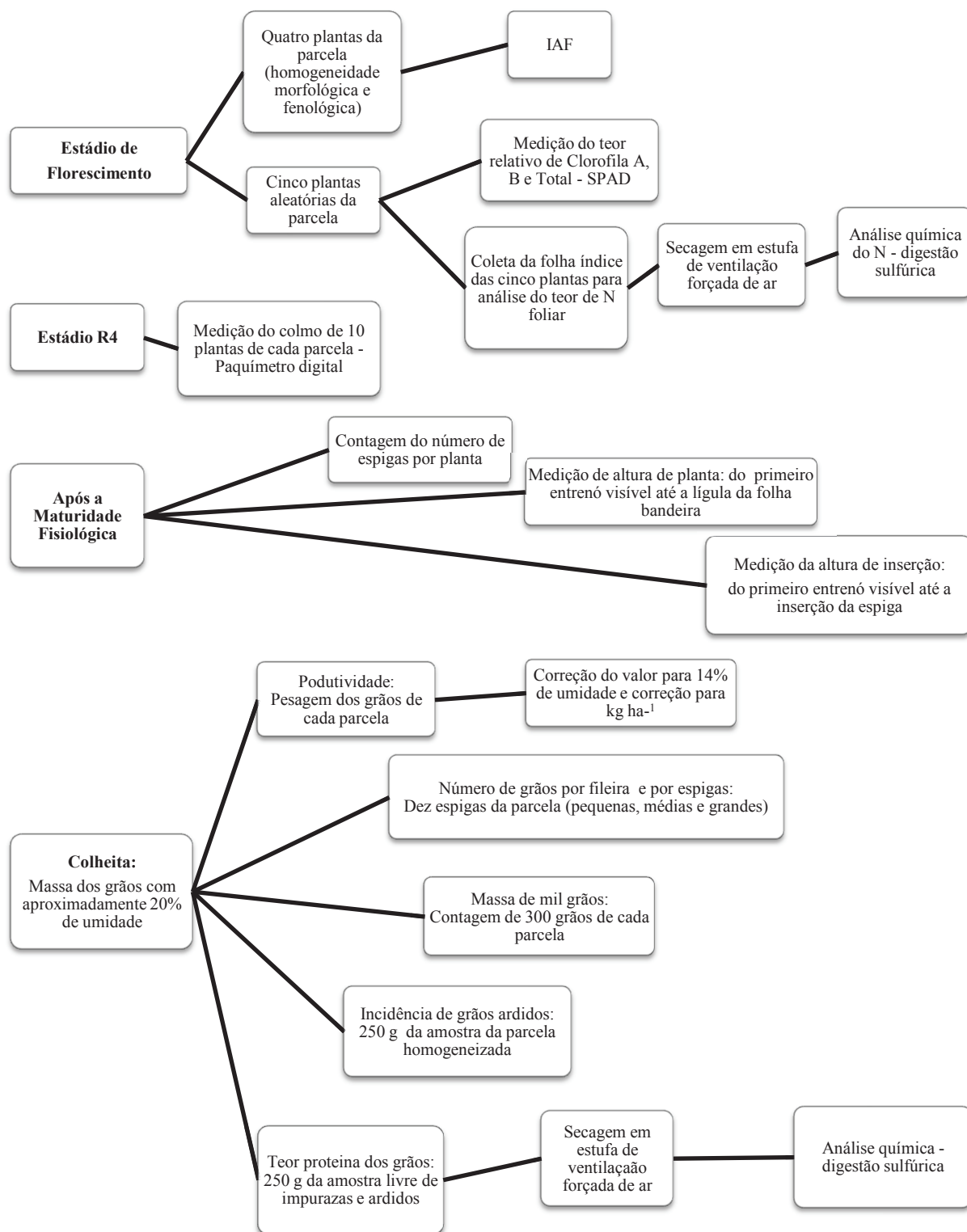


Figura 3. Fluxograma relativo às variáveis analisadas no experimento de acordo com os eventos da cultura. Guarapuava, 2013.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir dos resultados obtidos no Teste de Bartlett, as variâncias são homogêneas. Conforme a análise de variância (Tabela 3), verificou-se que a altura de inserção, o índice de área foliar, o teor relativo de clorofila A, B e Total, o índice de espigamento, número de grãos por espiga, o índice de área foliar, massa de mil grãos, teor de N foliar, teor de proteína dos grãos, incidência de grãos ardidos e o rendimento de grãos do milho foram afetados pelas doses de nitrogênio em cobertura, contudo não houve efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da interação dos fatores para estas variáveis. O número de fileiras por espiga e o diâmetro de colmo não foram afetados por nenhum dos fatores de variação. Contudo, a altura de planta foi influenciada pelo uso de *A. brasilense* e das doses de nitrogênio, sendo esta, a única variável que apresentou interação significativa entre os fatores analisados.

Na média dos resultados, a inoculação no sulco de semeadura foi a que proporcionou a menor altura de planta (208 cm), sendo que a inoculação nas sementes (212 cm) e o tratamento controle (211 cm) não diferiram entre si (Tabela 4). Segundo a análise de regressão (Figura 4), quando da ausência da inoculação seriam necessários 291 kg ha⁻¹ de N em cobertura para obter a máxima eficiência técnica (MET) de 218 cm de altura. Para a inoculação nas sementes, com a dose de 214 kg ha⁻¹ de N seria possível obter a MET de 216 cm de altura da planta. Já com a inoculação no sulco de semeadura, não apresentou diferenças significativas.

Esse resultado coincide com os de outros trabalhos onde a inoculação do milho com *A. brasilense* proporcionou plantas maiores e mais vigorosas (PEDRINHO, 2009; BRACCINI et al., 2012; BARASSI et al., 2008). Ao contrário, Cavallet et al. (2000) observaram que o uso de produtos inoculantes a base *Azospirillum* spp. não provocou alterações na altura da planta, assim como Francisco et al. (2012) não observaram diferenças na altura de planta, prolificidade e massa de mil grãos quando da inoculação de sementes com *A. brasilense* e aplicação de doses de N em cobertura na cultura do milho.

Tabela 3. Resumo da análise de variância com os fatores de variação, graus de liberdade (GL) e quadrados médios para as variáveis avaliadas no experimento. Guarapuava, PR, 2013.

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios							
		Altura de planta	Altura de inserção	Diâmetro de colmo	IAF	Teor de CI A	Teor de CI B	Teor de CI Total	Teor de N foliar
<i>Azospirillum brasilense</i> (A)	2	99,68 ^{*1}	40,47 ^{ns}	0,004 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,82 ^{ns}	0,64 ^{ns}	2,14 ^{ns}	14,05 ^{ns}
Doses de Nitrogênio (N)	4	379,53 ^{**}	303,09 ^{**}	1,119 ^{ns}	5,17 ^{**}	55,44 ^{**}	98,41 ^{**}	300,65 ^{**}	620,77 ^{**}
A x N	8	92,62 [*]	27,73 ^{ns}	0,116 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,71 ^{ns}	0,74 ^{ns}	2,56 ^{ns}	8,09 ^{ns}
Bloco	3	58,17 [*]	70,94 ^{ns}	1,68 [*]	0,08 ^{ns}	4,06 ^{**}	2,98 ^{ns}	13,28 ^{**}	18,16 ^{ns}
Resíduo	42	26,54	27,17	0,56	0,06	0,66	1,14	2,84	8,13
CV (%)		2,45	4,27	3,40	5,00	2,14	5,84	3,00	6,74

Fator de Variação	GL	Quadrados Médios						
		Índice de espigamento	Número de fileiras por espiga	Número de grãos por espiga	Incidência de grão Ardido	Teor de proteína no grão	Massa de mil grãos	Produtividade
<i>Azospirillum brasilense</i> (A)	2	0,0003 ^{ns}	0,35 ^{ns}	795,75 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,06 ^{ns}	136,50 ^{ns}	948325,62 ^{ns}
Doses de Nitrogênio (N)	4	0,0034 [*]	0,85 ^{ns}	17194,15 ^{**}	4,00 [*]	9,79 ^{**}	1620,77 ^{**}	41265814,12 ^{**}
A x N	8	0,0009 ^{ns}	0,30 ^{ns}	244,29 ^{ns}	1,34 ^{ns}	0,01 ^{ns}	63,13 ^{ns}	114572,56 ^{ns}
Bloco	3	0,0041 ^{**}	0,29 ^{ns}	588,25 ^{ns}	1,55 ^{ns}	0,11 ^{ns}	138,05 ^{ns}	1341800,68 ^{ns}
Resíduo	42	0,001	0,37	910,58	1,48	0,12	118,38	501937,48
CV (%)		3,09	3,68	6,11	98,77	5,10	3,80	6,83

¹ ** Significativo a 1% de probabilidade. * Significativo a 5% de probabilidade. ^{ns} Não significativo.

CV = Coeficiente de variação.

Tabela 4. Altura de planta, altura de inserção, diâmetro de colmo, índice de área foliar, teores de clorofila A, B e Total do milho sob diferentes doses de nitrogênio em cobertura, com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*. Guarapuava, PR, 2013.

<i>Azospirillum brasilense</i>	Doses de Nitrogênio (kg ha ⁻¹)					
	0	75	150	225	300	Média
	Altura de Planta (cm)					
Com TS ¹	203 a	214 a	211 a	218 a	214 a	212 a
Sem TS ²	199 a	209 a	210 a	221 a	217 a	211 ab
Sulco ³	201 a	206 a	214 a	208 b	209 a	208 b
Média	201	210	212	215	213	210
	Altura de Inserção (cm)					
Com TS	115 a	126 a	126 a	126 a	126 a	124 a
Sem TS	111 a	122 a	125 a	125 a	128 a	122 a
Sulco	115 a	119 a	121 a	127 a	122 a	121 a
Média	114	122	124	126	125	122
	Diâmetro de colmo (cm²)					
Com TS	21,77 a	21,91 a	22,33 a	22,02 a	22,35 a	22,07 a
Sem TS	21,54 a	21,81 a	22,18 a	22,44 a	22,54 a	22,10 a
Sulco	21,72 a	21,84 a	22,21 a	22,48 a	22,20 a	22,09 a
Média	21,68	21,85	22,24	22,31	22,36	22,09
	IAF (cm²)					
Com TS	4,0 a	5,0 a	5,3 a	5,5 a	5,4 a	5,0 a
Sem TS	3,7 a	4,9 a	5,3 a	5,4 a	5,4 a	5,0 a
Sulco	3,9 a	5,0 a	5,3 a	5,4 a	5,4 a	5,0 a
Média	3,9	5,0	5,3	5,5	5,4	5,01
	Teor de Clorofila A (IFC)					
Com TS	34,16 a	38,29 a	38,52 a	39,33 a	39,90 a	38,04 a
Sem TS	33,69 a	37,49 a	38,89 a	38,71 a	39,40 a	37,64 a
Sulco	34,84 a	37,10 a	38,90 a	38,87 a	39,63 a	37,87 a
Média	34,23	37,63	38,77	38,97	39,65	37,85
	Teor de Clorofila B (IFC)					
Com TS	13,23 a	18,00 a	18,87 a	20,76 a	20,45 a	18,26 a
Sem TS	13,23 a	17,27 a	19,80 a	20,05 a	20,27 a	18,12 a
Sulco	14,17 a	17,85 a	19,77 a	20,06 a	20,55 a	18,48 a
Média	13,54	17,71	19,48	20,29	20,42	18,29
	Teor de Clorofila Total (IFC)					
Com TS	47,39 a	56,29 a	57,39 a	60,09 a	60,35 a	56,30 a
Sem TS	46,92 a	54,77 a	58,69 a	58,75 a	59,67 a	55,76 a
Sulco	49,01 a	54,95 a	58,67 a	58,93 a	60,18 a	56,35 a
Média	47,77	55,33	58,25	59,26	60,07	56,14
	Teor de N foliar					
Com TS	29,21 a	40,66 a	44,95 a	46,63 a	50,38 a	42,37 a
Sem TS	30,37 a	40,76 a	41,77 a	46,44 a	47,94 a	41,45 a
Sulco	31,82 a	42,08 a	46,39 a	48,16 a	47,19 a	43,13 a
Média	30,47	41,17	44,37	47,08	48,50	42,32

¹ A. brasilense nas sementes. ² Controle. ³ A. brasilense no sulco de semeadura. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

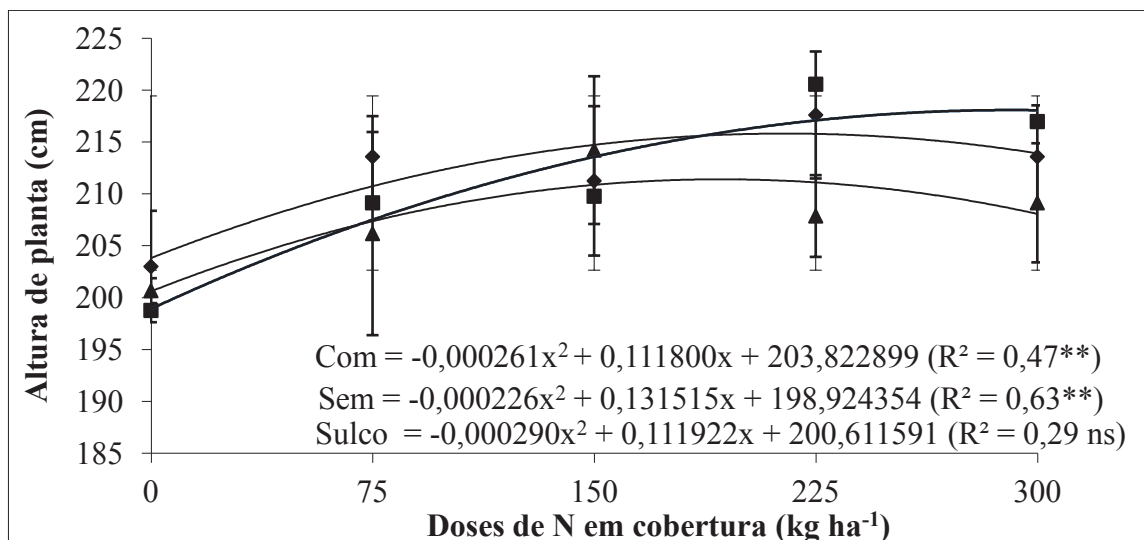


Figura 4. Altura de planta de milho em função da interação entre as doses de nitrogênio em cobertura e da inoculação com *Azospirillum brasilense* nas sementes, no sulco e sem inoculação. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. ^{ns} Não significativo. | (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.

Quanto à altura de inserção da espiga, observou-se resposta quadrática para a adubação nitrogenada, onde a máxima inserção de 126 cm seria obtida com a dose de 224 kg ha⁻¹ de N (Figura 5). No trabalho de Lana et al. (2012) em dois locais diferentes no estado do Paraná, avaliando o efeito da presença e ausência de adubação nitrogenada de base (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, verificou-se que a altura de inserção da espiga e de planta não sofreram efeito de nenhum desses três fatores analisados, efeito este que atribuíram a influência da genética do híbrido.

Já o diâmetro de colmo não foi influenciado pela inoculação e pelas doses crescentes de N em cobertura. Ao contrário dos resultados obtidos por Moraes (2012), onde sob condições de casa de vegetação, a dose de 100 kg ha⁻¹ nitrogênio proporcionou o maior diâmetro do colmo (14,76 mm) das plantas de milho, em comparação com a testemunha (0 kg ha⁻¹ de N) e a dose de 200 kg ha⁻¹ de N.

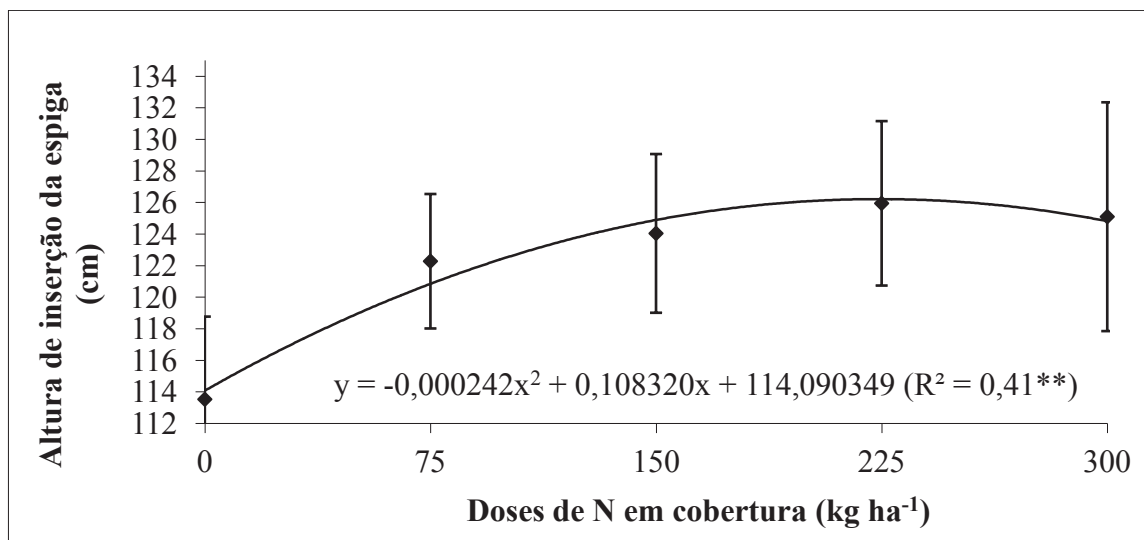


Figura 5. Altura de inserção da espiga de milho em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. | (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.

Observou-se também que independente da utilização de *A. brasilense*, o índice de área foliar (IAF) no florescimento teve comportamento diferenciado com as aplicações de N. À medida que as doses aumentaram, houve acréscimo de IAF até a dose de 225 kg ha⁻¹ de N, ficando propenso a diminuir posteriormente (IAF de 3,9; 5,0; 5,3; 5,5 e 5,4 para as doses de 0; 75; 150; 225 e 300 225 kg ha⁻¹ de N, respectivamente). Similarmente, França et al. (2011) constataram incremento no IAF do milho com a aplicação de doses crescentes de nitrogênio em cobertura (0, 60, 120 e 180 kg ha⁻¹ de N) em diferentes sistemas de cultivo (aveia/milho; vica/milho; aveia/milho e aveia + vica/milho + caupi), chegando a alcançar o IAF de 4,41 com a maior disponibilidade de nitrogênio, independente do sistema de cultivo.

Nota-se pela média dos tratamentos que a presença de N garantiu incremento significativo do IAF, mesmo nas menores doses testadas, efeito este que pode ser atribuído a importância do nutriente no crescimento da planta. Do mesmo modo, na análise de regressão foi verificado comportamento quadrático (Figura 6) onde 232 kg ha⁻¹ de N aplicados em cobertura corresponderia ao máximo IAF de 5,6.

Segundo Fancelli e Dourado Neto (2004), o IAF ideal para a cultura do milho varia entre 3 e 5, dependendo do arranjo de plantas, número e tamanho das folhas, do genótipo, clima, da fertilidade do solo e nutrição da planta. Neste experimento, a partir da dose de 150 kg ha⁻¹ de N testada, os índices encontrados ficaram acima dos valores críticos determinados

para a cultura, o que garante eficiente aproveitamento da luz pela planta e maior produção de fotoassimilados. Como a produtividade está diretamente relacionado à fotossíntese e esta depende do índice de área foliar, pode-se dizer que quanto mais rápido o IAF crítico for atingido e quanto mais tempo permanecer ativo maior será a produtividade do milho (PEREIRA e MACHADO, 1987).

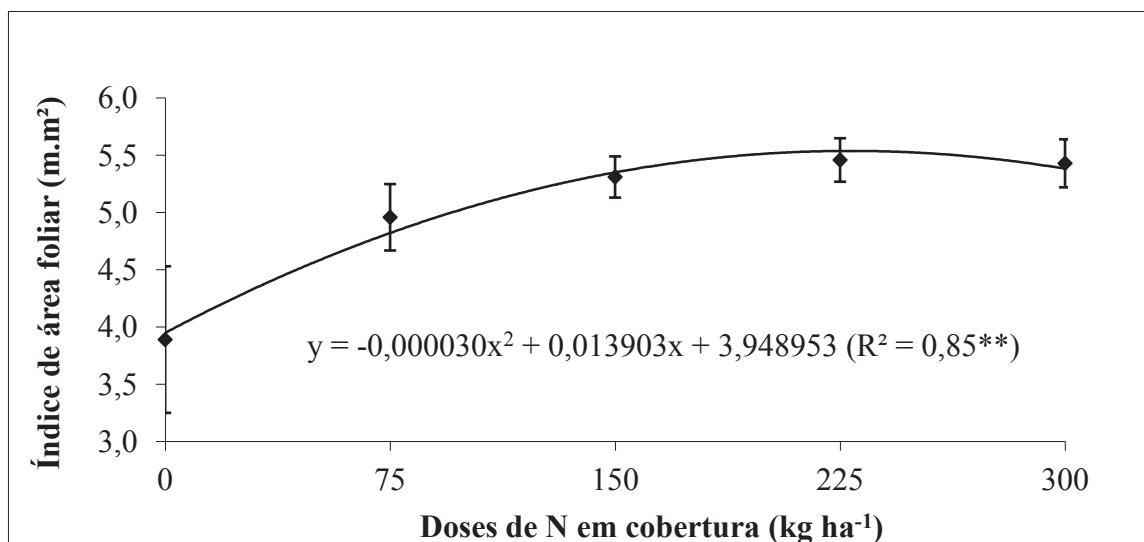


Figura 6. Índice de área foliar da cultura do milho em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. | (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.

Os teores de clorofila A, B e Total no estágio de florescimento não foram influenciados pela inoculação com *A. brasilense*, independente da forma de aplicação. Além disso, não foi constatada interação da inoculação com a adubação nitrogenada de cobertura. Esses resultados são contrários aos encontrados por Jordão et al. (2010), que observaram incremento no teor de clorofila pelo índice SPAD, de 46,73 para 50,34 na presença da bactéria comparativamente a não inoculação.

No entanto, pela média dos resultados é possível notar um aumento de 1,07% no teor de clorofila A quando foi efetuada a inoculação nas sementes e 0,62% com a inoculação no sulco. No teor de clorofila B, a inoculação nas sementes e sulco propiciaram incrementos de 0,76 e 1,96%. Já no teor de clorofila Total, acréscimos de 0,96 e 1,05% foram observados com a presença de *A. brasilense* nas sementes e no sulco de semeadura, respectivamente.

Entretanto, as doses de N em cobertura alteraram os teores de clorofila A, B e Total

(Figura 7). Estima-se que nessas condições experimentais, as doses de 250; 246 e 247 kg ha⁻¹ de N seriam responsáveis pelo o máximo teor de clorofila A (39,58), B (20,88) e Total (60,16). Mesmo na menor dose de N aplicada, verificou-se 7,56 IFC a mais na clorofila Total em relação ao tratamento controle. Esses resultados são interessantes do ponto de vista de que folhas bem nutridas por N, tem maior capacidade para assimilar CO₂ e assim sintetizar carboidratos no processo de fotossíntese (FERREIRA et al., 1997) que refletirão no acúmulo de matéria seca e produtividade da cultura. Um comportamento linear do índice SPAD com a aplicação de doses de N foi reportado por Argenta (2003). Essa relação positiva entre o teor de clorofila (SPAD) e a adubação nitrogenada na cultura do milho também foi observada no estágio de florescimento por Jakelaitis et al. (2005).

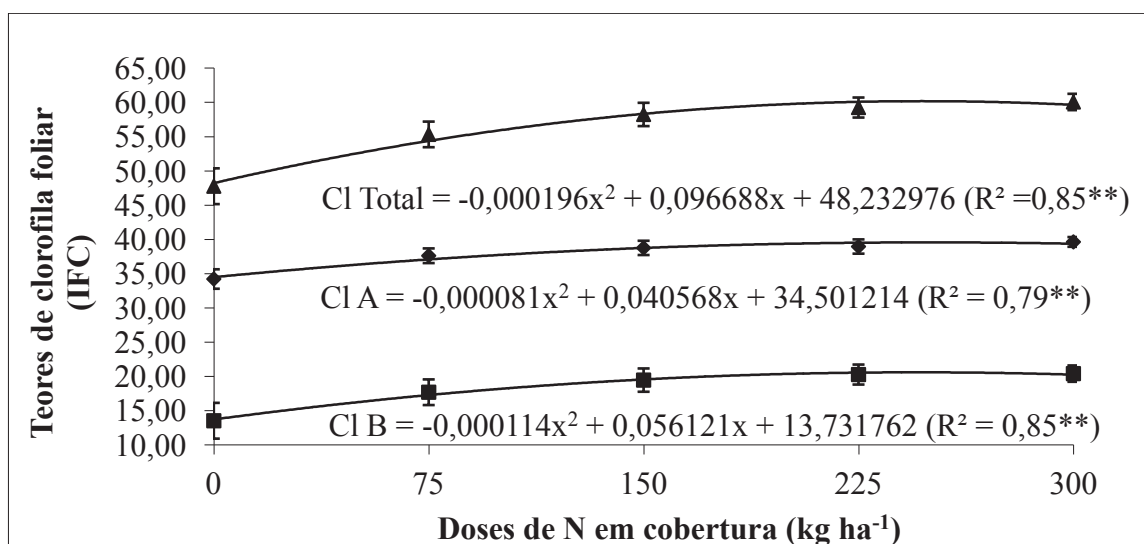


Figura 7. Teor relativo de clorofila A, B e Total da cultura do milho em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. | (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.

O teor de clorofila das folhas é um índice que se relaciona positivamente ao nível de N na planta (PIEKIELEK et al., 1995). Sendo assim, é possível que as alterações morfológicas (altura de planta, inserção, área foliar) e fisiológicas (teor de clorofila A, B e Total) na planta, tenham ocorrido em função da planta ter acumulado maior teor de N nas folhas com o aumento das doses do fertilizante nitrogenado aplicado e/ou pela pequena contribuição da fixação biológica de nitrogênio.

O teor de N foliar diferiu estatisticamente com as doses de N em cobertura. Segundo a

curva de regressão, para a máxima eficiência técnica de 48 g kg⁻¹ de N foliar seriam necessários 266 kg ha⁻¹ de N em cobertura (Figura 8). Os valores médios para cada dose variaram em 30,46; 41,17; 44,37; 47,08 e 48,50 g kg⁻¹ de N foliar com as doses de 0; 75; 150; 225 e 300 kg ha⁻¹ de N, respectivamente (Tabela 5).

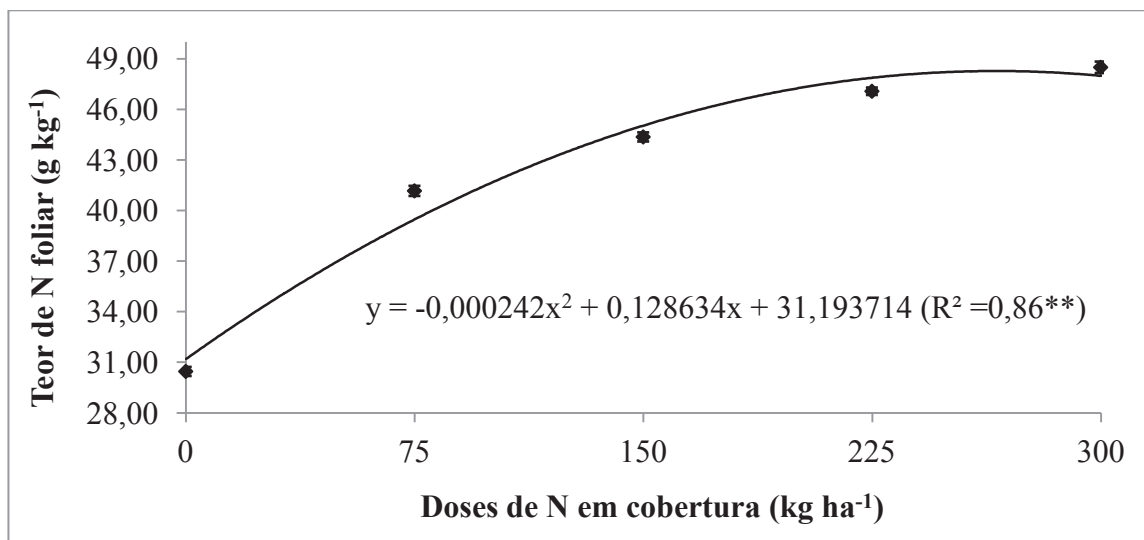


Figura 8. Teor de nitrogênio foliar função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. | (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.

Em relação às médias, é possível perceber que o teor de N na folha índice ficou propenso a aumentar em 2 % com a inoculação nas sementes e 4 % inoculação no sulco (Tabela 4). Isso nos evidencia que mesmo sem diferenças estatísticas entre a inoculação com *A. brasilense* e a variável, é possível que tenha havido uma pequena contribuição da fixação biológica para a nutrição da planta, ou a produção de hormônios pela bactéria (OKON e VANDERLEYDEN, 1997) também pode ter favorecido absorção pela planta dos nutrientes presentes no solo no período experimental.

Cabe ressaltar que plantas com maior teor de N foliar têm a capacidade de crescer e se desenvolver mais, garantindo maior índice de área foliar e por consequência, alta síntese de carboidratos pelo processo de fotossíntese, os quais favorecerão o desenvolvimento do sistema radicular que poderá explorar melhor o N do solo ou proveniente do fertilizante (SANTOS E PEREIRA, 1994).

Tabela 5. Teor de N foliar, índice de espigamento, número de fileiras por espiga, grãos por espiga, grãos ardidos, teor de proteína nos grãos e massa de mil grãos da cultura do milho sob diferentes doses de nitrogênio em cobertura, com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*. Guarapuava, PR, 2013.

<i>Azospirillum brasilense</i>	Doses de Nitrogênio					
	0	75	150	225	300	Média
	Índice de espigamento					
Com TS ¹	1,00 a	1,05 a	1,05 a	1,04 a	1,00 a	1,03 a
Sem TS ²	1,01 a	1,01 a	1,02 a	1,05 a	1,01 a	1,02 a
Sulco ³	1,01 a	1,03 a	1,01 a	1,05 a	1,02 a	1,03 a
Média	1,01	1,03	1,03	1,05	1,01	1,03
	Fileiras por espiga					
Com TS	16,1 a	16,4 a	16,5 a	16,7 a	16,6 a	16,5 a
Sem TS	16,1 a	16,3 a	16,5 a	16,6 a	15,8 a	16,3 a
Sulco	16,4 a	16,3 a	17,3 a	16,6 a	16 a	16,5 a
Média	16,2	16,4	16,8	16,6	16,1	16,4
	Grãos por espiga					
Com TS	428,8 a	478,3 a	519,8 a	538,1 a	515,8 a	496,2 a
Sem TS	426,1 a	472,5 a	495 a	526,4 a	514,2 a	486,8 a
Sulco	453,3 a	482,4 a	511,2 a	531,1 a	516,3 a	498,9 a
Média	436,1	477,7	508,7	531,9	515,4	494
	Grão Ardido (%)					
Com TS	0,687 a	2,77 a	1,965 a	0,59 a	0,343 a	1,271 a
Sem TS	1,790 a	1,932 a	0,64 a	1,261 a	0,669 a	1,258 a
Sulco	1,238 a	1,509 a	1,689 a	0,766 a	0,643 a	1,169 a
Média	1,238	2,07	1,431	0,872	0,552	1,233
	Teor de proteína dos grãos (g kg⁻¹)					
Com TS	55,3 a	60,4 a	69,9 a	72,7 a	76,3 a	66,9 a
Sem TS	53,5 a	59,3 a	68,6 a	72,9 a	75,0 a	65,8 a
Sulco	54,2 a	60,5 a	69,2 a	73,5 a	76,1 a	66,7 a
Média	54,3	60,1	69,2	73,0	75,8	66,5
	Massa de mil grãos (g)					
Com TS	271,9 a	282,5 a	296,0 a	293,2 a	292,5 a	287,2 a
Sem TS	256,2 a	284,8 a	292,2 a	290,0 a	293,3 a	283,3 a
Sulco	271,5 a	288,3 a	295,3 a	291,1 a	295,1 a	288,3 a
Média	266,5	285,2	294,5	291,4	293,7	286,3
	Produtividade (kg ha⁻¹)					
Com TS	7356 a	10177 a	11874 a	11633 a	11323	10473 a
Sem TS	6946 a	9728 a	11164 a	11410 a	11329	10115 a
Sulco	7490 a	10123 a	11438 a	11851 a	11646	10510 a
Média	7264	10009	11492	11631	11433	10366

¹ A. brasilense nas sementes. ² Controle. ³ A. brasilense no sulco de semeadura. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em sistema de semeadura direta, Aratani (2006) verificou na cultura do milho irrigado que o teor de N foliar respondeu linearmente ao incremento da adubação nitrogenada (0, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 kg ha⁻¹), apresentando teores que variaram de 26,04 a 34,16 g kg⁻¹.

Além disso, Ulger et al. (1995) constataram estreita ligação entre o teor de N presentes nas folhas e os componentes de rendimento, como número de grãos por espiga e massa de grãos, exercendo influência no enchimento de grãos e na produtividade da cultura.

Também foram observadas diferenças estatísticas no índice de espigamento, número de grãos por espigas, incidência de grãos ardidos, massa de mil grãos e produtividade quando foram aplicadas doses de N em cobertura, mas não houve efeito da inoculação com *A. brasilense* e da interação entre os fatores testados (Tabela 3). Diferentemente, Fulchieri e Frioni (1994) constataram que o peso dos grãos aumentou em 50% e o número de grãos por espigas dobrou na presença da inoculação com estirpes de *Azospirillum*. Já Kaminski et al. (2011) observaram que a inoculação de sementes com *A. brasilense* não diferiu estatisticamente da testemunha (sem inoculação) para o índice de espigamento, massa de mil grãos, percentagem de grãos ardidos e produtividade.

O índice de espigamento teve comportamento quadrático com a aplicação de N em cobertura. Conforme a análise de regressão, 208 kg ha⁻¹ de N aplicados em cobertura proporcionaria a máxima eficiência técnica desta variável, de 1,05 espigas por planta (Figura 9). Mesmo sem diferenças estatísticas para a inoculação com *A. brasilense*, percebe-se na média dos tratamentos (Tabela 5) que o maior índice de espigamento quando na presença do inoculante nas sementes foi de 1,05 espigas por planta com a dose de 75 kg ha⁻¹ de N, valor este que na ausência de inoculação e com inoculação no sulco seria atingido com 225 kg ha⁻¹ de N.

Ferreira et al. (2001) constataram que o índice de espigamento respondeu de forma quadrática ($R^2 = 0,99$) às doses crescentes de 0, 70, 140 e 210 kg ha⁻¹ de N em cobertura. Um incremento médio de 1,07 para 1,29 espigas por planta também foi reportado por Soares (2003) quando da aplicação de 120 kg ha⁻¹ de N em relação à testemunha, dose pela qual foi possível atingir incremento da ordem de 20%. No entanto, trabalhos com adubação nitrogenada na cultura do milho como o de Kappes et al. (2009) e Souza et al. (2003) não observaram resposta no índice de espigamento para as doses de N, possivelmente por que os fatores extrínsecos da planta dificilmente influenciam esta característica (SOUZA et al., 2001).

O número de grãos por espiga aumentou com as crescentes doses de N apresentando comportamento quadrático. Estima-se que para esta variável 240 kg ha⁻¹ de N proporcionariam 524 grãos por espiga, correspondendo a máxima eficiência técnica (Figura

10).

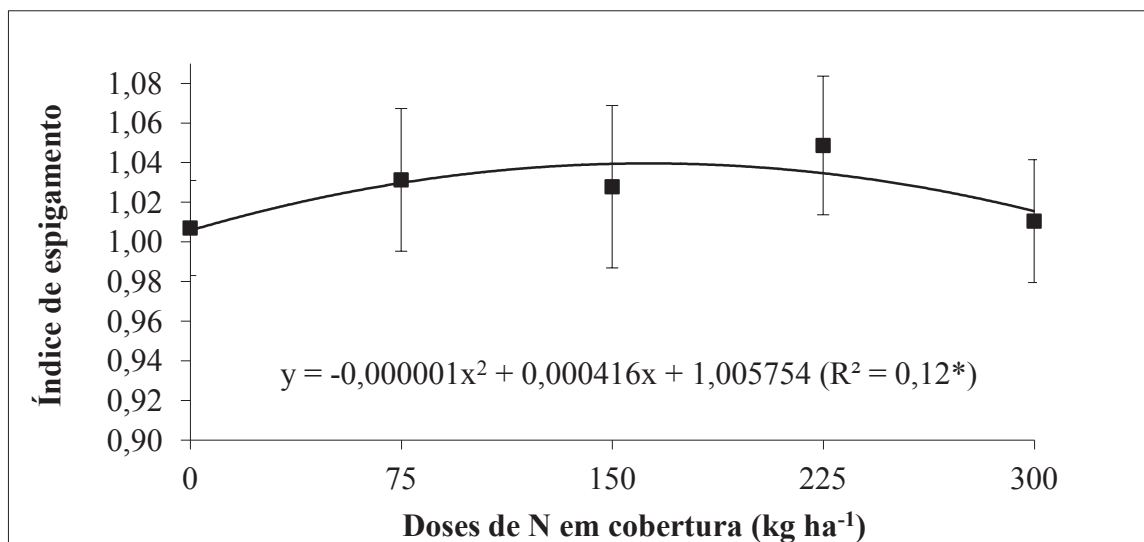


Figura 9. Índice de espigamento em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. * Significativo a 5% de probabilidade. | (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.

Para o número de grãos por espiga não houve diferenças significativas pela presença de *A. brasilense*, mas diante das médias obtidas, é possível que esta variável ficou propensa a aumentar nos tratamentos com inoculação (Tabela 5). Os incrementos observados no número de por espigas foi de 2,5% quando foi aplicado inoculante no sulco de semeadura. Com a inoculação nas sementes, o número de grãos por espiga foi 1,9% maior. É provável que o acréscimo neste componente de rendimento verificado na presença da bactéria *Azospirillum* venha contribuir posteriormente na produtividade da cultura.

Em experimento realizado na Argentina, foi constatado que a massa dos grãos aumentou em 50% e o número de grãos por espigas dobrou na presença da inoculação de *Azospirillum* (FULCHIERI e FRIONI, 1994). Já Kaminski et al. (2011) observaram que a inoculação de sementes com *A. brasilense* não diferiu estatisticamente da testemunha (sem inoculação) para o índice de espigamento, massa de mil grãos, incidência de grãos ardidos e produtividade.

Aumento linear no número de grãos por espiga com aumento das doses de N foi verificado no trabalho de Souza et al. (2006), em que 17,9% de grãos a mais por espiga foi alcançado com a dose de 120 kg ha⁻¹ quando comparada com a testemunha.

Com relação à qualidade dos grãos, foi possível observar que a porcentagem de grãos ardidos diminuiu de forma quadrática com o aumento das doses de N, sendo que com 300 kg ha⁻¹ de N foram encontradas as menores percentagens (Figura 11). A dose de 90 kg ha⁻¹ de N proporcionaria a maior incidência de grãos ardidos (1,66%). Apesar disso, todos os valores observados encontraram-se dentro dos limites aceitáveis para comercialização de grãos sem descontos (Tabela 5).

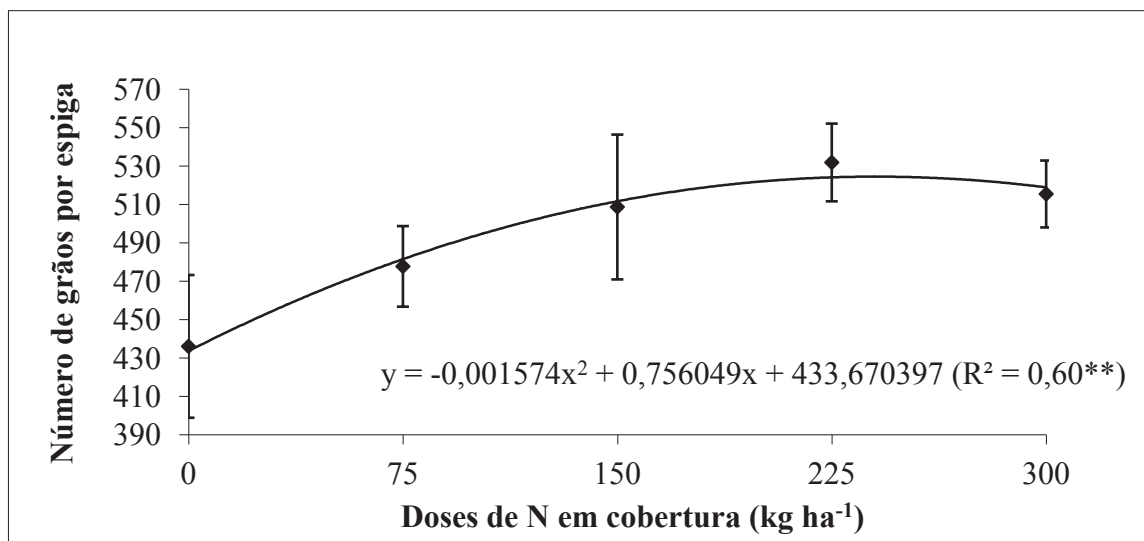


Figura 10. Número de grãos por espiga em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. | (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.

As doses crescentes de N em cobertura também exerceram influência sobre o teor de proteína nos grãos de milho. Conforme a análise de regressão linear, para cada kg ha⁻¹ de N adicionado em cobertura, houve um incremento de 0,0745 g kg⁻¹ no teor de proteína dos grãos (Figura 12). Foi verificado incremento entre 5,8 e 21,5 g kg⁻¹ no teor de proteína quando se utilizou a menor e a maior dose de adubação nitrogenada em cobertura em relação ao tratamento controle (Tabela 5). Similarmente, Amaral Filho et al. (2005) ao testarem diferentes arranjos populacionais e doses de N em cobertura (0; 50; 100 e 150 kg ha⁻¹) na cultura do milho verificaram que o teor de proteína dos grãos aumentou linearmente com as doses de N aplicadas.

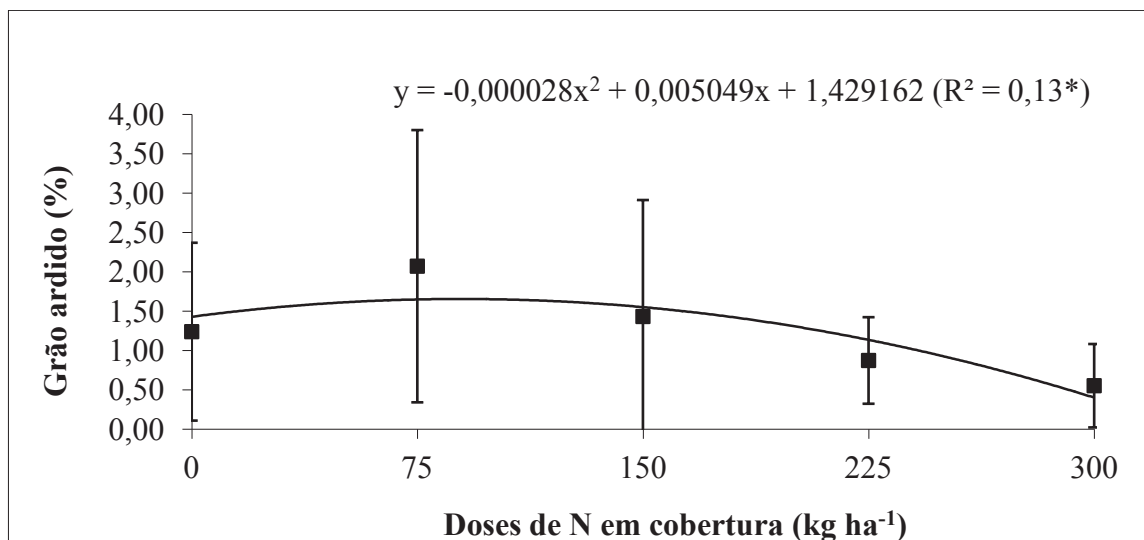


Figura 11. Incidência de grãos ardidos em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. | (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.

Esses resultados demonstram que o teor de proteína tem relação direta com a disponibilidade de N (LEMOS, 2011). Isso ocorre por que a formação de grãos está intimamente ligada a translocação de açúcares na planta. A sacarose e o nitrogênio contidos nos órgãos vegetativos são levados das fontes (órgãos produtores ou de armazenamento) até os drenos (partes vegetativas, reprodutivas e/ou em déficit fotossintético) para garantir o desenvolvimento das espigas e dos grãos. Assim, grande parte do N translocado para o grão será armazenado na forma de proteína (CRAWFORD et al., 1982).

Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas para o teor de proteína nos grãos em função da inoculação com *A. brasilense*. Apesar disso, na média dos resultados é possível observar que houve um incremento de 1,7 e 1,4 % quando se realizou inoculação nas sementes e no sulco, respectivamente, em relação ao tratamento controle (sem inoculação). Lemos (2011), pode constatar que apenas a adubação nitrogenada em cobertura ou inoculação mais aplicação de N em cobertura pode promover incremento no teor proteico dos grãos de trigo.

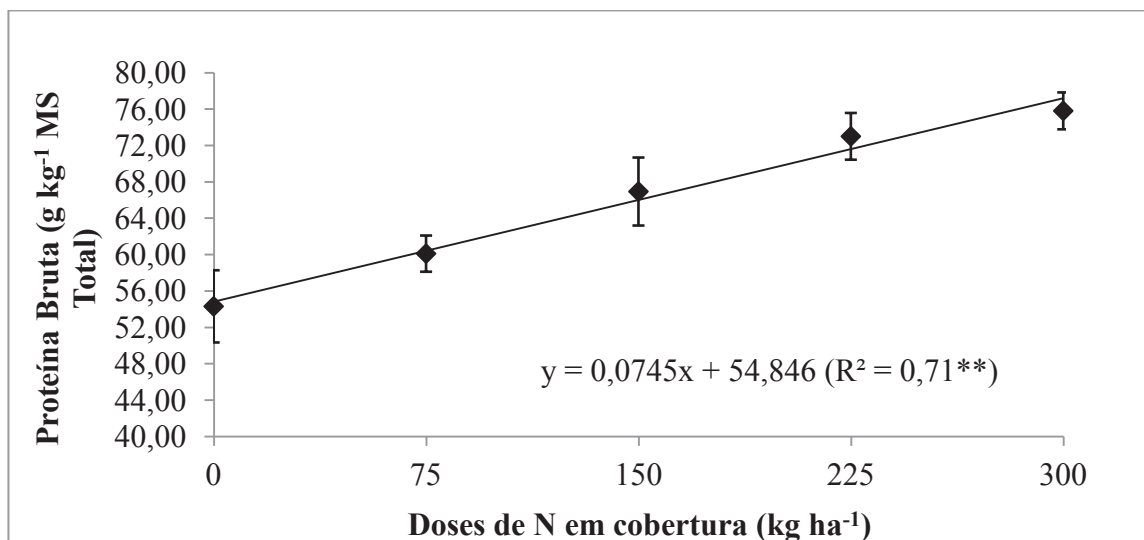


Figura 12. Teor de proteína nos grãos em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. | (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.

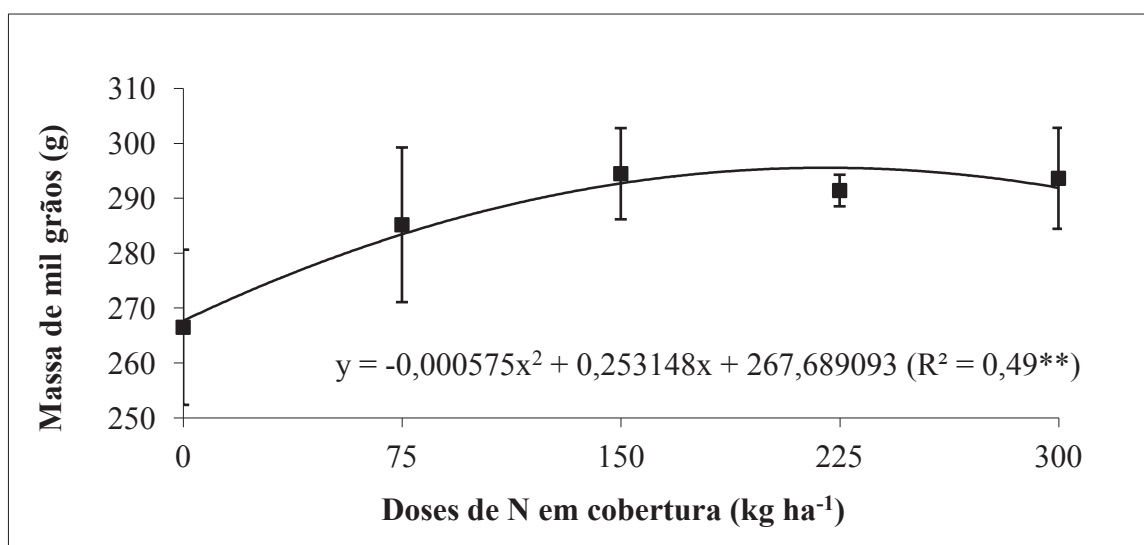


Figura 13. Massa de mil grãos em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. | (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.

Na Tabela 5 é possível verificar que a aplicação de N provocou ganhos na massa de mil grãos que variaram entre 19 e 28 g quando comparado ao tratamento controle (0 kg ha⁻¹ de N). Na análise de regressão (Figura 13) verificou-se que a aplicação de 220 kg ha⁻¹ de N em cobertura possibilitaria alcançar a máxima massa de mil grãos que correspondeu a 296 g.

A inoculação com *A. brasilense* não influenciou estatisticamente essa variável, mas a presença da bactéria nas sementes e no sulco de semeadura propiciou alcançar incrementos de 1,4 e 1,7% na massa de mil grãos em relação ao controle (Tabela 5). Em outros experimentos realizados em Guarapuava (PR) também não se constatou diferenças estatísticas para a massa de mil grãos com a inoculação de *A. brasilense* na cultura do milho (BASI et al., 2011; SANTOS et al., 2011).

A existência de correlação linear entre a massa de mil grãos e as doses de N foi observada por Sangói e Almeida (1994). Assim como esses autores, Amaral Filho et al. (2005) e Silva et al. (2005) reportaram que a aplicação de N na cultura do milho incrementa o índice de espigamento, o número de grãos por espiga e conseqüentemente, a produtividade do milho.

O N tem a importante função de estabelecer a capacidade do dreno de reprodução o qual responde em função do número e do tamanho dos grãos da espiga. Apesar do número de grãos por espiga se correlacionar mais fortemente com a produtividade do milho do que qualquer outro componente produtivo (BELOW, 2002), neste experimento verificou-se que a massa de mil grãos (0,95), número de grãos por espiga (0,96), IAF (0,99), teor de clorofila A (0,97), B (0,98) e Total (0,97), teor de N foliar (0,94) e o teor de proteína nos grãos tiveram forte correlação com a produtividade da cultura. Da mesma forma que o IAF correlacionou-se fortemente com a massa de mil grãos, número de grãos por espiga, teor de clorofila A, B e Total. Verificou-se também forte correlação entre o teor de N nas folhas e o teor de proteína nos grãos, IAF, grãos por espiga e teores de clorofila (Figura 14).

Isso se deve ao fato de que este nutriente exerce papel importante para a vida da planta, atuando como constituinte da clorofila, ácidos nucleicos, fitocromos, coenzimas, enzimas e proteínas (FORNASIERI FILHO, 2007). Além disso, aproximadamente 60% do N foliar está associado ao cloroplasto (BELOW, 2002) que é a organela responsável pela fotossíntese. A disponibilidade do nutriente pode afetar o desenvolvimento da área foliar, prejudicando a interceptação luminosa e conseqüentemente prejudicando a eficiência do processo de fotossíntese e o enchimento de grãos. Assim, a correlação entre os componentes de rendimento, com o teor de N foliar, e estes com a produtividade, nos mostra a importância de aplicar o N com a fonte e dose certa a fim de promover melhor aproveitamento pela planta (Ulger et al., 1995) que vai responder em produtividade.

Todas as alterações dos componentes de rendimento em função da adubação nitrogenada levaram ao incremento da produtividade do milho neste experimento. Conforme a análise de regressão (Figura 14), a máxima eficiência de 11879 kg ha⁻¹ de grãos de milho seria alcançada com a dose agronômica de 222 kg ha⁻¹ de N. A dose mais econômica de 190 kg ha⁻¹ de N resultaria na máxima eficiência de 11781 kg ha⁻¹ de milho. Na média dos resultados (Tabela 7) essa resposta quadrática fica visível nos ganhos obtidos em relação ao tratamento controle, demonstrando a importância da adubação nitrogenada em cobertura sobre a produtividade da cultura do milho.

Ao testar níveis de N em híbridos de milho modernos, Sangóí et al. (2000) obtiveram maior rendimento de grãos pelo incremento no número de grãos por espiga e na massa dos grãos. Conforme Silva (2001), a aplicação de metade do N na semeadura e o restante nos estádios de 4 e 6 folhas proporcionou a maior produtividade de 7296 kg ha⁻¹ de grãos, deixando evidente a necessidade de aplicação de N em cobertura e do parcelamento dessa adubação para a cultura do milho.

Mesmo na análise de variância não terem sido observadas diferenças estatísticas para a o uso de inoculante a base de *Azospirillum brasilense*, é possível verificar que a máxima produtividade obtida sem a inoculação foi de 11410 kg ha⁻¹ de grãos de milho com a dose de 225 kg ha⁻¹ de N (Tabela 5). Com a inoculação, a aplicação de 150 kg ha⁻¹ de N bastaria para alcançar a produtividade de 11874 kg ha⁻¹ de grãos com *A. brasilense* nas sementes e 11438 kg ha⁻¹ de grãos com inoculação no sulco de semeadura, as quais superam o rendimento obtido no tratamento controle com inferior necessidade de nitrogênio (75 kg ha⁻¹ de N a menos) representando economia no uso de adubo nitrogenado mineral com a garantia de níveis de produtividade superam àqueles observados com uma dose maior de fertilizante. Se avaliar a economia de fertilizante mineral nitrogenado de 3,3 sacas de ureia por hectare a um preço atual de R\$ 70,80, a redução de custo seria de R\$ 244,83 por hectare.

Variáveis Analisadas	Altura de Planta (cm)	Altura Inserção (cm)	Produtividade (kg ha ⁻¹)	Número de espigas por planta	Grãos Ardidos (%)	Massa de mil grãos (g)	Número de fileiras por espiga	Número de grãos por espiga	Diâmetro de colmo (mm)	IAF (m ² m ⁻²)	Teor de Cla (IFC)	Teor de Clb (IFC)	Teor de CI Total (IFC)	Teor de N foliar (g kg ⁻¹)	Teor de PB nos grãos (g kg ⁻¹)
Altura de planta (cm)	1,00														
Altura de inserção (cm)	0,82 ⁺⁺	1,00													
Produtividade (kg ha ⁻¹)	0,79 ⁺⁺	0,89 ⁺⁺	1,00												
Número de espigas por planta	0,40 ⁺	0,53 ⁺	0,49 ⁺	1,00											
Grãos ardidos (%)	-0,10 ⁺	-0,13 ⁺	-0,21 ⁺	0,33 ⁺	1,00										
Massa de mil grãos (g)	0,75 ⁺	0,84 ⁺⁺	0,95 ⁺⁺⁺	0,35 ⁺	-0,26 ⁺	1,00									
Número de fileiras por espiga	0,34 ⁺	0,25 ⁺	0,38 ⁺	0,25 ⁺	0,15 ⁺	0,37 ⁺⁺	1,00								
Número de grãos por espiga	0,80 ⁺⁺	0,85 ⁺⁺	0,96 ⁺⁺⁺	0,51 ⁺	-0,31 ⁺	0,90 ⁺⁺	0,41 ⁺	1,00							
Diâmetro de colmo (mm)	0,72 ⁺	0,83 ⁺⁺	0,85 ⁺⁺	0,33 ⁺	-0,39 ⁺	0,80 ⁺⁺	0,21 ⁺	0,85 ⁺⁺	1,00						
IAF (cm ² cm ⁻¹)	0,83 ⁺	0,91 ⁺⁺⁺	0,99 ⁺⁺⁺	0,45 ⁺	-0,26 ⁺	0,95 ⁺⁺⁺	0,33 ⁺	0,94 ⁺⁺⁺	0,84 ⁺⁺	1,00					
Teor de Cla (IFC)	0,82 ⁺⁺	0,90 ⁺⁺	0,97 ⁺⁺⁺	0,36 ⁺	-0,25 ⁺	0,93 ⁺⁺⁺	0,33 ⁺	0,92 ⁺⁺⁺	0,82 ⁺⁺	0,98 ⁺⁺⁺	1,00				
Teor de Clb (IFC)	0,82 ⁺⁺	0,87 ⁺⁺	0,98 ⁺⁺⁺	0,40 ⁺	-0,30 ⁺	0,93 ⁺⁺⁺	0,35 ⁺	0,95 ⁺⁺⁺	0,83 ⁺⁺	0,98 ⁺⁺⁺	0,99 ⁺⁺⁺	1,00			
Teor de CI Total (IFC)	0,82 ⁺⁺	0,89 ⁺⁺	0,97 ⁺⁺⁺	0,38 ⁺	-0,28 ⁺	0,93 ⁺⁺⁺	0,34 ⁺	0,94 ⁺⁺⁺	0,83 ⁺⁺	0,98 ⁺⁺⁺	1,00 ⁺⁺⁺	1,00 ⁺⁺⁺	1,00		
Teor de N Foliar (g kg ⁻¹)	0,81 ⁺⁺	0,87 ⁺⁺	0,95 ⁺⁺⁺	0,32 ⁺	-0,34 ⁺	0,91 ⁺⁺⁺	0,29 ⁺	0,92 ⁺⁺⁺	0,86 ⁺⁺	0,97 ⁺⁺⁺	0,97 ⁺⁺⁺	0,98 ⁺⁺⁺	0,98 ⁺⁺⁺	1,00	
Teor de PB nos grãos (g kg ⁻¹)	0,74 ⁺	0,78 ⁺⁺	0,90 ⁺⁺⁺	0,27 ⁺	-0,50 ⁺	0,83 ⁺⁺	0,20 ⁺	0,92 ⁺⁺⁺	0,90 ⁺⁺⁺	0,90 ⁺⁺⁺	0,90 ⁺⁺⁺	0,93 ⁺⁺⁺	0,92 ⁺⁺⁺	0,93 ⁺⁺⁺	1,00

Tabela 6. Correlação linear entre as variáveis analisadas. ⁺ (0 - 0,75): indica fraca correlação linear. ⁺⁺ (0,75-0,90): indica média correlação linear. ⁺⁺⁺ (0,90-1,00): indica forte correlação linear.

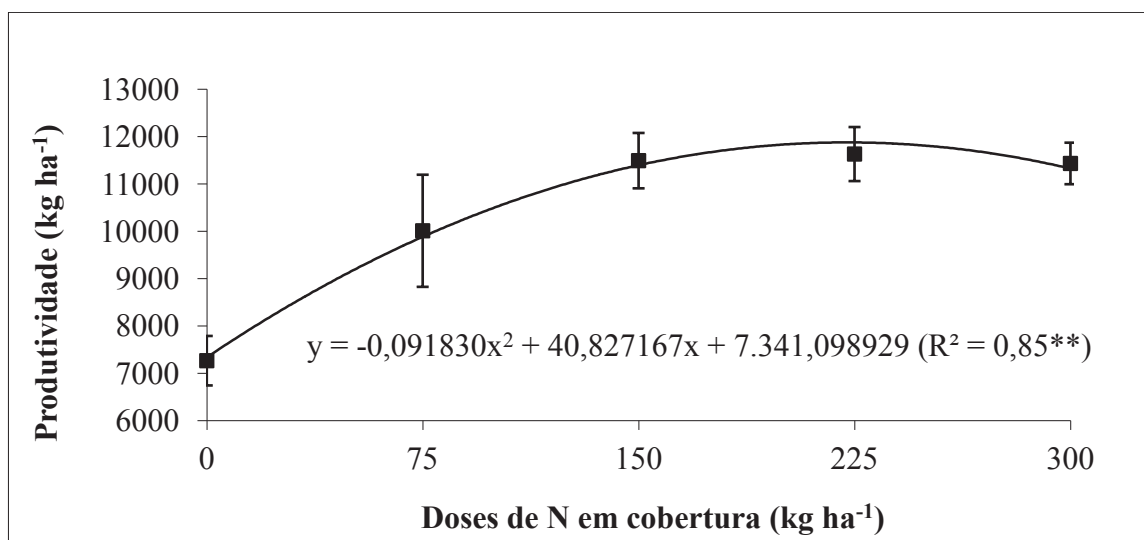


Figura 14. Produtividade de grãos em função das doses de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013. ** Significativo a 1% de probabilidade. | (Barras na curva) Correspondem ao desvio padrão.

Tabela 7. Incremento de produtividade do milho em relação à testemunha em função das doses crescentes de nitrogênio em cobertura. Guarapuava, PR, 2013.

Doses de N	Produtividade (kg ha ⁻¹)	Ganhos (kg ha ⁻¹)
0	7264	-
75	10009	2745
150	11492	4228
225	11631	4367
300	11433	4168

Ainda, se considerar o incremento de produtividade, é possível alcançar o ganho de 710 kg ha⁻¹ de milho com a inoculação de *A. brasilense* nas sementes (11874 kg ha⁻¹) e de 274 kg ha⁻¹ de milho com a inoculação no sulco (11438 kg ha⁻¹), quando foram aplicados 150 kg ha⁻¹ de N em cobertura associado ao uso de inoculante em relação à ausência de inoculação (11164 kg ha⁻¹) para a mesma dose de N (Tabela 5). O custo atual do produto a base de *A. brasilense* é de R\$ 10,00 para cada 100 mL do inoculante. Assim, a inoculação de *A. brasilense* (BR11005) nas sementes e no sulco de semeadura mais 150 kg ha⁻¹ de N, podem proporcionar o incremento na receita seria de R\$ 344,00 e de R\$ 98,00 por hectare, respectivamente.

Na média dos tratamentos, independente da dose de N aplicada em cobertura, verifica-se que o uso de inoculante nas sementes propiciou acréscimos de 3,5% na produtividade do

milho em relação a não inoculação. Quando se procedeu da aplicação no sulco de semeadura, esse incremento foi de 3,9%. Se considerarmos o baixo custo por área do inoculante e levarmos em conta o ganho financeiro que se tem, em torno de 6 a 6,6 sacas de milho a mais por hectare, apenas pelo uso do inoculante (Tabela 8) e ainda, com possibilidade de redução no uso de N mineral, vale afirmar que essa é uma tecnologia promissora que merece atenção por parte dos pesquisadores afim de verificar a coerência das repostas da cultura pela inoculação com essa bactéria.

Tabela 8. Incremento médio de produtividade do milho em relação à testemunha em função da inoculação nas sementes e no sulco de semeadura. Guarapuava, PR, 2013.

<i>Azospirillum brasilense</i>	Produtividade Média	Ganhos kg ha ⁻¹	Ganhos %	Ganhos sacas
Sem TS	10115 a ¹	-	-	-
Com TS	10473 a	357	3,5	6,0
Sulco	10510 a	394	3,9	6,6

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em estudos recentes como Hungria et al. (2010), a inoculação com *Azospirillum* proporcionou 24 a 30% de incremento no rendimento em relação a ausência de inoculação, chegando a alcançar produtividades médias de 3410 a 3570 kg ha⁻¹ de milho safrinha. Já Bartchen et al. (2010) pode verificar que apesar da inoculação de sementes com *A. brasilense* ter incrementado a produtividade do milho quando comparado a testemunha, os resultados não foram superiores aos observados quando da aplicação de doses de N em cobertura.

O fato da inoculação com *Azospirillum brasilense* não ter apresentado diferenças estatisticamente significativas para a maioria dos componentes de rendimento pode estar relacionado ao número de fatores que influenciam o processo de interação entre planta e bactéria, dentre eles destacam-se: a escolha da estirpe, estado nutricional da planta e da bactéria, genótipo da planta, condições edafoclimáticas e competição com outros microorganismos (QUADROS, 2009).

Conforme a Figura 2 pode-se perceber que a disponibilidade hídrica no estabelecimento da cultura foi reduzida, o que nos remete a hipótese de ter havido influência negativa na sobrevivência da bactéria *A. Brasilense* (BR11005) diante deste evento. No caso da cultura da cana-de-açúcar, o número de bactérias diazotróficas associadas é variável dependendo da taxa de precipitação pluvial (Reis Jr. et al., 2000). Entretanto, conforme

Oliveira et al. (2004), em geral o nível de umidade do solo exerce pouca influência na sobrevivência da *A. brasilense* estirpe BR11001.

O segundo decêndio do mês de fevereiro de 2012 correspondeu ao estágio de R4 da cultura do milho (grãos com ½ da linha do leite – *Milk line*), período em que ocorreu déficit hídrico. É possível que a produtividade efetiva do híbrido de milho não tenha sido totalmente expressada nesta safra, já que até o estágio de maturidade fisiológica o grão ainda está em processo de acúmulo de matéria seca. Neste caso, que este estresse pode ter influenciado no enchimento dos grãos e conseqüentemente, na massa de mil grãos e na produtividade da cultura. Vale destacar que este déficit foi igual em todos os tratamentos e assim não houve influência os resultados experimentais.

De acordo com Tabela 1, o pH do solo em CaCl₂ da área experimental era de 4,83 (camada de 0-10 cm) e 4,53 (camada de 10-20cm). Mesmo sem terem sido realizadas avaliações de sobrevivência de *A. brasilense*, é possível que o pH do solo na implantação deste experimento pode ter exercido efeitos negativos sobre a bactéria, pois o pH do solo é um dos fatores que influenciam no crescimento das bactérias fixadoras de N atmosférico. A maioria delas são pouco tolerantes a acidez, tanto em condições de campo, como em meios de cultura (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). Segundo Döbereiner e Pedrosa (1987), o pH entre 6,0 e 7,8 seria o ideal as para o crescimento da *A. brasilense*. No entanto, esta faixa de pH limitaria a utilização desta tecnologia nos sistemas de semeadura direta, deixando claro a necessidade de realizar pesquisas testando a viabilidade da inoculação em gramíneas em diferentes faixas de pH do solo.

Para que ocorra interação entre a planta e a bactéria é indispensável o uso de estirpes selecionadas de *A. brasilense* para compor o inoculante (HUNGRIA, 2011). Neste trabalho, utilizou-se da estirpe BR11005 (Sp 245) a qual é selecionada e registrada para a cultura do milho. No entanto, os resultados dos experimentos vistos a campo são muito variáveis, dependendo da estirpe que é utilizada para determinado híbrido, devido ao fenômeno chamado de quimiotaxia.

Por exemplo, Novakowski et al. (2009) analisando a produtividade do milho com e sem utilização de *Azospirillum brasilense* com a estirpe BR11005, sob doses de N na base e em cobertura, em duas épocas de semeadura da cultura do milho puderam concluir que mesmo sem aplicação de N na semeadura, a inoculação associada a adubação nitrogenada em cobertura seriam suficientes para garantir incremento na produtividade da cultura. Já 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. Assim como Basi et al. (2011) verificaram que independente da utilização de N em cobertura, a inoculação com *Azospirillum brasilense* (Abv5 e Abv6) nas sementes ou no sulco de semeadura incrementa o rendimento do milho. Esses trabalhos demonstram a necessidade de se elaborar pesquisas comparando o desempenho das estirpes de *Azospirillum* sobre a produtividade da cultura do milho a fim de buscar estirpes adaptadas aos diferentes tipos de clima, solo e região.

Além disso, 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. As pesquisas que avaliam os efeitos da inoculação com *A. brasilense* na cultura do milho foram deixadas de lado por muito tempo, passando a ser retomadas apenas nos últimos anos. Esse fato faz com que atualmente existam poucos resultados experimentais no Brasil relatando essa interação genótipo-bactéria.

Kaminski et al. (2011) ao testar seis híbridos de milho inoculados ou não com *Azospirillum brasilense* em Guarapuava (PR), observaram que o híbrido P30F53 HX produziu 58 kg ha⁻¹ a mais quando da presença da bactéria, mas não diferiu estatisticamente da testemunha do mesmo modo que não foi o híbrido que melhor respondeu a inoculação no experimento. Já Sandini e Novakowski (2011) analisando o efeito da inoculação de *A. brasilense* e da adubação nitrogenada de base, verificaram incremento significativo de 2048 kg ha⁻¹ (14,98%) na produtividade do híbrido P30F53HX quando foi realizada inoculação sem aplicação de N de base, assim como relataram economia de nitrogênio de até 95 kg ha⁻¹ pelo uso de 20 kg ha⁻¹ de N mais inoculante.

Esses resultados reforçam os resultados relatos de Cheng et al. (2011), os quais constataram que a inoculação com *A. brasilense* incrementou o rendimento do híbrido P30F53Y, sugerindo que adubação nitrogenada de base no milho poderia ser substituída pela aplicação de *A. brasilense* sem efeitos negativos na produtividade, desde que ocorra o fornecimento de N em cobertura. Dessa forma, para obter resultados positivos com a inoculação é preciso utilizar híbridos com histórico de interação com a estirpe da bactéria.

Diante desses resultados de pesquisas conclui-se que os híbridos P30F53Y e HX respondem positivamente a inoculação de *A. brasilense*. No entanto, cabe destacar que neste experimento também foi utilizado o híbrido P30F53, mas desta vez, associado à Tecnologia

Roundup Ready (RR), a qual pode ter sido parcialmente responsável pela ausência de resposta estatística, já que essa tecnologia difere da *Herculex* (HX) e *Yieldgard* (Y).

Outro fator determinante do sucesso com o uso de inoculante no milho é o estado nutricional que a planta e a bactéria se encontram. A fixação biológica de nitrogênio é um processo que depende de energia na forma de ATP, pois trata-se de um processo endergônico, onde a amônia é mais rica em energia que o N atmosférico. A reação de FBN não é realizada constantemente pela bactéria fixadora, ocorrendo apenas quando concentração de N fixado for insuficiente e em baixas concentrações de O₂, pois este pode inativar a enzima nitrogenase e também devido ao alto gasto ATP para a fixação (HOFFMANN, 2007).

Conforme Quadros (2009), o sistema planta-bactéria tem se mostrado mais eficiente quando a inoculação de *Azospirillum* é realizada na presença de pequenas doses de N mineral que promovem o fornecimento de fontes de carbono às bactérias através dos exsudatos, o que contribui para a efetivação da inoculação. Os pesquisadores Okon e Vanderleyden (1997) verificaram respostas positivas para a cultura do milho como aumento de matéria seca, acúmulo de N na planta, e produção de grãos, principalmente em genótipos não melhorados inoculados com *Azospirillum* em baixa disponibilidade de N.

Segundo Cavallet et al. (2000), a inoculação de sementes com produto a base de *Azospirillum* associada a melhor disponibilidade de N, proporcionou aumento na produção do milho de 30%. Ao contrário, na cultura do trigo Okon e Labandera-Gonzalez (1994) verificaram a campo que a produção de grãos foi incrementada em 30% quando foi realizada inoculação de *A. brasilense* com adição de baixas doses de N (50-60 kg ha⁻¹). Do mesmo modo que não se observou incremento de produção do trigo com a aplicação de doses altas (100-170 kg ha⁻¹) de N no experimento de Dobbelaere et al. (2001).

Além destes fatores, a competitividade entre estirpes selecionadas e outras estirpes ou componentes da microbiota do solo pode inibir a efetivação da colonização da planta pela *Azospirillum* (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987). Partindo do pressuposto que esse gênero de bactérias é capaz de desenvolver mecanismos de sobrevivência em condições adversas como a ausência da planta hospedeira (BASHAN et al., 1995), não se pode descartar a possibilidade de existência de estirpes nativas na área experimental mesmo sem ter ocorrido análises comprobatórias, pois essas bactérias nativas ou naturalizadas podem competir com as estirpes inoculadas, mascarando os efeitos da inoculação, principalmente nas parcelas testemunha.

6. CONCLUSÕES

- A inoculação com *Azospirillum brasilense* independente do método de aplicação (via semente ou sulco) não proporciona incrementos na produtividade do milho, influenciando apenas na altura de plantas.
- A máxima produtividade, 11879 kg ha⁻¹ de grãos de milho seria alcançada com a dose agronômica de 222 kg ha⁻¹ de N e a máxima eficiência econômica de 11781 kg ha⁻¹ de milho com a dose de 190 kg ha⁻¹ de N.
- A máxima produtividade obtida na ausência da inoculação poderia ser superada com a presença do inoculante em aplicações de doses inferiores de N em cobertura, propiciando economia no uso de fertilizantes minerais de 75 kg ha⁻¹ de N, mesmo sem haverem diferenças estatísticas.
- É imprescindível que sejam realizados mais experimentos a campo avaliando os efeitos da inoculação com *A. brasilense* a fim de obter mais resultados desta tecnologia na cultura do milho em condições de ano, clima e solo diferentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL FILHO, J.P.R.A.; FILHO, D.F.; FARINELI, R.; BARBOSA, J.C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.29, p.467-473, 2005.
- ANDRADE, A.C.; FONSECA, D.M. da; QUEIROZ, D.S.; SALGADO, L.T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Especial ed., p.1643-1651, dez. 2003.
- ARAÚJO, S.C; Realidade e perspectivas para o uso de Azospirillum na cultura do milho. Piracicaba: IPNI – International Plant Nutrition Institute Brazil. 32p. (IPNI. Informações Agronômicas, 122). 2008.
- ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F.; FOSTHOFER, E.L.; STRIEDER, M. L.; SUHRE, E.; TEICHMANN, L.L. Adubação nitrogenada em milho pelo monitoramento do nível de nitrogênio na planta por meio do clorofilômetro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p. 109-119, 2003.
- BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. Potencialidad de Azospirillum en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p.49-59, 2008.
- BÁRBARO, I.M; BRANCALIÃO, S.R.; TICELLI, M. **É possível a fixação biológica de nitrogênio no milho?** Artigo em Hypertexto, 2008. Disponível em: <http://www.in.fobibos.com/Artigos/2008_2/fixacao/index.htm>. Acesso em: 29/5/2011
- BARRACO, M.; ÁLVAREZ, C.; SCIANCA, C. **Estratégias de fertilización de maíz**. General Villegas: INTA, 2009. 7p. (INTA. Jornada Agrofutura, 2009).
- BARROS NETO, C.R. de. **Efeito do nitrogênio e da inoculação de sementes com Azospirillum brasiliense no rendimento de grãos de milho**. 2008. 29p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa, PR, 2008.
- BARTCHEN, A.; FIORI, C.C.L.; WATANABE, S.H.; GUARIDO, R.C. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* na produtividade do milho (*Zea mays*). **Revista Campo Digit@l**, v.5, n.1, p.56-59, dez. 2010. ISSN 1981-092X.
- BASHAN, Y.; PUENTE, M. E., RODRIGUEZ-MEDONZA, M. N., TOLEDO, G., HOLGUIN, G., FERRERA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. Survival of *Azospirillum brasiliense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p.1938-1945, 1995.

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

BASI, S.; LOPES, E.C.P.; KAMINSKI, T.H.; PIVATTO, R.A.D.; CHENG, N.C.; SANDINI, I.E. *Azospirillum brasilense* nas sementes e no sulco de semeadura da cultura do milho. In.: Semana de Integração, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2. **Resumos...** Guarapuava: Anais da II SIEPE, 2011. 4p. ISSN-2236-7098.

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

BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas às raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006. 71p Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.

BORRÁS, L.; MADDONI, G.; OTEGUI, M. E. Leaf senescence in maize hybrids: plant population, row spacing and kernel set effects. **Field Crops Research**, v. 82, p. 13-26, 2003.

BORTOLINI, C. G.; SILVA, P. R. F.; ARGENTA, G.; FORSTHOFER, E. L. Sistemas de aplicação de nitrogênio e seus efeitos sobre o acúmulo de N na planta de milho. Seção IV – Fertilidade do Solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.361-366, 2002.

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, n. 2, p. 58-64, mar.-jun., 2012. ISSN-0100316X (impresso), ISSN 1983-2125 (online).

CANTARELLA, H. Calagem e adubação do milho. In: BÜLL, L.T. & CANTARELLA, H., eds. **Cultura do milho: Fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, Potafos, 1993. p.147-169.

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

CHENG, N.C.; NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I.; DOMINGUES, L. Substituição da adubação nitrogenada de base pela inoculação com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. In.: Seminário Nacional de Milho Safrinha, 11. **Anais...** Lucas do Rio Verde: Fundação Rio Verde, 2011. p.377-382. ISSN 2176-2546.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira de grãos: Safra 2011/2012 - Décimo Levantamento - Julho/2012**. Brasília: CONAB, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_02_09_17_04_07_boletim_fevereiro-11..pdf>. Acesso em: 01 ago. 2011.

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

CRAWFORD, T.W.; RENDIG, V.V.; BROADBENT, F.E. Sources, fluxes and sinks of nitrogen during early reproductive growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant Physiology**, v.70, p.1654-1660, 1982.

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, mar. 1993.

DEL GALLO, M.; FENDIRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. In.: OKON, Y. (Eds.). ***Azospirillum Plant associations***. Boca Raton: CRC Press, 1994, p.57-75.

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

DÖBEREINER, J. e PEDROSA, F.O. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. **Science Tech**, 155p., 1987.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In.: CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 173-180, 1992.

DOMMENLEN, V.A. et al. (Methyl) ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, p.2652-2659, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Principais herbicidas indicados para cultura de milho no sistema plantio direto e no preparo convencional do solo**. Passo Fundo: set. 2006a. (Documentos *online* n.61). Disponível em: < http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do61_13.htm>. Acesso em: 23 mai. 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: 2006b. 306p.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA. **ClorofiLOG: Conceitos e Características Básicas**. 2012. Disponível em: < <http://www.falker.com.br/faq/clorofilog.html>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

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. **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.; DOURADO NETO, D. **Produção de Milho.** Guaíba: 2º Ed. Agropecuária. 2004. 360p.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production Crops 2010.** FAOSTAT, 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acesso em: 28 de ago. de 2012.

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

FERREIRA, A. C. B.; ARAUJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G.; CARDOSO, A. A.. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Revista Scientia Agricola**, vol.58, n.1, p.131-138, 2001. ISSN 0103-9016.

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

FERREIRA, M.C.B.; FERNANDES, M.S. & DÖBEREINER, J. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biology Fertility Soils**, v.4, p.47-53, 1987.

FRANÇA, S.; MIELNICZUK, J.; ROSA, L.M.G.; BERGAMASCHI, H.. BERGONCI, J.I. Nitrogênio disponível ao milho: Crescimento, absorção e rendimento de grãos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 11, p.1143-1151, 2011.

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

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

FULCHIERI, M.; FRIONI, L. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in a central Argentina. **Soil Biology & Biochemistry**, v.26, p.921-923, 1994.

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

HALL, P.G. KRIEG N.R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, n.2, p.433-435, Feb. 1984.

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).

HOFFMANN, L. V. Biologia molecular da fixação biológica do nitrogênio. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas. Instituto Agrônômico, cap. 9, p. 153-164, 2007.

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, n.1-2, p. 413–425, 2010. DOI: 10.1007/s11104-009-0262-0.

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

IAPAR - Instituto Agrônômico do Paraná. **Cartas Climáticas do Paraná**. Versão 1.0. 2000. (Formato Digital, 1 CD).

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

JORDÃO, L.T.; LIMA, F.F.; LIMA, R.S.; MORETTI, P.A.E.; PEREIRA, H.V.; MUNIZ, A.S.; OLIVEIRA, M.C.N. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com Braquiária. In.: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 29. Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 13. Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 11. Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 8. **Anais...** Guarapari, ES: FERTIBIO, 2010, 5p.

JORNAL COOPERCAMPOS 2009. **Safra 2009/2010 Cautela e expectativa**. Campos Novos. 23 ed. 2009. 20p. Disponível em: <http://www.copercampos.com.br/editar/arquivos/editar_jornal/16102009jornalcopercampos23.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2011.

KAMINSKI, T.H.; NOVAKOWISKI, J.H.; BASI, S.; LOPES, E.C.P.; CHENG, N.C.; SANDINI, I.E. Desempenho de diferentes híbridos de milho submetidos à inoculação de *Azospirillum brasilense*. In.: Semana de Integração, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2. **Resumos...** Guarapuava: Anais da SIEPE, 2011. 4p. ISSN-2236-7098.

KAPPES, C.; CARVALHO, M.A.C.; YAMASHITA, O.M.; SILVA, J.A.N. Influência do nitrogênio no desempenho produtivo do milho cultivado na segunda safra em sucessão à soja. **Revista Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.39, n.3, p.251-259, jul./set. 2009. ISSN 1517-6398/ e-ISSN 1983-4063.

LANA, M.C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J.E. Inoculation with *Azospirillum*,

associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 3, p. 399-405, mai/jun, 2012.

LEMOS, J.M. **Resposta de cultivares de trigo à inoculação em sementes com *Azospirillum brasilense*, e a adubação nitrogenada em cobertura**. 63p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2011.

MAAK, R. **Geografia física do estado do Paraná**. Curitiba: Banco de Desenvolvimento do Paraná, 1968. 350p.

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, n.6, p.961-970, jun. 1998.

MARTIN, T.N.; PAVINATO, P.S.; SILVA, M.R.; ORTIZ, S.; BERTONCELI. Fluxo de nutrientes em ecossistemas de produção de forragens conservadas. In: Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas, 4, Maringá. 2011. **Anais...** Maringá: Anais do Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas, 4, , ES p.173-219, 2011.

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

MORAIS, T.P. **Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense* em híbridos de milho**. 83p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

NATALE, W.; COUTINHO, E.L.M.; BOARETTO, A.; PEREIRA, F.M. Dose mais econômica de adubo nitrogenado para a goiabeira em formação. **Horticultura Brasileira**, v.14, p.196-199, 1996.

NEHL, D.B.; ALLEM, S.J.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v.5, p.1-20, 1996.

NOVAKOWISKI, J.H.; NOVAKOWISKI, J.H.; PACENTCHUK, F.; SANDINI, I.E. Produtividade da cultura do milho com inoculação de *Azospirillum brasilense*. In.: Semana de Integração, Ensino, Pesquisa e Extensão. **Resumos...** Guarapuava: Anais da SIEPE, 2009, 4p.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; SILVA, E. E.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Survival of nodophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.4, p. 295-299, Oct./Dec. 2004. ISSN 1517-8382.

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

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate

plants. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v.6, n.7, p.366-370, 1997.

PEDRINHO, E.A.N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. 2009. 87p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, 2009.

PEREIRA, A.R.; MACHADO, E.C. **Análise quantitativa do crescimento de comunidade vegetal**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1987. 33 p. (Boletim Técnico, 114).

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

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

RAIJ B.V. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Ceres/Potafos, 1991, 343 p.

RAMBO, L.; SILVA, P.R.F. da; ARGENTA, G.; SANGOI, L. Parâmetros de planta para aprimorar o manejo da adubação nitrogenada de cobertura em milho. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1637-1645, 2004. ISSN 0103-8478.

REIS Jr., F.B.; REIS, V.M.; SILVA, L.G. & DÖBEREINER, J. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.985-994, 2000.

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

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

SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G.; SILVEIRA, A.P.D. da. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. *Biologia do Solo*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa. v.32, n.3, mai./jun. 2008.

SANDINI, I.; NOVAKOWSKI, H.J. Uso de inoculantes em milho safrinha. In.: XI Seminário Nacional de Milho Safrinha. **Anais...** Lucas do Rio Verde: Anais do XI Seminário Nacional de Milho Safrinha, Fundação Rio Verde, 2011. 67 - 81 p. ISSN 2176-2546.

SANGOI, L.; SCHWEITZER, C.; SILVA, P.R.F.da; SCHMITT, A.; VARGAS, V.P.; CASA, R.T.; OUZA, C.A.de. Perfilhamento, área foliar e produtividade do milho sob diferentes arranjos espaciais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** [online], v.46, n.6, p.609-616, 2011. ISSN 0100-204X.

SANTOS, H.P.; PEREIRA, L.R. Efeito de sistemas de sucessão de cultura de inverno sobre algumas características agrônomicas de milho em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p.1691-1694, 1994.

SANTOS, K.C.; NOVAKOWISKI, J.H.; BAZZANEZI, A.N.; NOVAKOWISKI, J.H.; PECENTCHUK, F.; SANDINI, I.E. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* sobre a produtividade e massa de mil grãos de diferentes híbridos de milho. In.: Semana de Integração, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2. **Resumos...** Guarapuava: Anais da SIEPE, 2011. ISSN-2236-7098.

SILVA, E.C. **Níveis e épocas de aplicação de nitrogênio na cultura do milho em plantio direto na região de cerrado**. 2001. 83p. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, Ilha Solteira, 2001.

SILVA, E.C.; BUZETTI, S.; GUIMARÃES, G.L.; LAZARINI, E.; SÁ, M.E. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio na cultura do milho em plantio direto sobre Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, n.3, p.353-362, 2005.

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

SIQUEIRA, J.O., FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS, Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236p.

SOARES, M.A. **Influência de nitrogênio, zinco e boro e de suas respectivas interações no desempenho da cultura de milho (*Zea mays* L.)**. 2003, 112 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2003.

SORATTO, R.P.; SILVA, A.H.; CARDOSO, S.M.; MEDONÇA, C.G. Doses e fontes alternativas de nitrogênio no milho sob plantio direto em solo arenoso. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 62-70, jan./fev. 2011.

SOUZA, A. C. ; CARVALHO, J.G. ; VON PINHO, R.G. ; CARVALHO, M.L.M. Parcelamento e época de aplicação de nitrogênio e seus efeitos em características agrônomicas do milho. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 321-329, 2001.

SOUZA, D.M.G.; LOBATO, E. Adubação com nitrogênio. In: SOUZA, D.M.G.; LOBATO, E.(Eds.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2 ed., Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004, p.129-145. Tecnológica, 2004, p.129-145.

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

SOUZA, L.C.F.; GONÇALVES, M.C.; ALVES SOBRINHO, T.; FEDATTO, E.; ZANON, G.D.; HASEGAWA, E.K.B. Culturas antecessoras e adubação nitrogenada na produtividade de milho em plantio direto irrigado. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.2, n.3, p. 55-62,

2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Nutrição Mineral. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.96-101.

TOLLENAAR, M. **Is low plant density a stress in maize?** *Maydica*, v.37, p.305-311, 1992.

ULGER, A.C.; BECKER, A.C.; KANT, G. Response of various maize inbreed line and hybrids to increasing rates of nitrogen fertilizer. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.159, p.157-163, 1995.

VERONA, D.A.; DUARTE JUNIOR, J.B.; ROSSOL, C.D.; ZOZ, T.; COSTA, A.C.T. **Tratamento de Sementes de Milho com Zeavit®, Stimulate® e Inoculação com *Azospirillum* sp.** In.: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 18., 2010. Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010.

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.

VON PINHO, R. G. et al. Adubação nitrogenada, densidade de semeadura e espaçamento entre fileiras na cultura do milho em sistema plantio direto. In: Congresso Brasileiro de Milho e Sorgo, 26., 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Associação Brasileira de Milho e Sorgo/Epamig. 1 CD

YAMADA, T. **Adubação nitrogenada do milho. Quanto, como e quando aplicar?** *Informações Agronômicas*, Piracicaba: Potafos, n.74, p.1-5, 1996.

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