

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

ROBERTA PACOLA OLIVEIRA

**INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E MANEJO DA ADUBAÇÃO  
NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO**

CHAPADÃO DO SUL – MS  
2016

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

ROBERTA PACOLA OLIVEIRA

**INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E MANEJO DA ADUBAÇÃO  
NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marivaine da Silva Brasil

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

CHAPADÃO DO SUL – MS  
2016



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

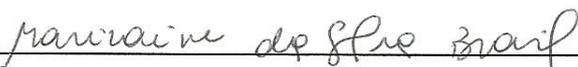


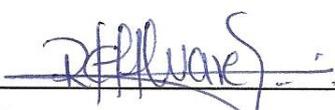
## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

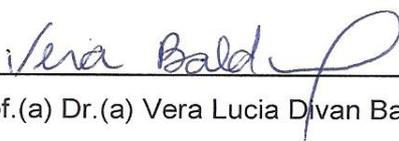
**DISCENTE: Roberta Pacola Oliveira**

**ORIENTADOR (A): Prof. (a) Dr. (a) Marivaine da Silva Brasil**

**INOCULAÇÃO DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE E MANEJO DA  
ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO**

  
\_\_\_\_\_  
Prof.(a) Dr.(a) Presidente Marivaine da Silva Brasil

  
\_\_\_\_\_  
Prof.(a) Dr.(a) Rita de Cassia Felix Alvarez

  
\_\_\_\_\_  
Prof.(a) Dr.(a) Vera Lucia Divan Baldani

Chapadão do Sul, 18 de Dezembro de 2015.

*A Deus pela vida, saúde e proteção para que fosse possível a realização desse sonho.*

*Aos meus pais Roberto, Marcia, por terem me dado a vida e apoio durante todos os meus estudos, serei eternamente grata.*

*Aos meus irmãos Marcela e Rodrigo pelo companheirismo.*

*Ao meu noivo Maurício por todo amor e paciência durante a caminhada.*

*Aos meus avós Madalena e Dalva por todo amor dedicado.*

DEDICO E OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela proteção e forças nos momentos de dificuldades que por muitas vezes foram enfrentadas durante a caminhada.

À minha família em especial aos meus pais, irmão e avós Roberto, Márcia, Rodrigo, Madalena e Dalva pelo apoio nessa jornada, pela compreensão nos momentos de ausência e momentos difíceis, serei eternamente grata. Agradeço minha irmã Marcela pela amizade, companheirismo, convivência e ajuda durante a execução do experimento, sem medir dia e esforço, sempre prontamente para me ajudar.

Ao meu noivo Maurício pelo companheirismo, carinho e amor a mim dedicado durante todo período, pela compreensão, desabafos e minha ausência, obrigado por tudo.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Marivaine pela oportunidade de aprendizado que apesar da distância, sempre, independente de dia e hora, esteve pronta para me ouvir e tirar minhas dúvidas, meu muito obrigado.

Aos professores Rita e Sebastião pelo tempo disponibilizado para me ajudar, me ouvir e tirar infinitas dúvidas e por todo suporte durante todo o experimento, pois sem vocês a caminhada com certeza seria mais árdua.

Aos alunos de graduação de Agronomia do grupo da fitotecnia em especial a Jamile que se disponibilizou durante as férias para me ajudar e ao Alef por estar presente durante todo o processo do experimento.

Aos técnicos de laboratório Daly, Monica Zuffo e pela ajuda nas análises laboratoriais.

À Dr<sup>a</sup> PhD Vera Lúcia Divan Baldani por aceitar o convite de compor a banca examinadora.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo programa de pós-graduação oferecido e a todos os professores, funcionários e amigos que direta ou indiretamente colaboraram na realização dessa conquista, a todos o meu muito obrigado.

## RESUMO

OLIVEIRA, Roberta Pacola. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Inoculação de *Azospirillum brasilense*. e manejo da adubação nitrogenada na cultura do milho.

Professora Orientadora: Marivaine da Silva Brasil.

O uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas proporciona incremento na produtividade da cultura, podendo minimizar o uso de fertilizantes químicos. Além desses microrganismos fixarem o N presente na atmosfera ( $N_2$ ) tornando-o disponível para as plantas na forma de amônia ( $NH_3$ ), também conseguem produzir fitormônios idênticos aos sintetizados pelas plantas como AIA, giberelinas e citocininas, no qual auxiliam no crescimento de raízes e pelos radiculares, promovendo melhor aproveitamento de água e nutrientes presentes no solo. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da bactéria *Azospirillum brasilense* com presença e ausência da adubação nitrogenada em diferentes inoculações nos componentes de produção do milho. Os experimentos foram conduzidos no campo experimental da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul localizada em Chapadão do Sul-MS durante o período de safra e safrinha com tratamentos dispostos em blocos ao acaso com arranjo do tipo fatorial  $2 \times 2 \times 2 + 1$  (tratamento adicional testemunha). Os tratamentos foram constituídos pelas estirpes de bactérias *Azospirillum brasilense*: Abv4 + Abv5 e HAI3, presença e ausência de adubação nitrogenada (dose de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  de N total, divididos em  $20 \text{ kg}$  na semeadura +  $180 \text{ kg ha}^{-1}$  na cobertura) e sistema de inoculação na semente e pulverização no sulco de plantio durante o período de safra e safrinha. Foram avaliados: produtividade, número de espigas totais, massa de grãos por espiga, número de grãos por espiga, massa de cem grãos, teor de nitrogênio nos grãos e quantificação de bactérias diazotróficas. Para o período da safra o número de grãos por espiga, número de espigas totais e massa de grãos por espiga, os tratamentos apresentaram diferença em relação a testemunha. Para a safrinha a variável número de grãos por espiga, os tratamentos também apresentaram diferença em relação a testemunha. Para a produtividade, somente o tratamento sem adubação nitrogenada com a estirpe HAI3 pulverizada no sulco apresentou diferença quando comparada a testemunha durante o período da safra. Para a NMP presente nas raízes, as plantas inoculadas apresentaram resultados superiores a testemunha.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias diazotróficas. Fixação biológica. *Zea mays* L.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Roberta Pacola. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Inoculation of *Azospirillum brasilense* and management of nitrogen fertilization in corn.

Author: Roberta Pacola Oliveira.

Adviser: Marivaine da Silva Brasil.

The use of nitrogen-fixing bacteria in grasses provides increase in crop yield and can minimize the use of chemical fertilizers. In addition to these microorganisms fixing N in the atmosphere (N<sub>2</sub>) making it available to plants in the form of ammonia (NH<sub>3</sub>) can also produce phytohormones identical to those synthesized by plants as AIA, gibberellins and cytokinins, which assist in the growth of roots and root hairs, promoting better use of water and nutrients in the soil. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of *Azospirillum brasilense* bacteria with presence and absence of nitrogen fertilization in different inoculations in corn production components. The experiments were conducted in the experimental field of the Federal University of Mato Grosso do Sul located in Chapadão do Sul-MS during the harvest season and off-season with treatments in a randomized block design with factorial arrangement 2x2x2 +1 (additional control treatment). The treatments consisted of strains of bacteria *Azospirillum brasilense*: Abv4 + Abv5 and HAI3, presence and absence of nitrogen fertilization (dose of 200 kg ha<sup>-1</sup> N total, divided into 20 kg at sowing + 180 kg ha<sup>-1</sup> on the cover) and inoculation system on seed and spraying in the furrow during the harvest season and off-season. Were evaluated: productivity, the total number of spikes, grain weight of spikes, number of kernels of spikes, mass hundredfold, nitrogen content in grains and quantification diazotrophics. For the period of the season the number of grains of spike, number of total corn and grain weight in spikes, the treatments showed differences compared to control. For the off-season the variable number of grains of spike, the treatments also showed differences compared to control. For productivity, only the treatment without nitrogen fertilization with HAI3 strain sprayed into the groove was different when compared to a witness during the period of harvest. For the NMP present in the roots, the inoculated plants showed better results than the witness.

**KEY-WORDS:** Diazotrophic bacterium. Biological fixation. *Zea mays* L.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Dados climáticos de precipitação pluviométrica, temperatura e umidade relativa em Chapadão do Sul-MS, 2015.	<b>32</b>
<b>2</b>	Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por grama de matéria fresca de raiz durante período de primeira safra.	<b>42</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Análise química do solo da área experimental Universidade Federal de Mato Grosso do Sul na camada de 0– 20 cm, 2014	<b>31</b>
<b>2</b>	Número de grãos por espiga (NGE), número de espigas totais (NET) e massa de grãos por espiga (MGE) durante período de safra.	<b>36</b>
<b>3</b>	Número de grãos por espiga (NGE), número de espigas totais (NET) e massa de grãos por espiga (MGE) durante período de safrinha.	<b>37</b>
<b>4</b>	Produtividade do milho (PROD), Massa de cem grãos (MCG) e Teor de nitrogênio nos grãos (TNG) durante o período de safra.	<b>40</b>
<b>5</b>	Produtividade do milho (PROD), Massa de cem grãos (MCG) e Teor de nitrogênio nos grãos (TNG) durante o período de safrinha.	<b>41</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 A cultura do Milho .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 O elemento Nitrogênio .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 <i>Azospirillum spp.</i> e a fixação biológica do nitrogênio .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 <i>Azospirillum brasilense</i> como promotor de crescimento vegetal .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5 Efeitos da inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> na cultura do milho .....</b>	<b>20</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> E MANEJO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO.....</b>	<b>27</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>27</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>28</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivado no mundo ocupando cerca de 70% de área cultivada, possui grande importância econômica devido à versatilidade da sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia, porém, a maior parte da produção de milho é usada na alimentação animal (DUARTE, 2000)

No ano agrícola 2014/15, a área produzida de milho de primeira e segunda safra totalizou 15,7 milhões de hectares em todo o Brasil. A sua produção foi de 84,3 milhões de toneladas com uma produtividade média de 4,9 kg ha<sup>-1</sup> na primeira safra e 5,6 kg ha<sup>-1</sup> na safrinha (CONAB, 2015).

Apesar do cereal ser amplamente cultivado em várias regiões do Brasil, sua produtividade é variável, o que se justifica em função das condições edafoclimáticas, uso de tecnologias modernas e cultivares adaptadas às regiões, além da possibilidade de maior uso da mecanização e mercado definido para o produto.

Uma das estratégias utilizadas para o aumento da produtividade é a adubação, sendo esta uma peça chave para uma boa sanidade da planta porque diminui a susceptibilidade a pragas e doenças, fatores que interferem no alcance de elevadas produtividades. Nesse contexto, o nitrogênio é essencial, sendo o nutriente mais exigido pelo milho, no qual a sua deficiência pode afetar em 14 a 80% no rendimento de grãos, além de diminuir o seu teor de proteína (FANCELLI, 2011).

Algumas alternativas, como o uso de cultivares adaptadas, manejo adequado de pragas, doenças e plantas daninhas, adubação mineral e utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio, vem sendo utilizadas a fim de garantir o bom desenvolvimento da planta refletindo de forma positiva na produtividade.

Existem alguns microrganismos que possuem a capacidade de assimilar o N atmosférico (N<sub>2</sub>) e transformá-lo em amônia através da enzima nitrogenase, que realiza a quebra da ligação tripla do N<sub>2</sub> fornecendo a amônia (NH<sub>3</sub>) para a planta. Esse processo que é conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN), é responsável por aproximadamente 65% do total de nitrogênio fixado, sendo considerado o segundo processo biológico mais importante depois da fotossíntese (CANTARELLA, 2007).

Além da FBN algumas bactérias também são conhecidas como rizobactérias promotoras do crescimento das plantas (RPCPs), a grande maioria delas habita a rizosfera e se alimentam de açúcares e exsudados das raízes das plantas, proporcionando o crescimento da espécie vegetal que segundo Freitas, (2007) e Rosas et al., (2006) um dos modos de ação direta desses microrganismos é facilitar a captação de certos nutrientes do solo, solubilizando minerais como o fósforo e tornando-o disponível à planta, além de também produzirem fitormônios como ácido indol acético – AIA, etileno, citoquininas e giberelinas, bem como a FBN atmosférico.

Autores como Fulchieri e Frioni (1994), Purcino et al., (1996) e Bashan e Holgin (1997) relataram que o ácido indolacético (AIA) excretados por *Azospirillum*, são responsáveis pela promoção do crescimento de plantas, em geral, devido a maior produção de matéria seca e acúmulo de nutrientes observados por plantas.

Dentre os microrganismos que realizam a fixação de nitrogênio nas raízes de gramíneas, e também produzem substâncias de crescimento, a bactéria *Azospirillum* sp. é a mais estudada (HARTMANN; BALDANI, 2006) e está sendo recomendada por vários pesquisadores no Brasil (REIS JUNIOR et al., 2008; GODOY et al., 2011; HUNGRIA 2011; QUADROS et al., 2014; ARAÚJO et al., 2014). Esses microrganismos se destacam por serem amplamente estudados, uma vez que os experimentos com inoculação apresentam resultados satisfatórios quando associadas com plantas da família Poaceae.

A principal forma de aplicação do inoculante na cultura do milho é a inoculação do produto via semente, contudo a utilização de fungicidas e inseticidas realizadas no tratamento de semente pode promover a diminuição da população e morte das bactérias (VARGAS; SUHET, 1980). Nos últimos anos tem se estudado formas alternativas para aplicação do produto para minimizar esse problema, como é o caso da pulverização no sulco pelo fato de reduzir os efeitos tóxicos dos produtos fitossanitários presentes no tratamento de semente em relação às bactérias diazotróficas (ZAMAROLLI; GALVAO, 2012)

Apesar das pesquisas apresentarem resultados positivos ao se utilizarem o *Azospirillum* em Poaceas, alguns obstáculos são enfrentados em condições de campo, ligada a fatores edafoclimáticos, competições com microrganismos nativos do solo, características físicas e químicas do solo, técnicas de inoculações, entre

outros favorecem a inconsistência dos resultados. (DOBBELAERE et al., 2001; REIS, 2007; LANA et al., 2012).

De acordo com Kappes et al., (2013) o conhecimento entre a interação bactéria-planta pode constituir estratégia importante e agregar informações referente a redução de aplicações de fertilizante nitrogenados redução de custos na semeadura e menor contaminação do lençol freático por compostos nitrogenados e maximização do aproveitamento do nitrogênio e outros nutrientes pela espécie vegetal.

Baseado nessas justificativas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a inoculação de *Azospirillum brasilense* na presença e ausência adubação nitrogenada na cultura do milho.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura do Milho

O milho é classificado como uma espécie alógama, monocotiledônia, diploide pertencendo à família Poaceae, possui ciclo fenológico variando de 90 a 205 dias, de acordo com seu genótipo e condições climáticas. Em relação ao seu sistema fotossintético, o milho utiliza quatro moléculas de carbono para realizar a fotossíntese sendo classificada como C4, possuindo grande eficiência na conversão de CO<sub>2</sub> promovendo uma alta taxa de fotossíntese líquida (FAGERIA, 1989; NORMAN et al., 1995). Sua origem ocorreu no México, e com grande variabilidade de espécies catalogadas. A partir da metade do século X, essa espécie apresentou grande evolução no desenvolvimento de variedades e híbridos para serem lançadas buscando a obtenção de altas produtividades de grão (GARCIA et al., 2006)

A cultura do milho é classificada como polipeptídica, ou seja, ela apresenta algumas características como tolerância a seca, adaptação a variações de temperaturas e tipos de solo, entre outras, tornando-se possível o seu cultivo em diferentes locais em praticamente todos os continentes. Essa adaptação foi possível através de pesquisas buscando variedades adaptadas a diferentes regiões climáticas, que abrange desde o Equador até o limite de terras temperadas além de diferentes altitudes (MAGALHÃES et al., 2006).

No Brasil as principais regiões produtoras de milho são o centro-oeste, sudeste e sul. E o grão depois de colhido se transforma em subprodutos que podem ser comercializados como óleos, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais (MAPA, 2015).

Apesar de ser amplamente cultivado o milho brasileiro ainda apresenta baixos índices de produtividade em contraste com o mercado que requer o aumento da produtividade a cada safra. Assim, torna-se necessário a adoção de tecnologias para obter altos rendimentos como a implantação da lavoura em época de semeadura recomendada, uso de cultivares adaptadas e melhoradas, tratamentos de sementes, correção de fertilidade do solo, controle fitossanitários, além do fornecimento adequado de nutrientes, principalmente o nitrogênio (CORREA JUNIOR et al., 2013). De acordo com Coelho (2006), para cada tonelada produzida,

são demandados em torno de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N, tornando-se o nutriente mais exigido para a cultura do milho sendo necessária então a aplicação de grandes quantidades desse nutriente para suprir a necessidade da cultura (DOTTO et al., 2010)

## 2.2 O elemento Nitrogênio (N)

O nitrogênio é o elemento absorvido em maior quantidade na cultura do milho, influenciando diretamente no rendimento de grãos principalmente pela relação direta com processos fisiológicos que ocorrem na planta como: fotossíntese, respiração, desenvolvimento e atividade das raízes, absorção iônica e outros (GAVA et al., 2010).

Esse elemento pode ser aplicado em doses variadas, no qual o aumento da dosagem proporciona um crescimento na produtividade, porém o aproveitamento de N decresce pelo fato do suprimento desse elemento ultrapassar as necessidades da cultura. A principal forma de fornecimento desse nutriente é via solo, e devido a este fato a cultura pode sofrer perdas desse elemento através da lixiviação, escoamento superficial, desnitrificação, volatilização e imobilização da massa microbiana (ALVA et al., 2006).

O fertilizante mais comumente utilizado no mundo pelos produtores é a ureia por ser de baixo custo e economicamente viável. Por outro lado, esse fertilizante apresenta desvantagens como alta higroscopicidade e maior suscetibilidade a perda por volatilização quando aplicado superficialmente no solo (SILVA et al., 2012).

Além do aspecto citado acima, o uso de fertilizantes nitrogenados consome grande parte do investimento do produtor agrícola, que visa melhor aproveitamento desse elemento pela planta. Uma das alternativas para a redução de custos de fertilizantes nitrogenados e aumento da produtividade é a fixação biológica do N atmosférico realizada por bactérias diazotróficas, dentre elas o *Azospirillum*.

## 2.3 *Azospirillum spp.* e a fixação biológica do nitrogênio

O *Azospirillum* é uma bactéria aeróbia, gram-negativa, móvel e de várias origens geográficas (ECKERT et al., 2001), além desses microrganismos possuem

a capacidade de crescer utilizando nitrogênio atmosférico como fonte única de nitrogênio (diazotróficos), e estabelecerem associações com raízes de diversas culturas gramíneas de importância agrícola como milho, sorgo, trigo e arroz (DÖBEREINER; DAY, 1976).

A bactéria do gênero *Azospirillum* foi descrita pela pesquisadora da Embrapa Dra Joana Döbereiner (1924-2000), sendo que uma das características observadas por ela em relação esse microrganismo foi a capacidade de realizar a fixação biológica do nitrogênio.

O primeiro trabalho desenvolvido por Joana Döbereiner no Brasil utilizando-se de bactérias diazotróficas foi em 1953 no qual foi relatada a incidência de bactérias do gênero *Azotobacter* em solos ácidos, já sendo conhecido o seu potencial FBN, porém o seu isolamento só havia sido feito em solos Europeus e Asiáticos. Em 1975 Döbereiner e Day descobriram a capacidade de FBN no gênero *Spirillum* posteriormente nomeado para *Azospirillum* (TARRAND et al., 1978).

Esse grupo de bactérias é alvo de muitos estudos neste momento, devido a sua grande capacidade de colonização que gira em torno de 100 espécies de plantas em todo o mundo e vem melhorando significativamente o desenvolvimento de diversas plantas agrícolas. James e Baldani (2012) afirmam que ainda existem estudos a serem desenvolvidos envolvendo o *Azospirillum*, pois para que a eficiência da utilização desta bactéria obtenha resultados positivos seja no crescimento, produtividade e desenvolvimento da planta, ainda depende do genótipo utilizado.

Reis (2007) destaca o uso da FBN realizado por bactérias diazotróficas como uma das alternativas em busca do melhor aproveitamento deste nutriente, devido à possibilidade de redução da aplicação de adubos nitrogenados.

#### **2.4 *Azospirillum brasilense* como promotor de crescimento vegetal**

As bactérias do gênero *Azospirillum* são classificadas como bactérias promotoras de crescimento das plantas (OKON, 1985), além de promoverem aumento no crescimento das raízes adventícias, esses elementos interferem alterando os processos de respiração das raízes via interferência nas atividades de enzimas da via glicolítica e do ciclo dos ácidos tricarbóxicos; além da produção de

nitritos, aumento nos sinais moleculares que interferem no metabolismo das plantas (OKON; LABANDERA-GONZALES, 1994; BASHAN; HOLGUIN, 1997).

O *Azospirillum brasilense* é considerado uma bactéria promotora de crescimento (PGPR) pelo fato de produzir fitohormônios que estimulam o crescimento das plantas, reduzem o potencial de membrana das raízes, solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico, produção de compostos de baixo peso molecular, denominados sideróforos e também proporcionam a redução da ação de microrganismos patogênicos, devido a produção de antibióticos e sideróforos (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; MOREIRA et al., 2010).

Os hormônios vegetais (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico) são substâncias orgânicas que desempenham funções na regulação do crescimento das plantas (RAVEN et al., 2001). O hormônio mais produzido em ocorrência natural é a auxina denominada, ácido indolacético (AIA), e diversos microrganismos como bactérias, fungos do solo ou associados às plantas, sintetizam hormônios idênticos aos encontrados nas plantas, dentre eles o AIA (PEDRINHO et al., 2010).

De acordo com Barberi et al., (1986) entre os hormônios vegetais, o mais estudado é o ácido indolacético por ser também o mais produzido pelas bactérias, bem como, por causar efeitos visíveis na morfologia das raízes, aumento do comprimento e o número de pelos radiculares. Em trabalho realizado por Sarwar; Kremer (1995) no qual foram avaliados 16 isolados da rizosfera de diferentes plantas verificou-se que os isolados associados às raízes das plantas eram mais eficientes na produção de auxinas do que os não associados às plantas.

Em dados acumulados em estudos durante o período de 19 anos de pesquisa sobre inoculação do *Azospirillum*, Okon e Vanderleyden (1997), observaram que essas espécies de bactéria promoveram ganho em produção em algumas culturas em condições diferentes de clima e solo; e somado a este fato, as bactérias além de promoverem a fixação biológica de nitrogênio, auxiliaram no aumento de volume de raízes para melhor exploração do solo em busca de água e nutrientes.

Vários inoculantes comerciais contendo a mistura de estirpes de *Azospirillum* foram lançados no mercado mundial, sendo que nos Estados Unidos, o produto Azo-Green<sup>TM</sup> foi desenvolvido e recomendado para aumentar o vigor de sementes. Os

países Itália, Alemanha e Bélgica também desenvolveram produtos conhecido como Zea Nit<sup>TM</sup> que continham a mistura de *Azospirillum brasilense* + *Azospirillum lipoferum* em uma formulação líquida e turfosa, recomendada para reduzir a aplicação de nitrogênio necessário à cultura em 30% e 40% (REIS, 2007). Países como Argentina, México, França e Índia também desenvolveram produtos à base de bactérias diazotróficas FBN. No Brasil, a Embrapa Soja e a UFPR em parceria com a empresa privada Total Biotecnologia, lançaram o inoculante líquido contendo estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* para milho e trigo, (HUNGRIA et al., 2011). Desde o lançamento outras empresas comerciais também lançaram no mercado inoculantes contendo as mesmas estirpes

## **2.5 Efeitos da inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho**

As bactérias do gênero *Azospirillum* vêm se destacando por apresentarem maior variedade de estudos, uma vez que esta bactéria apresenta resultados satisfatórios quando associadas com plantas da família Poaceae, além de estudos mostrarem que o uso dessas bactérias associadas a pequenas doses de nitrogênio tem demonstrado promotores de produção e aspectos morfológicos, quando comparados com os tratamentos com altas doses desse nutriente (VOGEL et al., 2013).

Contudo, as bactérias em associação com as plantas de milho, não conseguem fornecer o nitrogênio requerido pela planta, necessitando ser utilizado com baixas doses de fertilizantes. Dessa forma, a ação dessas bactérias se torna uma alternativa para o produtor para que possa permitir então, a redução do uso de adubos nitrogenados alcançando uma economia geral ou superior verificadas em leguminosas, que podem ser autossuficientes em nitrogênio (DÖBERENEIER et al., 1992). Acredita-se que também que ação benéfica desses microrganismos também é pela produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal.

Pesquisas recentes apontam para o ganho de produtividade quando se faz o uso de inoculante. Conceição et al., (2011) avaliaram o efeito na produtividade com a inoculação de estirpes de *Azospirillum* spp. da Embrapa Milho e Sorgo e do inoculante comercial em relação a adubação nitrogenada e os tratamentos com inoculação proporcionaram ganhos na produtividade em relação ao tratamento sem

nitrogênio em cobertura No México, Olivares et al. (2012) observaram que tratamentos inoculados com a bactéria apresentaram aumento na produtividade quando comparado a testemunha, para os experimentos estabelecidos em duas épocas diferentes. Lana et al., (2012) avaliaram o efeito da combinação da inoculação de *Azospirillum* associada com adubação nitrogenada, verificando que o tratamento que não recebeu adubação nitrogenada e as sementes que foram inoculadas com a bactéria, apresentaram um incremento de 15,4% na produção.

Em trabalho recente realizado pelos autores Costa et al., (2015) avaliando-se o efeito do inoculante contendo *Azospirillum brasilense* sobre o crescimento e produtividade de milho de segunda safra, foi observado uma resposta positiva no tamanho da espiga com incremento de 8%, teor de clorofila em 4%, massa de 100 grãos em 12% e produção de grãos em 29% demonstrando que o uso de bactérias fixadora de nitrogênio promovem ganhos para a cultura.

Diante do exposto acima fica evidente que é crucial a continuidade de estudos com o *Azospirillum brasilense* em Poaceas para que haja um estabelecimento sólido ao uso desse microrganismo associado com as condições e cultivares que melhor respondem aos ganhos de produtividade.

## REFERÊNCIAS

- ARAUJO, R. M.; ARAUJO, A. S. F.; NUNES, L. A. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta do milho verde à inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio. **Ciência Rural**, v.44, n.9, p. 1556-1560, 2014
- ALVA, A. K.; PARAMASIVAM, S.; FARES, A.; DELGADO, A.; MATTOS JR, D.; SAJWAN, K. Nitrogen and irrigation management practices to improve nitrogen uptake efficiency and minimize leaching losses. **Journal of Crop Improvement**, v.15, p. 369-420, 2006.
- BARBIERI, P.; ZANELLI, T.; GALLI, E.; ZANELLI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v.36, p. 87-90, 1986.
- BASHAN, Y., HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 103-121, 1997.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). Fertilidade do solo. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p. 375-470, 2007
- CONCEIÇÃO, O. P.; RESENTE, A. V.; MARRIEL, I. E.; NETO, A. E. F.; BATISTA, R. O; GOTT, R. M.; HICKMANN, C. Resposta do milho à inoculação com bactérias diazotróficas em solo de alto potencial produtivo no Cerrado. In: XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO. Resumos... Uberlândia, MG, 2011. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/897691>>. Acesso em: 02 de set 2015.
- COELHO, A.M. **Nutrição e adubação do milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 2006. (Circular Técnica, 78). Disponível em: <[http://www.xnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_6\\_edVferaduba.ntm](http://www.xnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_edVferaduba.ntm)>. Acesso em: 01 set. 2015.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, nono levantamento agosto de 2015, 2015, 63p.
- CORREA JUNIOR; E. S.; HOUSSEN, D.; GUIMARÃES, S.; LIMA, A. M.; GALON, L.; NUNES, U. R. Respostas fisiológicas de sementes de milho a tratamentos químicos. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v.7, n.1, 2013.
- COSTA, R. R. G. F.; QUIRINO, G. S. F.; NAVES, D. C. F.; SANTOS, C. B. S. ROCHA, A. F. S. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of secont-harvest maize, **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.45; n.3, p. 304-311, 2015.

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

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON W. E.; NYMAN, C. J. N. (Ed.). **Proc 1st Int Symp Nitrogen Fixation Washington**. p. 518–538, 1976.

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

DUARTE, J. O. Introdução e importância econômica do milho. In: CRUZ, J. C.; VERSIANI, R. P.; FERREIRA, M. T. R. (Ed.). **Cultivo do milho**. EMBRAPA CNPMS, 2000.

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

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

FANCELLI, A.L. Fenologia, fisiologia da produção e implicações práticas de manejo. In: **Milho: produção e produtividade**, USP/ESALQ/LPV, 2011, p. 1-34.

FREITAS, S. S. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Instituto Agrônomo, 2007. 312p.

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

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

- GODOY, J. C. S.; WATANABE, S. H.; FIORI, C. C. L.; GUARIDO, R. C..  
Produtividade de milho em resposta a doses de nitrogênio com e sem inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*. **Campo Digit@l**, v.6, n.1, p.26-30, 2011.
- HARTMANN, A.; BALDANI, J. I. **The genus *Azospirillum***. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). *The Prokaryotes*, p.115-140, 2006.
- HUGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação e rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja**, 2011, p. 36.
- JAMES, K. E; BALDANI, J. I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant Soil**, n.356, p.1-3. 2012, 312p.
- KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M. V.; ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; BEM, E. A. D.; PORTUGAL, J. R.; VILELA, R. G. Inoculação de sementes com bactérias diazotróficas e aplicação de nitrogênio em cobertura foliar em milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 527-538, 2013
- LANA, M. C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399-405, 2012.
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia produção de milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 2006. (Circular Técnica, 76).
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Milho**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acesso em: 30 de ago de 2015.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NOBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**. v.1; n.2; p. 74-99, 2010.
- NORMAN, M. J. T.; PEARSON, C. J.; SEARLE, P. G. E. **The ecology of tropical food crops**. Melbourne, 1995. 430 p.
- OKON, Y. *Azospirillum*: as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnolog**, v.3, p. 223- 228, 1985
- OKON, Y., LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: a evaluation of 20 years of word-wide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26. p. 1591-1601, 1994
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Rootassociated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, v.63, p. 364-370, 1997

OLIVARES, J. G. O; HERRERA, A. M.; PEREZ, N. M. Efecto de *Azospirillum brasilense* em el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipa, Mexico. **Universidad y Ciencia**, v.28, n.1, p. 79-84, 2012.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. de M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragmatia**, v.69, n.4, p. 905-911, 2010.

PURCINO, A.A.C.; PAIVA, E.; SILVA, M.R.; ANDRADE, S.R.M. de. Influence of *Azospirillum* inoculation and nitrogen supply on grain yield, and carbon and nitrogen-assimilating enzymes in maize. **Journal of Plant Nutrition**, v.19, p. 1045-1060, 1996.

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

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

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.3, p. 1139-1146, 2008.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.

ROSAS, S. B.; ANDRÉS, J. A.; ROVERA, M.; CORREA, N. S. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.3502-3505, 2006.

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.17, p. 261-269, 1995.

SILVA, A. A.; SILVA, T. S.; VASCONCELOS, A. C. P.; LANA, R. M. Q. Aplicação de diferentes fontes de ureia de liberação gradual na cultura do milho. **Bioscience Journal**, v.28, n.1, p. 104-111, 2012

TARRANT, J. J., KRIEG, N. R., DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal Microbiology**. v.24, 1978.

VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. Efeitos da inoculação e defi ciência hídrica no desenvolvimento da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.4, p.17-21, 1980.

VOGEL; G. F.; MARTINKOSKI, L.; MARTINS, P. J.; BICHEL, A. Desempenho agrônômico de *Azospirillum brasilense* na cultura do arroz: uma revisão. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.6, n.3, p. 567-578, 2013.

ZAMARIOLLI, L. E. R.; GALVÃO, M. A. K. Efeitos de métodos de aplicação do inoculante *Azospirillum brasilense* sobre o acúmulo de nitrogênio e produtividade do milho safrinha. In: 3º ENCMAP, **Anais...** Pompéia. 3º ENCMAP –2012.

## CAPÍTULO 1 - INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E MANEJO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO

### RESUMO

A utilização de bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio na cultura do milho apresentam grande potencial para redução do uso de fertilizantes químicos. Além de produzirem fitohormônios idênticos sintetizados pelas plantas, esses microrganismos proporcionam um aumento no volume de raízes secundárias, facilitando a busca de água e nutrientes, favorecendo o alcance de maiores produtividades para a cultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do *Azospirillum brasilense* com presença e ausência da adubação nitrogenada em diferentes inoculações nos componentes de produção e produtividade do milho. Os experimentos foram conduzidos no campus experimental da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Chapadão do Sul-MS durante duas épocas de semadura com tratamentos em blocos ao acaso com arranjo do tipo fatorial  $2 \times 2 \times 2 + 1$  (tratamento adicional testemunha) com três repetições, com combinações de dois inoculantes, presença e ausência de adubação nitrogenada para safra (dose de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  de N total, divididos em  $20 \text{ kg na semente} + 180 \text{ kg ha}^{-1}$  na cobertura) e safrinha (dose de  $70 \text{ kg ha}^{-1}$  de N total, divididos em  $10 \text{ kg} + 60 \text{ kg ha}^{-1}$ ), inoculação na semente e pulverização no sulco das estirpes Abv5+Abv6 (estirpe comercial) e HAI3 (estirpe selecionada pelo alto valor de produção de AIA). Foram avaliadas: produtividade, número de espigas totais, massa de grãos por espiga, número de grãos por espiga, massa de cem grãos, teor de nitrogênio nos grãos além da pelo método NMP das bactérias diazotróficas. Para o período da safra o número de grãos por espiga, número de espigas totais e massa de grãos por espiga, os tratamentos apresentaram diferença em relação a testemunha. Para a safrinha a variável número de grãos por espiga, os tratamentos também apresentaram diferença em relação a testemunha. Para a produtividade, somente o tratamento sem adubação nitrogenada com a estirpe HAI3 pulverizada no sulco apresentou diferença quando comparada a testemunha. Para a NMP presente nas raízes, as plantas inoculadas apresentaram resultados superiores a testemunha.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactéria diazotrófica. Fixação biológica. Safrinha. *Zea mays*.

## CHAPTER 1 - INOCULATION of *Azospirillum brasilense* AND MANAGEMENT OF NITROGEN IN MAIZE

### ABSTRACT

The use of nitrogen-fixing bacteria diazotrophic in corn have great potential to reduce the use of chemical fertilizers. In addition to producing identical phytohormones synthesized by plants, these microorganisms provide an increase in volume of secondary roots, facilitating the search for water and nutrients, favoring the achievement of higher yields for culture. The objective of this study was to evaluate the effect of *Azospirillum brasilense* with and without nitrogen fertilization in different inoculations in components production and productivity of maize. The experiments were conducted in the experimental campus of the Federal University of Mato Grosso do Sul in Chapadão do Sul-MS for two seasons sowing with treatments in a randomized block design with arrangement factorial 2x2x2 + 1 (additional control treatment) with three repetitions, combinations of two inoculants, presence and absence of nitrogen fertilization to harvest (dose of 200 kg ha<sup>-1</sup> N total, divided into 20 kg at sowing + 180 kg ha<sup>-1</sup> on the cover) and second crop (dose of 70 kg ha<sup>-1</sup> total N divided by 10 kg + 60 kg ha<sup>-1</sup>), and inoculating the seed in the furrow spray strains Abv5 + Abv6 (commercial strain) and HAI3 (strain selected as a high value AIA production). It was evaluated: productivity, the total number of spikes, grain weight per ear, number of kernels of spikes, mass hundredfold, nitrogen content in the grain beyond the NMP method of diazotrophics. For the period of the season the number of grains of spike, number of total corn and grain weight of spikes, the treatments showed differences compared to control. For the off-season the variable number of grains of spike, the treatments also showed differences compared to control. For productivity, only the treatment without nitrogen fertilization with HAI3 strain sprayed into the groove was different compared to the control. For the NMP present in the roots, the inoculated plants showed better results than the witness.

**KEY WORDS:** Bacterium diazotrophic. Biological fixation. Second crop. *Zea mays*.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial de produção de grãos de milho sendo superado apenas pelos EUA e China. No ano agrícola 2014/15, a área produzida de milho de primeira e segunda safra totalizou 15,7 milhões de hectares em todo o Brasil. A sua produção foi de 84,3 milhões de toneladas com uma produtividade média de 4,9 kg ha<sup>-1</sup> na primeira safra e 5,6 kg ha<sup>-1</sup> na segunda safra (CONAB, 2015).

Essa cultura pode ser cultivada em dois períodos de semeadura conhecidos como safra e safrinha. Na região centro-oeste, o período de safra, que é definido pela época de semeadura que varia entre os meses de setembro a novembro. Na safrinha, existe o problema de estiagem e seu plantio é feito de janeiro a abril, geralmente após a soja precoce (EMBRAPA, 2010).

O milho é uma cultura que explora uma grande quantidade de nitrogênio presente no solo, de forma que sua deficiência pode comprometer o rendimento dos grãos. Neste sentido, para que haja o seu suprimento, essa cultura requer um maior uso da adubação nitrogenada. A adubação nitrogenada interfere diretamente na produtividade dos grãos, além de possuir um grande custo para a produção (SILVA et al. 2005). Desta forma, devem-se buscar alternativas para que haja um menor volume de adubação nitrogenada, maior aproveitamento do nitrogênio e diminuição no bolso do produtor rural.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizada por microrganismos surge como uma alternativa promissora para o suprimento desse elemento através da fixação do N atmosférico tornando-o disponível para a planta e uma possível redução da adubação mineral (BODDEY; DÖBEREINER, 1995).

Dentre os microrganismos que realizam a fixação de nitrogênio nas raízes de gramíneas, a bactéria *Azospirillum brasiliense* é a mais estudada (HARTMANN; BALDANI, 2006) e está sendo recomendada por vários pesquisadores no Brasil (REIS JUNIOR et al., 2008; GODOY et al., 2011; HUNGRIA, 2011; QUADROS et al., 2014; ARAÚJO et al., 2014). Esses microrganismos se destacam por serem amplamente estudados, uma vez que os experimentos com inoculação apresentam resultados satisfatórios quando associadas com plantas da família Poaceae.

As bactérias do gênero *Azospirillum*, além de tornarem o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) disponível para a planta, também promovem o crescimento de raízes adventícias, aumentam a atividade da redutase do nitrato (CASSAN et al., 2008), além de sintetizarem hormônios idênticos aos encontrados nas plantas como auxinas, giberelinas e citocininas, e atuarem como agentes no controle biológico contra patógenos (OKON, 1985; CORREA et al., 2008, PEDRINHO et al., 2010).

Para Bashan et al., (2004) a resposta positiva das plantas em relação à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN) justificam-se além da produção de substâncias promotoras de crescimento, conferem também à planta proteção contra fitopatógenos, alteração na atividade metabólica e solubilização de fosfatos, estes fatores em conjunto podem promover o aumento da resistência das plantas ao estresse e facilitar sua adaptação a diversas condições edafoclimáticas (GRAY; SMITH, 2005)

A utilização do *Azospirillum brasilense* na cultura do milho ainda enfrenta obstáculos pela inconsistência dos resultados de pesquisas que podem variar de acordo com a cultivar utilizada, condições edafoclimáticas, metodologias e condições de ensaios a campo (BARTCHECHEN et al., 2010)

Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do *Azospirillum brasiliense* em relação à adubação nitrogenada e sistemas de inoculação.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no ano agrícola de 2014/15 durante o período de safra e safrinha, no município de Chapadão do Sul, Estado de Mato Grosso do Sul, em área experimental da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul situada a 18° 46' 17,8" de latitude sul, 52° 37' 27,7" de longitude oeste e com altitude de 813 m. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw (tropical úmido), com precipitação pluvial média anual de 1850 mm, e temperatura média anual variando de 13°C à 28°C.

O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico argiloso (EMBRAPA, 2006), cuja análise química da camada de 0-20 cm corresponderam aos valores da Tabela 1.

Tabela 1. Análise química do solo da área experimental da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul na camada de 0 – 20 cm, Chapadão do Sul, 2014.

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

O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com três repetições, em esquema fatorial 2x2x2 +1 (tratamento adicional testemunha). Os tratamentos foram constituídos pelas combinações de ausência e presença de adubação nitrogenada na dose recomendada para cultura com 200 kg ha<sup>-1</sup> de N no total, sendo aplicados 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura e 180 kg ha<sup>-1</sup> de N na cobertura (período da safra) e 70 kg ha<sup>-1</sup> de N totais sendo 10 kg ha<sup>-1</sup> de N aplicados na semeadura e 60 kg ha<sup>-1</sup> de N na cobertura (período da safrinha); inoculante comercial Masterfix contendo a bactéria da espécie *Azospirillum brasilense*, estirpes Abv5 e Abv6 (com 2x10<sup>9</sup> céls/mL), e inoculante contendo a estirpe HAI3 (com 1x10<sup>9</sup> céls/mL) isolada da gramínea *Hymenachene amplexicaulis* que crescem naturalmente na sub-região da Nhecolândia Pantanal Sul Mato-grossense, salientando-se que esta estirpe foi usada por apresentar grande produção de ácido indol acético in vitro (1038,61 µM) analisadas por Souza (2013). Foi realizado também sistemas de inoculações na semente e pulverização no sulco de plantio totalizando nove tratamentos combinados da seguinte forma para safra:

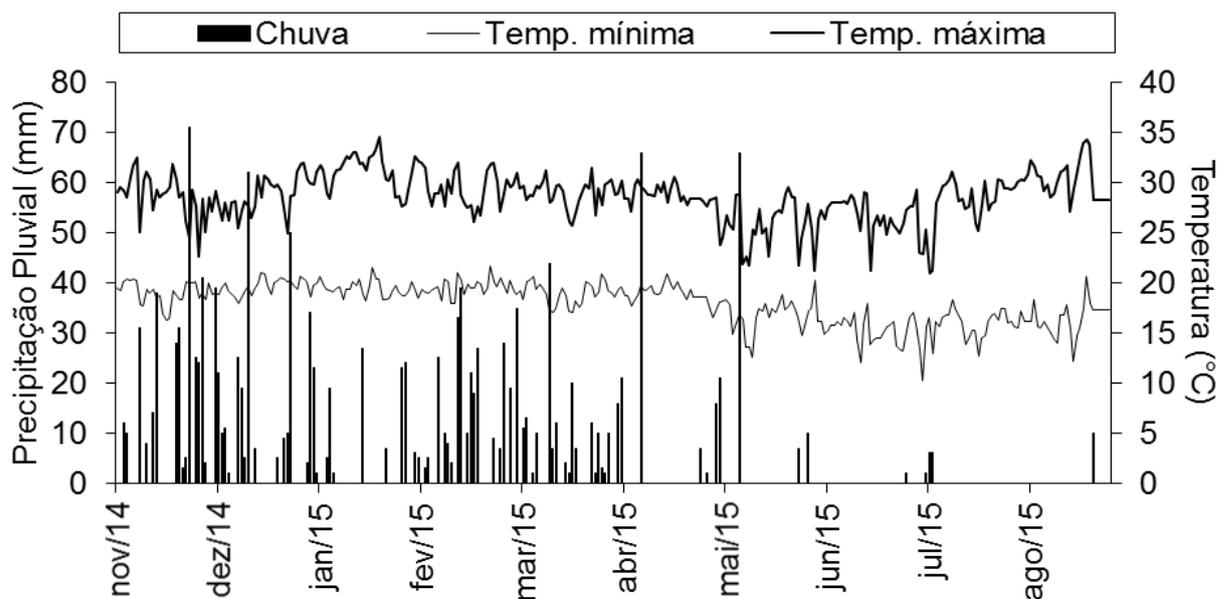
1) 300 mL ha<sup>-1</sup> de *A. brasilense* Comercial + inoculação na semente; 2) 300 mL ha<sup>-1</sup> de *A. brasilense* Comercial + pulverização no sulco; 3) 100 mL ha<sup>-1</sup> de *A. brasilense* HAI3 + inoculação na semente; 4) 100 mL ha<sup>-1</sup> de *A. brasilense* HAI3 + pulverização no sulco; 5) 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura + 180 kg ha<sup>-1</sup> de N na cobertura + 300 mL ha<sup>-1</sup> de *A. brasilense* Comercial + inoculação na semente; 6) 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura + 180 kg ha<sup>-1</sup> de N na cobertura + 300 mL ha<sup>-1</sup> de *A. brasilense* Comercial + pulverização no sulco; 7) 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura + 180 kg ha<sup>-1</sup> de N na cobertura + 100 mL ha<sup>-1</sup> de *A. brasilense* HAI3 + inoculação na semente; 8) 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura + 180 kg ha<sup>-1</sup> de N na cobertura + 300 mL ha<sup>-1</sup> de *A. brasilense* HAI3, pulverização no sulco; 9) Testemunha.

Para o período de safrinha, foram mantidas as mesmas combinações dos tratamentos, porém com a adubação nitrogenada na dose de 70 kg ha<sup>-1</sup> de N totais distribuídos em 10 kg ha<sup>-1</sup> na semeadura e 60 kg ha<sup>-1</sup> de N na cobertura.

O híbrido de milho utilizado no período de primeira safra foi o P2830H, que possui o ciclo super precoce. Para a segunda safra o híbrido de milho utilizado foi o CD384Hx com ciclo precoce, no qual ambos os materiais são indicados para plantio tanto de primeira quanto segunda safra. As parcelas experimentais foram compostas por cinco linhas de 5 m de comprimento, com espaçamento de 0,45 m entre si, objetivando uma densidade de 66,667 plantas por hectare.

Os dados diários de precipitação e umidade durante o período experimental de novembro de 2014 a abril de 2015 foram coletados pela estação meteorológica do INMET localizada em Chapadão do Sul-MS (Figura 1).

Figura 1: Dados observados de precipitação, temperatura e umidade durante os meses de novembro de 2014 a agosto de 2015. (Chapadão do Sul, MS, Brasil, 2015).



Fonte: Elaboração do autor

Para o preparo do inoculante, o isolado bacteriano HAI3 foi crescido em meio Dygs por 24 horas, sob agitação constante de 100 rpm a 30 °C. Para verificar a presença de contaminantes, alíquotas de 20 µL do cultivo foram transferidos e crescidos no período de 3 a 5 dias em meio semi-sólido NFb, sendo este semi-específico para *Azospirillum* spp. Posteriormente, foram passados para meio batata sólido para verificação do tipo de colônia característico de *Azospirillum* spp.

A semeadura da safra e safrinha foi realizada de forma manual, a safra no dia 21 de novembro de 2014 e a safrinha foi realizada no dia 27 de fevereiro de 2015 ambos em conjunto com a adubação química de P e K de acordo com a análise química da área experimental e necessidade da cultura. As inoculações das sementes foram realizadas no momento da semeadura, no qual as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos com o volume de 300 mL ha<sup>-1</sup> do inoculante comercial e agitada por dois minutos para homogeneização da distribuição da solução, da mesma forma foi feito com os tratamentos contendo o isolado HAI3 utilizando-se uma alíquota de 100 mL ha<sup>-1</sup>. Para a pulverização no sulco, utilizou-se de uma bomba manual no qual se aplicou do mesmo volume de inoculante diretamente sobre as sementes e em seguida o sulco foi fechado. Para os tratamentos que continham nitrogênio, foram aplicados 20 kg ha<sup>-1</sup> de N utilizando-se a ureia como fonte de N (45% de N) no momento da semeadura.

Em 16 de dezembro de 2014, realizou-se a adubação de cobertura do milho para a safra na dose de 180 kg ha<sup>-1</sup> de N, e no dia 27 de março de 2015 para a safrinha na dose de 60 kg ha<sup>-1</sup> de N, utilizando-se a ureia como fonte de N (45% de N), aplicado de forma manual sobre a superfície do solo, sem incorporação.

Durante o período da safra, foi realizada apenas uma aplicação para o controle fitossanitário de plantas daninhas com os produtos a base dos ingredientes ativos Atrazina 2,0 L ha<sup>-1</sup> + Tembotriona 0,240 L ha<sup>-1</sup> e para o controle de lagartas utilizou-se do Metomil 0,5 L ha<sup>-1</sup> para a primeira. Para safrinha, foram realizadas duas aplicações, uma idêntica ao período de safra e a outra utilizando-se dos produtos: Azoxistrobina+Ciproconazol 0,125 L ha<sup>-1</sup> + Mancozeb 1,5 kg ha<sup>-1</sup> + Flubendiamida 0,80 L ha<sup>-1</sup>.

Foram realizadas as seguintes avaliações: número de bactérias presente nas raízes frescas através do número do mais provável (NMP), número de grãos por espiga, número de espiga total, massa de grãos por espiga, massa de cem grãos, teor de nitrogênio nos grãos e produtividade.

A avaliação referente ao número de bactérias presentes nas raízes foi feita no período de pré-floração, aos 55 dias após a semeadura através do método proposto Baldani et al., (2014). Os dados foram coletados para quantificação do Número do Mais Provável (NMP) utilizando a tabela Mc Crady para três tubos/diluição.

A colheita foi realizada de forma manual no dia 20 de abril de 2015 sendo selecionadas cinco espigas aleatoriamente da área útil para a avaliação das seguintes variáveis: massa dos grãos por espigas, número de grãos por espiga e massa de 100 grãos. Foi feita também a contagem do número de espigas produzidas na área útil de cada parcela.

Os dados de produtividade foram obtidos através da trilha mecânica e a pesagem dos grãos estimados em  $\text{kg ha}^{-1}$  com a umidade corrigida para 13%. Para a análise do teor de nitrogênio total nos grãos, separou-se uma amostra de grãos de cada parcela para realização da moagem, digestão sulfúrica, destilação e titulação (K-jeldahl) metodologia adaptada pela EMBRAPA (2009).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas através do teste de Tukey e Dunnett à 5% de significância.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No período de safra, as variáveis número de grãos por espiga e número de espigas totais não apresentaram diferença entre os tratamentos avaliados. Em relação à testemunha, para o número de grãos por espiga, a testemunha apresentou diferença em relação a todos os demais tratamentos (Tabela 1).

Para o número de espigas totais, a testemunha não diferiu dos tratamentos sem adubação nitrogenada com pulverização no sulco das estirpes Abv5 + Abv6 e HAI3, com adubação nitrogenada combinada com a inoculação na semente das estirpes Abv5 + Abv6 e do tratamento com adubação nitrogenada mais pulverização no sulco da estirpe HAI3. Para a massa de grãos por espiga, ao se comparar entre os tratamentos sem a testemunha, o tratamento com aplicação de nitrogênio e inoculação por pulverização no sulco da estirpe HAI3 apresentou maior valor, porém não diferiu dos tratamentos: inoculados com as estirpes Av5 + Ab6 associada a adubação nitrogenada na semente, bem como no tratamento com ausência de adubação nitrogenada com inoculação tanto por pulverização no sulco e na semente da estirpe HAI3.

Ao se comparar os tratamentos em relação a testemunha, a mesma não apresentou diferença entre os tratamentos sem adubação nitrogenada com HAI3 inoculada na semente, sem adubação nitrogenada com Abv5 + Abv6 no sulco, com

adubação nitrogenada com Abv5 e Abv6 inoculada na semente, e o mesmo tratamento, porém utilizando a estirpe HAI3 (Tabela 1).

Para a safrinha o número de grãos por espiga, número de espigas totais e massa de grãos por espiga apresentou resultado não significativo ao se comparar os tratamentos, ou seja, não apresentaram diferença entre os tratamentos analisados. Comparando-se a testemunha, o único tratamento que apresentou diferença em relação ao número de grãos por espiga foi o sem adubação nitrogenada com inoculação da estirpe HAI3 na semente (Tabela 2).

Ao iniciar os estudos com o *Azospirillum*, acreditava-se que os resultados positivos obtidos em trabalhos realizados eram essencialmente derivados da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (DOBBELAERE et al., 2001); porém estudos posteriores relataram que os resultados positivos proporcionados por esses microrganismos eram provenientes também de alterações morfológicas e fisiológicas nas raízes das plantas em plantas com inoculação, o que resultava em uma maior absorção de água e nutrientes (OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

O alto teor de matéria orgânica presente no solo pode ter interferido nos resultados observados nas variáveis, fornecendo os nutrientes necessários para a expressividade dos resultados, aumentando as cargas do solo, além de colaborar para a sobrevivência da microbiota presente no solo, refletindo de forma positiva nos resultados obtidos.

Tabela 1. Número de grãos por espiga (NGE), número de espigas totais (NET) e massa de grãos por espiga (MGE) durante o período de safra <sup>(1)</sup> CPCS/UFMS Chapadão do Sul - MS, (2014/15)

TRATAMENTOS	NGE (n°)		NET (n°)		MGE (g)	
	BACTÉRIAS					
	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3
Sem N + Semente	574,93 <sup>ns</sup> (a)	498,80 <sup>ns</sup> (a)	48148,14 <sup>ns</sup> (a)	53333,33 <sup>ns</sup> (a)	128,70 bA (b)	144,13 bA (a)
Sem N + Sulco	605,73 <sup>ns</sup> (a)	539,35 <sup>ns</sup> (a)	44444,44 <sup>ns</sup> (b)	45925,92 <sup>ns</sup> (b)	166,65 aA (a)	136,08 bB (b)
Com N + Semente	615,26 <sup>ns</sup> (a)	586,26 <sup>ns</sup> (a)	45925,92 <sup>ns</sup> (b)	50370,37 <sup>ns</sup> (a)	157,14 aA (a)	146,17 bA (a)
Com N + Sulco	552,00 <sup>ns</sup> (a)	662,86 <sup>ns</sup> (a)	57037,03 <sup>ns</sup> (a)	47407,40 <sup>ns</sup> (b)	132,37 bB (b)	185,15 aA (b)
Testemunha	537,06 (b)	537,06 (b)	37037,03 (b)	37037,03 (b)	162,06 (a)	162,06 (a)
CV (%)	7,52		8,98		6,11	

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> – não significativo; médias seguidas de letras entre parênteses iguais na coluna não diferem pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade; CV - coeficiente de variação.

Tabela 2. Número de grãos por espiga (NGE), número de espigas totais (NET) e massa de grãos por espiga (MGE) durante o período de safrinha <sup>(1)</sup> CPCS/UFMS Chapadão do Sul - MS, (2014/15)

TRATAMENTOS	NGE (n°)		NET (n°)		MGE (g)	
	BACTÉRIAS					
	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3
Sem N + Semente	535,80 <sup>ns</sup> (b)	633,52 <sup>ns</sup> (a)	55555,55 <sup>ns</sup> (ns)	57777,77 <sup>ns</sup> (ns)	111,74 <sup>ns</sup> (ns)	89,42 <sup>ns</sup> (ns)
Sem N + Sulco	520,16 <sup>ns</sup> (b)	549,16 <sup>ns</sup> (b)	55555,55 <sup>ns</sup> (ns)	56296,29 <sup>ns</sup> (ns)	101,21 <sup>ns</sup> (ns)	78,35 <sup>ns</sup> (ns)
Com N + Semente	537,52 <sup>ns</sup> (b)	497,34 <sup>ns</sup> (b)	60740,73 <sup>ns</sup> (ns)	57037,03 <sup>ns</sup> (ns)	114,77 <sup>ns</sup> (ns)	96,73 <sup>ns</sup> (ns)
Com N + Sulco	522,18 <sup>ns</sup> (b)	575,25 <sup>ns</sup> (b)	54814,81 <sup>ns</sup> (ns)	50370,37 <sup>ns</sup> (ns)	88,93 <sup>ns</sup> (ns)	85,96 <sup>ns</sup> (ns)
Testemunha	495,17 (b)	495,17 (b)	57037,03 (ns)	57037,03 (ns)	103,72 <sup>ns</sup> (ns)	103,72 <sup>ns</sup> (ns)
CV (%)	8,87		8,35		9,34	

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> – não significativo; médias seguidas de letras entre parênteses iguais na coluna não diferem pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade CV - coeficiente de variação

Para a produtividade no período da safra, o tratamento com adubação nitrogenada inoculada com a estirpe HAI3 na semente apresentou maior produção de grãos. Para a massa de cem grãos e teor de nitrogênio nos grãos os tratamentos apresentaram resultado não significativo (Tabela 3).

Na safrinha, ao se analisar a produtividade dos tratamentos em relação à testemunha, o tratamento sem adubação nitrogenada com inoculação da estirpe HAI3 na semente apresentou resultado inferior à mesma, além de apresentar diferença para com os demais tratamentos. Para o teor de nitrogênio nos grãos, a testemunha não diferiu dos tratamentos sem nitrogênio com pulverização tanto das estirpes Abv5 + Abv6 e HAI3 no sulco e do tratamento com adubação nitrogenada com pulverização da estirpe HAI3 no sulco. As demais variáveis analisadas apresentaram resultado não significativo (Tabela 4).

Apesar dos resultados não apresentarem diferença estatística, observa-se um incremento na produtividade, quando comparamos os tratamentos com presença e ausência da adubação nitrogenada, sendo ambos associados com *Azospirillum brasilense*. Para o período da safra, o incremento foi de 1316 kg ha, com ganho equivalente a 20% na produção com o uso da adubação nitrogenada. Na safrinha, os tratamentos apresentaram incremento de 640 kg ha que representa 17% de aumento na produtividade com o uso da adubação.

De forma geral, baseado nos resultados demonstrados nesse experimento, o uso de *Azospirillum brasilense* associada ou não com a adubação nitrogenada apresentaram resultados de boa produtividade, ou seja, mesmo sem a utilização da adubação nitrogenada, os tratamentos com as estirpes Abv5 + Abv6 conseguem atingir uma boa produção em relação aos tratamentos com uso da adubação nitrogenada. Os volumes utilizados dos inoculantes (300 mL para Abv5 + Abv6 e 100 mL para HAI3) provavelmente interferiram nos resultados, no qual o volume utilizado para as estirpes Abv5 + Abv6 foi superior ao da estirpe HAI3, além de possuir diferença de concentração de bactérias, influenciando na expressividade dos resultados. Desta forma, o uso das estirpes testadas sem a combinação do adubo nitrogenado, torna-se viável quando comparada ao uso em conjunto da adubação, pois o mesmo também proporciona boa produtividade.

Em relação ao sistema de inoculação semente e sulco, os resultados apresentaram semelhança entre si, corroborando com resultados encontrados por

Fukami et al (2016) onde foram testados diferentes métodos de inoculação associado a cultura do milho e do trigo, no qual também foi observado que além do método tradicional de inoculação de *Azospirillum brasilense* na semente, a aplicação no sulco e foliar apresentaram eficiência semelhante ao inoculado na semente, representando métodos alternativos de inoculação afim de evitar a incompatibilidade desses microrganismos com produtos fitossanitários utilizados na semente, além de se observar também, que a dose do inoculante pode interferir de forma positiva ou negativa nos resultados a campo sendo necessário o uso da dose ideal para bons resultados a campo.

Uma das hipóteses para os valores de produtividade abaixo do esperado é o fato do estande de plantas apresentarem um número de plantas inferior ao desejável, tornando então um dos fatores que mostram o valor reduzido de algumas variáveis agronômicas e produtividade nesse experimento, quando comparada aos valores de produção da região. Apesar desse contratempo, torna-se interessante observar a diferença de valores entre os tratamentos, que é o que demonstra o resultado positivo dos neste trabalho.

Tabela 3. Produtividade do milho (PROD), Massa de cem grãos (MCG) e Teor de nitrogênio nos grãos (TNG) durante o período de safra. <sup>(1)</sup> CPCS/UFMS Chapadão do Sul - MS, (2014/15).

TRATAMENTOS	MCG (g)		TNG (%)		PROD (kg ha <sup>-1</sup> )	
	BACTÉRIAS					
	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3
Sem N + Semente	30,26 <sup> ns (ns)</sup>	29,77 <sup> ns (ns)</sup>	2,46 <sup> ns (ns)</sup>	2,62 <sup> ns (ns)</sup>	5155,55 aA (a)	5307,40 bA (a)
Sem N + Sulco	30,01 <sup> ns (ns)</sup>	28,46 <sup> ns (ns)</sup>	2,52 <sup> ns (ns)</sup>	2,37 <sup> ns (ns)</sup>	5107,40 aA (a)	5266,66 bA (a)
Com N + Semente	30,56 <sup> ns (ns)</sup>	29,77 <sup> ns (ns)</sup>	2,49 <sup> ns (ns)</sup>	2,62 <sup> ns (ns)</sup>	6062,97 aB (a)	7818,51 aA (b)
Com N + Sulco	30,52 <sup> ns (ns)</sup>	32,94 <sup> ns (ns)</sup>	2,76 <sup> ns (ns)</sup>	2,72 <sup> ns (ns)</sup>	6403,70 aA (a)	5814,81 bA (a)
Testemunha	3,93 <sup> (ns)</sup>	3,93 <sup> (ns)</sup>	2,57 <sup> (ns)</sup>	2,57 <sup> (ns)</sup>	5062,87(a)	5062,87 (a)
CV (%)	5,37		3,52		10,47	

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> – não significativo; médias seguidas de letras entre parênteses iguais na coluna não diferem pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade CV - coeficiente de variação.

Tabela 4. Produtividade do milho (PROD), Massa de cem grãos (MCG) e Teor de nitrogênio nos grãos (TNG) durante o período de safrinha. <sup>(1)</sup> CPCS/UFMS Chapadão do Sul - MS, (2014/15).

TRATAMENTOS	MCG (g)		TNG (%)		PROD (kg ha <sup>-1</sup> )	
	BACTÉRIAS					
	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3	Azosp. Comercial	Azosp. HAI3
Sem N + Semente	21,91 <sup> ns (ns)</sup>	19,87 <sup> ns (ns)</sup>	2,84 <sup> ns (b)</sup>	2,76 <sup> ns (b)</sup>	4192,59 <sup> ns (a)</sup>	2459,25 <sup> ns (a)</sup>
Sem N + Sulco	21,76 <sup> ns (ns)</sup>	18,68 <sup> ns (ns)</sup>	2,52 <sup> ns (a)</sup>	2,53 <sup> ns (a)</sup>	3503,70 <sup> ns (a)</sup>	2011,11 <sup> ns (b)</sup>
Com N + Semente	22,13 <sup> ns (ns)</sup>	18,94 <sup> ns (ns)</sup>	2,83 <sup> ns (b)</sup>	2,70 <sup> ns (b)</sup>	3799,99 <sup> ns (a)</sup>	3803,70 <sup> ns (a)</sup>
Com N + Sulco	21,50 <sup> ns (ns)</sup>	22,10 <sup> ns (ns)</sup>	2,64 <sup> ns (a)</sup>	2,69 <sup> ns (b)</sup>	3562,96 <sup> ns (a)</sup>	3562,96 <sup> ns (a)</sup>
Testemunha	19,10 <sup> (ns)</sup>	19,10 <sup> (ns)</sup>	2,27 <sup> (a)</sup>	2,27 <sup> (a)</sup>	3355,55 <sup> (a)</sup>	3355,55 <sup> (a)</sup>
CV (%)	8,62		6,37		12,57	

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> – não significativo; médias seguidas de letras entre parênteses iguais na coluna não diferem pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade CV - coeficiente de variação.

De acordo com Kappes et al., (2014), a expressão da massa de cem grãos é uma característica que pode ser influenciada pelo genótipo, pela disponibilidade de nutrientes e pelas condições climáticas durante o estágio de enchimento dos grãos.

Os teores de nitrogênio nas plantas inoculadas com ação combinada com as bactérias diazotróficas, também são relatados por outros autores, o que pode ser consequência dos mecanismos de promoção de crescimento, que podem melhorar a capacidade das plantas absorver nitrogênio e promover aumento da produtividade (DOBBELAERE et al., 2001). Os resultados com o uso da estirpe HAI3 corrobora com essa afirmação uma vez que a mesma apresenta alta produção de fitormônio AIA o que ocasiona o aumento do sistema radicular da planta, proporcionando então uma maior área no solo favorecendo a absorção de água e nutrientes presentes no meio, auxiliando no bom desenvolvimento da planta refletindo de forma positiva na produtividade.

Alguns autores relatam os resultados positivos com o uso do *Azospirillum* como Cavallet et al., (2000) e Hungria (2000) que obtiveram ganhos de produtividade na ordem de 17% e 9%, respectivamente, com o uso da bactéria *Azospirillum* spp. em milho associada com adubação. Resultados semelhantes também foram encontrados por Kappes et al., (2011) e Braccini et al., (2012) que observaram incremento na produtividade com os tratamentos com inoculação.

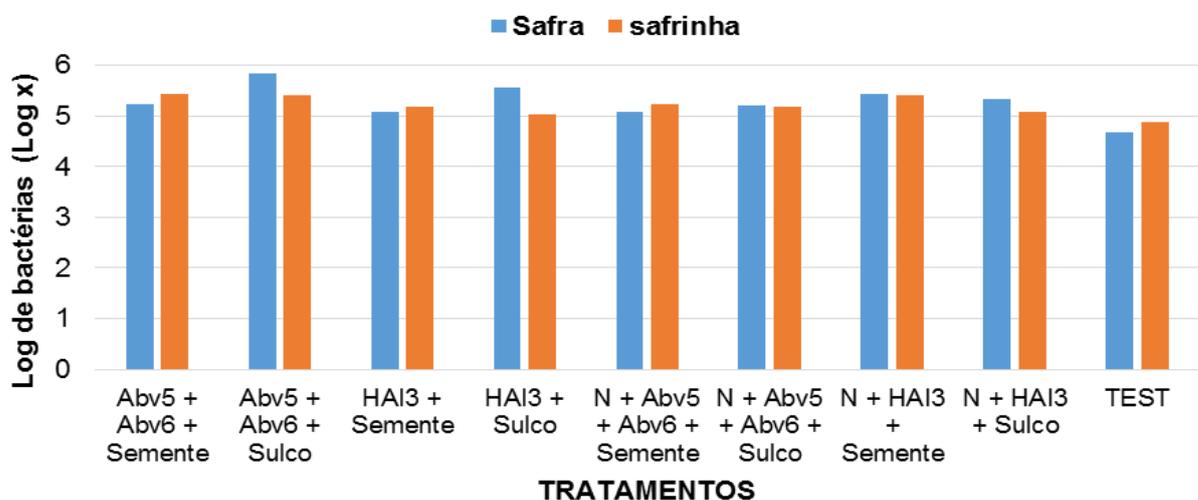
Os resultados presentes na literatura dos efeitos do uso do *Azospirillum* em relação ao desempenho agrônômico na cultura do milho ainda são bastante variáveis (Roesch et al., 2006). De acordo com Duarte et al (2012), os efeitos da adubação nitrogenada com o uso combinado da inoculação com *Azospirillum* na nutrição e produtividade na cultura do milho está relacionado a cultivar utilizada, além das condições edafoclimáticas vigentes.

Em relação ao NMP (Número Mais Provável) de bactérias presente em raízes frescas das plantas analisadas, para a safra, a maior quantidade de bactérias foi identificada no tratamento sem adubação nitrogenada inoculada com *A. brasiliense* comercial na semente que apresentou um valor de log de 5,45. A testemunha apresentou menor número de bactérias com log de 4,88 bactérias. Ao se comparar as médias dos tratamentos que receberam inoculação via semente em relação ao

pulverizado no sulco, os tratamentos inoculados via sementes apresentaram incremento de 0,76% no crescimento de bactérias em relação à pulverização sulco

Para safrinha, o tratamento que apresentou maior NMP foi a bactéria comercial pulverizada no sulco com 5,83 log e a testemunha apresentou o menor valor de 4,67 log. No período da safra, os tratamentos que foram inoculados na semente apresentaram um incremento de 2,76% em relação ao pulverizado no sulco (Figura 2).

Figura 2. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por grama de matéria fresca de raiz durante período safra e safrinha. CPCS/UFMS Chapadão do Sul - MS, (2014/15).



Fonte: Elaboração do autor

A sobrevivência no solo das bactérias inoculadas é essencial para o sucesso da inoculação, variando conforme o tipo de solo, clima e condições da planta (BASHAN; HOLGUIN, 1995). Portanto, o isolamento de microrganismos e a seleção de características bacterianas que promovem efeitos benéficos em plantas, além de estirpes competitivas são passos importantes para otimizar alto rendimento nas culturas e melhorar a sustentabilidade do ecossistema (ROESCH et al., 2007).

Para que ocorra interação entre a planta e a bactéria é indispensável o uso de estirpes selecionadas de *A. brasilense* para compor o inoculante, para haja efeito positivo nas variáveis agronômicas na cultura do milho (HUNGRIA, 2011). Em trabalho realizado por Santos et al., (2014) foi possível realizar o isolamento de 30 estirpes presentes em plantas de milho, no qual duas estirpes apresentaram uma boa produção de ácido indolacético e quatro estirpes com boa produção de atividade

da nitrogenase, mostrando-se com grande potencial para o uso em inoculações nas plantas de milho.

Neste experimento não foi verificado que a adubação tenha influenciado de forma negativa na população de bactérias presentes nas raízes, e também foi possível observar que a maior população de bactérias não relação com a maior produtividade. Pode-se inferir que os inoculantes apresentam compostos promotores de crescimento, bem como outras substâncias que após a inoculação fica disponível no solo, sendo rapidamente absorvido pelas radículas ainda durante a germinação, o que poderia influenciar positivamente no rendimento quando a bactéria é inoculada no sulco.

Uma das principais barreiras enfrentadas com o uso do *Azospirillum* na cultura do milho se dá pela inconsistência dos dados de pesquisas que diferem de acordo com o cultivar utilizado, condições edafoclimáticas variáveis, manejo da cultura, uso de estirpes selecionadas. Desta forma, a continuidade torna-se primordial para a obtenção de resultados ainda mais relevantes.

#### **4 CONCLUSÕES**

O uso de inoculantes com as estirpes Abv5 + Abv6 e HAI3, inoculadas na semente e no sulco na ausência da adubação nitrogenada é viável e proporciona bons resultados na produção da cultura do milho.

Os tratamentos inoculados apresentaram aumento no número de bactérias no interior das raízes de acordo com NMP.

A utilização de bactérias diazotróficas inoculadas colabora para o aumento da produtividade dos grãos na cultura do milho com ausência da adubação nitrogenada.

## 5 REFERÊNCIAS

- ARAUJO, R. M.; ARAUJO, A. S. F.; NUNES, L. A. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta do milho verde à inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio. **Ciência Rural**, v.44, n.9, p. 1556-1560, 2014
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semisolid media: a practical guide for microbiologists. **Plant Soil**, 2014.
- BARTCHECHEN, A.; FIORI, C. C. L.; WATANABE, S. H.; GUARIDO, R. C. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L.). **Campo Digital**, v.5, p. 56-59, 2010.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN G. Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. **Microbial Ecology**, v. 29, p. 269-281, 1995
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p. 521–577, 2004
- BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v.42, p. 241-250, 1995
- BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; NIN, G. G. P.; ALBRECHT, L. P.; BARBOSA, M. C.; ORTIZ, A. H. T. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, v.25, n.2, p. 58-64, 2012.
- CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.61-86.
- CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. C. S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, n.4, p. 129-32, 2000.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, nono levantamento agosto de 2015**, 2015. 63p.
- 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

DUARTE, A. P.; PIEDADE, R. C.; MARTINS, V. C.; CANTARELLA, H.; BARROS, V. L. N. P. Resposta de cultivares de milho ao nitrogênio em cobertura e à inoculação com *Azospirillum*. In: **ANAIS...** 29º Congresso Nacional de Milho e Sorgo; 2012; Águas de Lindóia.; 2012. p.1786-92

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

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; ALVARENGA, R. C.; GONTIJO NETO, M. M.; VIANA, J. H. M.; OLIVEIRA, M. F.; MATRANGOLO, W. J. R.; ALBUQUERQUE FILHO, M. R. Cultivo do Milho. EMBRAPA. **Embrapa Milho e Sorgo**. 2010. Disponível em: <[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_6\\_ed/manejomilho.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/manejomilho.htm)>. Acesso em: 10 de jan de 2016.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **Springer**, v.6, n. 3, 2016.

GODOY, J. C. S.; WATANABE, S. H.; FIORI, C. C. L.; GUARIDO, R. C.. Produtividade de milho em resposta a doses de nitrogênio com e sem inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*. **Campo Digit@l**, v.6, n.1, p.26-30, 2011.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.395-412, 2005

HARTMANN, A.; BALDANI J. I. **The genus *Azospirillum***. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). *The Prokaryotes*, p.115-140, 2006.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo, Embrapa Soja, 2011. 37p. (Documentos, n.325).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M. S.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v.331, p. 413-25, 2000.

KAPPES, C.; ARF, O.; BEM, E. A. D.; PORTUGAL, J. B.; GONZAGA, A. R. Manejo do nitrogênio em cobertura na cultura do milho em sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.13, n.2, p. 201-217, 2014.

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

- OKON, Y. *Azospirillum*: as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnolog**, v.3, p. 223- 228, 1985
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Rootassociated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, v.63, p. 364-370, 1997
- PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v.69, n.4, p. 905-911, 2010.
- QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; CAMARGO, F. A. O. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v.61, n.2, p. 209-218, 2014.
- REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.3, p. 1139- 1146, 2008.
- ROESCH, L. F.W.; QUADROS, P. D.; CAMARGO, F. A. O.; TRIPLETT, E. W. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.1377–1383, 2007.
- ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L.; PASSAGLIA, L. P. M.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S de; CAMARGO, F. A. O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, n.9, p. 967-974, 2006.
- SANTOS, J. S.; VIANA, T. O.; JESUS, C. M.; BALDANI, V. L. D.; FERREIRA, J. S. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.39, p. 78-85, 2014.
- 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**, v.29, n.3, p. 353-362, 2005.
- SOUZA, M. S. T. *Efeito da inoculação de Azospirillum spp. em gramíneas forrageiras do pantanal sul-mato-grossense*. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Corumbá, 2013.