



**SELEÇÃO E EFICIÊNCIA DE ESTIRPES
NATIVAS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ISOLADAS DE PLANTAS DE MILHO E ARROZ**

JOELMA DA SILVA SANTOS

2018

JOELMA DA SILVA SANTOS

**SELEÇÃO E EFICIÊNCIA DE ESTIRPES NATIVAS DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE PLANTAS DE MILHO E ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador
Prof. D.Sc. Joilson Silva Ferreira

**VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA-BRASIL**

S236s

Santos, Joelma da Silva.

Seleção e eficiência de estirpes nativas de bactérias
dizotróficas isoladas de
plantas de milho e arroz. / Joelma da Silva Santos, 2018.

91f. : il.

Orientador (a): D.Sc. Joilson Silva Ferreira.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia,
Programa de
Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia.
Vitória da Conquista,
2018.

Inclui referência F. 73 - 91.

1. Cultura do milho - Aspectos. 2. Fixação biológica de nitrogênio -
Leguminosas. 3. *Zea mays*. 4. Diazotrofo. I. Ferreira, Joilson Silva. II.
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia. T. III.

Catlogação na fonte: Juliana Teixeira de Assunção – CRB 5/1890

UESB – Campus Vitória da Conquista – BA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
Área de Concentração em Fitotecnia

Campus de Vitória da Conquista - BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “SELEÇÃO E EFICIÊNCIA DE ESTIRPES NATIVAS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE PLANTAS DE MILHO E ARROZ”.

Autor: Joelma da Silva Santos

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela Banca Examinadora:



Prof. Joilson Silva Ferreira, D.Sc., UESB
Presidente



Prof. Quelmo Silva de Novaes, D.Sc., UESB



Profa. Patrícia Anjos Bittencourt Barreto-Garcia, D.Sc., UESB



Prof. Geovane Lima Guimarães, D.Sc., IFBAIANO/Valença-BA



Profa. Felizarda Viana Bebé, D.Sc., IFBAIANO/Guanambi-BA

Data de realização: 31 de janeiro de 2018.

À minha mãe, Raimunda Silva.
Às minhas amigas Paula Acácia, Tarciana Viana e Joseane Ávila.
Minha eterna gratidão!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom DEUS, pelo dom da vida, por ser Luz no meu caminho e estar sempre comigo em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe, pelo incentivo, amor e confiança. Obrigada!

Aos meus irmãos, José Júnior e Sara Santos, pelo incentivo e carinho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Ao meu orientador, Dr. Joilson Silva Ferreira, pela orientação, oportunidade e compreensão.

À minha coorientadora, Dr^a. Vera Lúcia Divan Baldani, pelo apoio e contribuição.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), pela contribuição na minha formação.

À CAPES/FAPESB, pela concessão da bolsa de estudo.

À Embrapa Agrobiologia, pela colaboração na execução do projeto.

À banca examinadora, pela participação e contribuição.

Ao Prof. Divino Miguel, coordenador do laboratório de microbiologia do solo, por nos acolher e ceder espaço para o desenvolvimento das atividades laboratoriais.

Aos meus alunos de iniciação científica, Carol Chaves, Ângela Macedo, Mauricio Sousa, Thamara e Theillon Henrique, pela oportunidade de convívio e aprendizado.

À Diretoria de Campo Agropecuário (DICAP), pela colaboração e apoio técnico, em especial, Rita, Eduardo Ganem e Maurício Soares. E aos colaboradores do campo experimental, pela ajuda na condução dos experimentos, em especial, Carlos (Dui), Sr. Manoel, Márcio, Adriano e João Gordo.

Aos colegas de Pós-graduação, Joseane Ávila, Ingrid Moraes, Roberlan Ferreira, Bruna Madureira, Ariana Lisboa, Rayka Kristian, Cristina Meira, Raelly Silva, Renan Tiago, Josué Fogaça, Edenilson Ribeiro e Leandro Santos, pela amizade.

Aos membros do laboratório de microbiologia do solo, pela boa convivência e momentos de descontração.

Ao meu amigo Osmar Amorim, pela amizade e cuidado.

Ao meu amigo Roberto Coutinho, pelo incentivo, cuidado e atenção.

Às minhas colaboradoras, Tarciana Viana, Joseane Ávila, Paula Acácia e Rayka Kristain, pela imensa contribuição na reta final desse trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para essa conquista.

Quando chegamos ao limite, Deus chega com a providência.

RESUMO GERAL

SANTOS, J. S. **SELEÇÃO E EFICIÊNCIA DE ESTIRPES NATIVAS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE PLANTAS DE MILHO E ARROZ**. Vitória da Conquista – BA: UESB, 2018. 95 p. (Tese – Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)*

O milho é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo. É um dos principais grãos que compõem a dieta humana e animal. Devido ao aumento populacional e, conseqüentemente, à grande demanda por alimentos, a produção de alimentos tornou-se um grande desafio mundial. Objetivou-se avaliar a eficiência de isolados nativos de bactérias diazotróficas na cultura do milho cultivado em Vitória da Conquista-BA. Foram realizados quatro ensaios. O primeiro experimento objetivou pré-selecionar estirpes nativas para serem testadas em condições de campo. Foi realizado em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 18x2, com presença e ausência de inoculação. Foram avaliadas altura de plântulas, massas frescas e secas de raiz e parte aérea. O segundo ensaio teve o propósito de selecionar/testar estirpes nativas cultivadas em casa de vegetação, em DIC, arranjo fatorial 7x4, com presença e ausência de inoculação e quatro níveis de N (0, 30, 60 e 120 kg ha⁻¹) na forma de ureia. Os parâmetros avaliados foram: altura de plantas, diâmetro do colmo, massas fresca e seca da parte aérea e índice SPAD. A finalidade do terceiro ensaio foi testar estirpes nativas em contraste com padrão da Embrapa Agrobiologia - ZAE94, cultivados em casa de vegetação, em DIC, esquema fatorial 4x4, com presença e ausência de inoculação e quatro níveis de N (0, 40, 80 e 120 kg ha⁻¹) na forma de ureia. Os parâmetros avaliados foram os mesmos do segundo ensaio. O quarto experimento foi realizado a campo, em DBC, fatorial 5x4 com presença e ausência de inoculação com *H. seropedicae* (ZEA94), isolados nativos J9, J15, 43C, previamente selecionados, e quatro níveis de N (0, 40, 80 e 120 kg ha⁻¹). Avaliaram-se altura de plantas, diâmetro de colmo, comprimento da espiga, diâmetro da espiga e produtividade de grãos. Na presença da inoculação, verificou-se comportamento diferenciado dos genótipos; a inoculação do milho com as estirpes nativas promoveu aumentos na altura e nas massas fresca e seca da parte aérea das plantas de milho. As estirpes J9, J15 e 43C promoveram aumentos no diâmetro das espigas; a inoculação das bactérias diazotróficas ZAE94 e 43C promoveram incremento de 12,2% na produtividade de grãos de milho, quando associada ao nível de 40 kg ha⁻¹ de N.

Palavras-chave: *Zea mays*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, diazotrofo, inoculação.

*Orientador: Joilson Silva Ferreira, *D.Sc.*, UESB e Co - orientador: Vera Lúcia Divan Baldani, *D.Sc.*, UESB.

ABSTRACT

SANTOS, J. S. **SELECTION AND EFFICIENCY OF NATIVE STRAINS OF DIAZOTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM CORN AND RICE PLANTS**. Vitória da Conquista – BA: UESB, 2018. 95 p. (Tese – Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)*

Corn is one of the most important crops in the world. It is one of the main grains that make up human and animal diets. Due to the population increase and, consequently, the high demand for food, food production has become a major global challenge. The objective of this study was to evaluate the efficiency of native strains of diazotrophic bacteria in corn crop cultivated in Vitória da Conquista - BA. Four experiments were performed. The first experiment aimed to pre-select native strains to be tested under field conditions. It was carried out in a greenhouse, in completely randomized design (DIC), in an 18x2 factorial scheme, with presence and absence of inoculation. Seedling height, fresh and dry masses of root and shoot were evaluated. The second experiment has the purpose of selecting / testing native strains cultivated in greenhouse, in DIC, 7x4 factorial arrangement, with presence and absence of inoculation and four levels of N (0, 30, 60 and 120 kg ha⁻¹) in the form of urea. The following parameters were evaluated: plant height, stem diameter, fresh and dry mass of shoot, and SPAD index. The objective of the third experiment was to test native strains in contrast to Embrapa Agrobiology standard - ZAE94, grown in greenhouse, in DIC, 4x4 factorial scheme, with presence and absence of inoculation and four levels of N (0, 40, 80 and 120 kg ha⁻¹) in the form of urea. The parameters evaluated were the same as those of the second assay. The fourth experiment was conducted in the field, in DBC, factorial 5x4, with presence and absence of inoculation with *H. seropedicae* (ZEA94), native isolates J9, J15, 43C, previously selected, and four levels of N (0, 40, 80 e 120 kg ha⁻¹). Plant height, stem diameter, ear length, ear diameter, and grain yield were evaluated. In the presence of inoculation, it was verified a differentiated behavior of the genotypes; Corn inoculation with the native strains promoted increases in height, fresh and dry mass of shoot. Strains J9, J15, and 43C promoted increases in ear diameter; the inoculation of diazotrophic bacteria ZAE94 and 43C promoted 12.2% of increase in corn grain yield, when associated with the level of 40 kg ha⁻¹ of N.

Key words: *Zea mays*, biological fixation of nitrogen, diazotroph, inoculant.

* Adviser: Joilson Silva Ferreira, *D.Sc.*, UESB e Co-advisor: Vera Lúcia Divan Baldani, *D.Sc.*, UESB.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo da análise de variância e coeficientes de variação referentes à altura da planta (ALT), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de plântulas de milho híbrido AG 1051 e variedade AL Bandeirante com presença e ausência de inoculação com bactérias diazotróficas, aos 20 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.45
- Tabela 2.** Massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA), em função dos genótipos, milho híbrido AG 1051 e variedade AL Bandeirante, com presença e ausência de inoculação, aos 20 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.49
- Tabela 3.** Resumo da análise de variância e coeficientes de variação referentes à altura da planta (ALT), diâmetro do caule (DIAM), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e índice SPAD de plantas de milho híbrido AG 1051, com presença e ausência de inoculação e diferentes níveis de N, aos 67 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.....51
- Tabela 4.** Altura de plantas de milho, em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N, no híbrido AG 1051, aos 67 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.52
- Tabela 5.** Massa fresca da parte aérea de plantas de milho, em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N no híbrido AG 1051, aos 67 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.....54
- Tabela 6.** Índice SPAD em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N, no híbrido AG 1051, aos 67 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.57
- Tabela 7.** Massa seca da parte aérea e diâmetro de colmo de plantas de milho híbrido AG 1051, em função da inoculação com bactérias diazotróficas nativas, 67 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.....59
- Tabela 8.** Resumo da análise de variância e coeficientes de variação referentes à altura da planta (ALT), diâmetro do colmo (DIAC), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e índice SPAD em plantas de milho

híbrido AG 1051, com presença e ausência de inoculação e diferentes níveis de N, aos 46 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016..... 62

Tabela 9. Massa fresca da parte aérea plantas de milho híbrido AG 1051, em função da inoculação com bactérias diazotróficas, aos 46 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2017. 66

Tabela 10. Resumo da análise de variância e coeficientes de variação referentes à altura da planta (ALT), diâmetro do colmo (DIAC), comprimento da espiga (CESP), diâmetro da espiga (DESP) e produtividade (PROD) de milho híbrido AG 1051, com presença e ausência de inoculação com *H. seropedicae* ZAE94 e isolados nativos e diferentes níveis de N. Vitória da Conquista-BA, 2017. 68

Tabela 11. Comprimento da espiga do milho híbrido AG 1051, em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N. Vitória da Conquista-BA. 2017. 69

Tabela 12. Diâmetro da espiga de milho híbrido AG 1051, em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N. Vitória da Conquista-BA, 2017. 70

Tabela 13. Produtividade de grãos do milho híbrido AG 1051, em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N. Vitória da Conquista-BA, 2017. 71

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Altura de plântulas de milho em função da interação inoculação x genótipos, aos 20 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016. 46
- Figura 2.** Massa fresca da parte aérea (MFPA) (2A), massa seca da parte aérea (MSPA) (2B) e massa seca da raiz (MSR) (2C) de plântulas de milho, em função da inoculação, em híbrido AG 1051 e variedade AL Bandeirante, com presença e ausência de inoculação, aos 20 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016..... 48
- Figura 3.** Altura de plantas de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação e diferentes níveis de N, aos 67 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2016. 54
- Figura 4.** Massa fresca da parte aérea de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 67 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2016. 56
- Figura 5.** Índice SPAD de plantas de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 67 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2016. 58
- Figura 6.** Massa seca da parte aérea e diâmetro do colmo de plantas de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 67 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2016. 60
- Figura 7.** Altura de plantas de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 46 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2017. 63
- Figura 8.** Diâmetro do colmo (A), índice SPAD (B) e massa seca da parte aérea (C) de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 46 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2017. 64

Figura 9. Massa fresca da parte aérea de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 46 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2017.	67
Figura 10. Comprimento da espiga de milho híbrido AG 1051, em função da interação, com presença e ausência de inoculação e diferentes níveis de N. Vitória da Conquista – BA, 2017.....	70
Figura 11. Produtividade de grãos de milho híbrido AG 1051, em função da interação, com presença e ausência de inoculação e diferentes níveis de N. Vitória da Conquista-BA, 2017.	73

LISTA DE SÍMBOLOS

N	Nitrogênio
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
C.V.	Coefficiente de variação
ALT	Altura
DIAC	Diâmetro do colmo
MSPA	Massa seca da parte aérea
MFPA	Massa fresca da parte aérea
MSR	Massa seca da raiz
CESP	Comprimento da espiga
DESP	Diâmetro da espiga
PROD	Produtividade
DIC	Delineamento interiramente casualizados
DBC	Delineamento em blocos casualizados
DAS	Dias após a semeadura
CONAB	Companhia nacional de abastecimento
Mg ha ⁻¹ .	Mega grama por hectare
EMBRAPA	Empresa brasileira de pesquisa e agropecuaria
AIA	Acido indol acético
XET	Xiloglucano endotransglicosilase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Aspectos da cultura do milho.....	21
2.2 Microrganismos fixadores de nitrogênio	22
2.2.1 Gênero <i>Herbaspirillum</i>	23
2.2.2 Gênero <i>Azospirillum</i>	25
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio: na agricultura do Brasil.....	27
2.3.1 Fixação Biológica de Nitrogênio em leguminosas	29
2.3.2 Fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Caracterização dos experimentos.....	37
3.1.1. Experimento I: Seleção de estirpes nativas de bactérias diazotróficas	37
3.1.2 Experimento II - Seleção de estirpes nativas de bactérias diazotróficas, em condições de casa de vegetação e diferentes níveis de N.	39
3.1.3 Experimento III: Inoculação com a bactéria diazotrófica <i>H. seropedicae</i> (BR11417) ZAE94 e estirpes nativas, em condições de casa de vegetação e diferentes níveis de N.....	40
3.1.4 Experimento IV: Inoculação com a bactéria diazotrófica <i>H. seropedicae</i> (BR11417) ZAE94 e estirpes nativas, em condições de campo para avaliação de características agronômicas.....	41
3.1.5. Análise estatística	43
3.1.6 Descrição dos genótipos	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Experimento I: Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas	45

4.2 Experimento II: Seleção de estirpes nativas de bactérias diazotróficas em condições de casa de vegetação e diferentes níveis de N.	51
4.3. Experimento III: Inoculação com a bactéria diazotrófica <i>H. seropedicae</i> (BR11417) ZAE94 e estirpes nativas, em condições de casa de vegetação e diferentes níveis de N.	61
4.4. Experimento IV: Inoculação com a bactéria diazotrófica <i>H. seropedicae</i> (BR11417) ZAE94 e estirpes nativas, em condições de campo, para avaliação de características agronômicas.....	67
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

O aumento populacional e, conseqüentemente, a grande demanda por alimentos tornaram-se um grande desafio para o setor de produção mundial de alimentos. O milho é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo. É um dos principais grãos que compõem a dieta humana e animal e também é largamente empregado na indústria como matéria-prima para diversos processos.

Devido à sua importância, existe a necessidade do aumento da produção, e, para que isso ocorra, há necessidade de fornecimento de elementos essenciais. Dentre eles, o nitrogênio é o mais importante no metabolismo vegetal e requerido em maior quantidade. É um dos nutrientes que apresentam os efeitos mais significativos no aumento da produtividade da cultura do milho (SORATTO e outros, 2010), no entanto a maneira como é fornecido pode trazer diversos problemas ao meio ambiente, assim como tornar o custo de produção oneroso, como ocorre ao utilizar os fertilizantes químicos.

Para minimizar os impactos ambientais ocasionados pelos adubos químicos, como contaminação do solo, águas superficiais e subterrâneas, e aumentar a lucratividade do sistema produtivo, têm-se buscado alternativas a esses produtos, de forma que não se comprometa a produtividade da cultura. A fixação biológica de nitrogênio, processo natural disponível por intermédio de bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio atmosférico, pode fornecer a diversas culturas, como a do milho, uma parcela do N requerido.

Nas últimas décadas, com o advento da biotecnologia, têm-se observado contribuições significativas da FBN na produção de alimentos em culturas de importância econômica em todo o mundo. Diversas pesquisas são desenvolvidas para avaliar o efeito da inoculação com bactérias diazotróficas no desenvolvimento da cultura do milho.

A FBN tem apresentado um grande potencial, com resultados satisfatórios para redução de fertilizantes nitrogenados sintéticos (CONCEIÇÃO e outros, 2009), fato esse que tem justificado pesquisas no mundo todo. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a eficiência de isolados nativos de bactérias diazotróficas na cultura do milho, cultivado em Vitória da Conquista - BA.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos da cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea pertencente à família *Poaceae*, da tribo *Maydeae*, do gênero *Zea* (LIMA, 2007). É uma cultura que é produzida nas mais diversas condições ambientais, socioeconômicas, diferentes sistemas produtivos em várias regiões (EMBRAPA, 2008).

É uma planta de origem tropical, classificada como C4, e seu metabolismo possibilita uma alta conversão fotossintética com baixa taxa de abertura estomática, reduzindo perda de água por transpiração (TAIZ e ZEIGER, 2013). Esse grupo de vegetais é mais responsivo a altas temperaturas e luminosidade quando comparado às plantas C3. São capazes de expressar seu potencial produtivo e reduzir o ciclo da cultura com aumento da temperatura (SILVA e outros, 2010).

A sua importância econômica é devida às diversas formas de utilização, que variam desde a alimentação até a utilização em indústrias. Na alimentação, é considerado como fonte energética, por ser composto predominantemente de carboidratos e lipídeos (EMBRAPA, 2006), tanto na alimentação humana quanto na animal, sendo que esta utiliza o milho em maior quantidade.

A produção agrícola brasileira tem o milho como um dos cereais mais importantes economicamente (CASA e outros, 2007). Na safra agrícola 2017/18, a produção nacional foi de 67.170,9 mil toneladas, com produtividade média de 5.547 kg ha⁻¹. Na região Nordeste, produção de 2.118,8 mil toneladas, das quais 258,7 mil toneladas foram registradas na Bahia, que apresentou produtividade média de 2.183 kg ha⁻¹ (CONAB, 2018).

A utilização de cultivares melhoradas e técnicas de cultivo adequadas tem proporcionado uma evolução no cultivo, em termo de maiores rendimentos da cultura, década após década (EMBRAPA, 2008). Dentro do manejo da cultura para elevar a produtividade, é importante o fornecimento do nitrogênio, nutriente muito requerido pelos vegetais, e sua falta limita a produção (ZAMBOLIM e outros, 2012).

O nitrogênio pode ser fornecido através de produtos químicos ou por fontes alternativas, como ocorre através de inoculação das sementes com bactérias diazotróficas.

2.2 Microrganismos fixadores de nitrogênio

As bactérias diazotróficas são microrganismos que possuem um complexo enzimático denominado nitrogenase, o qual determina a capacidade de fixar nitrogênio. São representadas por diversos grupos filogenéticos que estão presentes em diferentes ecossistemas e podem ser de vida livre no solo ou em interações associativas com espécies vegetais, tanto na rizosfera quanto endofiticamente (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Acredita-se que as bactérias endofíticas apresentem um maior potencial de contribuição da FBN (BALDANI e BALDANI, 2005), por possuírem habilidade de colonizar o interior da planta e se proliferar em nichos protegidos do oxigênio, com menor concorrência; são alguns fatores que proporcionam condições adequadas para expressar o nível máximo da fixação de nitrogênio (KENNEDY e outros, 1997).

O termo endofítico é dividido em facultativo e obrigatório, os quais foram propostos para diferenciar as estirpes que colonizam tanto a superfície quanto o interior da raiz e sobrevivem no solo das que não possuem

sobrevivência fora das raízes e parte aérea das plantas, respectivamente (BALDANI e outros, 1997).

A associação das bactérias endofíticas ocorre em diferentes graus, que podem estar relacionados à especificidade da interação entre as características genéticas do microrganismo e do vegetal (OLIVARES e outros, 1997). As bactérias do gênero *Azospirillum* são endófitos facultativos e apresentam grau de especificidade menor em relação aos endófitos obrigatórios, como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Azoarcus* spp. e *Burkholderia* spp. (BALDANI e outros, 1997).

2.2.1 Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* foi estabelecido como bactérias fixadoras de nitrogênio, associadas às raízes ou rizosfera de plantas de milho, sorgo e arroz, cultivadas em três tipos de solos diferentes. Esse gênero pertence ao grupo dos microrganismos gram-negativos, microaeróbicos, móveis e se desenvolvem em uma faixa de pH de 5,3 a 8,0 (BALDANI e outros, 1986).

A primeira espécie identificada desse gênero foi a *H. seropedicae*. Atualmente, esse gênero possui dezesseis espécies descritas: *H. rubrisubalbicans* (BALDANI e outros, 1996), *H. frisingense* (KIRCHHOF e outros, 2001), *H. lusitanum* (VALVERDE e outros, 2003), *H. autotrophicum*, *H. huttiense*, *H. putei* (DING & YOKOTA, 2004), *H. chlorophenolicum* (IM e outros, 2004), *H. hiltneri* (ROTHBALLER e outros, 2006), *H. rhizosphaerae* (JUNG e outros, 2007), *H. aquaticum* (DOBRITSA e outros, 2010), *H. aurantiacum*, *H. canariense*, *H. soli* (CARRO e outros, 2012), *H. massiliense* (LAGIER e outros, 2012) e *H. psychrotolerans* (BAJERSKI e outros, 2013).

A espécie *H. seropedicae* foi isolada também de raízes previamente lavadas e desinfestadas de cana-de-açúcar, *Brachiaria decumbens* e *Digitaria decumbens*, além de outras espécies diferentes de gramíneas (BALDANI e outros, 1996), dendezeiro e pupunheira (FERREIRA e outros, 1995), capim elefante (REIS e outros, 2000) e bananeira (CRUZ e outros, 2001), associada com arroz inundado (RODRIGUES e outros, 2004). É uma espécie de maior ocorrência e distribuição dentro das diazotróficas endofíticas obrigatórias estudadas.

Por essa ampla distribuição e ocorrência, vários trabalhos foram desenvolvidos utilizando a inoculação de *H. seropedicae* com o objetivo de avaliar a contribuição da FBN para as culturas agrícolas; como exemplo, tem-se o estudo da produtividade de milho (BREDA e outros, 2016; ARAUJO e outros, 2015; DARTORA e outros, 2013; DOTTO e outros, 2010), o desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar (MATOSO e outros, 2016; GARCIA e outros, 2013; PEREIRA e outros, 2013) e a produção de grãos de arroz (FERREIRA e outros, 2011; GUIMARÃES e outros, 2010).

A *H. rubrisubalbicans*, a princípio, havia sido descrita como *Pseudomonas rubrisubalbicans*; posteriormente, foi reclassificada (BALDANI e outros, 1996). Essa espécie coloniza as raízes, caule e predomina concentração em folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), também encontrada em capim elefante (REIS e outros, 2000), bananeiras e dendenzeiros (CRUZ e outros, 2001). É uma bactéria promotora de crescimento vegetal em cana-de-açúcar (CHAVES e outros, 2015), porém apresenta fenótipo diferente quando inoculada em variedades sensíveis de cana-de-açúcar e sorgo, o que causa a doença da estria mosqueada e a estria vermelha, respectivamente.

H. frisigense foi isolada de plantas C4, *Miscanthus* spp. e *Spartina pectinata* da Alemanha e cultivares de *Pennisetum purpureum* cultivadas no Brasil (KIRCHHOF e outros, 2001). A bactéria desse gênero descrita na

sequência foi *H. lusitanum*, isolada de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* cultivados em solos de Portugal (VALVERDE e outros, 2003), que, inicialmente, foram classificados como fixadores de nitrogênio pela ampliação do gene nifD e pela formação de película e sem nitrogênio, porém Weiss e outros (2012), estudando o genoma dessa espécie, constataram a ausência de genes nif responsáveis pela fixação biológica e também genes de nodulação (nod). Acredita-se que essa espécie seja oportunista, capaz de colonizar nódulos radiculares, assim como outros tecidos vegetais.

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* são conhecidas por serem capazes de se associar com raízes, caule e folhas de gramíneas e por algumas espécies fixarem nitrogênio, atuarem como promotoras de crescimento vegetal; outras, isoladas de solos contaminados, amostras de água, entre outros. Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com espécies desse gênero, principalmente com a *H. seropedicae*, pelo fato de ter sido encontrada em um maior número de plantas de importância econômica.

2.2.2 Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* possui dezenove espécies descritas atualmente: *A. lipoferum* (BEIJERINCK e outros, 1925; TARRAND e outros, 1978), *A. brasilense* (TARRAND e outros, 1978), *A. largimobile* (BEN DEKIL e outros, 1997; SLY & STACKEBRANDT, 1999), *A. amazonense* (MAGALHÃES e outros, 1983; LIN e outros, 2015), *A. halopraeferens* (REINOLD e outros, 1987), *A. irakense* (KHAMMAS e outros, 1989), *A. doebereineriae* (ECKERT e outros, 2001), *A. oryzae* (XIE and YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG e outros, 2006), *A. canadense* (MEHNAZ e outros, 2007), *A. zae* (MEHNAZ e outros, 2007), *A. rugosum* (YOUNG e outros, 2008), *A. picis* (LIN e outros, 2009), *A.*

thiophilum (LAVRIMENKO e outros, 2010), *A. formosense* (LIN e outros, 2012), *A. fermentarium* (LIN e outros, 2013), *A. humicireducens* (ZHOU e outros, 2013), *A. soli* (LIN e outros, 2015) e *A. agrícola* (LIN e outros, 2016).

São bactérias microaerófilas, móveis em meio de cultivo, flagelo polar bem desenvolvido e, quando cultivadas em ágar a 30 °C, apresentam desenvolvimento de flagelos laterais, com comprimento menor em relação ao polar (TARRAND e outros, 1978). As representantes desse grupo colonizam tanto o interior quanto as superfícies das raízes de diversas plantas não leguminosas; são denominadas de diazotróficas endofíticas facultativas e ainda são capazes de sobreviver no solo em forma de cistos (BALDANI e outros, 1997). Apresentam boa sobrevivência em raízes e permanecem, portanto, em quantidade viável até o final do ciclo da cultura do milho inoculado (QUADROS e outros, 2014).

Moreira e outros (2013), estudando a ocorrência de bactérias do gênero *Azospirillum* associada a gramíneas forrageiras no semiárido do nordeste, constataram que os capins *Andropogon* e *Buffel* apresentaram maiores densidades de microrganismos diazotróficos endofíticos, e estes, com baixa diversidade fenotípica. Quadros e outros (2014), ao testarem uma mistura de três espécies de *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. oryzae*) na cultura do milho, observaram que a inoculação promoveu um aumento do teor relativo de clorofila, rendimento de matéria seca da parte aérea dos híbridos AS 1575 e SHS 5050 e peso de mil grãos para o híbrido P32R48.

Esse gênero tem sido o mais estudado dentro dos diazotróficos e usado como modelo para investigação entre as bactérias e cereais, principalmente a espécie *A. brasilense*, que foi descoberta nos anos 70. Essa espécie é encontrada no interior de tecidos vegetais, naturalmente associada às raízes e ao solo. Vem sendo utilizada no Brasil e no exterior como inoculante para culturas da família das poaceas (ZAKHAROVA e outros, 1999).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio: na agricultura do Brasil

O nitrogênio (N) é um dos principais nutrientes para o desenvolvimento das plantas; faz parte de proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos e da molécula de clorofila, a qual é responsável pela fotossíntese, cuja produção de fotoassimilados é de fundamental importância para a manutenção e desenvolvimento celular (TAIZ e ZEIGER, 2013). Sua concentração na atmosfera é abundante, 78%, na forma de N_2 , porém nenhum animal ou vegetal consegue assimilá-lo diretamente, devido à estabilidade da tripla ligação existente entre os dois átomos. Por isso, sua disponibilidade é um fator limitante na produtividade agrícola e em ecossistemas naturais (EPSTEIN e BLOOM, 2005), já que esse é um dos nutrientes absorvidos em maior quantidade pelas culturas.

Os fertilizantes nitrogenados apresentam baixa eficiência de assimilação, devido a perdas causadas por práticas culturais inadequadas e processos como lixiviação, desnitrificação e volatilização do NH_3 que chegam a 50% de todo o N adicionado (STRALIOTTO e outros, 2002; CANTARELLA, 2007). O uso de fertilizantes nitrogenados de maneira intensiva e inadequada pode acarretar sérios problemas de degradação ambiental, como, por exemplo, acidificação do solo e eutrofização da água (DIXON e KAHN, 2004; PELEGRIN e outros, 2009), poluição de águas superficiais e subterrâneas e, conseqüentemente, queda na produtividade, além de onerar os custos de produção, os quais representam de 5% a 20% do custo total (HUNGRIA e outros, 2001; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Nas últimas décadas, têm-se buscado alternativas para diminuir o uso exagerado de fertilizantes nitrogenados, de forma que não acarrete a queda da

produtividade das culturas. Para isso, procuram-se utilizar bactérias promotoras do crescimento de plantas, que visam a aumentar a eficiência de utilização dos fertilizantes e que, eventualmente, apótem N via fixação biológica, o que representa uma estratégia economicamente viável, além dos consequentes benefícios ambientais associados à redução no uso de fertilizantes (HUNGRIA, 2011; HUNGRIA e outros, 2010). Arruda (2012) afirma que esses microrganismos permitem a obtenção de alta produtividade, com baixo custo e menos agressão ao ambiente; um dos grandes desafios para isso é obter um manejo adequado dessa simbiose e, assim, aumentar sua eficiência.

A FBN é considerada o segundo processo biológico mais importante do planeta, após a fotossíntese (SILVA JÚNIOR e outros 2013). Realizada por uma parcela relativamente pequena de espécies de bactérias procariontes (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), também são conhecidas como diazotróficas (BARBOSA e outros, 2012). As diazotróficas podem ser de vida livre, endofíticas obrigatórias e facultativas (que habitam o interior ou a superfície dos tecidos) e simbióticas (que desenvolvem uma associação mutualística com seus hospedeiros) (MOREIRA e outros, 2010).

Em função da importância que a FBN representa para o setor agrícola no Brasil e no mundo, diversas instituições de ensino e pesquisa têm buscado ao longo dos últimos anos a otimização da FBN em espécies cultivadas, sejam gramíneas ou leguminosas, bem como em ecossistemas naturais.

Estudos relacionando a FBN e a produtividade agrícola estão sendo desenvolvidos em parceria entre o Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e a EMBRAPA Agrobiologia, desde o ano de 2010, como pode ser observado nos trabalhos de Jesus (2014), que avaliam resposta de diferentes genótipos de milho à inoculação de bactérias diazotróficas e fontes de nitrogênio; Viana e outros (2015), estudando o isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz; Santos e outros

(2015), estudando o isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de milho; Santos (2016), selecionando veículo de inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do sorgo; Ávila (2017), estudando a adubação verde associada à inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho; Morais (2016), avaliando o comportamento de híbridos de milho submetidos à adubação nitrogenada e à inoculação com bactéria diazotrófica; e Sousa (2017), isolando, identificando e selecionando bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal, associadas à cultura do sorgo, em solos de diferentes biomas.

2.3.1 Fixação Biológica de Nitrogênio em leguminosas

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das principais *commodities* agrícolas do Brasil e do mundo, destacando-se no agronegócio mundial devido à sua ampla adaptação aos climas tropicais e subtropicais. Além disso, apresenta grande importância econômica em função dos elevados teores de óleo e por possuir alto potencial produtivo combinado com altos teores de proteínas (40%), lipídios (20%) (MORAES e outros, 2006); sendo assim, é muito importante economicamente, em especial, para a fabricação de rações para animais e para alimentação humana (LOPES e outros, 2002).

A soja é uma cultura extremamente exigente em N, o qual é o elemento mineral requerido em maior quantidade pela planta e essencial para a obtenção de altas produtividades (AMADO e outros, 2010). A adubação nitrogenada é uma alternativa rápida capaz de suprir toda a demanda de N pela cultura, porém inviabiliza o cultivo devido ao alto custo dos fertilizantes (ZILLI e outros, 2010). A alta demanda de nitrogênio pela cultura da soja é suprida

principalmente pela FBN, através da simbiose planta-bactéria (HUNGRIA e outros, 2001; AMADO e outros, 2010).

A introdução da FBN foi umas das grandes propulsoras para o cultivo em larga escala da soja no Brasil; esta é um dos exemplos de maior sucesso, uma vez que ela possui simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN), em especial as do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (MASCARENHAS e outros 2005); possibilita uma economia anual aproximada de US\$ 3 bilhões em fertilizantes nitrogenados, correspondendo a 320 kg ha⁻¹ de N (HUNGRIA e outros 2005; FAGAN e outros 2007).

O feijoeiro-comum é uma cultura bastante diversificada quanto aos ambientes de cultivo, cultivada em todo o território nacional e praticamente todo o ano (SALVADOR, 2011). Em áreas irrigadas, tem sido uma opção vantajosa para agricultores, por apresentar ciclo relativamente curto e estabilidade de mercado (Araújo e Ferreira, 2011). A fixação simbiótica de N é uma das formas de obtenção de N pelo feijoeiro-comum, com produtividades de grãos superiores a 2.000 kg ha⁻¹ em cultivos com uso de inoculação (HUNGRIA e outros, 2003). Apesar de haver contribuição da FBN para a cultura, alguns trabalhos relatam que somente a inoculação não proporciona a quantidade de N necessária para atingir altos níveis de produtividade (ALVES, 2002; SILVA e outros, 2002; FERREIRA e outros, 2004) e que nem a FBN é capaz de suprir a necessidade de N da cultura (MATOSO e KUSDRA 2014).

A associação rizóbio-feijoeiro, principalmente *Rhizobium tropici*, quando é eficiente, pode fazer com que a FBN substitua a utilização de adubação nitrogenada, total ou parcialmente, e, dessa forma, seja reduzido o custo de produção e se proporcionem altos rendimentos na cultura (FERREIRA e outros, 2000; GRANGE e outros 2007; PELEGRIN e outros, 2009; TOZLU e outros 2012), porém Cassini e Franco (2011) afirmam que, em comparação com outras leguminosas, o feijoeiro-comum apresenta baixa eficiência na FBN, sendo

considerada uma das culturas com menor eficiência simbiótica, apenas 39% do N total em plantas de feijoeiro-comum provém da FBN (DWIVEDI e outros, 2015).

Essa ineficiência decorre do fato de a promiscuidade dessa leguminosa associar-se com grande diversidade de rizóbios do solo, (MARTÍNEZ-ROMERO, 2003; FONSECA, 2013). A nodulação realizada por rizóbios nativos torna-se ineficiente e dificulta a introdução de estirpes mais eficientes aplicadas via inoculante (OLIVEIRA e outros, 1996), o que explica casos de insucesso em ensaios com inoculação, mas Ferreira e outros (2013) afirmam que pode ser uma estratégia na seleção de estirpes mais eficientes e competitivas.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), feijão-de-corda ou feijão-macassar, é cultivado em todas as regiões brasileiras, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde, além da importância social e econômica, seu cultivo é feito tanto por pequenos quanto por médios e grandes produtores (ZILLI e outros, 2009a; GUALTER e outros, 2011), apresenta alta rusticidade, boa adaptabilidade às diversas condições edafoclimáticas e capacidade de se desenvolver em solo de baixa fertilidade.

O cultivo do feijão-caupi no Brasil tem-se destacado na tecnologia de inoculação com bactérias simbióticas para a promoção da FBN (SILVA JÚNIOR e outros, 2012); este, quando bem nodulado, pode dispensar fontes minerais de N, porém os solos contêm elevada população de rizóbios nativos capazes de nodular a cultura (ZILLI e outros, 2004; SOARES e outros, 2006; LEITE e outros, 2009; ZILLI e outros, 2009b) e, com isso, gerar respostas inconsistentes com relação a essa prática de manejo. Essa variabilidade de resposta à inoculação pode estar relacionada com a baixa especificidade para nodulação entre cultivares de feijão-caupi, como também à densidade e habilidade competitiva de rizóbios nativos; estes são mais competitivos e estão

em maior número em relação às bactérias presentes no inoculante com eficiência variável na FBN (HARA e OLIVEIRA, 2007).

A baixa especificidade da cultura mostra-se limitante à exploração tecnológica da FBN, já que esta é capaz de nodular e estabelecer simbiose com diversas espécies de bactérias do grupo rizóbio, incluídos os gêneros *Azorhizobium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, entre outros (WILLEMS, 2006; ZILLI e outros, 2006; ZHANG e outros, 2007). A maior eficiência tem sido observada para as espécies de *Bradyrhizobium*, especialmente *B. japonicum* e *B. elkanii*. A inoculação com estirpes *Bradyrhizobium* sp possibilita atingir níveis altos de produtividade da cultura (RUMJANEK e outros, 2005; GUALTER e outros, 2011), porém, mesmo entre estirpes dessas espécies, ocorre variação da FBN (MARTINS e outros, 2003; SOARES e outros, 2006; ZILLI e outros, 2006).

O guandu (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.) é uma espécie rústica de ciclo anual ou semi-perene, com grande potencial e multiplicidade de uso nas regiões brasileiras; é utilizada como adubo verde, quebra vento, forragem e alimento humano (WUTKE e outros 2014; RUFINI e outros, 2014). Assim como o feijoeiro-comum e o feijão-caupi, o guandu apresenta a capacidade de desenvolver nódulos com um grande número de bactérias fixadoras de N e também é considerada uma leguminosa promíscua, capaz de nodular com estirpes de crescimento rápido e lento. Dessa forma, pode existir competição entre as estirpes inoculadas e bactérias nodulantes nativas pouco efetivas quanto à FBN, o que pode limitar os efeitos da inoculação no guandu (RUFINI e outros, 2014).

Existem duas estirpes de bactérias nodulíferas aprovadas como inoculantes pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Mapa (BRASIL, 2011), que pertencem ao gênero de crescimento lento *Bradyrhizobium*: BR 2003 (SEMIA 6156), isolada de estilosantes, e BR 2801 (SEMIA 6157), isolada de crotalária. Segundo Rufini (2014), as bactérias do

gênero *Bradyrhizobium* são mais eficientes por apresentarem maior estabilidade em relação a outros gêneros de bactérias fixadoras de N₂, pois os genes relacionados ao estabelecimento (genes *nod*) e funcionamento da simbiose (genes *nif*) estão localizados em cromossomo e não em plasmídeos, que podem ser perdidos em condições ambientais estressantes.

2.3.2 Fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas

Na FBN em plantas não leguminosas, não há formação de nódulos, e sim, uma associação com bactérias diazotróficas presentes em diferentes partes da planta, como raiz e parte aérea (folhas e colmos), e na rizosfera (FERNANDES e outros, 2012). Reis Junior e outros (2008) relatam que a associação de bactérias diazotróficas dos mais diferentes gêneros e espécies, com um grande número de gramíneas, ocorre tanto em clima tropical como em clima temperado. O alto custo dos fertilizantes e a busca por uma agricultura sustentável provocaram aumento no uso de inoculantes que continham bactérias promotoras de crescimento vegetal, o que resultou em uma economia de 2 bilhões de dólares por ano (HUNGRIA e outros, 2011).

A partir da década de 70, a crise do petróleo despertou o interesse por formas alternativas ao uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura e fez intensificar os estudos envolvendo a associação de bactérias diazotróficas com as gramíneas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). A contribuição da FBN em plantas não leguminosas não é tão significativa como a das simbioses entre plantas da família leguminosas e rizóbios, porém, se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e cereais, essa se torna importante, em termos globais (NÓBREGA e outros, 2004).

Plantas da família *Poaceas* apresentam potencial significativo, respondendo com aumento na produção, quando inoculadas com bactérias diazotróficas (BALDANI e outros, 2002; GUIMARÃES e outros, 2003; CAMPOS e outros, 2003; GUIMARÃES e outros, 2010; Santos e outros, 2015; VIANA e outros, 2015). Gramíneas de interesse econômico, como milho, arroz e trigo, apresentam associação com bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Herbaspirillum*, e cana-de-açúcar com bactérias do gênero *Gluconacetobacter*.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma gramínea originária da Ásia e cultivada em todo o mundo (SOUZA, 2000), é o cereal mais consumido pela população mundial (KENENDY e outros, 2004); representa, aproximadamente, 20% da ingestão mundial de energia e 15% do aporte de proteína (KENNEDY e BURLINGAME, 2003). Tem em sua composição teor de proteína variando de 15 a 20% e amido entre 75 e 80% (STORCK, 2004).

Choudhury e Kennedy (2004) afirmam que, para a produção de uma tonelada de grãos de arroz, são necessários 16 a 17 kg de N, e, como os solos brasileiros são deficientes nesse mineral, o uso de adubação química é uma prática frequente entre os produtores. As aplicações de adubos nitrogenados, além dos impactos negativos ao meio ambiente, devido a aplicações excessivas, oneram os custos da produção; se houvesse uma substituição de 25% da demanda de N pela FBN, seria gerada uma economia de, aproximadamente, 380 milhões de dólares/ano (BALDANI e outros, 2002).

Bactérias de diversos gêneros têm sido isoladas de plantas de arroz, principalmente aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (BALDANI e DOBEREINER, 1980; BALDANI e outros, 1986, 2000; ENGELHARD e outros, 2000). Dentre esses, um dos mais promissores em termos de FBN em plantas de arroz é *H. seropedicae* (JAMES, 2002).

Dobereiner e Baldani (1995) observaram que 37 estirpes de *Herbaspirillum* spp., quando inoculados em plântulas de arroz, contribuíram com aumentos de 40% no N-total acumulado na plântula. Baldani e outros (2000) demonstraram que as estirpes M130 (*Burkholderia* sp.), ZAE94 (*H. seropedicae*) e M209 (*Burkholderia* sp.) contribuíram com 20, 17 e 11%, respectivamente, do nitrogênio acumulado na massa seca das plantas de arroz.

Guimarães (2006) observou que a cultivar IR42 obteve um aumento de 48% na produção de grãos, quando foi inoculada com bactérias diazotróficas e recebeu uma adubação de 50 kg ha⁻¹ de nitrogênio. Viana e outros (2015) observaram efeitos positivos quanto à inoculação na produção de grãos, cujos ganhos chegaram a 208,5%, dependendo da estirpe e dose de N utilizada.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura bastante difundida no Brasil (FARIA, 1993), industrialmente utilizada para produção de açúcar e álcool. A cultura de cana de açúcar acumula quantidades elevadas de N e pode chegar a valores em torno de 200 kg ha⁻¹ no ciclo de cana-planta (URQUIAGA e outros, 1992); considerando-se que, no Brasil, o cultivo de cana de açúcar ocorre com doses relativamente baixas de N (90-120 kg ha⁻¹) e expressa produtividade similar à de outros países com aplicação de 150-250 kg ha⁻¹ (CANTARELLA e outros, 2007).

Dourado-Neto e outros (2010) afirmam que a maior parte do N absorvido pelas plantas é derivado do solo, ao invés do fertilizante, o que sugere que a cultura possui um sistema natural de reposição de N eficiente (URQUIAGA e outros, 2011). Essas evidências sugerem que essa reposição de N ocorre via FBN (URQUIAGA e outros, 1992; BODDEY e outros, 2003; OLIVEIRA e outros, 2006; HERRIDGE e outros, 2008).

Herridge e outros (2008) e Urquiaga e outros (2012) apontam que a contribuição da FBN para a cultura da cana-de-açúcar gira em torno de 40 kg ha⁻¹ ano⁻¹. O incremento na produtividade da cana não tem sido atribuído a

aumentos na FBN, mas a efeitos benéficos promotores de crescimento, que, comprovadamente, ocorrem pela ação de bactérias diazotróficas (YADAV e outros, 2009; TAULE e outros, 2012; VIDEIRA e outros, 2011). Boddey e outros (2003) demonstraram que a adubação da cana-de-açúcar com fertilizantes nitrogenados pode diminuir o número de bactérias fixadoras de N₂.

As estimativas globais da FBN em cana-de-açúcar ainda são pouco confiáveis, devido à variação dos valores encontrados por pesquisadores em todo o mundo (HERRIDGE e outros, 2008). Trabalhos conduzidos na África do Sul e Austrália sugerem que a FBN não contribui significativamente para a nutrição nitrogenada da cultura nesses países (BIGGS e outros, 2002; HOEFSLOOT e outros, 2005). Herridge e outros (2008) afirmam que, no Brasil, a FBN contribui com cerca de 10 a 20% do N total acumulado pela cultura. Avaliação da FBN em 4 estados brasileiros e com 5 variedades de cana em 11 diferentes cultivos concluiu que a contribuição da FBN para as variedades de cana foi positiva, o que representa uma importante fonte de N para plantas (BODDEY e outros, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização dos experimentos

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação na área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, *Campus* Vitória da Conquista, a 850 m de altitude, cujas coordenadas geográficas são de 14° 51' de latitude Sul e 40° 50' de longitude Oeste. O clima regional é classificado como tropical de altitude (Cwb), de acordo com Köppen, com pluviosidade média anual em torno de 735 mm.

3.1.1. Experimento I: Seleção de estirpes nativas de bactérias diazotróficas

O ensaio objetivou selecionar estirpes nativas de bactérias diazotróficas com a finalidade de aplicação em campo. O experimento foi desenvolvido em recipientes sobre bancadas de madeira, em casa de vegetação, entre os dias 05 e 25 de março de 2016. Utilizaram-se sementes de milho híbrido AG1051 (AGROCERES) e sementes da variedade AL Bandeirante (CATI), adquiridas da casa do Fazendeiro, em Vitória da Conquista-BA. As estirpes nativas foram provenientes de isolados de plantas de milho da região de Vitória da Conquista: J1, J8, J9, J12, J15 (SANTOS, 2013); e de isolados de plantas de arroz da região de Vitória da Conquista (nativas): 2C, 4C, 10C, 20C, 27C, 29C, 32C, 23C, 43C, 14C (VIANA, 2012). As estirpes padrões foram cedidas pela EMBRAPA Agrobiologia: ZAE94 de *Herbaspirillum seropedicae* (BR11417) e o *Azospirillum brasilense* (Sp245); utilizou-se, também, o tratamento sem

inoculação. Todos os isolados nativos utilizados no presente trabalho foram previamente selecionados pelo seu potencial e habilidade em produção de ácido indolacético (AIA) e atividade da nitrogenase (VIANA, 2012; SANTOS, 2013). O isolado J9 foi sequenciado e pertence à espécie *Azospirillum brasilense* (SOUSA, 2017).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 18 x 2, com três repetições, onde o primeiro fator é presença e ausência de inoculação com as estirpes nativas, isoladas de plantas de milho e de arroz, e os padrões ZAE94 de *H. seropedicae* (BR11417) e o *A. brasilense* (Sp245) e ausência de inoculação. O segundo fator foi composto pelo híbrido AG 1051 e a variedade AL Bandeirante.

A inoculação das sementes com os isolados nativos foi realizada com inoculante líquido, produzido no laboratório de microbiologia do solo da UESB. Os isolados nativos foram reativados em meio DYGS, repicados para meios de cultura semissólido e sólidos específicos. Após a obtenção de colônias puras, procedeu-se ao preparo do inoculante, onde colônias purificadas foram crescidas em meio DYGS a 150 rpm, por 24 horas, a 30°C (DÖBEREINER e outros 1995). Nos tratamentos com inoculante líquido, utilizou-se a dosagem recomendada para a cultura do milho (100 mL ha⁻¹). Nos tratamentos com inoculação à base de turfa, os padrões foram cedidos pela EMBRAPA Agrobiologia; foram recebidos 250 g de inoculante para 10 Kg de sementes de milho (ALVES, 2007). As populações estabelecidas para as estirpes foram de 10⁹ células g⁻¹.

A semeadura foi realizada em 05/03/2016, utilizando-se 2 sementes por cultivar em recipientes com capacidade de 500 ml, contendo como substrato areia + vermiculita, na proporção de (2:1; v/v). Os substratos foram esterilizados duas vezes em autoclave vertical, a 120° C por 30 minutos, em intervalo de 24 horas.

Aos 20 dias após a semeadura (DAS), avaliaram-se: altura das plantas (ALT), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR).

3.1.2 Experimento II - Seleção de estirpes nativas de bactérias diazotróficas, em condições de casa de vegetação e diferentes níveis de N.

As estirpes que apresentaram melhor desempenho no ensaio anterior foram testadas em associação com diferentes níveis de nitrogênio. Utilizaram-se sementes de milho híbrido AG 1051 (AGROCERES), inoculadas com estirpes provenientes de isolados de plantas de milho da região de Vitória da Conquista (nativas): J8, J9, J15 (SANTOS, 2013); e de isolados de plantas de arroz da região de Vitória da Conquista (nativas): 4C, 32C, 43C, (VIANA, 2012) e tratamento sem inoculação (TSI). A formulação do inoculante seguiu a mesma metodologia descrita para o experimento I. Para o preparo do inoculante à base de turfa, após o crescimento da cultura bacteriana, 15 mL da suspensão foram acrescidos a sacos de polipropileno, com 35g de turfa, previamente preparados. O material foi homogeneizado e, em seguida, incubado por 24 horas a 30°C para maturação (DÖBEREINER e outros 1995).

A semeadura foi realizada em 27/05/2016, utilizando-se 4 sementes do híbrido AG 1051 por vaso; cada um continha o solo retirado da camada 0-20 cm do horizonte A de um Latossolo Amarelo típico. A adubação foi realizada de acordo com a recomendação da Comissão de Fertilidade do Solo do estado de Minas Gerais (Alvarez & Ribeiro 1999). A análise química do solo apresentou os seguintes resultados: pH em água = 6,6; P = 15 mg dm⁻³; K = 0,30 cmol_cdm⁻³e

M.O = 15 g dm⁻³. A adubação de base constou de 30 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 20 kg ha⁻¹ de K₂O, na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 7 x 4, cujo primeiro fator é: J8, J15, 4C, 32C, J9, 43C e tratamento sem inoculação; e o segundo fator, com os seguintes níveis de nitrogênio: 0, 30, 60 e 120 kg ha⁻¹, tendo como fonte a ureia, em um total de 28 tratamentos e três repetições. O ensaio foi conduzido em vasos com capacidade para 20 litros, mantendo-se duas plantas por vaso. A fonte de nitrogênio (ureia) foi aplicada de forma parcelada, com 50 % na semeadura e 50 % aos 17 dias após a semeadura (DAS).

As avaliações foram realizadas aos 67 DAS, analisando-se a altura de plantas (ALT), diâmetro do colmo (DIAM), massas fresca da parte aérea (MFPA) e seca da parte aérea (MSPA) e índice SPAD.

3.1.3 Experimento III: Inoculação com a bactéria diazotrófica *H. seropedicae* (BR11417) ZAE94 e estirpes nativas, em condições de casa de vegetação e diferentes níveis de N.

Objetivou-se testar, em condições de casa de vegetação, dois isolados nativos que apresentaram bom desempenho nos ensaios anteriores e uma estirpe padrão da Embrapa Agrobiologia, associados a diferentes níveis de nitrogênio. Utilizaram-se sementes de milho híbrido AG 1051 (AGROCERES), inoculadas com estirpes nativas: J9 e J15 (SANTOS, 2013); estirpe padrão de *H. seropedicae* (BR 11417) e tratamento sem inoculação (TSI). Todos os tratamentos com inoculação foram à base de turfa, e a metodologia para o preparo do inoculante está conforme a descrição nos experimentos I e II.

A semeadura foi realizada em 28/04/2017, com 3 sementes do híbrido AG 1051 por vaso, contendo o solo retirado da camada 0-20 cm do horizonte A de um Latossolo Amarelo típico. A análise química do solo apresentou os seguintes resultados: pH em água = 5,6; P = 3 mg dm⁻³; K = 86,02 cmol_cdm⁻³ e M.O = 15 g dm⁻³. A adubação de base constou de 80 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 20 kg ha⁻¹ de K₂O, na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente. A adubação foi realizada de acordo com a recomendação da Comissão de Fertilidade do Solo do estado de Minas Gerais (Alvarez e Ribeiro 1999).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4 x 4, onde o primeiro fator é a inoculação com as estirpes ZAE94, J9, J15 e tratamento sem inoculação, o segundo fator são os quatro níveis de nitrogênio, 0, 40, 80 e 120 kg ha⁻¹, tendo como fonte a ureia, em um total de 16 tratamentos e três repetições. O ensaio foi conduzido em vasos com capacidade para 20 litros, mantendo-se duas plantas por vaso. A fonte de N foi aplicada de forma parcelada, com 30% na semeadura e 70% aos 17 dias após a semeadura.

3.1.4 Experimento IV: Inoculação com a bactéria diazotrófica *H. seropedicae* (BR11417) ZAE94 e estirpes nativas, em condições de campo para avaliação de características agronômicas.

O estudo foi realizado em campo na área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Os isolados previamente selecionados foram aplicados em campo, a fim de avaliar os efeitos da inoculação nas condições edafoclimáticas locais. Utilizaram-se sementes de milho híbrido AG 1051 (AGROCERES), inoculadas com as estirpes nativas J9, J15 e 43C e a estirpe padrão ZAE94 de *H. seropedicae* (BR 11417) e tratamento sem

inoculação (TSI). A metodologia para o preparo do inoculante foi descrita nos experimentos I e II. Para o preparo do inoculante à base de turfa, após o crescimento da cultura bacteriana, 15 mL da suspensão dos isolados nativos J9, J15 e 43C foram acrescidos a sacos de polipropileno, com 35g de turfa, previamente preparados. O material foi homogeneizado e, em seguida, incubado por 24 horas a 30 °C para maturação. O inoculante turfoso da estirpe padrão ZAE94 (BR11417) foi cedido pela EMBRAPA Agrobiologia.

O preparo do solo constou de uma aração e duas gradagens. Cada parcela apresentava quatro linhas de cinco metros de comprimento, com espaçamento entre linhas de 0,7 m e 2 m entre os blocos. A área útil da parcela constava das duas linhas centrais, com bordaduras de 1 m nas extremidades.

O experimento foi instalado em 26/04/2017, em solo com os seguintes resultados de análises químicas: pH em água = 6,1; P = 9 mg dm⁻³; K = 0,19 Cmol_c dm⁻³ e M.O = 15 g dm⁻³. A adubação consistiu de 80 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 24 kg ha⁻¹ de K₂O, usando-se como fonte o superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente, aplicados no sulco da semeadura de todos os tratamentos. A semeadura foi realizada manualmente nos sulcos das parcelas, com 30 sementes por linha, iniciando-se pelo tratamento sem inoculação, para diminuir os riscos de contaminação. As sementes receberam 250 g de inoculante à base de turfa para 10 kg de sementes de milho (ALVES, 2007). O desbaste ocorreu 25 dias após a semeadura, com permanência de 18 plantas por linha. O estande foi regado por um sistema de rega por aspersão convencional, acionado a cada dois dias por aproximadamente uma hora.

O delineamento foi em blocos casualizados (DBC), em um arranjo fatorial 5 x 4, sendo que o primeiro fator consistia de inoculação com as estirpes nativas J9 e J15 (SANTOS, 2013) e a estirpe 43C (VIANA, 2012), a estirpe padrão ZAE94 (BR 11417) e o tratamento sem inoculação. O segundo fator foi fornecido por níveis de nitrogênio: 0, 40, 80 e 120 kg ha⁻¹, utilizando-se como

fonte a ureia, totalizando 20 tratamentos e cinco repetições. A fonte de N foi aplicada de forma parcelada, com 20% na semeadura, 40% aos 20 dias e 40% aos 69 dias após o plantio (DAS). Os tratamentos culturais e controle de pragas foram realizados de acordo com a necessidade do experimento.

Os parâmetros agrônômicos altura de planta e diâmetro do colmo foram coletados por ocasião da maturidade fisiológica. Para as variáveis, comprimento da espiga, diâmetro da espiga e produtividade (massa dos grãos secos a 13% umidade), as coletas foram realizadas ao final do ciclo da cultura. Na ocasião da colheita, os grãos apresentavam em média 28% de umidade; esses foram transportados para estufa para secagem, onde permaneceram até terem atingido 13% de umidade. Posteriormente, foram selecionadas 10 espigas comerciais da área útil de cada parcela para avaliação dos parâmetros.

3.1.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade. Para os níveis de N, realizou-se a análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se todos os recursos do programa Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2010).

3.1.6 Descrição dos genótipos

Foram utilizados o híbrido AG 1051 e a variedade AL Bandeirante. As sementes foram adquiridas em casa comercial de produtos agrícolas.

O genótipo AG 1051 é um híbrido duplo, ideal para produção de grão, devido à sua produção eficaz; é indicado para silagem da planta que apresenta alta qualidade e para consumo do milho verde. É uma planta de ciclo semiprecoce, porte alto, sistema radicular fasciculado bem desenvolvido, apresenta grãos dentados amarelos e boa qualidade de colmo. Pode ser cultivado no verão e no período de safrinha e possui flexibilidade de plantio em todas as regiões do Brasil (AGROCERES, 2017).

A variedade AL Bandeirante foi desenvolvida pela CATI-SP; é uma planta de ciclo semiprecoce, ideal para grão e silagem e de uma boa adaptabilidade às condições climáticas de todo o Brasil. Possui porte alto e um baixo índice de acamamento. É recomendada para solos de baixa à alta fertilidade, apresenta alta rusticidade e sementes de baixo custo. O grão apresenta cor amarelo-alaranjada, é semiduro, possui boa resistência às principais doenças; pode ser cultivada tanto na safra normal como na safrinha. (CATI, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I: Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas

Houve interação entre os fatores inoculação e genótipos para a variável altura das plântulas e massa fresca da raiz. Observou-se efeito isolado da inoculação e do genótipo nas massas fresca e seca da parte aérea. A massa seca da raiz foi incrementada, apenas, pela inoculação (Tabela 1).

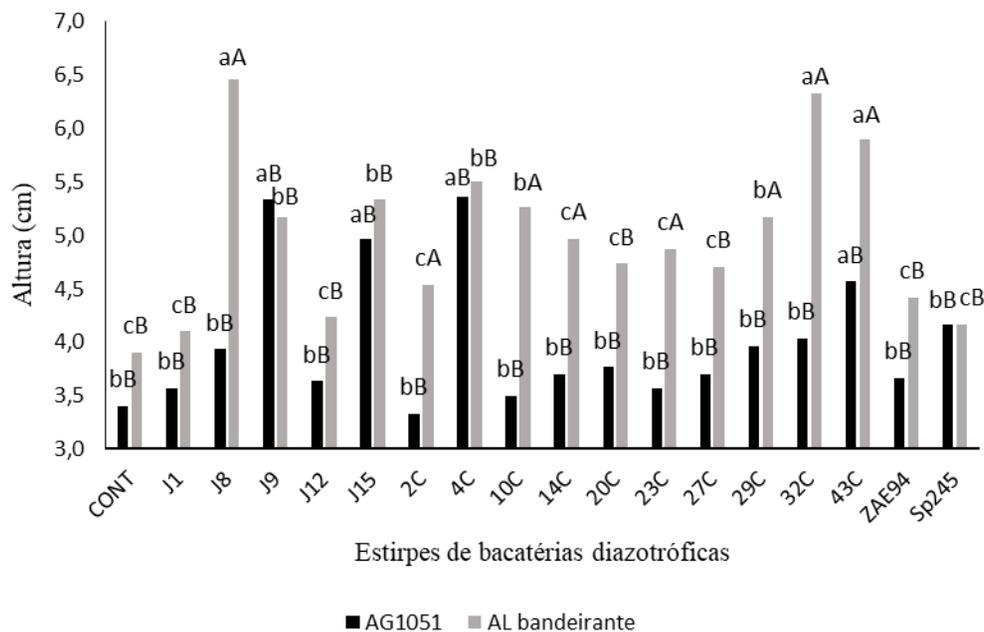
Tabela 1. Resumo da análise de variância e coeficientes de variação referentes à altura da planta (ALT), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de plântulas de milho híbrido AG 1051 e variedade AL Bandeirante com presença e ausência de inoculação com bactérias diazotróficas, aos 20 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.

F.V.	Quadrados médios				
	GL	ALT	MFPA	MSPA	MSR
INC. ²	17	2,02*	0,85*	0,02*	0,94*
GEN. ³	1	25,69*	4,30*	0,08*	0,43
INC.*GEN.	17	0,81*	0,19	0,002	0,12
Resíduo	72	0,45	0,13	0,005	0,17
CV (%)		14,86	5,22	1,39	6,11

*Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

¹FV- Fontes de variação; ²INC- inoculação com bactérias; ³ GEN.- genótipo.

Ao avaliar a altura das plântulas de milho, verificou-se que o grupo de estirpes com maior capacidade de promover incrementos em altura na variedade AL Bandeirante foram os isolados J8, 32C e 43C. Estes isolados promoveram aumentos de 65,9%, 62,3% e 51,3%, respectivamente, em relação ao tratamento sem inoculação (Figura 1).



*Letras minúsculas representam a inoculação, e letras maiúsculas, os genótipos do milho.

Figura 1. Altura de plântulas de milho em função da interação inoculação x genótipos, aos 20 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.

Essa interação indica que, nas condições testadas, a variedade AL Bandeirante respondeu mais positivamente à inoculação do que o híbrido AG 1051, o que revela que, na presença da inoculação, os genótipos apresentaram comportamento diferenciado. Essas diferenças entre genótipos, em relação à fixação biológica, mostram um grande potencial para sua melhor exploração através de melhoramento genético.

Em trabalho desenvolvido com plantas de milho por Ramos e outros (2010), 30 dias após a semeadura, inoculando com *Azospirillum lipoferum* (estirpe BR 11084), verificou-se aumento de 17,6% na altura das plantas.

Diferentes respostas são observadas em trabalhos que utilizaram inoculantes à base de bactérias diazotróficas. Ao avaliarem, aos 26 dias após o transplante, o arroz irrigado inoculado com *Azospirillum lipoferum* (BR 11080) e *Azospirillum brasilense* (BR11001), Kuss e outros (2008) verificaram que não houve alteração da altura das plântulas em relação ao tratamento sem inoculação. Esses mesmos autores observaram diferenças significativas entre as cultivares quando avaliaram a massa fresca das plântulas inteiras, massa fresca e massa seca de parte aérea de arroz.

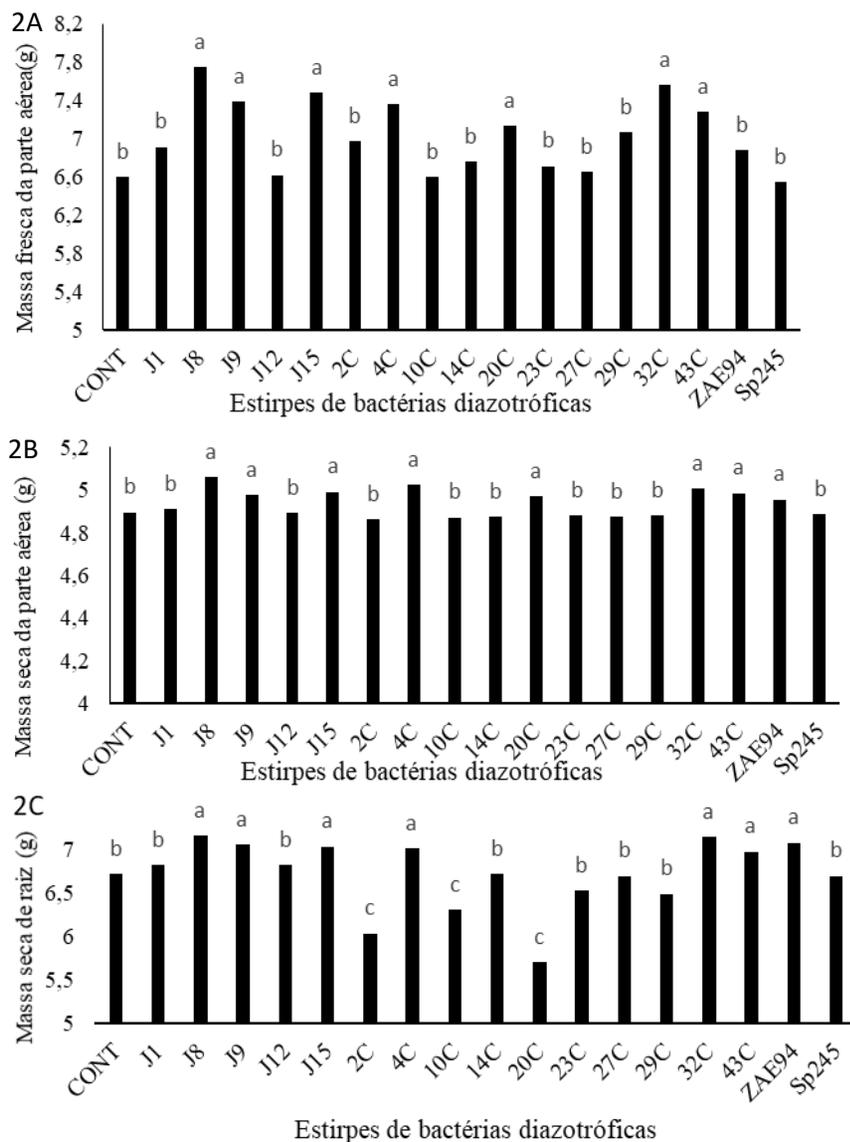
Para a massa fresca da parte aérea, observou-se que a inoculação com o grupo de estirpes J8, J9, J15, 4C, 20C, 32C e 43C promoveu incrementos significativos, com variação de 7,8% a 17,1%, em relação ao tratamento sem inoculação (Figura 2A).

A inoculação com o grupo de estirpes J8, J9, J15, 4C, 20C, 32C, 43C e ZAE94 aumentou em média 2,1% na produção de massa seca da parte aérea, em comparação a essa produção com o tratamento sem inoculação (Figura 2B).

Araújo e outros (2013) verificaram que, para a produção de matéria seca da parte aérea das plantas, houve interação significativa entre genótipos de milho e inoculação com bactéria do gênero *Herbaspirillum*. No entanto, esses mesmos autores verificaram que os híbridos simples DKB 390 e Somma responderam positivamente à inoculação, ao se incrementar a massa seca da parte aérea, 55 dias após a emergência.

Alves e outros (2015) observaram que tanto o milho híbrido SHS5050 como a variedade BRS4157 produziram quantidades similares de massa seca da parte aérea, 40 dias após a emergência, cultivados em substrato estéril.

Avaliando-se a massa seca da raiz, verificou-se que a inoculação com os isolados J8, J9, J15, 4C, 32C, 43C e a estirpe ZAE94 produziram aumentos significativos de 3,9% a 8,0% em relação ao tratamento sem inoculação (Figura 2C).



*Letras iguais nas barras não diferem entre si pelo teste de Skoot - Knott a 5% de probabilidade.

Figura 2. Massa fresca da parte aérea (MFPA) (2A), massa seca da parte aérea (MSPA) (2B) e massa seca da raiz (MSR) (2C) de plântulas de milho, em função da inoculação, em híbrido AG 1051 e variedade AL Bandeirante, com presença e ausência de inoculação, aos 20 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Ramos e outros (2010), que, ao avaliarem o efeito da inoculação com a bactéria (*Azospirillum lipoferum*, estirpe BR 11084), observaram diferenças significativas na massa seca da raiz, quando comparada à do tratamento controle.

Alves e outros (2015), avaliando a massa seca da raiz do milho híbrido SHS 5050, cultivado em substrato estéril, 40 dias após a emergência, observaram efeito positivo da inoculação pelas espécie *H. seropedicae* (ZS12, Z78, Z152, Z176, 83IIIA e B4362), em relação ao tratamento controle.

Os resultados reportados na literatura sobre os efeitos da inoculação com bactérias diazotróficas no desempenho agrônômico do milho são bastante variados. Ávila (2017), ao avaliar o efeito da adubação verde com mucuna preta e da inoculação com *H. seropedicae* ZAE94 (BR 11417) na cultura do milho, observou efeitos positivos da inoculação na produtividade de grãos, tanto no híbrido AG 1051, como na variedade AL Bandeirante.

Ao avaliar o efeito isolado dos genótipos utilizados, foram observados aumentos significativos nas massas fresca e seca da parte aérea (Tabela 2).

Tabela 2. Massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA), em função dos genótipos, milho híbrido AG 1051 e variedade AL Bandeirante, com presença e ausência de inoculação, aos 20 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.

GENÓTIPOS	MFPA	MSPA
AG 1051	6,81 b	4,91 b
AL Bandeirante	7,21 a	4,96 a

*Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Skoot - Knott a 5% de probabilidade.

A variedade AL Bandeirante apresentou valores estatisticamente superiores no acúmulo de massas fresca e seca da parte aérea de plântulas de milho, quando comparada ao híbrido AG 1051. Os genótipos apresentaram

comportamento diferenciado, e, para essas variáveis, os resultados foram independentes da inoculação.

Mendonça e outros (2006), ao compararem nove genótipos de milho, quais sejam, os híbridos BR 201 M, HS 20x22, BR 205 e Dekalb 644 e as variedades Sintético Elite, CMS 08, Sol da Manhã NF, Nitrodente e Catetão, com uma mistura de bactérias diazotróficas, das espécies *A. lipoferum* (estirpe S82), *A. amazonense* (estirpe Am 76) e *B. kururiensis* (estirpe M 130), verificaram que, apesar de todos os genótipos terem suas raízes, colmos e folhas colonizados pelas bactérias, não foi observada contribuição da FBN. Esses mesmos autores também observaram comportamento diferenciado entre híbridos e variedades na presença da inoculação. Todos os genótipos diferiram no rendimento de grãos, produção de biomassa e no acúmulo de N.

Araújo e outros (2013), ao avaliarem em casa de vegetação 35 genótipos de milho híbridos simples, duplo, triplo e variedades inoculadas com bactéria diazotrófica *H. seropedicae* (ZAE94), constataram que há diferenciação de resposta entre as cultivares avaliadas quanto à produção de biomassa e incremento de teor de N na parte aérea das plantas. Dotto e outros (2010), ao avaliarem o comportamento de híbridos de milho AS 1570 e AS 1540, na presença da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, associado a diferentes níveis de nitrogênio, verificaram diferenças significativas no comportamento dos híbridos.

O acúmulo de massa seca é proveniente do maior número de células e alongamento dessas, o que ocasiona a formação de novos tecidos. As bactérias diazotróficas promovem crescimento, por produção de hormônios vegetais, principalmente auxinas e giberelinas, e podem ter influenciado nessas respostas. A auxina produzida tem a capacidade de promover expansão celular, por meio da acidificação do meio, e a giberelina, pela ação das enzimas XET, que favorecem o rompimento da parede celular e expansão do tecido (TAIZ e

ZEIGER, 2013), e, em consequência, o crescimento da planta e o acúmulo de massa seca.

Oliveira e outros (2006) relatam que, embora sejam observados muitos efeitos positivos, a utilização de inoculantes que contenham essas bactérias como uma prática usual na agricultura requer análise crítica, devido à alta variabilidade observada, geralmente, nas respostas de plantas de diferentes genótipos sob condições edafoclimáticas distintas.

4.2 Experimento II: Seleção de estirpes nativas de bactérias diazotróficas em condições de casa de vegetação e diferentes níveis de N.

Houve interação entre os fatores inoculação e níveis de nitrogênio para as variáveis altura de planta, massa fresca da parte aérea e índice SPAD. O diâmetro do colmo e a massa seca da parte aérea foram influenciados pelos efeitos isolados da inoculação e dos níveis de N (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância e coeficientes de variação referentes à altura da planta (ALT), diâmetro do caule (DIAM), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e índice SPAD de plantas de milho híbrido AG 1051, com presença e ausência de inoculação e diferentes níveis de N, aos 67 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.

F.V.	GL	Quadrados médios				
		ALT	DIAM	MFPA	MSPA	SPAD
NV. ²	3	551,12*	98,97*	56055,5*	1575,3*	957,4*
INC. ³	6	109,92*	16,68*	5731,4*	249,9*	63,5*
NV.*INC.	18	128,33*	2,75	3583,2*	84,9	19,7*
Resíduo	54	32,03	2,20	1043,1	54,22	8,8
CV (%)		11,97	7,09	14,66	23,12	9,77

*Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

¹FV- Fontes de variação; ²NV.- níveis de N; ³INC.- inoculação.

A altura das plantas foi influenciada pela interação, o que indica que a inoculação com as estirpes nativas associadas aos níveis de N promoveu diferenças significativas nos valores médios das alturas das plantas.

Verificou-se que a inoculação com as estirpes nativas J8 e 43C, associada a 30 kg ha⁻¹N, aumentou a altura das plantas de milho em 26,1% e 39,2% em relação ao tratamento sem inoculação, e o isolado nativo J9, associado a 60 kg ha⁻¹N, promoveu incremento de 22,4%. Embora estatisticamente igual ao tratamento sem inoculação, o isolado J15, juntamente com 120 kg ha⁻¹N, aumentou em 14,9% a altura das plantas de milho. Nos tratamentos sem adição de N, foi observado que as estirpes J9 e 43C apresentaram resposta significativa e promoveram aumentos de até 50,2% na altura das plantas, quando comparados ao tratamento sem inoculação, demonstrando a eficiência dessas bactérias na disponibilização de nutrientes do solo para a planta e, possivelmente, de outras ações de crescimento vegetal que ocasionam benefícios ao desenvolvimento da planta (Tabela 4).

Tabela 4. Altura de plantas de milho, em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N, no híbrido AG 1051, aos 67 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.

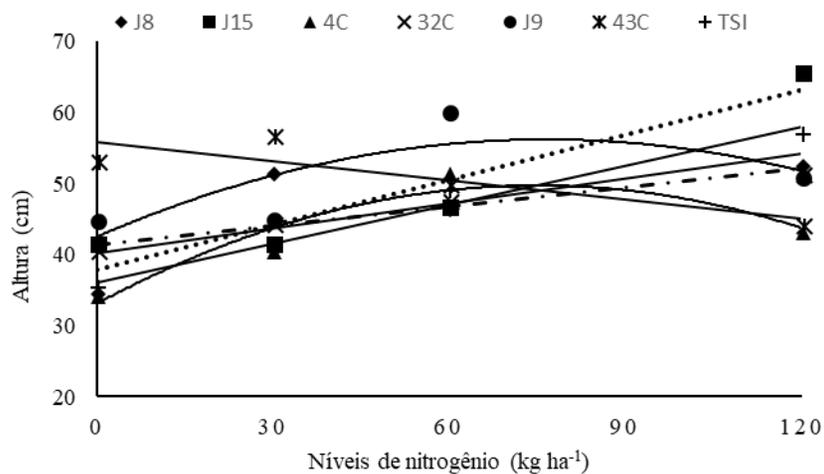
INC	Níveis de N (kg ha ⁻¹)			
	0	30	60	120
TSI	35,50 b	40,83 b	49,17 b	57,17 a
J8	34,67 b	51,50 a	46,50 b	52,67 b
J15	41,67 b	41,67 b	46,83 b	65,67 a
4C	34,33 b	40,50 b	51,50 b	43,33 b
32C	40,67 b	44,50 b	47,73 b	51,50 b
J9	44,83 a	45,00 b	60,17 a	51,00 b
43C	53,33 a	56,83 a	50,00 b	44,33 b
Médias	40,71	45,83	50,27	52,24

*Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Ramos e outros (2010), os quais observaram que a inoculação com *Azospirillum lipoferum* (estirpe BR 11084), associada a 30 kg ha⁻¹, promoveu, após 30 dias da semeadura, aumento de 21,4% na altura das plantas de milho.

Resultados contrários foram obtidos por Dartora e outros (2013) ao avaliarem a inoculação com *A. brasilense* e *H. seropedicae* nas fases vegetativa e reprodutiva do milho; não foram observados efeitos significativos na altura das plantas. Lana e outros (2012), ao avaliarem o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense*, associada à adubação nitrogenada, também não verificaram efeito da inoculação para a altura de planta de milho.

O desdobramento da interação das doses dentro da inoculação mostrou que os tratamentos inoculados com as estirpes J8, J15, 32C, 43C e o tratamento sem inoculação apresentaram ajuste linear, com tendência de aumento da altura das plantas com o aumento dos níveis de N. Os tratamentos com as estirpes 4C e J9 obtiveram tendência de comportamento quadrático, com ponto máximo de 73 e 77 kg ha⁻¹, respectivamente, fato que promoveu maiores aumentos de altura e economia na quantidade de nitrogênio utilizado e, dessa forma, mostrou sua eficiência em doses intermediárias de N (Figura 3).



J9 $Y = -0,0023x^2 + 0,3575x + 42,525$ $R^2 = 0,5836$
 4C $Y = -0,003x^2 + 0,4432x + 33,112$ $R^2 = 0,881$
 J8 $Y = 0,1175x + 40,168$ $r^2 = 0,5355$
 TSI $Y = 0,1835x + 36,032$ $r^2 = 0,9776$
 43C $Y = -0,0903x + 55,864$ $r^2 = 0,7571$
 J15 $Y = 0,2106x + 37,902$ $r^2 = 0,8957$
 32C $Y = 0,0886x + 41,448$ $r^2 = 0,9682$

Figura 3. Altura de plantas de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação e diferentes níveis de N, aos 67 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2016.

Quando avaliada a massa fresca da parte aérea, observou-se que a inoculação com as estirpes J8 e 43C associada a 30 kg ha⁻¹ aumentou essa variável em 56,6% e 70,7%, respectivamente, em relação ao tratamento sem inoculação, e a estirpe nativa J9, sem adição de N, em 66,8%. A inoculação com os isolados J8, J15 e 32C, associada a 120 Kg ha⁻¹, embora estatisticamente igual ao tratamento sem inoculação, promoveu aumentos de 7,8% a 20,4% da massa fresca da parte aérea das plantas de milho (Tabela 5).

Tabela 5. Massa fresca da parte aérea de plantas de milho, em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N no híbrido AG 1051, aos 67 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.

INC	Níveis de N (kg ha ⁻¹)			
	0	30	60	120
TSI	143,67 b	147,00 b	231,33 b	274,33 a
J8	158,00 b	230,33 a	206,00 b	295,67 a
J15	152,67 b	169,67 b	276,00 b	327,33 a
4C	126,33 b	176,33 b	253,33 b	206,00 b
32C	146,00 b	186,00 b	249,17 b	329,33 a
J9	167,00 b	200,00 b	270,33 b	222,33 b
43C	239,66 a	251,00 a	261,00 b	274,67 a
Médias	161,9	194,3	249,6	275,6

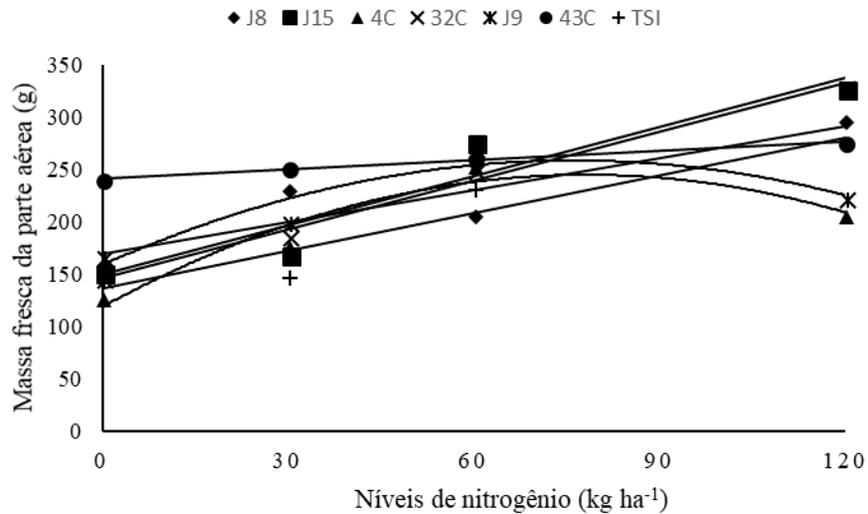
*Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

Esses resultados corroboram os obtidos por Viana e outros (2015), os quais verificaram que a inoculação com *H. seropedicae* ZAE94, associada a doses de nitrogênio, promoveu acúmulo de massa fresca de 32% a 70,5% e seca de 27,4% a 50,8% em arroz variedade BRS tropical cultivado em casa de vegetação, aos 60 dias após a emergência.

Kuss e outros (2008), ao avaliarem o efeito da inoculação com as bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum* e três isolados (UFSM-BD-14-06, UFSM-BD-31-06 e UFSM-BD-54-06), não observaram efeitos significativos na massa fresca de parte aérea, altura e comprimento de raiz em arroz irrigado.

Os acúmulos observados na massa fresca da parte aérea podem ser atribuídos à interação planta-bactéria na região da rizosfera. A resposta positiva à inoculação com bactérias diazotróficas pode ser atribuída à produção de substâncias promotoras do crescimento, que estimulam o desenvolvimento do sistema radicular e, com isso, aumentam os pelos radiculares e, conseqüentemente, a absorção de água e nutrientes (PAZOS e HERNÁNDEZ, 2001).

O desdobramento da interação das doses dentro da inoculação revelou que os tratamentos inoculados com as estirpes J8, J15, 32C, 43C e o tratamento sem inoculação apresentaram ajuste linear. Para a inoculação com as estirpes 4C e J9, o melhor ajuste foi o quadrático, com os maiores aumentos da massa fresca da parte aérea nos pontos máximo de 78 e 76 kg ha⁻¹, respectivamente (Figura 4).



$$\begin{aligned} \text{TSI} Y &= 1,1939x + 136,4 \quad r^2 = 0,8991 \\ 43\text{C} Y &= 0,288x + 241,46 \quad r^2 = 0,9835 \\ \text{J9} Y &= -0,0172x^2 + 2,6188x + 158,8 \quad R^2 = 0,8544 \\ 4\text{C} Y &= -0,0206x^2 + 3,2272x + 118,63 \quad R^2 = 0,9148 \\ \text{J8} Y &= 1,0191x + 169 \quad r^2 = 0,8305 \\ 32\text{C} Y &= 1,5551x + 145,97 \quad r^2 = 0,9921 \\ \text{J15} Y &= 1,566x + 149,2 \quad r^2 = 0,9109 \end{aligned}$$

Figura 4. Massa fresca da parte aérea de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 67 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2016.

No índice SPAD, a inoculação com as estirpes J15, J9 e 43C, com adição de 60 Kg ha⁻¹, aumentou essa variável em 15,5% a 18,5%, em relação ao tratamento sem inoculação. A inoculação com os isolados 4C e J8, com adição de 120 Kg ha⁻¹, proporcionou aumentos de 20,1% a 28,2% nos valores médios da leitura do índice SPAD das plantas de milho, quando comparada ao tratamento sem inoculação (Tabela 6).

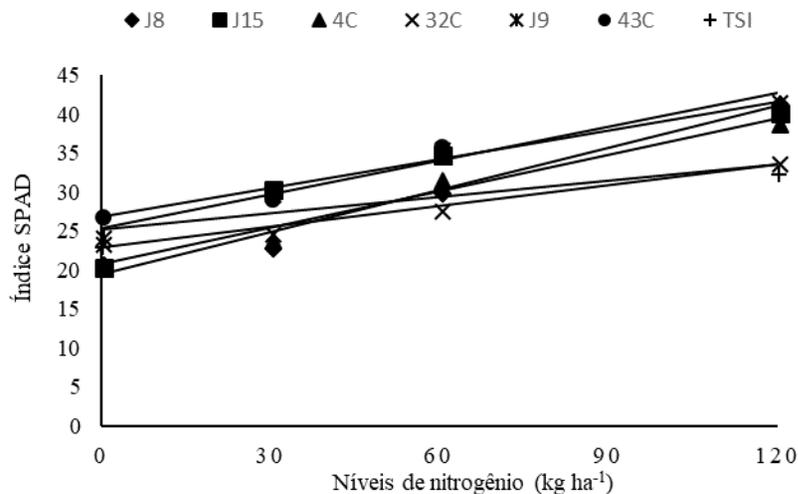
Tabela 6. Índice SPAD em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N, no híbrido AG 1051, aos 67 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.

INC	Níveis de N (kg ha ⁻¹)			
	0	30	60	120
TSI	23,10 b	29,57 a	30,37 b	32,47 b
J8	20,90 b	23,03 b	30,10 b	41,63 a
J15	20,60 b	30,66 a	35,07 a	40,47 a
4C	21,00 b	23,97 b	31,77 b	39,00 a
32C	23,50 b	24,87 b	27,90 b	33,83 b
J9	24,33 b	30,00 a	35,70 a	41,77 a
43C	27,00 b	29,27 a	36,00 a	41,10 a
Médias	22,91	27,34	32,42	38,61

*Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

Esses resultados corroboram Moraes (2016), o qual, ao estudar o efeito da inoculação com estirpes nativas em híbrido de milho AG1051, submetidas a diferentes níveis de N, também observou interação entre os fatores ao avaliar o índice SPAD.

O desdobramento da interação das doses dentro da inoculação mostrou que todos os tratamentos apresentaram comportamento linear. A leitura do índice SPAD nas folhas do milho aumentou linearmente (Figura 5), resultado já esperado, visto que o índice SPAD assemelha-se ao teor de clorofila nas folhas e a clorofila é produzida na presença de N; pressupõe-se, então, que, quanto maior for o teor de N, maior teor de clorofila e maior intensidade verde nas folhas; desse modo, isso refletirá em maior índice SPAD.



$$\begin{aligned} \text{TSI} & Y = 0,0688x + 25,268 \quad r^2 = 0,7598 \\ \text{J9} & Y = 0,1441x + 25,384 \quad r^2 = 0,9715 \\ \text{4C} & Y = 0,1561x + 20,742 \quad r^2 = 0,9737 \\ \text{J8} & Y = 0,1802x + 19,47 \quad r^2 = 0,9787 \\ \text{32C} & Y = 0,0888x + 22,858 \quad r^2 = 0,9837 \\ \text{J15} & Y = 1,566x + 149,2 \quad r^2 = 0,9109 \\ \text{43C} & Y = 0,1229x + 26,888 \quad r^2 = 0,9595 \end{aligned}$$

Figura 5. Índice SPAD de plantas de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 67 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2016.

A inoculação com as estirpes nativas J8, J15, 32C, J9 e 43C promoveu aumentos da massa seca da parte aérea de, 22,5% a 41,2%, quando comparada ao tratamento sem inoculação. Para o diâmetro do colmo, observou-se que a inoculação com o grupo de estirpes J15, J9 e 43C promoveu aumentos no diâmetro do colmo, de 10,5% a 15,6%, quando comparada ao TSI. Esse resultado pode ser associado ao efeito de promoção do crescimento vegetal proporcionado pelas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (Tabela 7). Um dos efeitos benéficos da inoculação com bactérias diazotróficas em gramíneas é a sua capacidade de produzir fito-hormônios (DOBBELAERE e

outros, 2001), principalmente auxinas e giberelinas, que favorecem a expansão do tecido e ocasionam o crescimento em altura e diâmetro.

Tabela 7. Massa seca da parte aérea e diâmetro de colmo de plantas de milho híbrido AG 1051, em função da inoculação com bactérias diazotróficas nativas, 67 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.

INC	MSPA	DIAC
	(g)	(cm)
TSI	25,99 b	19,64 b
J8	33,39 a	20,24 b
J15	31,85 a	21,70 a
4C	25,24 b	20,15 b
32C	36,70 a	20,08 b
J9	33,82 a	22,00 a
43C	35,99 a	22,70 a
CV	23,12	7,09

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott Knott a 5%. TSI-Tratamento sem inoculação. MSPA-massa seca da parte aérea. DIAC-diâmetro do colmo.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Santos e outros (2015), os quais, ao avaliarem o efeito da inoculação com *H. seropedicae* (BR 11417) sob diferentes níveis de nitrogênio em milho híbrido cultivado em casa de vegetação, verificaram que a inoculação promoveu um efeito significativo de 14,3% na massa seca da parte aérea.

De forma similar, Dartora e outros (2013), ao avaliarem a resposta da inoculação com as bactérias diazotróficas *A. brasilense* (estirpes Ab-V5) e *H. seropedicae* (SmR1), associada à adubação nitrogenada em milho híbrido 30R50, observaram efeito da inoculação combinada das estirpes com incremento de 15% no diâmetro basal do colmo, na fase vegetativa. Dotto e outros (2010), avaliando a inoculação com *H. seropedicae* em híbridos de milho AS 1570 e AS 1540, não verificaram efeito da inoculação e dos níveis de N sobre o diâmetro de colmo das plantas de milho.

A análise de regressão mostrou que, tanto na MSPA quanto no diâmetro do colmo, os níveis de N tenderam a um comportamento linear, o que sugere que, à medida que se aumentam os níveis de N, aumentam os valores dessas variáveis (Figura 6A, 6B).

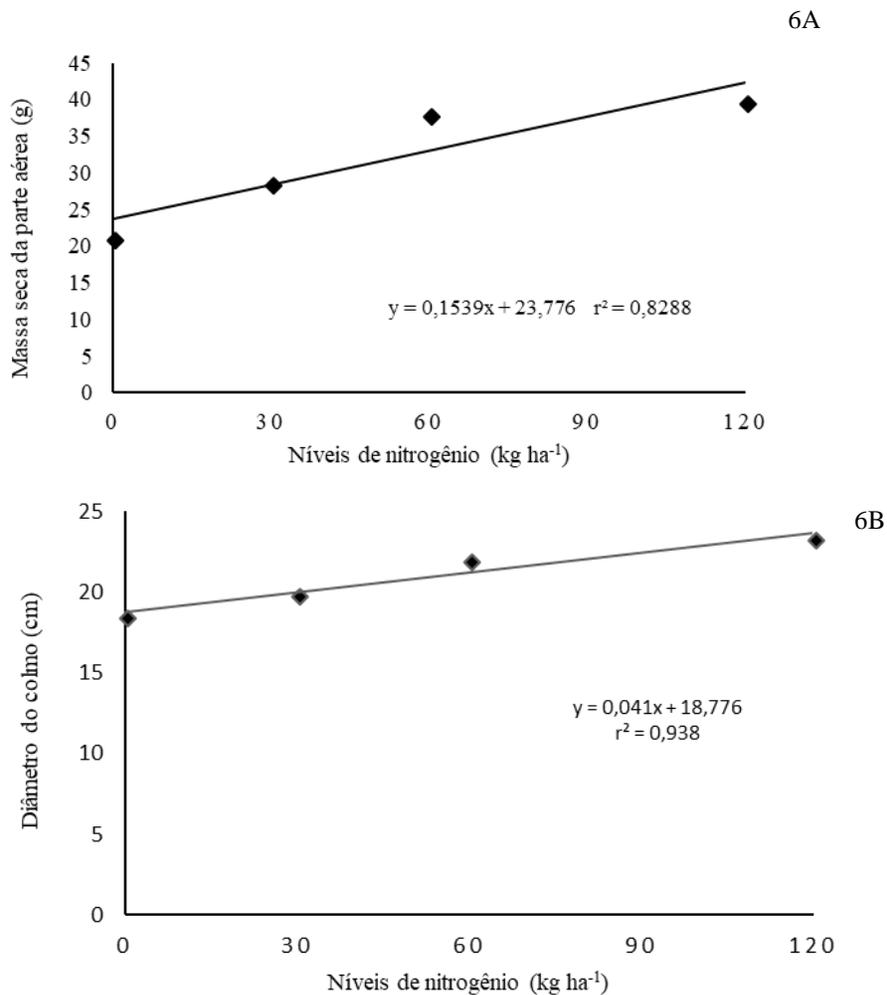


Figura 6. Massa seca da parte aérea e diâmetro do colmo de plantas de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 67 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2016.

O nitrogênio desempenha importantes funções na planta, é componente estrutural de macromoléculas e enzimas e participa da síntese de clorofilas, aminoácidos, proteínas, vitaminas, citocromos, ácidos nucleicos e hormônios (TAIZ e ZEIGER, 2013). Todos esses componentes estão interligados e associados a diferentes rotas de desenvolvimento da planta; quando o aporte de N fornecido para a planta é alto e adequado, a planta vai responder e ocasionar seu crescimento, como foi observado neste trabalho, nas variáveis massa seca e diâmetro.

Cunha e outros (2014), ao avaliarem o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* (Estirpes AbV5 e AbV6) em um híbrido de milho, associado a diferentes doses de nitrogênio, verificaram que a interação não foi significativa e que os fatores tiveram efeito isolado. Esses autores verificaram que a inoculação não incrementou o diâmetro de colmo das plantas de milho.

4.3. Experimento III: Inoculação com a bactéria diazotrófica *H. seropedicae* (BR11417) ZAE94 e estirpes nativas, em condições de casa de vegetação e diferentes níveis de N.

Não houve interação entre a inoculação e os níveis de nitrogênio; isso demonstra que esses fatores comportaram-se de forma independente. A altura das plantas, o diâmetro do colmo, a massa seca da parte aérea e o índice SPAD foram influenciados pelos efeitos isolados dos níveis de N. Para a massa fresca da parte aérea, foram observados efeitos isolados da inoculação e dos níveis de N (Tabelas 8).

Tabela 8. Resumo da análise de variância e coeficientes de variação referentes à altura da planta (ALT), diâmetro do colmo (DIAC), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e índice SPAD em plantas de milho híbrido AG 1051, com presença e ausência de inoculação e diferentes níveis de N, aos 46 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2016.

Quadrados médios						
F.V.	GL	ALT	DIAC	MFPA	MSPA	SPAD
NV. ²	3	897,89*	197,06*	85087,4*	925,44*	887,29*
INC. ³	3	42,84	2,34	5876,35*	47,22	24,08
NV.*INC.	9	48,11	2,06	1996,84	16,78	19,43
Resíduo	32	33,44	3,94	1346,73	33,52	9,46
CV (%)		12,60	8,54	16,54	14,50	7,79

*Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

¹FV- Fontes de variação; ²NV.- níveis de N; ³ INC.- inoculação.

Quando se avaliaram altura das plantas, diâmetro do colmo, índice SPAD e massa seca da parte aérea, verificaram-se aumentos significativos, em função da adubação nitrogenada, sem efeito da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* - ZAE94 e dos isolados nativos J9 e J15. As análises das regressões, para todas as variáveis, apresentaram ajuste quadrático com ponto máximo de 98 (Figura 7), 97 (Figura 8A); 115 (Figura 8B) e 100 kg ha⁻¹ de N (Figura 8C), respectivamente.

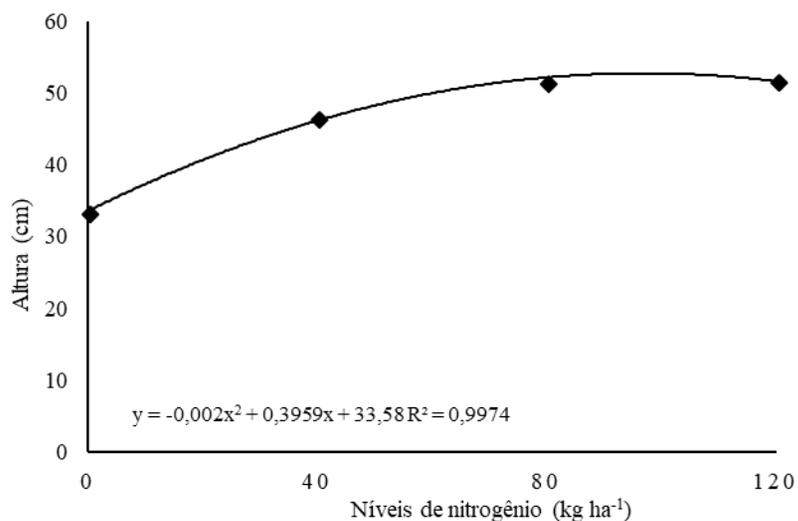


Figura 7. Altura de plantas de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 46 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2017.

Resultados contrários aos obtidos no presente trabalho foram encontrados por Braccini e outros (2012), ao avaliarem a eficiência agrônômica da inoculação com *A. brasilense* em híbrido triplo de milho, associado com o uso do biorregulador, observaram que a inoculação promoveu aumento na altura de plantas e no rendimento de grãos do milho em relação à testemunha.

Morais e outros (2015), ao avaliarem a resposta morfofisiológica e a atividade de enzimas no solo, decorrentes da aplicação de N mineral e da inoculação com *Azospirillum brasilense* em plantas de milho, sob condições de casa de vegetação, verificaram, 40 dias após a semeadura, incrementos na altura de planta, diâmetro do colmo e massa fresca e seca da parte aérea, em função do fertilizante nitrogenado.

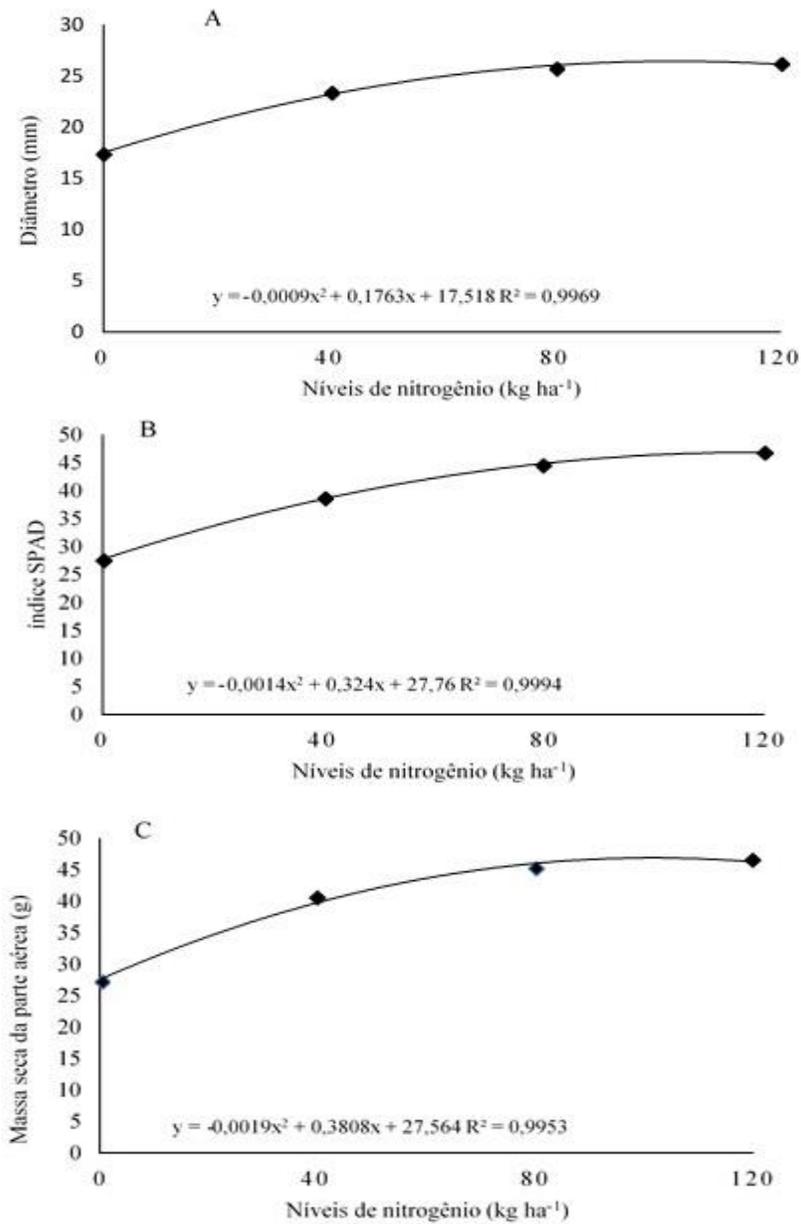


Figura 8. Diâmetro do colmo (A), índice SPAD (B) e massa seca da parte aérea (C) de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 46 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2017.

Ramos e outros (2010) verificaram que a inoculação com *Azospirillum lipoferum* (BR 11084) promoveu efeitos significativos no diâmetro basal do colmo de plantas de milho. Esses autores observaram efeito isolado e conjunto da inoculação com adição de 30 kg ha⁻¹ de N.

Reis Junior e outros (2008), ao estudarem o comportamento de dois híbridos de milho inoculados com *Azospirillum amazonense*, suplementado com diferentes doses e formas de N, cultivado em casa de vegetação, verificaram que, 25 dias após o plantio, a matéria seca da parte aérea não foi influenciada pelos fatores, apenas pelas formas/doses do N aplicado.

Embora existam muitos relatos com variabilidade dos resultados, a inoculação com bactérias diazotróficas pode ser uma boa estratégia para suprir parcialmente a adubação nitrogenada requerida pela cultura do milho. Contudo, fatores como o clima, a microbiota do solo, tipo de solo, as cultivares utilizadas e a própria adubação podem influenciar na resposta da inoculação (JAMES, 2000). Além disso, fatores como a origem da estirpe, a escolha da estirpe, o número de células viáveis e a formulação do inoculante podem influenciar na resposta da inoculação.

O genótipo da planta influencia na exsudação radicular e sustenta diferentes populações microbianas, não só para cada espécie vegetal (GU e MAZZOLA, 2001), como para cada variedade dentro de uma mesma espécie (RENGEL e outros, 1998). Ademais, a mesma espécie vegetal pode estimular diferentes populações microbianas entre um local e outro, o que leva a respostas diferentes à inoculação de um mesmo isolado promotor de crescimento (CHANWAY e outros, 2000).

A inoculação com *H. seropedicae* – ZAE94 promoveu acúmulo de 26,5% na massa fresca da parte aérea, quando comparada ao tratamento sem inoculação (Tabela 9). Esse resultado pode ser creditado à inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal.

Tabela 9. Massa fresca da parte aérea plantas de milho híbrido AG 1051, em função da inoculação com bactérias diazotróficas, aos 46 dias após a semeadura. Vitória da Conquista-BA, 2017.

INC	MFPA
TSI	197,83 b
J15	213,33 b
J9	226,08 b
ZAE94	250,17 a

*Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade. INC.- inoculação TSI.- Tratamento sem inoculação.

A espécie *H. seropedicae* é uma das diversas espécies capazes de produzir fito-hormônios (BASTIAN e outros 1998), toleram mudanças de pH, variando de 5,3 a 8,0 (BALDANI e outros 1986), apresentam grande potencial na FBN, devido à sua habilidade para colonizar diferentes partes da planta, estabelecer-se dentro de nichos protegidos do oxigênio e, dessa forma, poder expressar seu potencial para fixar nitrogênio (KENNEDY e outros 1997). O gênero *Azospirillum* apresenta um metabolismo bastante versátil, o que confere características adaptativas, o que, assim, permite o estabelecimento competitivo na rizosfera (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Infere-se que a estirpe J9, *Azospirillum brasilense*, endófito facultativo, contribuiu de forma menos expressiva no acúmulo de massa fresca da parte aérea, possivelmente devido a algum fator externo, como o clima e a microbiota do solo.

A análise de regressão mostrou comportamento de ajuste quadrático, com ponto máximo de 109 kg ha⁻¹ de N, na qual foi verificada a maior massa fresca da parte aérea, 290 g (Figura 9).

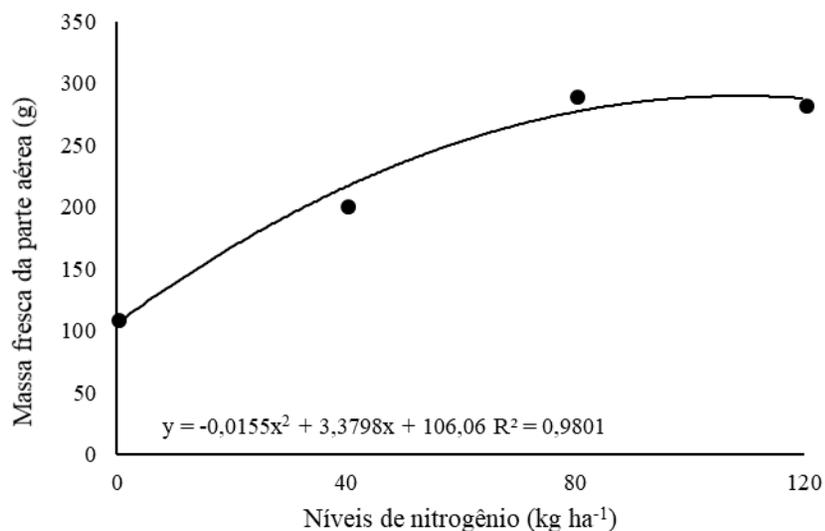


Figura 9. Massa fresca da parte aérea de milho híbrido AG 1051, em função dos níveis de nitrogênio, com presença e ausência de inoculação, aos 46 dias após a semeadura, sob condições de casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2017.

Esses resultados divergem dos obtidos por Moraes (2016), o qual, ao avaliar diferentes estirpes nativas de bactérias diazotróficas (isolados 16B, 17B, N6 e J9) em milho híbrido AG1051, quando aplicadas juntamente a diferentes proporções de N, não verificou efeitos dos fatores sobre a massa fresca da parte aérea.

4.4. Experimento IV: Inoculação com a bactéria diazotrófica *H. seropedicae* (BR11417) ZAE94 e estirpes nativas, em condições de campo, para avaliação de características agrônômicas.

Houve interação entre a inoculação e os níveis de nitrogênio para o comprimento da espiga e produtividade de grãos. O diâmetro da espiga foi

influenciado pelo efeito isolado da inoculação. Os resultados são apresentados independentes para cada fator. Não foram observados efeitos sobre a altura das plantas e o diâmetro do colmo (Tabela 10).

Tabela 10. Resumo da análise de variância e coeficientes de variação referentes à altura da planta (ALT), diâmetro do colmo (DIAC), comprimento da espiga (CESP), diâmetro da espiga (DESP) e produtividade (PROD) de milho híbrido AG 1051, com presença e ausência de inoculação com *H. seropedicae* ZAE94 e isolados nativos e diferentes níveis de N. Vitória da Conquista-BA, 2017.

F.V.	GL	Quadrados médios				
		ALT	DIAC	CESP	DESP	PROD
NV. ²	3	0,006	6,11	0,27	0,02	51785,16
INC. ³	4	0,021	6,59	0,66	0,05*	343189,59
NV.*INC.	12	0,021	10,68	1,25*	0,02	832406,41*
BLO ⁴	4	0,028	8,72	0,44	0,01	69138,93
Resíduo	76	0,020	9,42	0,38	0,02	423471,38
CV (%)		6,02	9,52	4,01	2,52	9,23

*Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

¹FV- Fontes de variação; ²NV.- níveis de N; ³INC.- inoculação. BLO⁴ -Bloco

A altura de plantas e o diâmetro do colmo não foram influenciados pela inoculação com as bactérias diazotróficas e pela fertilização nitrogenada. Quando avaliado o comprimento da espiga, verificou-se efeito da interação entre a inoculação e os níveis de N (Tabela 10).

A inoculação com a bactéria ZAE94 e o isolado nativo 43C, com adição de 40 kg de N, promoveu aumentos significativos em relação aos demais tratamentos. Os isolados J15 e 43C, quando suplementados com 80 kg de N ha⁻¹, apresentaram comprimento da espiga estatisticamente semelhante ao TSI. O tratamento com ZAE94, embora estatisticamente igual ao TSI, promoveu aumento de 3,5% no comprimento da espiga, quando suplementado com o nível máximo de N (Tabela 11).

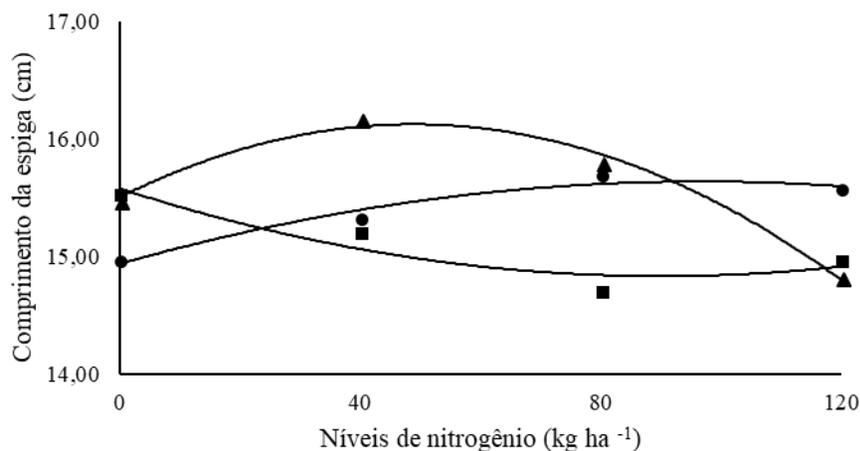
Tabela 11. Comprimento da espiga do milho híbrido AG 1051, em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N. Vitória da Conquista-BA. 2017.

INC	Níveis de N (kg ha ⁻¹)			
	0	40	80	120
TSI	14,96 a	15,32 b	15,69 a	15,57 a
ZAE94	15,21 a	15,73 a	14,80 b	16,11 a
J9	15,53 a	15,20 b	14,70 b	14,96 b
J15	15,19 a	15,22 b	16,07 a	15,49 a
43C	15,53 a	16,17 a	15,81 a	14,82 b
Médias	15,28	15,53	15,41	15,39

*Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. TSI. Tratamento sem inoculação.

Kappes e outros (2013), avaliando o desempenho agrônômico do milho, em função da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* (Ab v5 e Ab v6) e N em cobertura e foliar, verificaram que a inoculação com *A. brasilense* incrementou em 3,7% o comprimento de espiga em relação ao tratamento sem inoculação.

O desdobramento da interação revelou que a inoculação com estirpes bacterianas J9, 43C e o TSI, apresentou melhor ajuste quadrático (Figura 10).



● TSI $\hat{y} = -8E-05x^2 + 0,0145x + 14,935$
 $R^2 = 95,99\%$

■ J9 $\hat{y} = 9E-05x^2 - 0,0166x + 15,577$
 $R^2 = 88,45\%$

▲ 43C $\hat{y} = -0,0003x^2 + 0,0254x + 15,503$
 $R^2 = 98,97\%$

Figura 10. Comprimento da espiga de milho híbrido AG 1051, em função da interação, com presença e ausência de inoculação e diferentes níveis de N. Vitória da Conquista – BA, 2017.

Verificou-se que a inoculação com as estirpes nativas J9, J15 e 43C diferiram estatisticamente dos demais tratamentos. O diâmetro da espiga obteve aumento significativo, variando de 1,2 a 1,8% em relação ao TSI (Tabela 12).

Tabela 12. Diâmetro da espiga de milho híbrido AG 1051, em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N. Vitória da Conquista-BA, 2017.

INC	DESP
TSI	5,05 b
ZAE94	5,03 b

Continuação...	
J9	5,11 a
J15	5,12 a
43C	5,14 a

*Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade. INC.- inoculação TSI.- Tratamento sem inoculação.

Para a produtividade de grãos, houve interação entre a inoculação e níveis de N. Diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos suplementados com 40 kg ha⁻¹ de N. Verificou-se que a inoculação com as bactérias diazotróficas ZAE94 e 43C, associada a 40 kg ha⁻¹, promoveu aumentos significativos de 12,2% na produtividade de grãos, em relação ao tratamento sem inoculação (Tabela 13).

Tabela 13. Produtividade de grãos do milho híbrido AG 1051, em função da inoculação, presença e ausência de inoculação e níveis de N. Vitória da Conquista-BA, 2017.

INC	Níveis de N (kg ha ⁻¹)			
	0	40	80	120
TSI	6614,10 b	6698,19 b	7361,93 b	7044,03 b
ZAE94	7144,27 b	7516,33 a	6634,87 b	7632,42 b
J9	7497,75 b	6656,71 b	6622,73 b	6982,30 b
J15	6850,62 b	6683,08 b	7418,16 b	7111,22 b
43C	7025,14 b	7518,43 a	7196,55 b	6811,43 b
Médias	7026,38	7014,55	7046,85	7116,28

*Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. TSI. Tratamento sem inoculação.

Resultados semelhantes foram evidenciados por Alves (2007), avaliando o efeito da inoculação com *H. seropedicae*, estirpe BR 11417, com diferentes genótipos de milho e níveis de adubação; o autor verificou que a inoculação proporcionou aumentos de até 34% na produtividade dos grãos de milho.

Repke e outros (2013), Vogt e outros (2014), Sangoi e outros, (2015), verificaram, em condições de campo, que a inoculação com *A. brasilense* não proporcionou incrementos significativos na produtividade de grãos. Contudo, Hungria e outros (2010) obtiveram efeitos da inoculação com inoculante líquido à base de *A. brasilense*, cepas Ab-V5 e Ab-V6, associados a 80 e 50 Kg ha⁻¹ de N, e observaram aumentos na produção de 27% e 31% nas culturas de milho e trigo, respectivamente.

Relatos positivos da inoculação com bactérias diazotróficas associadas à cultura do milho também foram constatados por: Reis Junior e outros, 2008; Zilli e outros, 2008; Montanez e outros, 2009; Lana e outros 2012; Dartora e outros, 2013; Alves e outros, 2015; Santos e outros, 2015; e Ávila, 2017.

Os estudos de regressão mostraram melhor ajuste quadrático, com ponto máximo de 7150, 7422, 8413 Mg ha⁻¹ do TSI, 43C e J9, respectivamente. Apesar de apresentar incremento, os modelos lineares e quadráticos não foram significativos para explicarem os resultados obtidos na produtividade de grãos nos tratamentos com ZAE94 e J15 (Figura 11).

Um fator importante para o sucesso da inoculação em experimentos de campo é o estabelecimento e a multiplicação do microrganismo, que terá de competir com isolados nativos do solo e com outros microrganismos (BALDANI e outros, 1986). De acordo com Reis e outros (2000), para se obterem respostas positivas provenientes da FBN, é necessária a utilização de estirpes eficientes associadas a genótipos, uma vez que a planta é o fator-chave para promover essa interação.

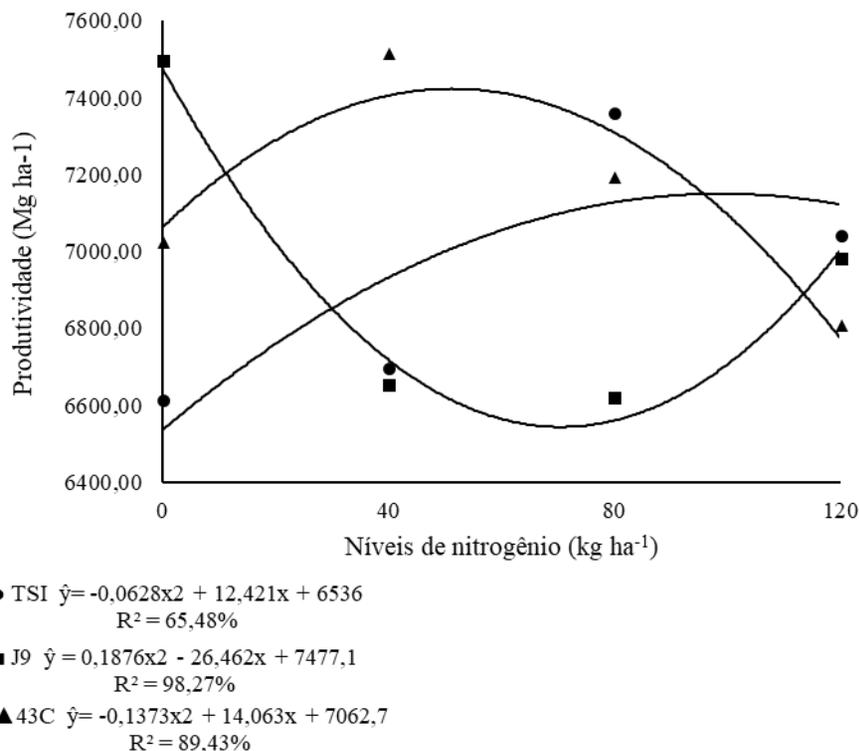


Figura 11. Produtividade de grãos de milho híbrido AG 1051, em função da interação, com presença e ausência de inoculação e diferentes níveis de N. Vitória da Conquista-BA, 2017.

Baldani e Baldani (2005) ressaltaram que diversos avanços relacionados à interação entre gramíneas e as bactérias diazotróficas foram obtidos. No entanto, a eficiência dessa associação, possivelmente, não resultará em efeitos similares aos que ocorrem entre leguminosas e os rizóbios. Contudo, Moreira e outros (2010) ressaltam que os cálculos da contribuição de Nitrogênio fixado para gramíneas variam de 25 a 50 kg N/ha/ano, o que corresponde a, aproximadamente, 17% da demanda requerida pelas culturas. Considerando a importância que as espécies produtoras de grãos, como arroz, milho e trigo, entre outras, e se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas

e cereais, a fixação biológica de nitrogênio associativa torna-se importante, em termos globais.

Os resultados encontrados na literatura sobre os efeitos da inoculação com bactérias diazotróficas no desempenho agrônomo na cultura do milho e de outras espécies de importância econômica são variados. Como observado no presente trabalho, as estirpes das bactérias diazotróficas apresentaram eficiência distinta, quando submetidas a diferentes condições experimentais. Verificou-se em condições de campo que houve interação entre inoculação e níveis de N, com a possibilidade de observar efeito significativo da inoculação associada a uma dose intermediária de N. Esses resultados sugerem que a resposta da planta não é resultante apenas do N fixado biologicamente na região da rizosfera, mas também da ação de outros mecanismos atribuídos às bactérias promotoras de crescimento vegetal.

Novas pesquisas devem ser realizadas a fim de avaliar o potencial da inoculação com bactérias diazotróficas na mesma cultura, assim como em outras culturas e localidades, visto que esses microrganismos têm potencial para contribuir parcialmente com o N requerido por diversas culturas e, dessa maneira, possibilitar vantagens econômicas, tanto para o pequeno quanto para o grande produtor, e vantagens ambientais em escala mundial.

5. CONCLUSÕES

Na presença das estirpes nativas das bactérias diazotróficas, verificou-se comportamento diferenciado entre os genótipos de milho.

A inoculação do milho com as estirpes nativas J9 e 43C promoveram aumentos na altura das plantas de até 50,2%.

As estirpes J8 e 43C proporcionaram aumentos de massa fresca da parte aérea das plantas de milho de até 70,7%.

As estirpes J8, J15, 32C, J9 e 43C proporcionaram incrementos de massa seca da parte aérea das plantas de milho variando de 22,5 a 41,2%.

As estirpes J9, J15 e 43C promoveram aumentos no diâmetro das espigas de milho.

A inoculação das bactérias diazotróficas ZAE94 e 43C promoveram incremento de 12,2% na produtividade de grãos de milho quando associada ao nível de 40 kg ha⁻¹ de N.

6. REFERÊNCIAS

ALCANTARA, R. M. C. M.; MOTA, M. C.; ARAÚJO, A. et al. Relações entre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e a duração do ciclo de diferentes genótipos de cultivos de leguminosas de grãos. Teresina: **Embrapa Meio-Norte**, 2009, 27 p. Documentos 197.

ALVES, G. C. **Efeito da Inoculação de Bactérias Diazotróficas dos Gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em Genótipos de Milho**. 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2007.

ALVES, G. C.; VIDEIRA, S. S.; URQUIAGA, S. et al. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant Soil** (2015) 387:307–321.

ALVES, V.G. **Resposta do feijoeiro a doses de nitrogênio no plantio e cobertura e à inoculação de sementes com rizóbio**. 46p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

ALVAREZ V, V. H; RIBEIRO, A. C. Calagem. In: Comissão de fertilidade do solo do estado de minas gerais (CFSMG). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ª aproximação**, Viçosa, 1999, p.41-60.

ARAÚJO, G. A. A.; FERREIRA, A. C. B. **Manejo do solo e plantio**. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BOREM, A. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2011. p. 87-114.

ARAUJO, F. F.; FOLONI, J. S. S.; WUTZKE, M. et al. Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1043-1054, maio/jun. 2013

ARAUJO, E. O.; MARTINS, M. R.; VITORINO, A. C. T. et al. Effect off nitrogen associad with diazotrofic bacteria inoculation on nitrogen use efficiency and its biological fiation by corn determined using 15N. **African Journal of Microbiology Research**, v.9, p. 643-650, 2015.

ARRUDA, L. M. **Seleção e caraterização de rizobactérias promotoras de crescimento de milho cultivadas no Rio Grande do Sul**. Universidade Federal

do Rio Grande do Sul. (Dissertação – Mestrado em genética e biologia molecular) p. 58; 2012.

ÁVILA, J. S. **Adubação verde e inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho**. Vitória da Conquista - BA: UESB (Dissertação – Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia) 56p; 2017.

AGROCERES. Sementes Agrocere. Milho híbrido AG 1051. Disponível em: http://www.sementesagrocere.com.br/pages/Produto.aspx?p=AG_1051. Acesso em 15 dezembro 2017.

AMADO, T. J. C.; SCHLEINDWEIN, J. A.; FIORIN, J. E. Manejo do solo visando à obtenção de elevados rendimentos de soja sob sistema plantio direto. In: Thomas AL & Costa JA (Eds.) Soja - Manejo para alta produtividade de grãos. Porto Alegre, UFRGS. p.35-97. 2010.

BAJERSKI, F.; GANZERT, L.; MANGELSDORF, K. et al. *Herbaspirillum psychrotolerans* sp. nov., a member of the family Oxalobacteraceae from a glacier forefield. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, 63, 3197-3203, 2013.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on ter biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p.549-579, 2005.

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

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 36, 86-93, 1986.

BALDANI V. L. D.; DOBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 433–439, 1980.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G. et al. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as ***Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.**; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as ***Herbaspirillum* species 3**. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 46, 802-810,1996.

BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; TEIXEIRA, K. R. S. et al. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (org) **Biociencia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, Caxias do Sul, 433p. 2002.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, 29: 911-922, 1997.

BARBOSA, J.Z.; CONSALTER, R.; MOTTA, A.C.V. Fixação biológica de nitrogênio em poaceae. **Evidência**, v.12, n.1, p.7-18, 2012.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P. et al. Production of indole-3-acetic and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, n.1, p.7-11, 1998.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1900-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.

BEIJERINCK, M.W. Über ein *Spirillum*, welches frei en Stickstoff bindenkann Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. **Abteilung II**, 1925, 63, 353-359.

BEN DEKHIL, S.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; et al. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Syst. Appl. Microbiol.**, 20, 72-77, 1997.

BIGGS, I. M.; STEWART, G. R.; WILSON, J. R.N. et al. Natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. **Plant and Soil**, v. 238, p. 21-30, 2002.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R. et al. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v.252, p.139-149, 2003.

BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; PICCININ, G. G. et al. SEED INOCULATION WITH *Azospirillum brasilense*, ASSOCIATED WITH THE

USE OF BIOREGULATORS IN MAIZE. **Revista Caatinga, Mossoró**, v. 25, n. 2, p. 58-64, mar.-jun., 2012.

BREDA, F. A. F.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, V. 51, n.1, p.45-52, jan. 2016.

CAMPOS, D. B.; RESENDE, A. S.; ALVEZ, B. J. et al. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sob inundação. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 41-46, 2003.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; VENEGAS, V.H.A.; BARROS, N.F. et al. (eds.). Fertilidade do solo. Viçosa, MG, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.375-470, 2007.

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. **Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos**. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). Feijão. 2. ed. Viçosa: UFV, 2011. p. 143-170.

CARRO, L.; RIVAS, R.; LEÓN-BARRIOS, M. et al. *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., isolated from volcanic mountain soil, and emended description of the genus *Herbaspirillum*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2012, 62, 1300-1306.

CASA, R. T.; MOREIRA, E. N.; BOGO, A. et al. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos em híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.4, p.353-357, 2007.

CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N. et al. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **R. Bras.Ci. Solo**,339:1595-1602, 2015.

CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J. et al. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v. 133, p. 81-88, 2000.

CHOUDDHURY, A. T. M. A.; KENNEDY, I. R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production, **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 39, p. 219-227, 2004.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanamento da Safra brasileira de grãos, v.5, safra 2017/18, N.4** – Quarto levantamento, Brasília, p.126, janeiro 2018.

CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; CONCEIÇÃO, P. S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p. 1880-1883, set, 2009.

CUNHA, F. N.; SILVA, N. F.; BASTOS, F. J. C. et al. Efeito da *Azospirillum brasilense* na produtividade de milho no sudoeste goiano. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.13, n.3, p. 261-272, 2014.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B. et al. 16 S Ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril.). **Applied and Environmental Microbiology**, Whashington, v.67, n..5, p.2375-2379, 2001.

DARTORA, J. GUIMARÃES, V. F.; MARINE, D. et al. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e ambiental**, v.17, n.10, p.1023-1029, 2013.

DOBBELAERE, S.; C, A.; THYS, A.; PTACEK, D. et al. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, n.9, p.871- 879, 2001.

De JESUS, C. M. **Respostas de diferentes genótipos de milho à inoculação de bactérias diazotróficas e fontes de nitrogênio**. 90 p. (Mestrado em Agronomia, Fitotecnia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Vitória da Conquista – BA, 2014.

DING, L.; YOKOTA, A.: Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2004, 54, 2223-2230.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 2, n. 1, p. 621-631, 2004.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa SPI, Brasília, 1995.60 p.

DOBRITSA, A.P.; REDDY, M.C.S.; SAMADPOUR, M.: Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 60, 1418-1426, 2010.

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

DOURADO-NETO, D.; POWLSON, D.; ABU BAKAR, R. et al. Multiseason Recoveries of Organic and Inorganic Nitrogen-15 in Tropical Cropping Systems. **Soil Science Society of America Journal**, v. 74, n. 1, p. 139–152, 2010.

DWIVEDI, S. L.; SAHRAWAT, K. L.; UPADHYAYA, H. D. et al. Advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. **Adv. Agron.** 128, 1–116, 2015.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen -fixing bacterium associated with the C4 -grass *Miscanthus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2001, 51, 17-26.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA – **A cultura do milho**, Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p.517, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA – **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**, Sete Lagoas - MG: Circular Técnica 75, 2006.

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; HUREK, B. R. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 131-141, 2000.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. 2.ed. **Massachussets: Sinauer**, 380 p. 2005.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A. et al. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja - revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.14, n.1, p.89-106, 2007.

FARIA, V. P. O uso da cana de açúcar para bovinos no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 5., 1993, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, p. 1-16, 1993.

FERNANDES, M. F.; PROCÓPIO, S. O.; TELES, D. A. et al. Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura da cana-de açúcar para a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 55, n. 4, p. 318-326, 2012.

FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V. et al. **Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees**. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis, RJ. Abstracts... Seropédica: EMBRAPA-CNPAB; UFRRJ, 1995. p. 210.

FERREIRA, A. C. B.; ANDRADE, M. J. B.; ARAÚJO, G. A. A. Feijão de alta produtividade: nutrição e adubação do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, v.25, p.61-72, 2004.

FERREIRA, A. N.; ARF, O.; CARVALHO, M.A.C. et al. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agricola**, v.57, p.507512, 2000.

FERREIRA, A. S., PIRES, R. R., RABELO, P. G. et al. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 72, p. 103-108, 2013.

FERREIRA, D. F. SISVAR - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.13, 2011.

FONSECA, G. G.; OLIVEIRA, D. P.; SOARES, B. L. et al. Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 6, p. 1778-1787, 2013.

GARCIA, J. C.; VITORINO, R.; AZANIA, C. A. M. et al. Inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar, variedade RB 867515. **Nucleus**, v.10, n.1, 2013.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v.36, n.1, p.1389-1398, 2004.

GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G. et al. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.303-308, 2011.

GUIMARÃES, S. L. **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. 2006. 86p. Tese (Doutorado em Agronomia - Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 25-30, 2003.

GUIMARÃES, S. L. CAMPOS, D. T. S; BALDANI, V. L. D. et al. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, v.23, n.4, p.32-39, 2010.

GU, Y. H.; MAZZOLA, M. Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of *Pseudomonas putida* strain 2C8. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1155-1162, 2001.

HARA, F. A. dos S.; OLIVEIRA, L. A. de. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v.34, p.343-357, 2007.

HERRIDGE D. F., PEOPLES M., BODDEY R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil** 311, 1–18. 2008.

HOEFSLOOT, G.; TERMORSHUIZEN, A. J.; WATT, D. A. et al. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown south African sugarcane cultivar. **Plant Soil**, v.277, p.85 – 96, 2005.

HUNGRIA, M. **Inoculação com Azospirillum brasiliense: inovação em rendimento a baixo custo** – Londrina: Embrapa Soja, 2011.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, n.1-2, p.413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Embrapa Soja. Circular técnica: Londrina-PR, n. 35; p.48; 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, n. 2, p.88-93, 2003.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R.J. et al. The Importance of Nitrogen Fixation to Soybean Cropping in South America. Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, **Ecology, and the Environment**, v. 4, p.25-42, 2005.

IM, W.T.; BAE, H.S.; YOKOTA, A. et al. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2004, 54, 851-855.

JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N. et al. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Mol. Plant Microbe Interact.**, 15(9):894-906, 2002.

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

JUNG, S.Y.; LEE, M. H.; OH, T. K. et al. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2007, 57, 2284-2288.

KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M. V. et al. Seeds inoculation with diazotrophic bacteria and nitrogen application in side-dressing and leaf in maize. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 527-538, mar./abr. 2013

KENNDY, G.; BURLIGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. **Food Chemistry**, Barking, v.80, n.4, p.589-596, apr. 2003.

KENENDY I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; MIHA'LY L. KECSKE'S. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KENNEDY, I. R.; GERK-PEREG, L. L.; WOOD, C. et al. Biological nitrogen fixation in non-legumes field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 65-79, 1997.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D. et al. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.**, 1989, 140, 679-693.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M. et al. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2001, 51, 157-168.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; HOLTZ, E. K. et al. Inoculação de bactérias diazotróficas e desenvolvimento de plântulas de arroz irrigado em solo e câmara de crescimento. Revista da FZVA. **Uruguiana**, v.15, n.1, p. 90-102. 2008.

LAGIER, J. C.; GIMENEZ, G.; ROBERT, C. et al. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Herbaspirillum massiliense* sp. nov. **Stand. Genomic Sci.**, 7, 200-209, 2012.

LANA, M. C.; DARTORA, J.; MARINI, D. et al. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 59, n.3, p. 399-405, mai/jun, 2012.

LAVRINENKO, K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E. et al. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2010, 60, 2832-2837.

LEITE, L. F. C.; ARAÚJO, A. S. F.; COSTA, C. N. et al. Nodulação e produtividade de grãos do feijão-caupi em resposta ao Molibdênio. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 4, p. 492-497, 2009.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; LIU, Y. C. et al. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 65, 4601-4607, 2015.

LIN, S. Y.; LIU, Y. C.; HAMEED, A. et al. *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 66, 1453-1458, 2016

LIN, S.Y.; LIU, Y.C.; HAMEED, A. et al *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 63, 3762-3768, 2013.

LIN, S.Y.; SHEN, F.T.; YOUNG, L.S. et al. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 62, 1185-1190, 2012.

LIN, S. Y.; YOUNG, C. C.; HUPFER, H. et al. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2009, **59**, 761-765.

LIMA, G. T. **Consequências da remoção do limbo foliar em diferentes estádios reprodutivos da cultura do milho**. 51p. Dissertação (Mestrado em fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, MG, 2007.

LOPES, A. C. A.; VELLO, N. A.; PANDINI, F. et al. Variabilidade e correlações entre caracteres em cruzamentos de soja. **Scientia Agrícola**, v. 59, p. 341-348, 2002.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S.M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **An. Acad. Brasil Ciênc.**, 1983, 55, 417-430.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a Strategy for improving grain yield in the Semi-Arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.38, p.333-339, 2003.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, Haia, v. 252, n. 1, p. 11-23, 2003.

MASCARENHAS, H. A. A.; TANAKA, R. T.; WUTKE, E. B. et al. **Nitrogênio: a soja aduba a lavoura da cana.** O Agrônomo, v. 01, n. 57, 2005.

MATOSO, S. C. G.; KUSDRA, J. F. Nodulação e crescimento do feijoeiro em resposta à aplicação de molibdênio e inoculante rizobiano. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, **Campina Grande**, v. 18, n. 6, p. 567-573, 2014.

MATOSO, E. S.; MARCO, E.; BELLE, C. et al. Desenvolvimento inicial de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **13º jornada de pós-graduação e pesquisa.** Urcamp, 2016.

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

MEHNAZ (S.), WESELOWSKI (B.) and LAZAROVITS (G.): Azospirillum zeae sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of Zea mays. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2007, 57, 2805-2809.

MORAIS, T. P.; BRITO, C. H.; FERREIRA, A. S. et al. Q. Aspectos morfofisiológicos de plantas de milho e bioquímico do solo em resposta à adubação nitrogenada e à inoculação com Azospirillum brasilense. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 62, n.6, p. 589-596, nov-dez, 2015.

MORAIS, I. C. **COMPORTAMENTO DE HÍBRIDOS DE MILHO SUBMETIDOS À ADUBAÇÃO NITROGENADA E À INOCULAÇÃO COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA.** 84 p. (Mestrado em Agronomia, Fitotecnia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Vitória da Conquista – BA, 2016.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NOBREGA, R. S. A. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** 1(2): 74-99, 2010

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 626 p. 2002.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 729 p.2006.

MOREIRA, F. T. A.; SANTOS, D. R.; SILVA, G. H. et al. OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Azospirillum* spp. ASSOCIADAS A GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS NO SEMIÁRIDO NORDESTINO. **HOLOS**, 29, v. 3, 2013.

MONTANEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 45, p. 253-263, 2009.

NOBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. et al. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, n.2, p. 269-279, 2004.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.284, n.1-2, p.23-32, 2006.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. et al. Infection of mottled stripe diseasesusceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist** 135: 723-737, 1997.

PAZOS, M.; HERNÁNDEZ, A. Evaluación de cepas nativas del género *Azospirillum* y su interacción con el cultivo del arroz. **Cultivos Tropicales**, v. 22, n. 4, p. 25-28, 2001.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F. M.; OTSUBO, I. M. N. et al. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.219-226, 2009.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G. et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2006, 56, 1263-1271.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO. et al. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Rev Ciências Agronômicas**. V.44, n.2, p.363-370, 2013.

QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F. et al. Desempenho agrônômico a campo de híbrido de milho inoculados com *Azospirillum*. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 61, n.2, p.209-218, 2014.

RAMOS, A. S.; SANTOS, T. M. C.; SANTANA, T. M. et al. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Verde**, Mossoró, v.5, n.4, p.113 - 117 out/dez de 2010.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I. et al. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 37, 43-51, 1987.

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

REIS, V. M, BALDANI, J. I. BALDANI, V. L. D. et al. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in plant Science**, v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D. et al. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M.S. (ed.) *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.153-174, 2006.

REPKE, R. A; CRUZ, S. J. S; SILVA, C. J. et al. Eficiência do *Azospirillum brasiliense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **R Bras MilhoSorgo**. 2013; 12:214-26.

RENGEL, Z.; ROSS, G.; HIRSCH, P. Plant genotype and micronutrient status influence colonization of wheat roots by soil bacteria. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 99-113, 1998.

RODRIGUES, L. da S. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado**. 2004. 94 f. Tese

(Doutorado em AgronomiaCiência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I. et al. Herbaspirillum hiltneri sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 56, 1341-1348, 2006.

RUFINI, M.; SILVA, M. A. P. da; FERREIRA, P. A. A. et al. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutradox. **Biology and Fertility of Soils**, v.50, p.115-122, 2014.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R. et al. **Fixação biológica de nitrogênio**. In: FREIRE FILHO, F.R.; ARAUJO LIMA, J. A.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.279-335.

SALVADOR, C. A. Análise da conjuntura agropecuária safra 2011/12 - Feijão. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná. 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/feijao_2011_12.pdf>. Acesso em: 24 novembro de 2016.

SANTOS, J. S.; VIANA, T. O.; JESUS, C. M. et al. INOCULATION AND ISOLATION OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA IN MAIZE GROWN IN VITÓRIA DA CONQUISTA, BAHIA, BRAZIL. **R. Bras. Ci. Solo**, 39:78-85, 2015.

SANTOS, J. S. **ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA CULTURA DO MILHO CULTIVADOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA – BA**. UESB, (Mestrado em Agronomia, Fitotecnia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Vitória da Conquista – BA, 97 p. 2013.

SANTOS, L. G. **Seleção de veículo de inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do sorgo**. Vitória da Conquista: UESB, 2016. 100p. (Tese – Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)

SANGOI, L.; DA SILVA, L. M. M.; MOTA, M. R. et al. Desempenho Agrônômico do Milho em Razão do Tratamento de Sementes com Azospirillum sp. e da Aplicação de Doses de Nitrogênio Mineral. **R. Bras. Ci. Solo**, 39:1141-1150, 2015

SILVA, G. M.; STONE, L. F.; MOREIRA, J. A. A. Manejo da adubação nitrogenada no feijoeiro irrigado sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.32, p.1-5, 2002.

SILVA JÚNIOR, E. B.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; OLIVEIRA, P. J. et al. Eficiência agrônômica de nova formulação de inoculante rizobiano para feijão caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 138-141, 2012.

SILVA JÚNIOR, E. B.; FERREIRA, A.; BODDEY, M. R. et al. Ontogenia da nodulação de feijão-caupi em vaso com solo da área de produção do Centro-Oeste. In: III Congresso Nacional de feijão-caupi. Recife. **Anais...** Recife: IPA, 2013.

SILVA, R. F. da, OLIVEIRA, E. C. de; JUSTINO, F. B. et al. Influência das mudanças climáticas na cultura do milho na área da Amazônia. **XVI Congresso Brasileiro de Meteorologia**, Pará, 2010.

SLY, L. I.; STACKEBRANDT, E. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1999, 49, 541-544.

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A.; FERREIRA, P. A. A. et al. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I-caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.30, n.1, p. 795-802, 2006.

SOUZA, J. A. M. **Produção de anticorpos monoclonais, imunolocalização da proteína salt e análise do efeito da salinidade na estrutura e ultraestrutura de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2000. Dissertação (Mestrado em biociências e Biotecnologia). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacazes, 2000.

SOUSA, F. G. **Isolamento, identificação e seleção de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal associadas à cultura do sorgo, em solos de diferentes biomas**. Vitória da Conquista – BA: UESB, 2017. (Tese – Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia).

SORATTO, R. P.; PEREIRA, M.; COSTA, T. A. M. et al. Fontes alternativas e doses de nitrogênio no milho safrinha em sucessão à soja. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.41, n.4, p.511-518, 2010.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p.487 - 506, 2000.

STORCK, C. R. **Variação na composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos**. 2004. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G.; MERCANTE, F. M. **Fixação biológica de nitrogênio**. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J. & STONE, L.F. Produção de feijoeiro comum em várzeas tropicais. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p.122-153.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

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

TAULÉ, C.; ZABALETA, M.; MAREQUE, C. et al. New betaproteobacterial rhizobium strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. **Appl Environ Microbiol.**78:1692-700, 2012.

TOZLU, E.; KARAGOZ, K.; BABAGIL, G. E. et al. Effect of some plant growth promoting bacteria on yield components of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Aras 98). **Journal of the Agricultural Faculty**, Fukuoka, v. 43, n. 2, p. 101-106, 2012.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; **BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates**. Soil Science Society of America Journal, v.56, p.105-114, 1992.

URQUIAGA, S. XAVIER, R.; MORAIS, R. F. et al. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data of the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, 2011.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F. de; et al. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of

biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v.356, p.5-21, 2012.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C. et al. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2003, 53, 1979-1983.

VIANA, T. O. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista - BA.** Vitória da Conquista - BA: UESB, (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia) p. 97; 2012.

VIANA, T. O.; SANTOS, J. S.; MANFREDI, C. et al. Isolation and inoculation of diazotrophic bacteria in rice (*Oryza sativa* L.) grown in Vitoria da Conquista – BA. **African Journal of Agricultural Research**. Vol. 10(29), pp. 2847-2854, 16 July, 2015.

VIDEIRA, S. S.; DE OLIVEIRA, D. M.; DE MORAIS, R. F. et al. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 51–66, 21 dez. 2011.

VOGT, G. A; BALBINOT, JUNIOR A. A; GALOTTI, G. J. M. et al. Desempenho de genótipos de milho na presença ou ausência de inoculação com *Azospirillum brasiliense* e adubação nitrogenada de cobertura. **Agropecu Catarinense**. 2014;27: 49-54.

WEISS, V.; FAORO, H.; TADRA-SFEIR, M. Z. et al. Genome Sequence of *Herbaspirillum lusitanum* P6-12, an Endophyte Isolated Draft from Root Nodules of *Phaseolus vulgaris*. **J. Bacteriol.** v. 194, n. 15, p. 4136-4137, 2012.

WUTKE, E. B.; CALEGARI, A.; WILDNER, L. do P. **Espécies de adubos verdes e plantas de cobertura e recomendações para seu uso.** In: LIMA FILHO, O.F. de; AMBROSANO, E.J.; ROSSI, F.; CARLOS, J.A.D. (Ed.). *Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e prática.* Brasília: Embrapa, 2014. v.1, p.59-168.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2005, 55, 1435-1438.

YADAV, R. L.; SUMAN, A.; PRASAD, S. R. et al. Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N-economy of sugarcane cultivation under subtropical climatic conditions of India. **European Journal of Agronomy**, v. 30, p.296-30, 2009.

YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C. et al. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 58, 959-963, 2008.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview, **Plant Soil**, vol. 287 (pg. 3-14), 2006.

ZHANG, W. T.; YANG, J. K.; YUAN, T. Y. et al. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Biology and Fertility of Soils**, v.44, p.201-210, 2007.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; ZANÃO-JUNIOR, L. A. **Efeito da nutrição mineral no controle de doenças de plantas**. Viçosa-MG, 2012, p.321.

ZAKHAROVA, E. A.; SHCHERBAKOV, A. A.; BRUDNIK, V. V. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **Eur.J. Biochem.**259, 572-576, FEBS, 1999.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F. et al. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, v. 39, n.4, p. 749-758, 2009a.

ZILLI, J. E.; VALISHESKI, R. R.; FREIRE-FILHO, F. R. et al. Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, 35:281-287, 2004.

ZILLI, J. É.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N.G. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.811-818, 2006.

ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; MOREIRA, F. M. S. et al. **Fixação biológica de nitrogênio**. In: In: ZILLI, J.E.; VILARINHO, A. A. & ALVES, J. M. A., eds. A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira. Boa Vista, Embrapa Roraima, p.185-22. 2009b.

ZILLI, J. E.; SMIDERLE, O. J.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; Eficiência agronômica de diferentes formulações de inoculantes contendo *Bradyrhizobium* na cultura da soja em Roraima. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 4, n. 2, p. 56-61, jul-dez, 2010.

ZILLI, J. E.; PERIN, L.; MARSON, B. F. et al. Rendimento de grãos da cultura do milho inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* no cerrado de Roraima. In: FERTBIO 2008, Londrina. **Anais**. Londrina: SBCS, 2008. CD Rom.

ZHOU, S.; HAN, L.; WANG, Y. et al. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 2013, 63, 2618-2624. Zuffo, Alan Mario. Aplicações de *Azospirillum brasilense* na cultura da soja / Alan Mario Zuffo. – Lavras: UFLA, 2016.