

**COMPORTAMENTO DE HÍBRIDOS DE MILHO
SUBMETIDOS À ADUBAÇÃO NITROGENADA E À
INOCULAÇÃO COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA**

INGRID CARDOSO MORAIS

2016

INGRID CARDOSO MORAIS

**COMPORTAMENTO DE HÍBRIDOS DE MILHO
SUBMETIDOS À ADUBAÇÃO NITROGENADA E À
INOCULAÇÃO COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA**

Dissertação 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
Mestre.

Orientador:
Prof. Dr. Joilson Silva Ferreira

VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA – BRASIL
2016

*À minha mãe Edenildes;
À minha avó Edneir;
Ao meu avô Nilson (in memorian);
Ao Meu Pai Ricardo;
Ao Meu esposo George.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Obrigada à mãe natureza, pela vida concedida e pela aprendizagem assimilada nos momentos de maiores dificuldades. Pois como diz Hermes Trimegisto:

“Toda a causa tem seu efeito, todo efeito tem sua causa; tudo acontece de acordo com a lei; o acaso é simplesmente um nome dado a uma lei não reconhecida; há muitos planos de causalidade, porém nada escapa à lei.”

O CAIBALION

Sou muito grata à minha família, pelo AMOR incondicional. Em especial, à minha mãe, por batalhar cotidianamente, com o intuito de me ajudar a crescer; à minha avó, pelas palavras e pela energia positiva despendida ao meu favor; ao meu avô, por sempre me incentivar nas minhas decisões e pelo seu sorriso, sempre que algo de bom acontecia em minha vida; ao meu pai, pela ajuda e pelos conselhos nos tempos difíceis.

Obrigada ao meu amigo, amor, esposo e companheiro de todas as horas, pelo incentivo, pelas palavras, pelas risadas e pelo amor.

Meus agradecimentos ao professor Joilson, por ter me orientado nesses dois anos e pela imensa compreensão.

Aos meus companheiros de caminhada: Joelma, pelos momentos vividos, pelos conhecimentos e pela amizade que levarei sempre comigo; Maurício, Joseane, Ariana, pela disposição de ajudar ao próximo, adorei conhecer vocês.

À Darlaine e Bruna, pela beleza e grandeza da amizade.

Ao professor Divino, pelo incentivo e pelo conhecimento passados a mim.

Ao programa de pós-graduação em Agronomia, por ter me dado oportunidade de estudar na instituição e de me aprimorar como profissional.

À Capes pela concessão da bolsa.

E a todos os professores e funcionários da UESB que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa conquista.

RESUMO

MORAIS, Ingrid Cardoso. **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.

A fixação biológica de nitrogênio em plantas de milho surge como uma alternativa mais sustentável ao uso de adubos nitrogenados, os quais correspondem a 40% dos custos totais de produção do milho. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi identificar estirpes capazes de promover incrementos nas variáveis analisadas em genótipos de milho, quando submetidos a diferentes fontes e proporções de nitrogênio no município de Vitória da Conquista – BA. Foram montados dois experimentos, cada qual correspondente aos genótipos AG 1051 e AL Bandeirantes, organizados em DBC e em fatorial do tipo 5x3+2 (5 Estirpes x 3 combinações de N + 2 tratamentos adicionais) com, respectivamente, 5 e 4 repetições. As combinações de N corresponderam a 25%:75%, 50%:50%, 75%:25% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e os tratamentos adições foram compostos por 100% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 100% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cada parcela experimental foi formada por vaso de 10 dm³, contendo 1 planta. Foram avaliadas, quinzenalmente, as variáveis: altura, diâmetro do caule e número de folhas. Aos 75 DAE, foram avaliadas a massa fresca da parte aérea (MFPA), a massa seca da parte aérea (MSPA) e o índice SPAD. Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% e 1% de significância, utilizando o Software Assistat. O genótipo AG 1051 foi mais responsivo à adubação com SO_4NH_4 , enquanto o genótipo AL Bandeirantes apresentou-se mais responsivo à adubação com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. A inoculação com a estirpe 17B proporcionou melhores resultados em ambos os genótipos. A inoculação com a estirpe N6, quando associada às maiores proporções de amônio, demonstrou resultados satisfatórios para o genótipo de milho AG1051. A inoculação com bactérias diazotróficas, juntamente com o fornecimento de nitrato e de amônio, incrementaram no crescimento dos genótipos de milho, quando comparada com o fornecimento N somente via fertilizante mineral.

Palavras-chave: *Zea mays*, Nitrato, Amônio, *Herbaspirillum* e *Azospirillum*

ABSTRACT

MORAIS, Ingrid Cardoso. **BEHAVIOUR OF THE SUBMITTED MAIZE HYBRIDS NITROGEN AND INOCULATION WITH BACTERIA DIAZOTROPHIC.** 84 p. (Master's Degree in Agronomy, Phytotechny). State University of Southwest Bahia – SUSB, Vitoria da Conquista – BA, 2016.

The biological fixation of nitrogen in corn plants emerges as a more sustainable alternative to the use of nitrogen fertilizer corresponding to 40% of total production costs of maize. The aim of this study was to identify stems able to promote increases in variables in corn genotypes submitted to different nitrogen sources and levels in Vitoria da Conquista - BA. Were mounted two experiments, each corresponding to genotypes AG 1051 and AL Bandeirantes, organized in DBC and factor type 5 x 3 + 2 (5 strains x 3 combinations of N + 2 additional treatments) with respectively 5 and 4 replicates. The N combinations corresponded to 25%: 75% 50% 50% 75% 25% (Ca(NO₃)₂: (NH₄)₂SO₄) and treatments additions were composed of 100% Ca(NO₃)₂ and 100% (NH₄)₂SO₄. Each plot was made up of 10 dm³ pot containing 1 plant. Biweekly were evaluated variables height, stem diameter and number of leaves. 75 DAE were evaluated MFPA, MSPA and SPAD index. All data were submitted to analysis of variance and averages will be compared by Tukey test, to 5% and 1% probability, using the Software Assistat. The AG1051 genotype was more responsive to fertilization with (NH₄)₂SO₄, while the AL Bandeirantes genotype showed to be more responsive to fertilization with (Ca(NO₃)₂). Inoculation with the strain 17B provided better results in both genotypes. Inoculation with strain N6, when associated with major proportions of ammonium, demonstrated satisfactory results for the AG1051 maize genotype. Inoculation with diazotrophs, together with the provision of nitrate and ammonium, increased the growth of maize genotypes, compared with providing only N mineral fertilizer.

Key words: *Zea mays*, Nitrate, Ammonium, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificações dos tratamentos oriundos da combinação entre as estirpes e proporções de nitrogênio.....	41
Tabela 2 – Altura de plantas de milho aos 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AG1051, inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.....	46
Tabela 3 – Diâmetro de plantas de milho aos 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AG1051, inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.....	49
Tabela 4 – Número de folhas de plantas de milho aos 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AG1051, inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.....	50
Tabela 5 – Índice SPAD, Massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas de milho do híbrido AG1051 aos 75 DAE, inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.....	51
Tabela 6 – Altura aos 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AL Bandeirantes inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.....	58
Tabela 7 – Diâmetro aos 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AL Bandeirantes inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.....	61
Tabela 8 – Valores Médios do diâmetro (mm) do genótipo de milho AL Bandeirantes, em função da interação entre as estirpes e as proporções de nitrogênio.....	62
Tabela 9 – Número de folhas aos 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AL Bandeirantes inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.....	63

Tabela 10 – Índice SPAD, Massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas de milho do híbrido AL Bandeirantes aos 75 DAE, inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.....64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Índice SPAD para o efeito da inoculação em função dos níveis de N (A). Índice SPAD para o efeito dos níveis de N em função da inoculação (B). N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio.....53

Figura 2 – Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) para o efeito da inoculação em função dos níveis de N (A). Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) para o efeito dos níveis de N em função da inoculação (B). N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio.....56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

NH₄⁺ – Amônio
NO₃⁻ – Nitrato
NO₂⁻ – Nitrito
RCHNH₂COOH – Aminoácidos
CO(NH₂)₂ – Uréia
C₅H₄N₄O₃ – Ácido Úrico
pH – Potencial Hidrogeniônico
H⁺ – Hidrogênio
HATS – Sistema de transporte de Alta Afinidade
LATS – Sistema de transporte de Baixa Afinidade
USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
N – Nitrogênio
N₂ – Nitrogênio Atmosférico
NH₃⁺ – Amônia
% – Porcentagem
Tg – Tera grama (1000 000 g)
FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
BA – Bahia
CIB – Conselho de Informação sobre Biotecnologia
CO₂ – Dióxido de Carbono
ADP – Difosfato Adenosina
ATP - Trifosfato de Adenosina
C – Carbono
Ca(NO₃)₂ – Nitrato de Cálcio
cm – Centímetro
cmol_c/dm³ – Centimol de carga por decímetro cúbico
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
CTC – Capacidade de Troca Catiônica
DAE – Dias após a Emergência
DAP – Dias Após o Plantio
dm³ – Decímetro cúbico
e⁻ – Elétron
FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio
H₂ – Hidrogênio
H₂O – Água
ha – Hectare

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMET – Instituto Nacional de Meteorologia
Kg – Kilograma (1000 g)
M.O. – Matéria Orgânica
MFPA – Massa fresca da parte aérea
mg/dm – Miligrama por decímetro
mL – Mililitro
mm – milímetro
MSPA – Massa Seca da Parte Aérea
(NH₄)₂SO₄ – Sulfato de Amônio
O₂ – Oxigênio
°C – Grau Celsius
Pi – Fósforo inorgânico
SPAD – Análise de Desenvolvimento de solo planta
t – Tonelada
UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	13
2.0 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 A cultura do milho	17
2.2 Nitrogênio	21
2.2.1 Dinâmica do Nitrogênio no solo	21
2.2.1 Nitrogênio nas plantas.....	24
2.2.3. Importância do nitrogênio para as plantas de milho	28
2.4 Bactérias diazotróficas e Fixação Biológica de Nitrogênio em gramíneas	31
2.5 Bactérias diazotróficas associadas ao cultivo do milho.....	36
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Descrição da área experimental	40
3.2 Delineamento experimental	41
3.3 Descrição dos genótipos	43
3.4 Inoculação e Plantio.....	43
3.5 Adubação Nitrogenada	44
3.6 Avaliações.....	44
3.7 Análise estatística	45
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Experimento I: Comportamento do híbrido de milho AG1051 à adubação nitrogenada e à inoculação com bactéria diazotróficas. .	46
4.2 Experimento II: Comportamento do híbrido de milho AL Bandeirantes à adubação nitrogenada e à inoculação com bactéria diazotróficas.....	58
5.0 CONCLUSÕES.....	69
6.0 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	70

1.0 INTRODUÇÃO

O potencial produtivo do milho coloca essa cultura como sendo a segunda maior do mundo, com produção de 991 milhões de toneladas no ano de 2014, conforme dados do USDA (2014).

A maior parte do milho produzido é destinada à formulação de rações animais, cerca de 85%, e os demais (15%), ao consumo direto ou indireto na alimentação humana (PAES, 2006).

No cenário mundial, o Brasil ocupa o terceiro lugar, representando um percentual aproximado de 7,6% de toda produção mundial, atrás apenas dos Estados Unidos e da China que juntos ultrapassam a metade de todo milho produzido (USDA, 2014).

Para atingir níveis elevados de produção, é preciso que haja adoção de práticas de manejo adequadas e que favoreçam o melhor desempenho das plantas nas diversas condições edafoclimáticas em que são cultivadas.

Nesse aspecto, os nutrientes minerais assumem papel relevante, pois são substanciais no processo de conversão do CO₂ em matéria seca, e na produção das plantas de milho (DURÃES, 2014).

Os nutrientes minerais mais exportados na cultura do milho são, em ordem decrescente, nitrogênio, potássio e fósforo. Dentre eles, o nitrogênio é o elemento que apresenta maior interferência na qualidade do grão, necessitando de 305 kg.ha⁻¹ de N para produzir cerca de 6,4 toneladas de grão (MALAVOLTA, 1980).

O nitrogênio é componente de proteínas, com destaque especial para a zeína e a glutelina, que representam 90% de todo N presente no endosperma dos grãos e que são sensivelmente afetadas pela presença de N no solo (YAMADA e outros, 2007).

Em solos brasileiros, a quantidade de nitrogênio disponível às plantas é baixa, devido à velocidade de ciclagem, que não permite a formação de grandes estoques de N no solo.

A disponibilidade de N é controlada pelos processos de mineralização, assim como pela adição de fertilizante e pela fixação biológica de nitrogênio.

No entanto, a contribuição dos fertilizantes nitrogenados de origem industrial no estoque de N em solos do Brasil, representa apenas 1/3 do N mineral fixado biologicamente, que é de 7,3 Tg.ano⁻¹ (CANTARELLA, 2007).

Tendo em vista que o consumo mundial de fertilizante nitrogenado no ano de 2009 atingiu 92.040.356 toneladas e que a síntese de uma tonelada de amônia consome 1,3 toneladas de combustíveis fósseis, a fixação biológica de nitrogênio surgiu como uma alternativa capaz de suprir, total ou parcialmente, o nitrogênio demandado pelos sistemas agrícolas.

A adoção de práticas de manejo adequadas, capazes de favorecer fixação biológica de nitrogênio em áreas cultivadas com milho, deve ser conduzida de forma que haja resultados positivos na produção, bem como na redução dos custos de produção da cultura, minimização da dependência de fertilizantes nitrogenadas e na mitigação dos impactos ambientais causados pelo uso.

Em culturas de leguminosas como soja, a maior parte do N disponível às plantas é oriunda da fixação biológica realizada por grupos de bactérias chamadas diazotróficas, que estabelecem relação simbiote com a planta.

Essas bactérias apresentam mecanismos distintos, quando associadas a diferentes tipos de plantas; em gramíneas como milho, a

fixação biológica é considerada uma possibilidade recente, sendo necessária a elucidação dos mecanismos envolvidos na associação entre as bactérias diazotróficas e as plantas de milho.

O uso de bactérias que se associam com plantas de milho vem sendo testado com o intuito de obter resultados mais concretos a respeito do mecanismo de interação entre a bactéria e a planta, já que a especificidade, o benefício da interação bactéria-planta e a variação do comportamento de ambos os organismos são altamente dependentes das condições ambientais e de manejo.

Se tratando de manejo, vale considerar que a adição de fertilizantes nitrogenados juntamente com a inoculação com bactérias diazotróficas pode afetar o processo de fixação.

Todavia, não existem resultados conclusivos sobre essa afirmação, pois como são utilizadas diferentes fontes de N na agricultura, torna-se relevante compreender, de forma mais precisa, o comportamento das plantas de milho, quando submetidas à inoculação na presença de nitrato e/ou amônio.

No município de Vitória da Conquista a expressão econômica do milho é relevante. Conforme mostram dados do IPEA (2014), houve um aumento de 245% na produção do milho, saindo de 405 toneladas no ano de 2006 para 1400 toneladas em 2009.

Mesmo assim, a produtividade da região é considerada baixa, se comparada às outras regiões produtoras, e isso se dá em consequência do nível tecnológico e econômico dos produtores rurais que ainda é limitado.

Assim, o fornecimento de fontes adequadas de fertilizantes minerais nitrogenados, concomitante ao uso de adubos biológicos, pode

colaborar com a redução do custo de produção do milho cultivado no município de Vitória da Conquista, sudoeste da Bahia.

Conforme o exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar estirpes capazes de promover o maior incremento das características avaliadas em dois genótipos de milho, quando submetidos a diferentes fontes e níveis de nitrogênio, no município de Vitória da Conquista – BA.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do milho

Desde os primórdios do século XVIII, a origem do milho começou a ser discutida, levando à formulação de várias hipóteses. O primeiro trabalho científico que demonstrou o interesse sobre a origem botânica e geográfica do milho data do ano 1829, quando o pesquisador Auguste Saint-Hilaire formulou a hipótese que relatava que o milho teria sido originado de uma forma ancestral do milho Tunicata (*Zea mays tunicata*), acreditando-se que o milho teria como centro de origem o Brasil (BARGHINI, 2004). Porém, ao longo do tempo, essa hipótese foi extinta.

Atualmente, existem, segundo Fornasieri Filho (2007), três hipóteses sobre a origem do milho, que correspondem à: “evolução divergente” do Teosinte; hipótese do “milho como antepassado do teosinte” e o milho como “descendente do teosinte”.

O milho apresenta como seu centro de origem geográfica as terras americanas, mais precisamente na região compreendida entre o México (América do Norte) e a Guatemala (América Central) (CIB, 2009).

As civilizações Incas, Maias e Astecas tinham esse fruto como sagrado e a partir da ligação geográfica existente entre a América Central e a América do Sul foram tomadas, segundo Smith (1995) citado por Barghini (2004), duas rotas de difusão: uma via Venezuela em direção às terras baixas, e outra via Colômbia e Equador, em direção às terras altas. Essas rotas contribuíram para ampla adaptabilidade aos fatores ambientais.

Até a descoberta da América, no século XV, essa planta era desconhecida em outras partes do mundo. Após a chegada de Cristovão Colombo às terras americanas e seu posterior retorno à Europa, no ano de 1493, alguns frutos foram levados e a partir de então se difundiu no continente, com posterior difusão para o resto do mundo.

O milho é uma planta monocotiledônea, pertencente à família Poaceae, Subfamília Panicoidae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. Apresenta-se como uma espécie monoica de polinização alógama, com dois tipos de inflorescência: a masculina e a feminina.

A inflorescência masculina é composta por um pendão contendo um eixo central ramificado, constituindo espiguetas, responsável pela disponibilização do pólen à parte feminina que, por sua vez, é integrado por estigmas interligados aos ovários e, quando fecundados pelos grãos de pólen, dão origem a uma semente que, em condições propícias, produzirá um fruto do tipo cariopse, contendo uma única semente, envolta por um pericarpo de coloração variada.

O grão de milho é composto por 60% de amido, 10% de proteínas e 4% de lipídeos (FANCELLI & LIMA, 1982), com alto valor energético (NORMAN e outros 1995).

A quantidade e a qualidade dos grãos variam conforme condições ambientais (RITCHIE e outros, 2003), como radiação solar, temperatura e umidade.

Além disso, as condições de manejo podem interferir de forma distinta, variando de acordo com o estágio fenológico (ALVES e outros, 2010) e os genótipos cultivados (CARGNELUTTI FILHO e outros, 2007).

O metabolismo fotossintético C4 das plantas de milho possibilita uma alta conversão fotossintética, o qual permite que a

planta reduza a abertura estomática, mesmo quando há fixação do CO₂, favorecendo uma menor perda de água pela planta (TAIZ & ZEIGER, 2004).

De acordo com Magalhães e outros (2002), outros fatores que fundamentam esse comportamento da planta de milho são: o sistema radicular mais desenvolvido que a parte aérea; a espessura e a cerosidade da cutícula e a mudança no ângulo foliar. Possibilitando, desse modo, que a demanda energética permaneça constante, mesmo em condições ambientais adversas (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Essas características justificam a alta amplitude de distribuição geográfica do milho como cultura agrícola anual, podendo ser cultivado em latitudes que variam de 58°N, no Canadá, até 40°S na Argentina, explicando, assim, o fato deste cereal ser o mais produzido e um dos mais consumidos em todo mundo.

A versatilidade de aplicação do milho também foi preponderante para sua produção e consumo, uma vez que além de ser utilizado na alimentação humana, tanto de forma *in natura* quanto como ingredientes de produtos alimentícios industrializados (PAES, 2006), também é empregado na alimentação animal (PINOTTI e outros).

No Brasil, o milho é produzido em duas épocas do ano: no verão, período que compreende a época das chuvas, conhecido como milho primeira safra; e no inverno, conhecido como milho safrinha ou segunda safra, por inicialmente representar uma época de menor produção da cultura (DUARTE e outros, 2015).

No entanto, conforme os dados publicados pela CONAB, a contribuição do milho primeira safra tem diminuído consideravelmente, com queda de 4,4% na produção de 2014, em comparação à anterior. Essa inversão da produção é consequência da utilização de novas

tecnologias empregadas no milho safrinha, que registrou um aumento de 12% em relação à safra anterior, correspondendo a 64% do milho produzido no Brasil.

Em relação à produção total de milho, houve um aumento, saindo de 80.051,7 mil toneladas na safra de 2013 para 84.729 mil toneladas na última safra, perfazendo um aumento de 5,8 % (CONAB, 2015).

A maior parte da produção do milho, cerca de 90%, está concentrada nas regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste, sendo o estado do Mato Grosso o mais representativo, com percentual de 25% do total produzido no país. Apenas esse estado produz cerca de três vezes mais do que é produzido na Região Nordeste.

Isso reflete que o nível tecnológico adotado por essas regiões é bem superior, quando comparada com a Região Nordeste, em que a produtividade não ultrapassa os 2.500 t.ha⁻¹, bem abaixo da média nacional que é de 5.382 t.ha⁻¹ (CONAB, 2015).

O Nordeste ocupa o penúltimo lugar em produção, contudo, de todos as propriedades rurais que produzem milho no Brasil, cerca de 59% estão localizadas na Região Nordeste (IBGE, 2015), o que mostra ser uma cultura muito expressiva na região, porém predominantemente praticada por produtores de pequeno porte com mão de obra familiar, pouco tecnificada e capitalizada.

Assim, faz-se necessário o uso de práticas que mitigue os custos de produção, para que haja uma maior inserção desses produtores no cenário do agronegócio local, já que maior parte da produção é destinada ao próprio consumo.

No âmbito da Região Nordeste, a Bahia é o estado com maior expressão no cultivo do milho, com 2.830 mil toneladas numa área de 801 mil hectares (CONAB, 2015).

Em vista disso, as possibilidades de avanço no cenário nacional são consideravelmente amplas, e para contribuir com isso é preciso que haja a produção de dados científicos capazes de promover um incremento de conhecimentos aplicáveis às condições econômicas e ambientais do estado.

2.2 Nitrogênio

2.2.1 Dinâmica do Nitrogênio no solo

A litosfera é o maior reservatório de nitrogênio no planeta, contendo $1,6 \times 10^{11}$ Tg. Deste valor, a porção associada à matéria orgânica é de $2,4 \times 10^5$ Tg.

Cerca de 78% dos gases da atmosfera é representada pelo N_2 , com valores estimados em $3,9 \times 10^9$ Tg. Ademais, calcula-se que a hidrosfera e a biosfera contribuem com $2,3 \times 10^7$ e $2,8 \times 10^5$ Tg, respectivamente (STEVESON e outros, 1982).

Todavia, o aporte de N disponível nos solos está vinculado à decomposição da matéria orgânica (fonte primária) (MALAVOLTA, 2006); fixação industrial, através do processo de Haber-Bocsh; fixação atmosférica, por intermédio das descargas elétricas e à fixação biológica de nitrogênio.

Durante o processo de decomposição da matéria orgânica, a biomassa microbiana necessita assimilar carbono (C) e nitrogênio (N) para síntese de compostos essenciais ao funcionamento de seu metabolismo. A dinâmica do nitrogênio do solo, através dos processos

de mineralização e imobilização, está diretamente correlacionada à dinâmica do carbono (MALAVOLTA & MORAES, 2007).

A relação C/N dos compostos orgânicos determina as reações de mineralização ou imobilização do nitrogênio pela microbiota do solo. Uma relação C/N alta, ou seja, com menor quantidade de nitrogênio, contribui com a imobilização deste elemento pelos microrganismos heterotróficos presentes no solo. E a mineralização é impulsionada pela relação C/N baixa (SILVA & MENDONÇA, 2007).

As reações de mineralização e imobilização são fundamentais no ciclo global e, conseqüentemente, na disponibilidade do nitrogênio para as plantas e microrganismos. Ambos os processos estão intrinsecamente correlacionados com os fatores edafoclimáticos e de manejo.

Estudos realizados por Vargas e outros (2005) demonstraram que, em sistema de plantio direto, a imobilização do N foi menor, quando comparada com o sistema convencional, justificada pela maior relação C/N da matéria orgânica presente nos resíduos do milho.

A mineralização é uma série de reações bioquímicas que transforma o nitrogênio orgânico em amônio (NH_4^+), através da ação de inúmeras enzimas, como proteases e desidrogenases, excretadas por microrganismos. A imobilização ocorre simultânea e inversamente a esse processo, e consiste na conversão do N inorgânico em orgânico.

O NH_4^+ liberado na mineralização é oxidado a nitrato (NO_3^-), coordenado por uma série de reações, mediadas pela ação de bactérias, processo esse conhecido como nitrificação (CANTARELLA, 2007).

O nitrato e sua forma reduzida NO_2^- (nitrito) servem como substrato para a reação de desnitrificação, que acontece na ausência de oxigênio (O_2) e permite a redução do nitrato ou nitrito às formas

gasosas, como óxido nitroso (N_2O) ou nitrogênio atmosférico (N_2) (CANTARELLA, 2007).

Em seguimento, o N_2 retorna ao sistema, fechando o ciclo do nitrogênio através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), que reduz o nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3^+) (HOFFMANN, 2007).

É estimada que a FBN global contribui com um aporte de 260 Tg. ano⁻¹ de nitrogênio, em ambientes naturais e áreas cultivadas, que respectivamente representam 88% e 12% deste total, e é tido como um dos processos mais importantes para manutenção da disponibilidade de N, pois contribui duas vezes mais com o aporte, quando comparada com a adição de fertilizantes nitrogenados no solo (GALLOWAY e outros, 2004).

É importante ponderar que somente 2% de todo nitrogênio encontrado no solo encontra-se sob a forma de nitrato e amônio (MALAVOLTA, 2006), pois essas moléculas estão em constante dinamismo, sendo as perdas expressivas neste aspecto.

Fatores ambientais como temperatura, umidade, composição e manejo do solo influenciam no teor de nitrogênio disponível e atuam sob as perdas por lixiviação e volatilização do nitrato e do amônio, respectivamente (ROCHETTE e outros, 2009).

Pesquisas realizadas por Lorensine e outros (2012) demonstraram haver uma interação positiva entre dose de adubo nitrogenado e percentual de perdas, corroborando Bortolotto e outros (2013), que encontraram uma quantidade de nitrato lixiviado 5 vezes maior em detrimento ao aumento da dose de 400 para 800 kg.ha⁻¹.

As perdas do nitrato por lixiviação se devem à baixa interação do NO_3^- com as partículas do solo, carregadas negativamente (CANTARELLA, 2007). Elevados teores de água no solo é o fator que

mais determina essa perda, pois promovem um maior carreamento desse íon.

De forma análoga, Donagemma e outros (2008), estudando a distribuição de nutrientes em colunas de latossolos, observaram uma lixiviação mais expressiva, quando irrigado com a maior lâmina de água.

Já a volatilização do amônio, a partir da sua transformação em amônia (NH_3^+), é favorecida pelo caráter alcalino do solo, pois nessas condições há uma maior quantidade do íon na solução do solo, devido à maior dissociação do amônio, variando de 0,01% em meio com pH 5,2, para 50% em pH 9,2 (CANTARELLA, 2007).

Temperaturas elevadas também estimulam a volatilização (LAI & TABATABAI, 1992.), promovendo uma maior atividade da urease, enzima que catalisa a reação que transforma a ureia em amônio.

A utilização de adubos, tanto sob a forma de amônio quanto sob a forma de ureia, está sujeita a perdas. Esta última tem a perda estimulada pela acidez no solo, sendo que o processo de hidrólise consome prótons e produz moléculas de NH_4^+ , que podem ser transformado em amônia.

A perda de ureia pode atingir valores de 80% em Neossolo Quartzarênico, 56% em Nitossolo Vermelho (SANGOI e outros, 2003) e 34% e 38%, repectivamente, em Cambissolo e Gleissolo alagados (KNOBLAUCH e outros, 2012).

2.2.1 Nitrogênio nas plantas

As plantas absorvem o amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), aminoácidos ($\text{RCHNH}_2\text{COOH}$), ureia [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] e ácido úrico ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$) (CAMPBELL, 1978). No entanto, o amônio e o

nitrato são as únicas formas que podem ser incorporadas ao esqueleto de carbono da planta (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os mecanismos pelos quais esses íons são absorvidos, transportados, redistribuídos e assimilados são distintos e variam com a natureza do íon, com a espécie de planta, com as condições climáticas do sistema solo-planta-atmosfera (SANTOS e outros, 2010) e com as condições de manejo (D'ANDRÉA, 2004).

De acordo com Silva e outros (2010), o pH constitui um dos fatores de maior importância, influenciando no equilíbrio oxidação-redução e na solubilidade de vários constituintes, bem como na forma iônica de vários elementos, além de controlar os transportes na membrana.

O nitrato se movimenta no solo por fluxo de massa e, ao entrar em contato com a superfície das raízes, penetra no vegetal contra um gradiente eletroquímico (transporte ativo), com gasto de energia, em que, para cada molécula de NO_3^- absorvida, há um influxo de dois prótons (H^+) concomitante à saída de um e, como consequência disso, o meio se torna mais alcalino (CRAWFORD, 1995; NELSON & HARVE, 1999; COLODETE, 2013).

O cátion NH_4^+ , assim como qualquer outro íon carregado positivamente, é absorvido sem gasto de energia. Cada molécula de amônio absorvido cotransporta uma molécula de H^+ e expelle dois prótons para manter o gradiente eletroquímico (HEDRICH & SCHOEDER, 1989).

Esse fato foi comprovado por resultados obtidos por Silva e outros (2010), que mostraram que a aplicação de N na forma de amônio proporcionou uma redução no pH de cerca de 25% em relação ao pH inicial.

A absorção dos íons NO_3^- e NH_4^+ pelas raízes é regulada por dois sistemas distintos de carreadores: um de alta (High Affinity Transport System – HATS) e outro de baixa afinidade (Low Affinity Transport System – LATS), com o primeiro induzido pelas baixas concentrações externas de N e o outro, de baixa afinidade, atua em condições de altas quantidades de N no solo, conforme Siddiqi e outros (1990), Lea (1993) e Von Wirén e outros, (1997). Essa característica explica os distintos mecanismos das plantas em resposta a diferentes fontes e teores de nitrogênio disponível.

Solos com pH próximo à neutralidade (pH 6) favorecem à concentrações mais elevadas do nitrato no solo devido à disponibilidade de H^+ , que participa na absorção (EPSTEIN, & BLOOM, 2006), além disso, o movimento do nitrato por fluxo de massa (OLSON & KURTZ, 1982) justifica a maior preferência deste íon pelas plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Desse modo, Carneiro e outros (2015), estudando o efeito do NO_3^- e do NH_4^+ nos parâmetros fisiológicos de plantas de seringueira, constataram que a adubação com nitrato proporcionou maior assimilação de CO_2 e transporte de elétrons, o que favoreceu ao aumento da taxa fotossintética.

Diferente disso, Souza e outros (2011), Teixeira Filho e outros (2010), Megda e outros (2009), Valderrama e outros (2011) e Queiroz e outros (2011) indicaram não haver relação entre as fontes de nitrogênio e as características avaliadas.

Resultados obtidos por Vale e outros (1998) e por Kaneko e outros (2015) mostraram que fornecimento simultâneo de nitrato e amônio proporcionou o incremento de 8% na produtividade de plantas

de milho e maior produção de matéria seca em feijoeiro, respectivamente.

Após ser absorvido, o nitrogênio é transportado para outros órgãos do vegetal via xilema (YAMADA e outros, 2007). A forma química que esse elemento é transportado varia de acordo com a espécie vegetal e sua necessidade metabólica.

De modo geral, as plantas transformam o NH_4^+ em aminoácidos logo nas raízes, posteriormente são direcionados a outros órgãos (CAMARGOS, 2012).

O nitrato pode ser reduzido nas raízes para, em seguida, ser transportado como amônio ou aminoácido ou até mesmo ser transportado da mesma forma em que foi absorvido (RODRIGUES & COUTINHO, 2000 e EPSTEIN, & BLOOM, 2006).

A demanda energética para assimilação do nitrato no esqueleto de carbono é maior, em comparação à assimilação do amônio (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000).

A incorporação do nitrato nos compostos orgânicos é mediada pela ação da enzima nitrato redutase que o reduz a nitrito, que por sua vez é reduzido a amônio pela nitrito redutase. Já o amônio é rapidamente assimilado, mas para tal a glutamina sintetase catalisa a reação de formação da glutamina que, por meio de da glutamato sintase, forma glutamato (TAIZ & ZEIGER).

Cerca de um quarto do gasto energético dos vegetais está relacionado com as várias reações envolvidas na redução do nitrato e do amônio e a posterior incorporação do nitrogênio às formas orgânicas nas plantas (EPSTEIN, & BLOOM, 2006). Esses números mostram a importância do nitrogênio para a manutenção do metabolismo vegetal.

2.2.3. Importância do nitrogênio para as plantas de milho

O nitrogênio (N) é um elemento químico indispensável para manutenção do metabolismo do vegetal. Após ser assimilado, ele participa da constituição de importantes biomoléculas, como clorofila, aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, nucleotídeos (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Em plantas de milho, inúmeros resultados têm sido divulgados e demonstram que o nitrogênio contribui no incremento dos parâmetros agronômicos, tais como: peso de mil grãos (QUEIROZ e outros, 2011 e PRICINOTTO e outros, 2014), rendimento (DEMARI, 2014) e produtividade (QUEIROZ e outros, 2011; SOUZA e outros, 2011). Esta planta apresenta alta demanda por fertilizantes nitrogenados (BASTOS e outros, 2008), sendo altamente responsiva às doses elevadas deste nutriente no solo.

Para incrementar os parâmetros, é preciso haver equilíbrio entre a demanda da planta e a quantidade de nitrogênio disponibilizada na adubação, uma vez que o percentual de N requerido no ciclo do milho perfaz 8% no 1º mês (primeiro estágio), 50% no 2º mês (segundo estágio), 28% no 3º mês e 14% no 4º mês (MALAVOLTA, 1980).

De maneira geral, as plantas de milho, nos estádios iniciais, costumam acumular pequenas quantidades de N na matéria seca, e no decorrer do seu desenvolvimento apresentam um acúmulo linear e crescente até os estádios finais (BORGES, 2006).

Esse tipo de conhecimento permite um manejo mais equilibrado e mais econômico da adubação nitrogenada para produção de milho.

Santos e outros (2010), ao estudarem o comportamento de plantas de milho em resposta a 150kg de N, aplicados em três diferentes

épocas, sob a forma de ureia em cobertura, demonstraram que a adubação total do N no estágio de 4 folhas completamente desenvolvidas foi o tratamento que proporcionou maiores teores de nitrogênio na massa seca dos grãos, constatando que 62% do N aplicado via fertilizante apresentava-se nesse órgão.

Resultados similares foram encontrados por Demari (2014), que indicou haver superioridade nos resultados, quando se aduba nos estádios iniciais, o que ratifica a maior exigência desse elemento a ser translocado na fase de formação dos grãos de milho.

A aplicação de nitrogênio nas plantas de milho pode permitir o incremento na produtividade de $1.773 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, superior à não aplicação de N (QUEIROZ e outros, 2011).

Resultados Similares também foram encontrados por Soratto e outros (2010) e Valderrama (2011), que observaram um incremento linear da produtividade do milho com a aplicação de N cujo aumento foi de, respectivamente, 7,6% e 27%, em relação ao tratamento sem adição de N em cobertura.

Mas para alcançar a produtividade em níveis satisfatórios é indispensável que haja um balanço entre as características inerentes ao solo (química, física e microbiológica) e as condições climáticas.

Os diversos sistemas de manejo empregados no solo podem interferir na eficiência de utilização do fertilizante nitrogenado pelo milho.

Resultados compilados por Figueiredo e outros (2005) demonstraram haver uma diferença na Eficiência de Recuperação do Nitrogênio do Fertilizante (ERNF), via sulfato de amônio, nos quais o teor de N nos grãos do cultivar BR 205 variou de 26%, para o sistema

de preparo com arado de aivecas e 34% para o preparo com escarificador e arado de aivecas.

A absorção do nitrato e do amônio assume comportamentos diferentes nas plantas de milho. As plantas de milho são capazes de absorver o amônio na região apical da raiz, região esta que carece de tecido vascular maduro, o que facilita sua absorção. O armazenamento do NH_4^+ ocorre predominantemente em regiões radiculares com maior presença de vacúolos na célula, esse mecanismo permite um menor efeito da toxicidade do amônio (BLOOM e outros, 2012).

Por outro lado, o nitrato é absorvido e assimilado nas regiões de maior ocorrência de tecidos mais maduros, região basal, de onde é transportado para a região meristemática da raiz (BLOOM e outros, 2012).

De acordo com Heinrichs e outros (2006), a maior parte do nitrogênio absorvido pelas plantas de milho ocorre na fase inicial (17 dias após a emergência), sob a forma de amônio.

Esses resultados são semelhantes àqueles encontrados por Maçãs (2008), que obtiveram maiores acúmulos de nitrogênio em plantas de milho com 30 dias, quando submeteu 100% da adubação na forma de amônio.

Diferentemente do exposto, dados produzidos por Queiroz e outros (2011) indicaram não haver relação entre as fontes de nitrogênio utilizadas no experimento (ureia, nitrato de amônio e ureia polimerizada), e as características avaliadas.

Assim como Soratto e outros (2010), que estudando o comportamento do milho em função de quatro diferentes fontes de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio, ureia extrusada e sulfonitrato de

amônio), observaram o incremento dos parâmetros avaliados, independente da fonte utilizada.

Baseado nesses resultados, pode-se concluir que estudos realizados com fontes de nitrogênio de origem semelhante não são indicados para comparar as respostas dos diferentes genótipos de milho.

De acordo com Bredemeier & Mundstock (2000) e Heinrichs e outros (2006), a existência de formas preferenciais de N, a taxa e a quantidade de nitrogênio absorvido e assimilado durante o ciclo da planta dependem da presença de carregadores específicos na membrana plasmática, da atividade das enzimas envolvidas no seu ciclo, da disponibilidade de energia, da taxa fotossintética, da repartição na formação de biomassa e do estágio de desenvolvimento da planta. Fatores estes controlados pela expressão de genes inerentes às plantas de milho (PATTERSON e outros, 2010 e DEMARE, 2014).

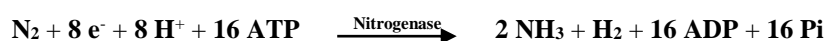
Entretanto, de forma geral, pode-se indicar o fornecimento concomitante de ambas as formas (MAÇÃS, 2008 e KANEKO e outros, 2015), já que podem proporcionar incrementos positivos às plantas de milho.

2.4 Bactérias diazotróficas e Fixação Biológica de Nitrogênio em gramíneas

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo natural de conversão do nitrogênio atmosférico (N_2) à amônia (NH_3^+), mediada pela ação de microrganismos, sejam eles de vida livre ou associados simbioticamente a outros organismos, sendo as bactérias os mais expressivos nesse processo.

A fixação só ocorre devido à capacidade de microrganismos procariotos capazes de produzir a enzima nitrogenase, que atua na quebra das ligações triplas covalentes entre as duas moléculas de nitrogênio, e outros componentes do sistema, indispensáveis ao processo de fixação.

A reação a seguir corresponde à transformação do nitrogênio atmosférico em amônia (YAMADA e outros, 2007):



A condição de baixa concentração de oxigênio (O₂) do sistema em que ocorrerá a FBN é indispensável para que aconteça o processo, pois altos níveis de oxigênio (O₂) provoca irreversível inativação da enzima.

Segundo Marin e outros (1999), existem três grupos de bactérias diazotróficas: as de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso; as associativas, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose; e as simbióticas, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Este último é conhecido como rizóbio, capaz de se hospedar em plantas leguminosas, como a soja e o feijoeiro, viabilizando o funcionamento do sistema agrícola com doses reduzidas de adubos nitrogenados.

No entanto, as gramíneas interagem com esses microrganismos de maneira associativa, sem a formação de estrutura especializada, como é o caso das espécies pertencentes ao gênero *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* (BALDANI & BALDANI, 2005),

Beijerinckia (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958) e *Burkholderia* (BALDANI e outros, 1997).

Segundo Baldani e outros (1997), existem três categorias de bactérias diazotróficas associadas às plantas não leguminosas: rizosféricas, endofíticas facultativas e endofíticas obrigatórias.

As bactérias dos gêneros *Beijerinckia spp.* e *Azotobacter spp.* são consideradas como rizosféricas; como endofíticas facultativas pode-se exemplificar o gênero *Azospirillum spp.* e *Klebsiella spp.*; e as pertencentes aos gêneros *Derxia spp.*, *Gluconacetobacter spp.*, *Herbaspirillum spp.* e *Azoarcus spp.* são endofíticas obrigatórias, conforme citado por Moreira e outros (2010).

Como as bactérias associativas não formam estruturas como os nódulos, onde estariam mais estáveis (MOREIRA e outros, 2010), elas utilizam mecanismos capazes de favorecer sua proteção do meio externo, tais como: a proteção respiratória através da redução da taxa respiratória na qual são capazes de minimizar a concentração O₂ da superfície da célula; ativando e desativando a nitrogenase, quando há, respectivamente, menor e maior concentração da molécula; e através da produção de polissacarídeos extracelulares.

Todos esses mecanismos se baseiam no fato desses microrganismos ocuparem preferencialmente regiões onde a concentração de oxigênio é baixa o suficiente para não provocar danos à nitrogenase (DÖBEREINER e outros, 1997).

Segundo Jeger & Spence (2001), o processo de colonização é dividido em duas etapas: pré-colonização e pós-colonização.

Na pré-colonização, a bactéria se move até o contato com a superfície da raiz, estabelece o reconhecimento da interação planta-bactéria e finalmente penetra no vegetal (no caso das endofíticas).

Enquanto que a pós-colonização compreende a multiplicação em locais de maior preferência da bactéria.

A interação entre planta-bactéria associativa fixadora de nitrogênio é estimulada pelas substâncias exsudadas pelas raízes das plantas, nas quais têm sua composição variada de acordo com o genótipo da planta, fatores bióticos e abióticos (KENNEDY, 1997) e a forma de manejo (FAGOTTI e outros, 2012).

Assim, é comum a presença de diferentes comunidades dessas bactérias associadas a diferentes espécies (MOREIRA e outros, 2010) e genótipo (GOMES, 2009).

As bactérias rizosféricas e/ou endofíticas chegam até as superfícies das raízes através da quimiotaxia, um estímulo induzido pela diferença de potencial químico provocada pela absorção dos nutrientes, movimento da água e produção de exudados (entre outros) (JEGER & SPENCE, 2001), facilitado, no caso dos gêneros *Herbaspirillum spp.*, *Burkholderia spp.* e *Azospirillum spp.*, pela estrutura motora conhecida como flagelos (KENNEDY, 1997).

De acordo com Perin e outros (2003), o estabelecimento endofítico, comparado ao ambiente rizosférico, é considerado como um fator relevante para que as bactérias possam influenciar de forma mais eficiente no crescimento da planta, visto que no interior do vegetal a competição microbiana é menor, além de ser menos sujeito a flutuações ambientais e a interface de troca de metabólitos.

Após o reconhecimento da planta por parte das bactérias diazotróficas, a penetração acontece comumente nas zonas de crescimento das raízes laterais, onde se rompe a camada de células da epiderme, originando cavidades que facilita a penetração das bactérias,

podendo ocorrer também em locais onde há ferimentos (REIS E OLIVARES, 2006).

Uma vez dentro da planta, as bactérias diazotróficas endofíticas estão localizadas principalmente nos espaços intercelulares (HOFFMANN, 2007).

A capacidade de mobilidade bacteriana, associada ao movimento de água durante o processo de transpiração e ao comportamento do xilema como condutor, torna possível que as bactérias cheguem até os órgãos vegetativos e reprodutivos da parte aérea das plantas (ZIMMER e outros, 2012).

A localização da bactéria dentro da planta é muito dependente da associação planta-bactéria, sugerindo especificidade dessa interação (HOFFMANN, 2007). Em plantas de arroz, observou-se maior contribuição da fixação biológica de nitrogênio em tecidos foliares colonizados com *Azospirillum brasiliense* (PEDRAZA e outros, 2009).

Considerando este mesmo gênero de bactéria em plantas de milho, houve maior predominância nos tecidos radiculares, quando comparado com a parte aérea (GOMES, 2009).

Por outro lado, resultados compilados por Gomes (2009) indicam que o número de bactérias endofíticas diazotróficas nas raízes de milho do mesmo genótipo, pode atingir 50% a 99,26% da colonização, quando comparada ao percentual da parte aérea, nos biomas da Mata Atlântica e Cerrado, respectivamente. Sugerindo, desse modo, que os fatores externos são cruciais para haver manutenção da interação planta-bactéria.

As bactérias diazotróficas associativas utilizam inúmeros mecanismos capazes de estabelecer a colonização das plantas e assim fixar nitrogênio.

A FBN em sistemas agrícolas pode contribuir significativamente com o aporte de N nos solos, com valores que podem variar de 60 a 107 kg de N. ha⁻¹.ano⁻¹ em áreas cultivadas com cana-de-açúcar (URQUIAGA e outros 2012) e de 17 a 54 kg. ha⁻¹ em cultivos de capim elefante (MORAIS, 2008).

2.5 Bactérias diazotróficas associadas ao cultivo do milho

Diferentes genótipos de milho respondem de forma distinta à inoculação com bactérias (DOTTO e outros, 2010), como verificado por Vogt e outros (2014), que demonstraram haver diferentes respostas de produtividade entre oito genótipos de milho, em função da presença ou ausência da inoculação com *Azospirillum*.

Resultados similares foram encontrados por Lopes e outros (2008) que, ao estudar o efeito da inoculação com *Herbaspirillum* em duas variedades de milho BR 106 e BRS 1030, obtiveram diferentes respostas, um incremento e uma redução de produtividade, respectivamente.

Esse comportamento é devido à interação específica que cada genótipo de milho exerce com as bactérias diazotróficas (MONTAÑEZ e outros, 2009) e vice-versa, pois a interação é controlada por fatores genéticos e regulada por fatores ambientais (REIS & TEIXEIRA, 2014).

As bactérias diazotróficas, mais precisamente as pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, fixam o nitrogênio em regiões de baixas concentrações de oxigênio (DÖBEREINER e outros, 1995), sendo este limitante para o seu desenvolvimento, já que a nitrogenase é uma enzima altamente sensível ao oxigênio e necessita de condições anaeróbias para sua atividade.

Apesar disso, as bactérias diazotróficas precisam regular o suprimento de oxigênio para prover ATP e ao mesmo tempo proteger a nitrogenase contra seu efeito deletério (REIS & TEIXEIRA, 2014).

Nesse aspecto, as bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* apresentam um mecanismo chamado de microaerofilia, capaz de reduzir a quantidade de oxigênio demandada.

No que diz respeito ao comportamento do milho, quando submetido à inoculação com bactérias diazotróficas, em comparação à adubação nitrogenada, são encontrados diferentes resultados.

Para Lana e outros (2012), que estudaram o desenvolvimento e a produtividade do milho em resposta à inoculação com *Azospirillum brasilense*, associada à adubação nitrogenada, a inoculação proporcionou um aumento significativo na produtividade, mesmo quando confrontada com a maior dose de nitrogênio aplicado via fertilização mineral. Resultados análogos a esses foram encontrados por Reis Junior e outros (2008).

Contudo, os dados obtidos por Godoy e outros (2011) mostraram que a inoculação com estirpes de *Azospirillum brasilense* não apresentou resposta na cultura do milho para o parâmetro produtividade.

Machado e outros (1998) concluíram que a inoculação juntamente com a adubação de 100 Kg de N ha⁻¹ não se mostrou diferente estatisticamente do tratamento sem inoculação e com a mesma dose de N, indicando que a presença da bactéria pouco influenciou na produção de grãos de milho.

Como diferentes repostas são encontradas, quando se correlaciona a presença de bactérias diazotróficas concomitante ao uso de adubo nitrogenado em plantas de milho, faz-se necessário o

desenvolvimento de pesquisas para consolidar os conhecimentos ligados ao comportamento desses microrganismos em diferentes condições ambientais e de manejo.

Pesquisas utilizando bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho são recorrentes. Roesch e outros (2008) constataram que a diversidade dessas bactérias apresenta-se de forma distinta a depender da parte da planta de milho, e concluíram que o *Azospirillum* predomina na região da rizosfera, enquanto o *Herbaspirillum* foi encontrado em maior número no interior das plantas.

A associação desses gêneros com plantas de milho trazem benefícios visíveis, tais como a produção do hormônio auxina demonstrada por Crozier e outros (1988) e Bastián e outros (1998), e a solubilização de fosfato mediada pela ação de bactérias diazotróficas.

Além disso, podem contribuir com o aumento do sistema radicular, favorecendo a maior absorção de nutrientes e água do solo, como foi observado por Reis Junior e outros (2008), que observaram uma maior produção de matéria seca de raízes e acúmulo de nutrientes por plantas de milho, quando submetidas à inoculação com *Azospirillum amazonense*, corroborando os dados coletados por Araújo e outros (2013).

A eficiência da fixação biológica de nitrogênio em milho é bem relativa. Porém, o potencial de uso de bactérias diazotróficas tem sido respaldado por estudos que provam que se pode alcançar produtividade consideravelmente satisfatória, como comprovado por Lana e outros (2012), que obtiveram uma produção de 6662,3 Kg ha⁻¹ para o milho inoculado e 6956,0 kg ha⁻¹, quando apenas adubado, havendo, desse modo, uma diferença de produtividade de 294 kg ha⁻¹.

Em vista disso, o uso da inoculação pode ser uma alternativa mais sustentável ao uso de adubos nitrogenados, pois estes representam 40% dos custos totais de produção de milho (MACHADO e outros, 1998).

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da área experimental

Foram implantados dois experimentos, ambos conduzidos no campo experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus de Vitória da Conquista, no qual as coordenadas geográficas compreendem 14°88' latitude sul, 40°79' longitude oeste, com altitude aproximada de 875 metros (INMET, 2014).

Para a montagem dos experimentos, foi coletado solo da camada de 0-20 cm de um Latossolo Amarelo Típico, o qual foi, posteriormente, submetido à análise química na UESB.

Os resultados da análise demonstraram as seguintes características: pH em H₂O = 5,9; CTC efetiva = 5,7; P = 3,0 mg dm⁻³; K = 0,38 cmol_c dm⁻³; Ca = 3,7 cmol_c dm⁻³; Mg = 1,5 cmol_c dm⁻³; Al = 0,1 cmol_c dm⁻³.

De acordo com o resultado da análise, recomendou-se a quantidade de fertilizantes, segundo a Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (ALVAREZ & RIBEIRO, 1999), considerando como parâmetro o milho grão. Desse modo, foi recomendada adubação de 230 g de superfosfato simples e 0,52 g de Cloreto de Potássio, adicionadas em vasos com volume de 10 dm³, os quais foram utilizados nos experimentos.

3.2 Delineamento experimental

Os dois experimentos foram conduzidos durante 75 dias, contados a partir da emergência das plantas, período este que marcou o final da fase vegetativa.

Para cada experimento, foi utilizado um genótipo de milho diferente: AG 1051 e AL bandeirante.

A disposição dos ensaios experimentais foi feita em blocos inteiramente casualizados e distribuídos em esquema fatorial do tipo 5 x 3 + 2 com 5 e 4 repetições (para o genótipo AG1051 e ALBandeirantes, respectivamente), sendo cinco estirpes, três combinações de nitrogênio e mais dois tratamentos adicionais que correspondiam à adubação com 100% de nitrato de cálcio e 100% de sulfato de amônio.

Os experimentos foram compostos por 17 tratamentos, com parcelas constituídas por vasos com capacidade volumétrica de 10 dm³, cada um contendo 1 planta.

A tabela 1 mostra os 17 tratamentos formados pela combinação entre diferentes estirpes e níveis de nitrogênio, utilizadas tanto para o genótipo AG 1051 quanto para o AL Bandeirante.

Tabela 1 – Especificações dos tratamentos oriundos da combinação entre as estirpes e proporções de nitrogênio.

Inoculação	Nitrogênio (Ca(NO ₃) ₂ : (NH ₄) ₂ SO ₄)	Tratamentos
16B *	N1 (25%:75%)	16BN1
	N2 (50%:50%)	16BN2
	N3 (75%:25%)	16BN3

17B	N1 (25%:75%)	17BN1
	N2 (50%:50%)	17BN2
	N3 (75%:25%)	17BN3
N6	N1 (25%:75%)	N6N1
	N2 (50%:50%)	N6N2
	N3 (75%:25%)	N6N3
J9	N1 (25%:75%)	J9N1
	N2 (50%:50%)	J9N2
	N3 (75%:25%)	J9N3
SI	N1 (25%:75%)	SIN1
	N2 (50%:50%)	SIN2
	N3 (75%:25%)	SIN3
A1	100% Nitrato de Cálcio	
A2	100% Sulfato de Amônio	
TOTAL	17	

* Estirpe16B: Similar ao gênero *Azospirillum*, isolada de plantas de arroz (VIANA, 2012); Estirpe 17B: Similar ao gênero *Azospirillum*, isolada de plantas de arroz (VIANA, 2012); Estirpe N6: Similar ao gênero *Azospirillum*, isolada de plantas de milho (SANTOS, 2012); Estirpe J9: Similar ao gênero *Herbaspirillum*, isolada de plantas de milho; SI: Sem inoculação.

Nos dois experimentos, utilizou-se espaçamento de 25 cm entre parcelas e 75 cm entre blocos, totalizando uma área de 25,5 m² orientados de leste a oeste, no sentido do comprimento do bloco.

3.3 Descrição dos genótipos

Nos experimentos foram utilizados dois genótipos de milho: AG 1051 e AL Bandeirantes. Ambos são híbridos de ciclo semiprecoce e de boa adaptabilidade às condições climáticas de Vitória da Conquista.

A seguir, estão descritas algumas características desses híbridos:

- AG 1051 – Esse híbrido, produzido pela Agrocere, apresenta um porte alto e também uma alta inserção de espiga, na qual produz grão dentado de coloração amarelo creme, sendo seu principal fim a produção de milho verde e silagem de planta inteira, pois apresenta um alto potencial de produção de matéria seca e de proteína (AGROCERES, 2014).
- AL Bandeirante – Híbrido produzido pela empresa Cati, tem porte alto, com inserção da espiga em torno de 1,25 metros, produz grão do tipo semiduro de coloração amarela alaranjada. É considerado como um híbrido de alta rusticidade, mostrando alta resistência ao acamamento e à quebra (CATI, 2014).

3.4 Inoculação e Plantio

Em ambos os experimentos, o plantio foi realizado no dia 17/06/2015, em vasos com capacidade volumétrica de 10 dm³. No momento do plantio, em cada parcela foram colocadas para germinar quatro sementes, previamente inoculadas com 1mL do meio DYGS líquido, contendo 10⁸ células.g⁻¹.

Aos 13 dias após o plantio, as plantas emergiram, procedendo nesse momento o desbaste, deixando apenas uma plântula em cada vaso.

3.5 Adubação Nitrogenada

Para adubação nitrogenada, foi utilizada a dose de 90 kg.ha⁻¹, como recomendada por Jesus (2014), sendo o N fornecido sob duas formas: Nitrato de Cálcio Ca(NO₃)₂ e Sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, combinados nas seguintes proporções: 25%:75%; 50%:50%; 75%:25%, respectivamente.

A adubação nitrogenada foi distribuída em cobertura, na forma de solução, e parcelada em duas aplicações, sendo a primeira, 15 dias após a emergência, e a segunda, 15 dias após a primeira aplicação.

3.6 Avaliações

- Avaliação Morfológica

Esta avaliação teve início 15 dias após a segunda aplicação do nitrogênio (30 DAE) e foram repetidas quinzenalmente até os 75 DAE. Foram determinados o número de folhas, a altura (cm) e o diâmetro do caule (mm) de cada parcela experimental.

A massa fresca e seca da parte aérea(g) foram mensuradas após os 75 DAE. Cada parcela experimental foi coleta, pesada e posteriormente encaminhada para secagem em estufa a 65°C até a observação do peso constante.

- *Quantificação da clorofila*

Essa análise foi realizada aos 75 DAE, através do clorofilômetro do tipo SPAD-520. Foram efetuadas 3 leituras na parte adaxial, a 2 cm da margem e no terço médio da última folha totalmente desenvolvida.

3.7 Análise estatística

Os dados foram tabulados e submetidos ao teste de normalidade, para que homogeneidade fosse confirmada. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey utilizando o software Assistat (SILVA & AZEVEDO, 2009).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I: Comportamento do híbrido de milho AG1051 à adubação nitrogenada e à inoculação com bactéria diazotrófica

Não houve interação significativa entre as estirpes e os níveis de nitrogênio para a altura do híbrido de milho, evidenciando que, para este parâmetro, os efeitos das estirpes independem das proporções de nitrogênio mineral.

Resultados similares também foram obtidos por Araújo e outros (2013), que não observaram significância entre a interação da inoculação e a adubação nitrogenada para a variável altura.

A variável altura foi crescente ao longo do experimento, com maior expressividade de aumento observado entre os 60 e os 75 DAE. Desse modo, a partir das diferenças significativas entre as médias de altura aos 75 DAE, pode-se indicar que o fator estirpe foi preponderante para esse resultado.

Como mostra a Tabela 2, a maior média da altura foi associada à estirpe 17B, 15% superior à J9, respectivamente, *Azospirillum* e *Herbaspirillum*. As estirpes 16B, N6 e SI não diferiram entre si, porém, foram superiores a J9 e inferiores a 17B.

Tabela 2 – Altura de plantas de milho aos 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AG1051, inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.

Fatores	GL	ALTURA (cm)			
		30 DAE	45 DAE	60 DAE	75 DAE
Estirpe	4	ns	ns	ns	*
16B ¹ (<i>Azospirillum</i>)		40,60	50,98	53,58	71,83 ab
17B (<i>Azospirillum</i>)		40,81	52,45	53,68	78,98 a

N6 (<i>Azospirillum</i>)		39,13	53,42	52,28	75,73 ab
J9 (<i>Herbaspirillum</i>)		36,34	50,27	48,70	66,95 b
SI (Sem inoculação)		39,53	49,63	50,22	73,87 ab
Nitrogênio	2	ns	ns	ns	ns
Ca(NO ₃) ₂ :					
(NH ₄) ₂ SO ₄					
N1 (25%:75%)		38,91	52,38	52,73	72,68
N2 (50%:50%)		39,66	50,93	51,82	75,14
N3 (75%:25%)		39,26	50,92	50,52	72,59
E vs N	8	ns	ns	ns	ns
Fatorial vs Adicionais	1	*	ns	ns	ns
Fatorial		39,28 a	47,88	51,69	73,47
Adicionais		35,42 b	49,26	50,81	68,45
Adicionais	1	ns	ns	**	ns
A1		33,78	47,64	44,40 b	62,62
A2		37,06	50,88	57,22 a	74,28
Tratamentos	16	ns	ns	ns	ns
Blocos	4	ns	ns	ns	ns
Resíduo	64				
Total	85				
C.V. (%)		14,62	11,65	12,71	13,30

*, **, ns. Significativo para 5%, 1% e não significativo, respectivamente, pelo Teste Tukey. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. ¹ Estirpe 16B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe 17B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe N6: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de milho ; Estirpe J9: Similar ao *Herbaspirillum* spp, isoladas de milho; SI: Sem inoculação; N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio; A1: 100% de nitrato de cálcio e A2: 100% de sulfato de amônio; CV: coeficiente de variação.

Esse resultado pode ser justificado pelo fato das bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* apresentarem-se mais versáteis para sobreviver no solo e entrar em contato com as raízes (MOREIRA e outros, 2010), podendo se estabelecer tanto no interior das mesmas, quanto na sua superfície. Não ocorrendo o mesmo com as bactérias do gênero *Herbaspirillum*, que são endofíticos obrigatórios (PERIN e outros, 2003), e que, neste caso, possivelmente não houve colonização eficiente, já que a altura média das plantas inoculada com essa bactéria foi menor até mesmo nos tratamentos não inoculados.

A resposta da altura das plantas de milho é dependente do nitrogênio (PRICINOTTO e outros, 2014). Como os tratamentos inoculados com *Herbaspillum* foram inferiores, possivelmente o estabelecimento dessa bactéria no híbrido AG1051 pode ter limitado a disponibilidade de N oriundo da fixação biológica de nitrogênio e assim reduzido seu fornecimento às plantas.

Houve diferenças estatísticas entre os tratamentos fatoriais e os tratamentos adicionais (TABELA 2). Os tratamentos fatoriais, ou seja, os inoculados e adubados com nitrato e amônio, tiveram média da altura de 39,28 cm aos 30 DAE, com 3,86 cm superiores à altura média dos tratamentos adicionais, sem inoculação.

De forma geral, a inoculação concomitante ao fornecimento de ambas as formas de nitrogênio influenciou na superioridade dos tratamentos fatoriais, já que proporcionou maiores incrementos da altura das plantas de milho aos 30 DAE.

Quando se comparou a resposta da altura entre tratamentos adicionais, os maiores valores da altura foram encontrados para as plantas que receberam 100% da dose de N sob a forma de sulfato de amônio (TABELA 2). Mas os tratamentos adicionais foram estatisticamente diferentes entre si, somente aos 60 DAE.

O fornecimento de 100% do nitrogênio sob a forma de sulfato de amônio incrementou em 29% a média da altura, aos 60 DAE, quando comparada com a adubação de 100% de nitrato de cálcio. Esse resultado corrobora os dados recorrentes na literatura, indicando que as plantas de milho absorvem preferencialmente o amônio ao invés do nitrato (HEINRICHS e outros, 2006).

Para a variável diâmetro, os efeitos da interação entre estirpe e níveis de nitrogênio não foram significativos.

Foram encontradas diferenças significativas entre as médias do diâmetro aos 75 DAE. O tratamento N1 (25% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) apresentou valores de diâmetro 2,24 e 1,18 mm maiores que N2 e N3, respectivamente (TABELA 3).

Tabela 3 – Diâmetro aos 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AG1051, inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.

Fatores	GL	DIÂMETRO (mm)			
		30 DAE	45 DAE	60 DAE	75 DAE
Estirpe	4	ns	ns	ns	ns
16B ¹ (<i>Azospirillum</i>)		22,82	25,59	23,90	22,54
17B (<i>Azospirillum</i>)		21,87	25,07	23,13	21,74
N6 (<i>Azospirillum</i>)		21,42	25,47	23,60	23,04
J9 (<i>Herbaspirillum</i>)		21,71	25,89	24,14	22,60
SI (Sem inoculação)		22,03	25,18	24,07	23,00
Nitrogênio	2	ns	ns	ns	**
Ca(NO ₃) ₂ :					
(NH ₄) ₂ SO ₄					
N1 (25%:75%)		22,65	26,19	24,58	23,96 a
N2 (50%:50%)		21,64	24,98	23,49	21,72 b
N3 (75%:25%)		21,62	25,15	23,23	22,07 b
E vs N	8	ns	ns	ns	ns
Fatorial vs Adicionais	1	ns	ns	ns	ns
Fatorial		21,97	25,44	23,77	22,5
Adicionais		20,66	24,75	22,48	21,81
Adicionais	1	ns	ns	ns	ns
A 1		21,04	24,80	22,28	21,38
A2		20,28	24,70	22,68	22,24
Tratamentos	16	ns	ns	ns	ns
Blocos	4	ns	*	ns	ns
Resíduo	64				
Total	85				
C.V. (%)		11,15	8,77	8,63	11,96

*, **, ns. Significativo para 5%, 1% e não significativo, respectivamente pelo Teste Tukey. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. ¹ Estirpe 16B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe 17B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe N6: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de milho; Estirpe J9: Similar ao *Herbaspirillum* spp, isoladas de milho; SI: Sem inoculação; N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de

amônio; A1: 100% de nitrato de cálcio e A2: 100% de sulfato de amônio; CV: coeficiente de variação.

Oliveira e outros (2008) obtiveram dados semelhantes ao avaliar o efeito de diferentes relações amônio:nitrato no desenvolvimento inicial do milho pipoca, quando observaram o incremento no diâmetro do colmo à medida que se aumentou a participação do amônio.

Os resultados observados na Tabela 4 demonstram que os efeitos das estirpes sobre o número de folhas do milho independem dos percentuais combinados entre o nitrato e o amônio, e vice-versa.

Tabela 4 – Número de folhas aos 30, 45, 60, 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AG1051, inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.

Fatores	GL	NÚMERO DE FOLHAS			
		30 DAE	45 DAE	60 DAE	75 DAE
Estirpe	4	Ns	ns	ns	ns
16B ¹ (<i>Azospirillum</i>)		4,93	6,93	8,40	8,93
17B (<i>Azospirillum</i>)		5,13	7,20	8,60	9,13
N6 (<i>Azospirillum</i>)		4,86	7,20	8,53	9,20
J9 (<i>Herbaspirillum</i>)		4,80	6,86	8,13	8,86
SI (Sem inoculação)		4,93	6,80	8,13	9,40
Nitrogênio	2	ns	ns	ns	ns
Ca(NO ₃) ₂ : (NH ₄) ₂ SO ₄					
N1 (25%:75%)		5,00	7,20	8,44	9,12
N2 (50%:50%)		4,84	6,96	8,28	9,20
N3 (75%:25%)		4,96	6,84	8,36	9,00
E vs N	8	ns	ns	ns	ns
Fatorial vs Adicionais	1	ns	ns	ns	*
Fatorial		4,93	7,00	8,36	9,1 a
Adicionais		4,60	7,20	8,20	8,2 b
Adicionais	1	ns	ns	ns	ns
A 1		4,40	7,20	8,00	8,60
A2		4,80	7,20	8,40	7,80
Tratamentos	16	ns	ns	ns	ns
Blocos	4	ns	*	ns	**
Resíduo	64				
Total	85				

C.V. (%)	12,23	10,89	9,79	11,46
----------	-------	-------	------	-------

*, **, ns. Significativo para 5%, 1% e não significativo, respectivamente pelo Teste Tukey. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. ¹ Estirpe 16B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe 17B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe N6: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de milho ; Estirpe J9: Similar ao *Herbaspirillum* spp, isoladas de milho; SI: Sem inoculação; N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio; A1: 100% de nitrato de cálcio e A2: 100% de sulfato de amônio; CV: coeficiente de variação.

Ao Analisar as médias (TABELA 4), observa-se que, aos 75 DAE, os tratamentos fatoriais incrementaram em, aproximadamente, 11% no número de folhas em relação aos tratamentos que receberam apenas a adubação mineral.

O fornecimento simultâneo do nitrogênio oriundo do fertilizante mineral e do N proveniente da inoculação com bactérias diazotróficas, provavelmente, contribuiu para o resultado observado aos 75 DAE, visto que o suprimento de N interfere diretamente no número de folhas, como foi exposto por Gondim e outros (2010).

Houve efeito significativo para a interação entre as estirpes e os níveis de nitrogênio, SPAD e MSPA (TABELA 5).

O índice SPAD, a MFPA e a MSPA não foram influenciados pela inoculação das estirpes e pelas diferentes proporções de nitrogênio mineral (TABELA 5).

Tabela 5 – Índice SPAD, Massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas de milho do híbrido AG1051, inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.

Fatores	GL	SPAD	MFPA (g)	MSPA (g)
Estirpe	4	ns	ns	ns
16B ¹ (<i>Azospirillum</i>)		31,39	141,33	38,13
17B (<i>Azospirillum</i>)		31,72	141,33	39,73
N6 (<i>Azospirillum</i>)		32,22	147,20	39,73
J9 (<i>Herbaspirillum</i>)		31,60	129,60	35,20

SI (Sem inoculação)		30,51	135,06	36,66
Nitrogênio	2	ns	ns	ns
Ca(NO ₃) ₂ :				
(NH ₄) ₂ SO ₄				
N1 (25%:75%)		31,80	142,16	38,96
N2 (50%:50%)		31,08	142,56	38,64
N3 (75%:25%)		31,58	132,00	36,08
E vs N	8	*	ns	*
Fatorial vs Adicionais	1	ns	ns	ns
Fatorial		31,44	138,90	37,89
Adicionais		32,06	128,8	35,80
Adicionais	1	ns	ns	ns
A1		30,98	118,00	32,40
A2		33,14	139,60	38,80
Tratamentos	16	ns	ns	ns
Blocos	4	*	*	ns
Resíduo	64			
Total	85			
C.V. (%)		13,42	18,32	18,63

*, **, ns. Significativo para 5%, 1% e não significativo, respectivamente pelo Teste Tukey. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. ¹ Estirpe 16B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe 17B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe N6: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de milho; Estirpe J9: Similar ao *Herbaspirillum* spp, isoladas de milho; SI: Sem inoculação; N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio; A1: 100% de nitrato de cálcio e A2: 100% de sulfato de amônio; CV: coeficiente de variação.

Independentemente dos níveis de N, a ausência de inoculação (SI) proporcionou os menores valores médios do índice SPAD (FIGURA 1).

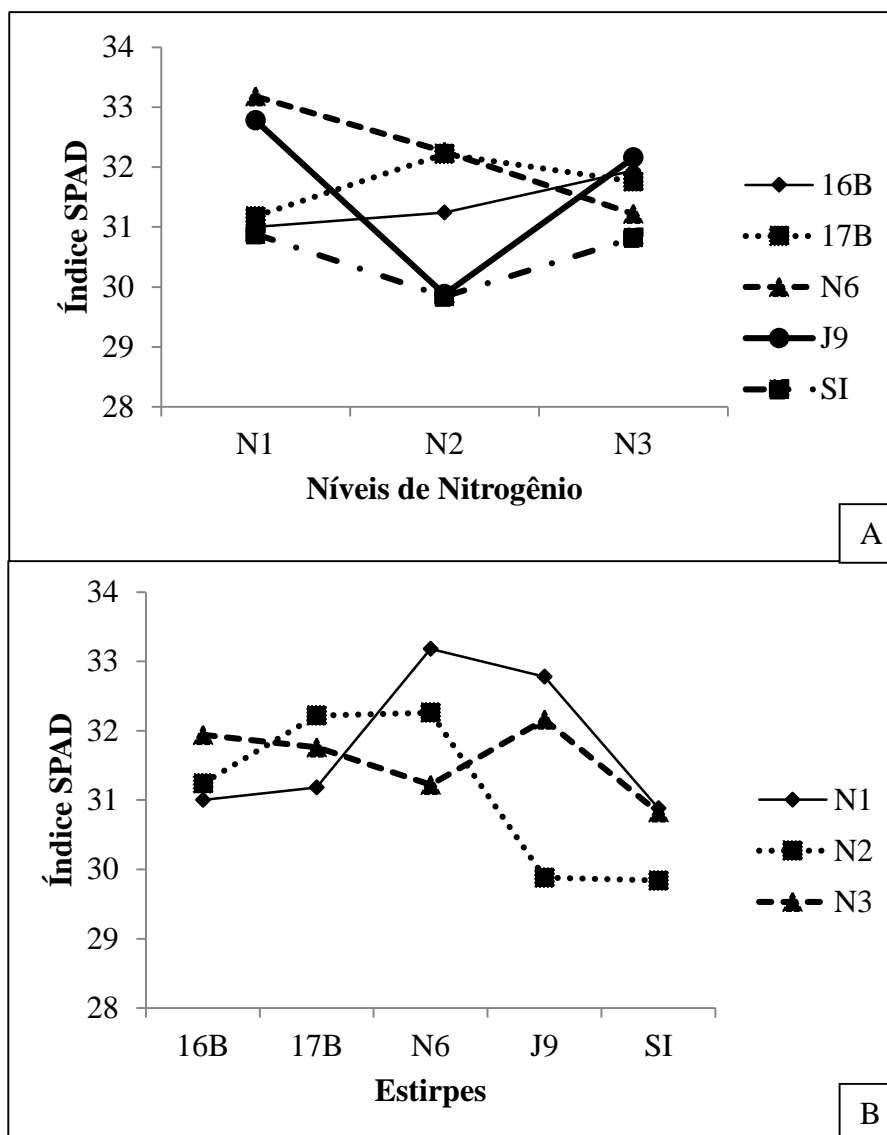


Figura 1 – Índice SPAD para o efeito da inoculação em função dos níveis de N (A). Índice SPAD para o efeito dos níveis de N em função da inoculação (B). N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio.

Cadore (2014) obteve resultados que indicaram que o teor de clorofila foi superior para os tratamentos que foram simultaneamente adubados com N e inoculados com bactérias do gênero *Azospirillum*.

Ao estudar o comportamento de plantas de milho à inoculação e à adubação nitrogenada, Baldani & Baldani (2005) concluíram que os teores mais elevados de clorofila estavam associados aos tratamentos com inoculação de *A.brasilense*, acrescido de 120 kg ha⁻¹ de N, ou apenas adubado com 120 kg ha⁻¹ de N, e atribuiu esses resultados à suplementação adicional de N via fertilizante mineral, que proporcionou plantas bem nutridas, capazes de liberar exsudatos e estabelecer o reconhecimento químico por parte das bactérias diazotróficas.

De forma geral, a estirpe N6 (*Azospirillum*) combinada com a adubação de 25% de Ca(NO₃)₂ e 75% de (NH₄)₂SO₄, expressou superioridade quanto ao índice SPAD (FIGURA 1).

Esse resultado pode ter ocorrido devido à estirpe ser oriunda de isolamentos de plantas de milho, pois, de acordo com Baldani & Baldani (2005), estas apresentam maior capacidade de estabelecimento em plantas de mesma espécie. Além disso, a adubação com 75% de (NH₄)₂SO₄, provavelmente, reduziu o gasto energético necessário à assimilação do nitrato e à incorporação do N em moléculas orgânicas como clorofila (MALAVOLTA, 2006; BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000).

A adição de 50% de Ca(NO₃)₂ e 50% de (NH₄)₂SO₄ (N2) e a inoculação com a estirpe de *Herbaspirillum* (J9) reduziu os valores do SPAD (FIGURA 1). Entretanto, para o mesmo nível de nitrogênio (N2) inoculado com a estirpe do gênero *Azospirillum* (N6), esses valores foram 7,5% maiores.

Apesar de não haver diferenças estatísticas entre as médias do índice SPAD de plantas de milho, Araújo (2014) indicou que a inoculação com *Azospirillum*, associada ou não à adubação com N,

incrementou na característica avaliada, quando comparada com as bactérias do gênero *Herbaspirillum*, submetidas às mesmas condições.

Apesar de não haver diferenças estatísticas entre as médias, a Figura 2 mostra que o fornecimento de 75% de nitrato de Cálcio e 25% de sulfato de amônio (N3), independentemente da inoculação, induziu a menor produção de MSPA para as plantas de milho.

Reis Júnior e outros (2008), de forma análoga, evidenciaram um incremento de 71% na massa seca da parte aérea de plantas de milho adubadas com 25% de nitrato e 75% de amônio, tanto na presença como na ausência da bactéria fixadora de N.

As plantas de milho em desenvolvimento inicial absorvem preferencialmente o nitrogênio sob a forma de NH_4^+ (HEINRICHS e outros, 2006) (WARNCKE & BARBER, 1973.), visto que nesta fase há presença de tecidos pouco lignificados, o que facilita a absorção do amônio pelas plantas de milho (BLOOM e outros, 2012)

A assimilação do nitrato implica em maior gasto energético, se comparado com o amônio, que pode ser prontamente incorporado ao esqueleto de carbono da planta (TAIZ & ZEIGER, 2004). Desse modo, a massa seca pode ser considerada como uma variável de grande relevância para se estimar essa conversão.

Na Figura 2 observa-se que a MSPA do milho inoculado com a estirpe J9 (*Herbaspirillum*) reduziu à medida que a concentração de nitrato aumentava.

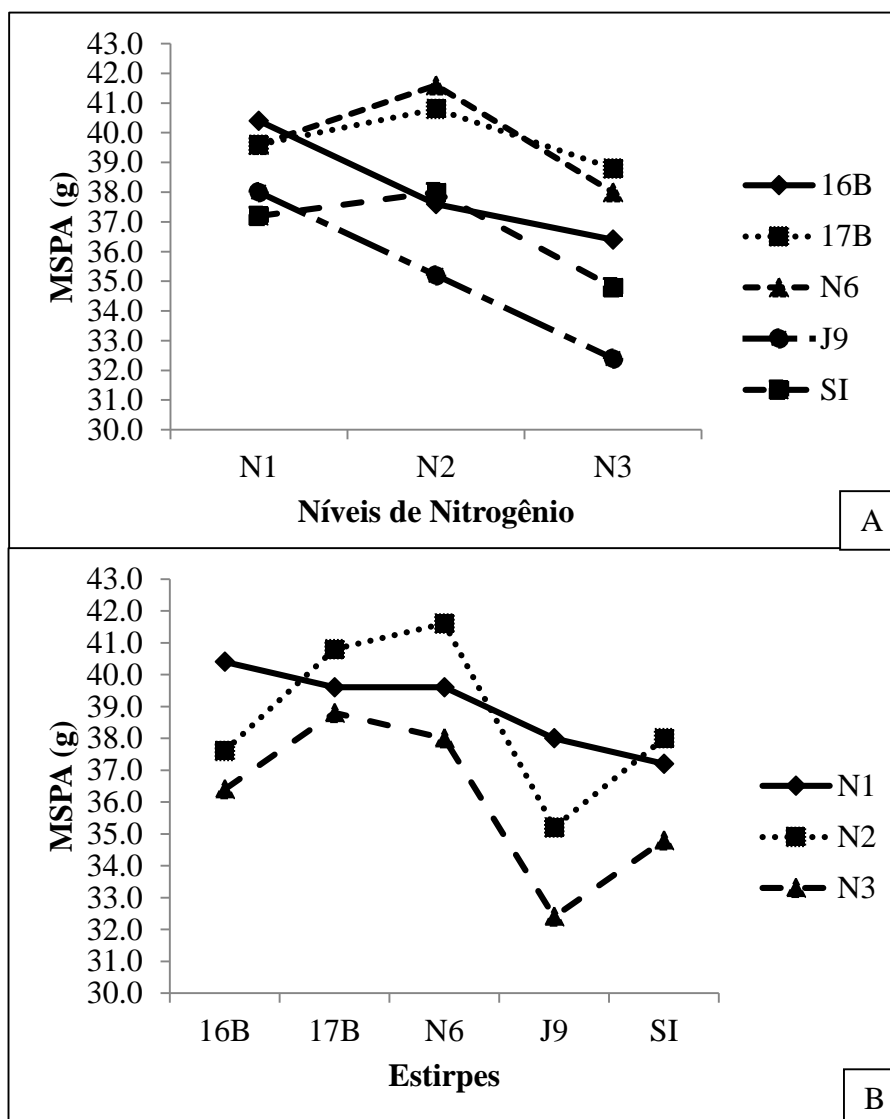


Figura 2 – Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) para o feito da inoculação em função dos níveis de N (A). Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) para o efeito dos níveis de N em função da inoculação (B). N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio.

Os valores da MSPA oscilaram de 32,4 g até 41,6 g, para, respectivamente, os tratamentos que receberam a estirpe J9

(*Herbaspirillum*) mais 75% de nitrato de cálcio e 25% de sulfato de amônio (N2) e para a estirpe N6 (*Azospirillum*) associada à adubação de 50% de nitrato de cálcio e 50% de sulfato de amônio (N2) (FIGURA 2).

Alguns estudos sugerem que o fornecimento concomitante de ambas as formas de N (nitrato e amônio) pode favorecer ao melhor desenvolvimento das plantas (HOLZSCHUH e outros, 2009; MALAVOLTA, 2006; SILVA e outros, 2010; BARBOSA e outros, 2005).

Além disso, a associação com a estirpe de *Azospirillum* (N6), que foi previamente isolada de plantas de milho, pode ter contribuído com a interação mais equilibrada entre a bactéria, o genótipo e o percentual de N utilizado, favorecendo, desse modo, uma maior conversão do N assimilado em matéria seca.

4.2 Experimento II: Comportamento do híbrido de milho AL Bandeirantes à adubação nitrogenada e à inoculação com bactéria diazotróficas

Não houve interação significativa entre as estirpes e os níveis de nitrogênio para a altura do híbrido AL Bandeirantes (TABELA 6), sugerindo que os efeitos das estirpes independem do nível de nitrogênio e vice-versa.

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as médias da altura aos 30, 45 e 75 DAE para o fator estirpe, quando analisado separadamente. Apenas aos 60 DAE, as médias da altura foram estatisticamente diferentes (TABELA 6), com destaque para estirpe 17B (*Azospirillum*), que apresentou média de 60,08 cm.

Como observado na Tabela 6, o uso da estirpe 17B possibilitou aumento de 20,47% na altura das plantas, em relação à estirpe N6, não diferindo estatisticamente das estirpes 16B, J9 e SI.

Tabela 6 – Altura aos 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AL Bandeirantes inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.

Fatores	GL	ALTURA (cm)			
		30 DAE	45 DAE	60 DAE	75 DAE
Estirpe	4	ns	ns	*	Ns
16B ¹ (<i>Azospirillum</i>)		41,98	52,25	59,45 ab	86,44
17B (<i>Azospirillum</i>)		43,75	54,64	60,08 a	83,40
N6 (<i>Azospirillum</i>)		41,23	48,17	49,87 b	73,88
J9 (<i>Herbaspirillum</i>)		42,79	53,49	58,45 ab	77,00
SI (Sem inoculação)		43,05	51,63	56,16 ab	87,21
Nitrogênio	2	ns	ns	ns	Ns
Ca(NO ₃) ₂ : (NH ₄) ₂ SO ₄					
N1 (25%:75%)		41,72	50,27	56,97	79,05
N2 (50%:50%)		42,31	53,05	57,08	83,11
N3 (75%:25%)		43,64	52,78	56,36	82,60
E vs N	8	ns	ns	ns	Ns

Fatorial vs Adicionais	1	ns	ns	ns	Ns
Fatorial		42,56	52,03	56,47	81,59
Adicionais		39,27	48,86	54,52	78,42
Adicionais	1	ns	ns	ns	Ns
A1		38,92	50,77	57,70	86,07
A2		39,62	46,95	51,35	70,77
Tratamentos	16	ns	ns	ns	Ns
Blocos	3	ns	*	**	Ns
Resíduo	48				
Total	67				
C.V. (%)		13,38	11,10	15,50	18,66

*, **, ns. Significativo para 5%, 1% e não significativo, respectivamente pelo Teste Tukey. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. ¹ Estirpe 16B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe 17B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe N6: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de milho; Estirpe J9: Similar ao *Herbaspirillum* spp, isoladas de milho; SI: Sem inoculação; N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio; A1: 100% de nitrato de cálcio e A2: 100% de sulfato de amônio; CV: coeficiente de variação.

Fica evidente que os resultados correspondentes à inoculação com bactérias diazotróficas em plantas cultivadas são distintos e que o percentual de incremento na variável altura é dependente das condições inerente ao ambiente e à carga genética da planta.

Kappes e outros (2013), ao inocular sementes de milho com *Azospirillum brasilense*, observaram um incremento de 6,2% na altura das plantas e correlacionaram esse resultado à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias.

Dados publicados por Santos e outros (2011) sugeriram que a inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio promoveram crescimento em altura, equivalente à adubação de 120 kg.ha⁻¹ de N em cana-de-açúcar.

Entretanto, de forma distinta, Dartora e outros (2013) indicaram que a altura de planta do milho, tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva, não foi influenciada pela inoculação com *A. brasilense* e *H. seropedicae*.

A não significância da resposta da altura aos diferentes percentuais de nitrogênio pode ter ocorrido devido a esse híbrido tolerar solos de baixa a alta fertilidade e ser considerado um híbrido super-rústico (SEMEATA, 2015).

Apesar de não haver diferenças estatísticas quando se compara os tratamentos fatoriais (inoculação + nitrogênio) com aqueles que receberam somente a adubação nitrogenada, é notável que as maiores médias da altura foram encontradas para os tratamentos que foram simultaneamente inoculados e adubados (TABELA 6).

É importante salientar que a presença de microrganismos diazotróficos beneficia as plantas não só pela fixação biológica de nitrogênio (ALVES e outros, 2015), mas também pela redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ALQUERES e outros, 2010); pela produção de fitormônios (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000), pelo aumento do sistema radicular (REIS JUNIOR e outros, 2008; ARAÚJO e outros, 2013) e pela solubilização de fosfato (PEDRINHO e outros, 2010).

O diâmetro do colmo não foi influenciado pelo efeito principal de cada fator nos períodos de avaliação (TABELA 7).

Foi observado efeito significativo da interação aos 75 DAE, (TABELA 7). Desse modo, foi desdobrada a interação dos fatores, como mostra a Tabela 8.

Tabela 7 – Diâmetro aos 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AL Bandeirantes inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.

Fatores	GL	DIÂMETRO (mm)			
		30 DAE	45 DAE	60 DAE	75 DAE
Estirpe	4	ns	ns	ns	ns
16B ¹ (<i>Azospirillum</i>)		21,19	25,05	23,02	21,75
17B (<i>Azospirillum</i>)		21,45	25,46	23,97	23,74
N6 (<i>Azospirillum</i>)		21,63	25,55	23,71	21,72
J9 (<i>Herbaspirillum</i>)		21,19	24,59	23,47	23,10
SI (Sem inoculação)		20,88	24,87	22,95	20,86
Nitrogênio	2	ns	ns	ns	ns
Ca(NO ₃) ₂ : (NH ₄) ₂ SO ₄					
N1 (25%:75%)		21,69	25,15	23,48	22,16
N2 (50%:50%)		21,09	25,09	23,21	22,47
N3 (75%:25%)		21,03	25,08	23,59	22,08
E vs N	8	ns	ns	ns	*
Fatorial vs Adicionais	1	ns	ns	ns	ns
Fatorial		21,27	25,11	23,42	22,24
Adicionais		20,61	23,37	22,05	21,03
Adicionais	1	ns	ns	ns	Ns
A 1		20,60	23,45	21,27	21,50
A2		20,62	23,30	22,82	20,57
Tratamentos	16	ns	ns	ns	*
Blocos	3	ns	*	ns	ns
Resíduo	48				
Total	67				
C.V. (%)		11,47	9,89	9,09	11,68

*, **, ns. Significativo para 5%, 1% e não significativo, respectivamente pelo Teste Tukey. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. ¹ Estirpe 16B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe 17B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe N6: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de milho ; Estirpe J9: Similar ao *Herbaspirillum* spp, isoladas de milho; SI: Sem inoculação; N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio; A1: 100% de nitrato de cálcio e A2: 100% de sulfato de amônio; CV: coeficiente de variação.

Entre os níveis de N, foram observadas diferenças estatísticas apenas entre os tratamentos não inoculados (SI), com destaque para adubação de 75% de Ca(NO₃)₂ e 25% de (NH₄)₂SO₄, que diferiu apenas

dos tratamentos que foram adubados com 25% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, perfazendo um incremento de 30% no diâmetro (TABELA 8).

Tabela 8 – Valores Médios do diâmetro (mm) do genótipo de milho AL Bandeirantes, em função da interação entre as estirpes e as proporções de nitrogênio.

Estirpe	Nitrogênio		
	N1	N2	N3
16B ¹	22,80 abA	22,72 abA	19,75 aA
17B	24,55 aA	23,25 abA	23,42 aA
N6	23,32 aA	19,55 bA	22,30 aA
J9	22,00 abA	25,17 aA	22,12 aA
SI	18,12 bB	21,65 abAB	22,82 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. *, **, ns. Significativo para 5%, 1% e não significativo, respectivamente pelo Teste Tukey. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. ¹ Estirpe 16B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe 17B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe N6: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de milho; Estirpe J9: Similar ao *Herbaspirillum* spp, isoladas de milho; SI: Sem inoculação; N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio; A1: 100% de nitrato de cálcio e A2: 100% de sulfato de amônio; CV: coeficiente de variação. DMS colunas = 5,1765 (minúscula) a 5% /DMS linha = 4,4146 (MAIÚSCULA) a 5%.

Com base nesses resultados, pode-se constatar que o híbrido AL Bandeirantes, quanto ao diâmetro, é mais responsivo ao nitrato, pois essa variável foi crescente, conforme o aumento do percentual de NO_3^- , quando não inoculado (SI).

Como observado na Tabela 8, ao fornecer o nitrogênio na proporção N1 (25% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), foram

encontrados os maiores valores de diâmetro para as estirpes 17B e N6, sendo superior apenas ao tratamento não inoculado.

Quando foi fornecido 50% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na inoculação com a estirpe J9, os valores do diâmetro foram 5,62 mm superiores à média do tratamento inoculado com a estirpe N6 (TABELA 8).

Segundo resultados descritos na Tabela 9, o número de folhas não foi influenciado pela interação das estirpes combinadas com os níveis de nitrogênio (ExN).

Tabela 9 – Número de folhas aos 30, 45, 60 e 75 dias após a emergência (DAE) das plantas de milho do híbrido AL Bandeirantes inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.

Fatores	NÚMERO DE FOLHAS				
	GL	30 DAE	45 DAE	60 DAE	75 DAE
Estirpe	4	ns	ns	ns	ns
16B ¹ (<i>Azospirillum</i>)		5,25	7,41	7,75	8,83
17B (<i>Azospirillum</i>)		5,25	7,50	8,33	9,25
N6 (<i>Azospirillum</i>)		5,25	7,16	8,00	9,00
J9 (<i>Herbaspirillum</i>)		5,08	7,33	7,75	8,75
SI (Sem inoculação)		4,83	7,08	8,33	8,75
Nitrogênio	2	ns	ns	ns	ns
Ca(NO ₃) ₂ : (NH ₄) ₂ SO ₄					
N1 (25%:75%)		5,25	7,15	7,85	8,75
N2 (50%:50%)		5,15	7,50	8,00	8,85
N3 (75%:25%)		5,00	7,25	7,95	9,15
E vs N	8	ns	ns	ns	ns
Fatorial vs Adicionais	1	ns	ns	ns	ns
Fatorial		5,13	7,30	7,93	8,91
Adicionais		5,25	7,50	7,75	8,50
Adicionais	1	ns	ns	ns	ns
A 1		5,25	7,75	8,00	8,25
A2		5,25	7,25	7,50	8,75
Tratamentos	16	ns	ns	ns	ns
Blocos	3	ns	ns	ns	ns
Resíduo	48				

Total	67			
C.V. (%)	12,91	11,46	10,63	13,98

¹ Estirpe 16B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe 17B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe N6: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de milho ; Estirpe J9: Similar ao *Herbaspirillum* spp, isoladas de milho; SI: Sem inoculação; N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio; A1: 100% de nitrato de cálcio e A2: 100% de sulfato de amônio; CV: coeficiente de variação.

Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para a característica número de folhas, quando avaliados isoladamente os efeitos das estirpes e dos níveis de N (TABELA 9).

Diferentemente do observado, os dados compilados por Oliveira e outros (2008) indicaram que o número de folhas foi maior quando se aplicou o nitrogênio em igual proporção amônio e nitrato (50%:50%).

A interação entre ExN não exerce influência sobre o índice SPAD, a MFPA e a MSPA (TABELA 10), ou seja, os efeitos dos fatores são independentes entre si.

Tabela 10 – Índice SPAD, Massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas de milho do híbrido AL Bandeirantes aos 75 DAE, inoculadas com diferentes estirpes e proporções de nitrogênio.

Fatores	GL	SPAD	MFPA	MSPA
Estirpe	4	*	**	*
16B ¹ (<i>Azospirillum</i>)		30,87 ab	145,16 ab	42,16 ab
17B (<i>Azospirillum</i>)		32,25 a	168,66 a	46,00 a
N6 (<i>Azospirillum</i>)		26,05 b	134,50 b	36,50 b
J9 (<i>Herbaspirillum</i>)		30,51 ab	150,50 ab	40,33 ab
SI (Sem inoculação)		30,10 ab	140,50 ab	38,66 ab
Nitrogênio	2	ns	ns	ns
Ca(NO ₃) ₂ :				
(NH ₄) ₂ SO ₄				
N1 (25%:75%)		30,11	142,60	40,10
N2 (50%:50%)		30,59	152,00	42,60
N3 (75%:25%)		29,18	149,00	39,50
E vs N	8	ns	ns	ns

Fatorial vs Adicionais	1	ns	*	ns
Fatorial		27,89	147,87 a	33,00
Adicionais		26,11	132,25 b	37,00
Adicionais	1	ns	ns	ns
A1		26,57	140,00	38,50
A2		25,65	124,50	35,50
Tratamentos	16	ns	**	*
Blocos	3	ns	**	**
Resíduo	48			
Total	67			
C.V. (%)		12,91	12,72	16,06

*, **, ns. Significativo para 5%, 1% e não significativo, respectivamente pelo Teste Tukey. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. ¹ Estirpe 16B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe 17B: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de arroz; Estirpe N6: Similar ao *Azospirillum* spp., isoladas de milho; Estirpe J9: Similar ao *Herbaspirillum* spp, isoladas de milho; SI: Sem inoculação; N1: 25% de nitrato de cálcio e 75% sulfato de amônio; N2: 50% de nitrato de cálcio e 50% sulfato de amônio; N3: 75% de nitrato de cálcio e 25% sulfato de amônio; A1: 100% de nitrato de cálcio e A2: 100% de sulfato de amônio; CV: coeficiente de variação.

Montanez e outros (2009) evidenciaram que a fixação biológica de nitrogênio pode ou não ser afetada pela adubação nitrogenada e que essa resposta varia conforme os genótipos de milho.

Ademais, é importante destacar que a interação entre bactérias diazotróficas e plantas de milho é dependente não só da genética, mas também dos fatores ambientais, em especial, do nitrogênio (ROESCH et al., 2006), como demonstrado por Lana e outros (2012), ao constatar que a inoculação com *Azospirillum*, na ausência de adubação nitrogenada, incrementou as variáveis analisadas.

Ao analisar o efeito das estirpes, foram observadas diferenças estatísticas para as variáveis SPAD, MFPA MSPA (TABELA 10). Hungria e outros (2010) indicaram que, dependendo da estirpe utilizada, as plantas de milho respondem de forma distinta, e isso ocorre devido à especificidade na interação entre planta e bactéria (OLIVEIRA e outros, 2006).

As maiores médias para índice SPAD foram obtidas pela inoculação com a estirpe 17B, na qual diferiu apenas da estirpe N6 e promoveu um aumento de 24% na sua média. Apesar de ambas estirpes pertencerem ao gênero *Azospirillum*, esses resultados indicam que diferentes estirpes contribuíram de forma distinta no parâmetro avaliado (TABELA 12).

Possivelmente, a inoculação com a estirpe 17B contribuiu para uma melhor eficiência no aproveitamento do N disponível no solo, já que o teor de clorofila correlaciona-se com o suprimento de N às plantas.

Dados obtidos por Jordão e outros (2010) observaram que a média da leitura do índice SPAD nos tratamentos com a presença da bactéria foi maior que a média dos tratamentos, na qual não houve inoculação, comprovando, assim, o efeito da inoculação sobre este parâmetro.

De forma similar aos dados obtidos neste trabalho, Araújo (2014), estudando o efeito de diferentes espécies de bactérias diazotróficas, verificou que os tratamentos com inoculação de *Azospirillum brasilense* apresentaram índice SPAD 6% acima, quando comparado com a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*.

Como o índice SPAD mede a intensidade do verde, ou seja, da clorofila presente nas folhas, é considerado como um parâmetro expressivo para estimar o teor de nitrogênio, já que a molécula de clorofila apresenta quatro átomos de N no núcleo central (TAIZ & ZEIGER, 2004), perfazendo cerca de 50% de todo nitrogênio presente nas folhas (CHAPMAN & BARRETO, 1997).

Na literatura, os resultados quanto ao índice SPAD são relativos e variam de acordo com o tipo de manejo adotado, espécie vegetal,

estirpe de bactéria, condições climáticas e características do solo, além disso, outro fator importante é a interação entre os microrganismos presentes no solo, algo pouco levado em consideração nos trabalhos publicados.

Na Tabela 10, foram constatadas diferenças estatísticas entre as médias da MFPA e MSPA, quando avaliada a inoculação com diferentes estirpes. Em ambas as características, a inoculação com a estirpe 17B foi superior apenas à estirpe N6.

A inoculação com a estirpe 17B proporcionou aumentos significativos de 34,16g e 9,5g, para, respectivamente, MFPA e MSPA, em comparação à estirpe N6 (TABELA 10).

Esses resultados indicam que a associação do híbrido AL Bandeirantes com estirpe 17B pode contribuir com o melhor aproveitamento com N disponível no sistema, uma vez que, como sugerido por Ferreira (1997), plantas com suprimento adequado de nitrogênio apresentam maior assimilação de CO₂ e incorporação de carboidratos, o que resultará, conseqüentemente, em maior acúmulo de biomassa.

Kuss e outros (2008) não observaram relação entre inoculação de *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum* e outros três isolados de bactérias diazotróficas entre a massa fresca da parte aérea de plantas de arroz.

Assim como os resultados observados neste trabalho, Baptista e outros (2011), objetivando selecionar estirpes *Herbaspirillum* e *Azospirillum* tolerantes a elevados teores de alumínio e avaliar seu potencial como promotora de crescimento de plantas de milho, observaram maiores valores de peso seco da parte aérea nos tratamentos com a estirpe ZAE-98 de *Herbaspirillum seropedicae*.

Ao estudar a resposta à inoculação com 21 diferentes estirpes de *Herbaspirillum*, Alves e outros (2015) verificaram diferenças de até 100% na MSPA de plantas de milho.

Contudo, Sala e outros (2008) não constaram diferenças nos valores de MSPA ao avaliar o efeito das bactérias diazotróficas em plantas de milho.

Não foram observadas diferenças entre as respostas do índice SPAD, MFPA e MSPA ao avaliar os diferentes níveis de N (TABELA 10).

Portanto, o fornecimento concomitante das formas de N, nitrato e amônio, segundo Maças (2008), resulta em melhores incrementos na biomassa de plantas de milho, uma vez que a demanda é relativa e dependente dos estágios de desenvolvimento, com maior absorção do NH_4^+ nas fases iniciais e do nitrato nas finais (HEINRICHS e outros, 2006).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, fica evidenciada a importância da seleção de estirpes mais específicas para cada genética de planta, capazes de favorecer o incremento nas características desejáveis de plantas de milho, quando submetidas a determinadas condições edafoclimáticas.

5.0 CONCLUSÕES

- ✓ O genótipo AG 1051 apresentou-se mais responsivo à adubação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- ✓ O genótipo AL Bandeirantes apresentou-se mais responsivo à adubação com NO_3Ca_2 se comparada com a adubação com SO_4NH_4 .
- ✓ A inoculação com a estirpe N6 (*Azospirillum*), quando associada às maiores proporções de amônio, demonstrou resultados satisfatórios para o genótipo de milho AG1051.
- ✓ A inoculação com *Azospirillum* (estirpe 17B) proporcionou melhores resultados em ambos os genótipos de milho.
- ✓ A inoculação com bactérias diazotróficas, juntamente com o fornecimento de nitrato e de amônio, incrementaram no crescimento dos genótipos de milho, quando comparada com o fornecimento de N somente via fertilizante mineral.

6.0 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AGROCERES. Disponível em: <<http://www.sementesagroceres.com.br/pages/Produto.aspx?p=13>>. Acesso em: Novembro de 2014.

ALQUERES, S. M. C.; OLIVEIRA, J. H. M.; NOGUEIRA, E. M.; GUEDES, H. V.; OLIVEIRA, P. L.; CÂMARA, F.; BALDANI, J. I.; MARTINS, O. B. Antioxidant pathways are up-regulated during biological nitrogen fixation to prevent ROS-induced nitrogenase inhibition in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Arch Microbiol**, v, 192, p. 835–841, 2010.

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

ALVES, F. Q. G.; SILVA, F. C.; COSTA, I. J. S.; DAVID, A. M. S. S.; SIMÕES, D. A. Qualidade fisiológica de híbridos de milho submetidos a diferentes temperaturas. In: **28º Congresso Nacional de Milho e Sorgo**. Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010.

ALVES, G. C.; VIDEIRA, S. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant Soil**, v, 387, p. 307–321, 2015.

ALVES, M. da S.; COELHO, E. F.; PAZ, V. P. da S.; ANDRADE NETO, T. M. de. Crescimento e produtividade da bananeira cv. Grande Naine sob diferentes combinações de nitrato de cálcio e uréia. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 57, n.1, p. 125-131, 2010.

ARAÚJO, E. de O. **Quantificação da contribuição de bactérias diazotróficas na absorção de nitrogênio pela cultura do milho**. 2014. 160 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal da Grande Dourados.

ARAÚJO, É. de O.; MERCANTE, F. M. ; VITORINO, A. C. T. NUNES, D. P.; PAIM, L. R.; MENDES, D. A. E. Inoculação de

Herbaspirillum seropedicae no desenvolvimento de genótipos de milho sob diferentes níveis de nitrogênio. **XII Seminário Nacional Milho Safrinha**, Dourados: MT, 2013.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, v. 29, n.5-6, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, 31 p, 2005.

BAPTISTA, R. B.; MAURI, R.; V. L. D. BALDANI. Tolerância de estirpes de bactérias diazotróficas a Al_3^+ , para inoculação em milho (*Zea mays*). **Rev. de Ci. Vida**. Seropédica v. 31, n. 1, P 33-41, 2011.

BARBOSA, J. G.; MUNIZ, M. A; MARTINEZ, H. E. P.; LEITE, R. DE A.; CARDOSO, A. A.; BARBOSA, M. S. Concentração de macronutrientes em crisântemo de vaso, cultivado sob diferentes relações NO_3^-/NH_4^+ . **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 3, 2005.

BARGHINI, A. O milho na América do Sul Pré-Colombiana: uma história natural. Instituto Anchieta de pesquisas. São Leopoldo: Unisinos, **Série Antropologia**, n. 61, 170 p, 2004.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.7-11, 1998.

BASTOS, E. A.; CARDOSO, M. J.; MELO, F. de B.; RIBEIRO, V. Q.; ANDRADE JÚNIOR, A. S. de. Doses e formas de parcelamento de nitrogênio para a produção de milho sob plantio direto. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 39, n. 02, p. 275-280, 2008.

BLOOM, A. J. RANDALL, L.; TAYLOR; A. R.; SILK, W. K. Deposition of ammonium and nitrate in the roots of maize seedlings supplied with different nitrogen salts. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 5, p. 1997–2006, 2012.

BORGES, I. D. **Marcha de absorção de nutrientes e acúmulo de matéria seca em milho**. 2006. 115 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras.

BORTOLOTTI, R. P.; BRUNO, I. P.; DOURADO-NETO, D.; TIMM, L. C.; SILVA, A. N. da; REICHARDT, K. Nitrate leaching through climatologic water balance in a fertigated coffee plantation. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 60, n.6, p. 785-792, 2013.

BREDEMEIER, C. & MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

CADORE, R. **Associação entre *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada em híbridos de milho**. 2014. 73f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Goiás.

CAMARGOS, L. S. **Análise das alterações no metabolismo do nitrogênio em *Canavalia ensiformes* (L.) em resposta a variações na concentração de nitrato fornecida**. 2002. 113f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Eds). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, p. 375-470, 2007.

CARGNELUTTI FILHO, A.; PERECIN, D.; MALHEIROS, E. B.; GUADAGNIN, J. P. Comparação de métodos de adaptabilidade e estabilidade relacionados à produtividade de grãos de cultivares de milho. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.571-578, 2007.

CARNEIRO, M. M. L. C.; GOMES, M. P.; SANTOS, H. R. B.; REIS, M. V. dos; MENDONÇA, A. M. das C.; OLIVEIRA, L. E. M. de. Fotorrespiração e metabolismo antioxidante em plantas jovens de seringueira cultivadas sob diferentes fontes de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.10, n.1, p.66-73, 2015.

CATI. Disponível em:
<<http://www.agroinsumos.com.br/links/culturas/milho.htm>>. Acesso
em Novembro de 2014.

CHAPMAN, S. C.; BARRETO, H. J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. *Agronomy Journal*, Madison, v. 89, n.1, p. 557-562, 1997.).

COLODETE, C. M. Fluxo molecular e iônico das proteínas de transporte em membranas. **Persp. Online: biol. & saúde**. Campos dos Goytacazes, v. 11, p. 43-52, 2013.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira de grãos: **Décimo segundo levantamento, setembro 2015** / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2015.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA – CIB. Guia do Milho: Tecnologia do campo à mesa Cartilha. **Paraná:CIB**, 16p, 2009.

CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, Rockville, v.7, p.859-868, 1995.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indóis in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

D'ANDRÉA, A. F.; SILVA, M. L. N.; CURI, N.; GUILHERME, L. R. G. Estoque de carbono e nitrogênio e formas de nitrogênio mineral em um solo submetido a diferentes sistemas de manejo. **Pesq. agropec. bras.**, v.39, n.2, p.179-186, 2004.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; GERSON SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.10, p.1023–1029, 2013.

DEMARI, G. H. **Fontes e parcelamento do nitrogênio na cultura do milho**. 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Santa Maria.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p. 771-774, 1997.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, v.1, p.261-272, 1958.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. **Itaguaí: Embrapa-CNPAB**, 60p,1995.

DONAGEMMA, G. K.; RUIZ, H. A.; ALVAREZ, V. H.; FERREIRA, P.A.; CANTARUTTI, R. B.; SILVA, A. T. DA; FIGUEIREDO, G. C. Distribuição do amônio, nitrato, potássio e fósforo em colunas de latossolos fertirrigadas. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 32, p. 2493-2504, 2008.

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

DUARTE, J. O; , J. C; GARCIA, J. C; MATTOSO, M. J. Embrapa Milho e Sorgo. **Sistema de Produção, ISSN 1679-012X Versão Eletrônica** - 6ª edição Set./2010. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/economia.htm> acessado em 05/10/2015.

DURÃES, F. O. M. **Limitações fisiológicas do milho nas condições de plantio nas regiões tropicais baixas**. Disponível em:< http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/LimiteMilho/Index.htm>. Acesso em: Outubro de 2014.

EPSTEIN, E. & BLOOM, A.J. **Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas**. 2ª ed. Trad. NUNES, M.E.T. **Editora Planta**, Londrina, 403 p, 2006.

FAGOTTI, D. S. L.; CERZINI, P.; DELAMUTA, J. R. M.; HUNGRIA, M. ; NOGUEIRA, M. A. Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas de Milho em Cultivos Convencional e Agroecológico. **FERTBIO**, Maceió, 2012.

FANCELLI, A. L.; LIMA, U. A. Milho: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo: **SICCI; PROMOCET; FEALQ**, p.112; 1982.

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

FIGUEIREDO, C. C. de; RESCK, D. V. S.; GOMES, A. C.; URQUIAGA, S. Sistemas de manejo na absorção de nitrogênio pelo milho em um Latossolo Vermelho no Cerrado. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.40, n.3, p.279-287, 2005.

FORNASIERI FILHO, D. Manual da cultura do milho. **Jaboticabal: Funep**, 276 p, 2007.

GALLOWAY, J. N.; DENTENER, F. J. ; CAPONE, D. G. ; BOYER, E. W.; HOWARTH, R. W. ; SEITZINGER, S. P.; ASNER, G. P.; CLEVELAND, C. C.; GREEN, P. A. ; HOLLAND, E. A.; KARL, D. M. ; MICHAELS, A. F.; PORTER, J. H.; TOWNSEND, A. R. ; VÖOSMARTY, C. J. Nitrogen cycles: past, present, and future. **Biogeochemistry**, p. 153-226, 2004.

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

GOMES, DE L. M. **Bactérias Diazotróficas Endofíticas em cultivares de milho em áreas de cerrado e mata no estados de Roraima**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Roraima.

GONDIM, A. R. O.; PRADO, R. M.; ALVES, A. U.; FONSECA, I. M. Eficiência nutricional do milho cv. BRS 1030 submetido à omissão de

macronutrientes em solução nutritiva. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 4, p. 539-544, 2010.

HEDRICH, R.; SCHROEDER J. I. The Physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**. v.40, p.539-569, 1989.

HEINRICHS, R.; GAVA, G. J.; CORAZZA, E. J.; DUETE, R. R. C.; VILLANUEVA, F. C. A MURAOKA, T. Forma preferencial de absorção de nitrogênio (15NH_4^+ ou 15NO_3^-) pelas culturas de soja, feijão, arroz e milho. **Científica, Jaboticabal**, v.34, n.1, p.25 - 30, 2006.

HOFFMANN, L. V. Biologia Molecular da Fixação Biológica do Nitrogênio. In: Silveira, A. P. D. da & Freitas, S. dos S. (Eds). Microbiota do solo e qualidade ambiental. **Campinas: Instituto Agrônomo**, 312 p, 2007.

HOLZSCHUH, M. J.; BOHNEN, H.; ANGHINONI, I.; MEURER, E. J.; CARMONA, F. de C.; COSTA, S. E V. de A. Resposta do arroz irrigado ao suprimento de amônio e nitrato. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 33, p. 1323-1331, 2009.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M. S.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 331, n. 1/2, p. 413-425, 2010.

IBGE, **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=822&z=p&o=2&i=P>> Acesso em: Junho de 2015.

INMET, **INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA**. Banco de dados meteorológicos para ensino e pesquisa - BDMEP. Estação 83344. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>. Acesso em: Outubro de 2014.

IPEA, **INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA**. Disponível em: <<http://www.ipeadata.gov.br>>. Acesso em: Dezembro de 2014.

JEGER, M. J. & SPENCE, N. J. Biotic interactions in plant-pathogen associations. **New York: British Society for plant pathology**, 2001.

JESUS, C. M. **Resposta de diferentes genótipos de milho à inoculação de bactérias diazotróficas e fontes de nitrogênio**. 90 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista.

JORDÃO, L. T. ; LIMA, F. F. de; LIMA, R. S. ; MORETTI, P. A. E. ; PEREIRA, H. V.; MUNIZ, A. S. OLIVEIRA, M. C. N. de. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária. **In: XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas; XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas; XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo; VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo**. Guarapari – ES, 2010.

KANEKO, F. H.; ARF, O.; SABUNDJIAN, M. T.; FERREIRA, J. P.; GITTI, D.C.; LEAL, A. J. F.; nascimento, v. Fontes e modos de aplicação de nitrogênio na cultura do milho em sistema plantio direto. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 9,p. 191-196, 2015.

KAPPES, C.; ARF, O. ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; BEM, E. A. D.; PORTUGAL, J . R.; VILELA, R. G. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 2, p. 527-538, 2013.

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

KNOBLAUCH, R.; ERNANI, P. R.; WALKER, T. W.; KRUTZ, L. J.; VARCO, J. J.; GATIBONI, L. C.; DESCHAMPS, F.C. Volatilização de amônia em solos alagados influenciada pela forma de aplicação de uréia. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 36, p. 813-821, 2012.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; HOLTZ, E. K.; LOVATO, T. Inoculação de bactérias diazotróficas e desenvolvimento de plântulas de arroz

irrigado em solo e câmara de crescimento. **Revista da FZVA, Uruguaiana**, v.15, n.1, p. 90-102, 2008.

LAI, C. M. & TABATABAI, M. A. Kinetic parameters of immobilized urease. **Soil Biol. Biochem.**, v. 24, p. 225-228, 1992.

LANA, M. DO C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN; J. E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399-405, 2012.

LEA, P. J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P. J.; LEEGOOD, R. C. Plant biochemistry and molecular biology. **Chichester: John Wiley and Sons**, v.7, p.155-180, 1993.

LOPES, A. A. de C.; REIS JUNIOR, F. B. dos; MENDES, I. de C.; ALVES, G. C.; MARRIEL, I. E.; REIS, V. M. Efeito da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade do milho nos períodos de safra e safrinha. **In: IX Simpósio Nacional sobre o Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Anais do evento: Brasília**, 2008.

LORENSINI, F. ; CERETTA, C. A. ; GIROTTO, E.; CERINI, J. B.; CLEDIMAR ROGÉRIO LOURENZI, C. R.; CONTI, L de; TRINDADE, M. M. ; MELO, G. W. de ; BRUNETTO, G. Lixiviação e volatilização de nitrogênio em um Argissolo cultivado com videira submetida à adubação nitrogenada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.7, p.1173-1179, 2012.

MAÇAS, J. E. S. **Nitrogênio Nítrico e amoniacal no desenvolvimento da parte aérea de milho cultivado em argissolo**. 2008. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Programa de Pós Graduação em Ciência do solo, Faculdade Agronomia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Fisiologia do Milho. **Embrapa: Circular técnica**, n. 22. Sete Lagoas - MG, 2002.

MALAVOLTA, E. & MORAES, M. F. Fundamentos do nitrogênio e do enxofre na nutrição mineral de plantas cultivadas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S.; VITTI, G.C. (Eds.) Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira. **Piracicaba: IPNI**, p. 189 – 249, 2007.

MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Ceres, 251p, 1980.

MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. **Piracicaba: Editora Ceres**, p. 631; 2006.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio: Bactérias Fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 32 p, 1999.

MEGDA, M. M.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; XAVIER VIEIRA, M. X. Resposta de cultivares de trigo ao nitrogênio em relação às fontes e épocas de aplicação sob plantio direto e irrigação por aspersão. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 33, n. 4, p. 1055-1060, 2009.

MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G. S.; MARGARITA. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biol Fertil Soils**, v. 45, p. 253–263, 2009.

MORAIS, R. F. de. **Potencial Produtivo e Eficiência da Fixação Biológica de Nitrogênio de Cinco Genótipos de Capim Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), para Uso como Fonte Alternativa de Energia**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

MOREIRA, F. M. S., & J. O. SIQUEIRA. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. UFLA: Lavras, 626 p, 2006.

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

NELSON, N.; HARVEY, W. R. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. **Physiology Rev.**; v. 79, n. 2, p. 361-85, 1999).

NORMAN, M. J. T.; PEARSON, C. J.; SEARLE, P. G. E. The ecology of tropical food crops . 2. ed. **Melbourne**: Cambridge University Press, p. 430; 1995.

OLIVEIRA, A. L. M. de; CANUTO, E. de L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1/2 , p. 23-32, 2006.

OLIVEIRA, F. A. de; FRANCISMAR, B. P. M. de; OLIVEIRA, K. T. de; GUIMARÃES, I. P.; Desenvolvimento inicial do milho pipoca cultivado sob diferentes relações $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$. **Mossoró, Brasil**, v.21, n.5, p.197-201, 2008.

OLSON, R. A.; KURTZ, L. T. Crop Nitrogen requirements, utilization, and fertilization. In: Stevenson, F. J. (Ed.). Nitrogen in Agricultural Soils. Madison: **American Society of Agronomy**, n. 22, p. 567-604, 1982.

PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grãos de Milho. Embrapa Milho e Sorgo, **Circular Técnica: n° 75**, Sete Lagoas-MG, 6 p, 2006.

PATTERSON, K.; ÇAKMAK, T; COOPER, A.; LAGER, I.; RASMUSSEN, A. G.; ESCOBAR, M. A. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. **Plant Cell and Environment**, v. 33, p. 1486–1501, 2010.

PEDRAZA, R. O.; BELLONE, C. H., BELLONE, S. C. de; BOA SORTE, P. M. F.; SANTOS TEIXEIRA, K. R dos S. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European journal of soil biology**, v. 45, p. 36 – 43, 2009.

PEDRINHO E. A.; GALDIANO JÚNIOR R. F.; CAMPANHARO J. C.; ALVES L. M. C.; LEMOS E.G. M. Identificação e avaliação de

rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantina**, v. 69, p. 905-911, 2010.

PERIN, L.; SILVA, M. F. da; FERREIRA, J. S.; CANUTO, E. L.; MEDEIROS, A. F. A.; F. L. OLIVARES, F. L.; REIS, V. M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 47 - 53, 2003.

PINOTTI, E. B; ALMEIDA, D; ARAÚJO, H. M; BARBOSA, R. Z. PETÍLIO, A. A. Características vegetativas de três cultivares de milho (*Zea mays* L.) sob quatro populações de plantas em espaçamento reduzido. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia** – ISSN: 1677-0293. Ano VII – Número 15 – Periódicos Semestral; Junho de 2009.

PRICINOTTO, L. F.; VIDIGAL FILHO, P. S.; SCAPIM, C. A.; MARQUES, O. J.; OKUMURA, R. S.; RECHE, D. L. Effects of nitrogen rates and application time on popcorn. *African journal of agricultural research*, v. 9, p. 2132-2141, 2014.

QUEIROZ, A. M de; SOUZA, C. H. E. de; MACHADO, V. J.; LANA, R. M. Q; KORNDORFER, G. H.; e SILVA, A. de A. Avaliação de diferentes fontes e doses de nitrogênio na adubação da cultura do milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, n.3, p. 257-266, 2011.

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

REIS, V. M & F. L. OLIVARES. Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 34 p., 2006.

REIS, V. M. & TEIXEIRA, K. R. DOS S. **Fixação Biológica de Nitrogênio: Estado da Arte**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap6ID-cgUrYruYKy.pdf>>. Acesso em: Novembro de 2014.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. Como a planta de milho se desenvolve. **POTAFOS**. Informações Agronômicas, Piracicaba, n.103, p.1-11, 2003.

ROCHETTE, P. Reducing ammonia volatilization in a no-till soil by incorporating urea and pig slurry in shallow bands. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, n.84, p.71-80, 2009.

RODRIGUES, M. A. & COUTINHO, J. F. Eficiência de utilização do azoto pelas plantas. **Instituto Politécnico de Bragança**, 2000.

ROESCH, L. F. W.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. B.; TRIPLETT, E. W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant Soil**, v. 302, p. 91–104, 2008.

ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L.; PASSAGLIA, L. P. M.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S de; CAMARGO, F. A. O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, n. 9, p. 967-974, 2006.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G. de; SILVEIRA, A. P. D. da. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 32, p. 1099-1106, 2008.

SANGOI, L.; ERNANI, P.R.; LECH, V. A.; RAMPAZZO, C. Volatilização de N-NH₃ em decorrência da forma de aplicação de uréia, manejo de resíduos e tipo de solo, em laboratório. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.4, p.687-692, 2003.

SANTOS, B. L. S.; SOUZA, M. A. de; LIMA, J. A.; TARDIN, F. D.; SIMÕES, W. L.; OLIVEIRA, A. R. de. Análise biométrica de cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio. **In: Jornada de Iniciação científica da Embrapa semiárido, Petrolina**, v. 6, 2011.

SANTOS, J. da S. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do milho em Vitória da Conquista – BA**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

SANTOS, M. M.; GALVÃO, J. C. C.; SILVA, I. R.; MIRANDA, G. V.; FINGER, F. L. Épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na

cultura do milho em plantio direto, e alocação do nitrogênio (15N) na planta. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 34, p. 1185-1194, 2010.

SEMEATA. Disponível em: <<http://www.semeata.com.br/?sessao=produto&ver&id=22>>. Acesso em: 12 de setembro de 2015.

SIDDIQI, M.Y., GLASS, A. D. M., RUTH, T. J. Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx. **Plant Physiology**, Lancaster, v.93, p.1426-1432, 1990.

SILVA, F. de A. S. e. & AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, I. R. & MENDONÇA, E. DE S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Eds). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, p. 375- 470, 2007.

SILVA, P. C. C.; COUTO, J. L. DO; SANTOS, A. R. dos. Efeito dos íons amônio e nitrato no desenvolvimento do girassol em solução nutritiva. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.17, n.1, p. 104-114. 2010.

SMITH, Bruce D. The emergence of Agriculture. New York: **Scientific American Library**, 1995.

SORATTO, R. P; PEREIRA, M.; da COSTA, T. A. M da; LAMPERT, V. do N. Fontes alternativas e doses de nitrogênio no milho safrinha em sucessão à soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 4, p. 511-518, 2010.

SOUZA, J. A.; BUZETTI, S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; ANDREOTTI, M.; MARCO EUSTÁQUIO de SÁ, M. E. de; ARF, O. Adubação nitrogenada na cultura do milho safrinha irrigado em plantio direto. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p.447-454, 2011.

STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses:

genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24 , p. 487 – 506, 2000.

STEVENSON, F. J. Origin e distribution of nitrogen in soil. In: STEVENSON, F. J.; BREMMER, J. M.; HANUCK, R. D; KEENEY, D. R, (Eds.). Nitrogen in agriculturam soils. **Madison: American Society Og Agronomy**. n. 22, p. 1-42, 1982.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M.; ARF, O.; BENETT, C. G. S. Doses, fontes e épocas de aplicação de nitrogênio em trigo irrigado em plantio direto. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.8, p.797-804, 2010.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, F. de, BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M. E; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S. de; & ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixationto Brazilian sugarcane varieties. **Plant Soil**, v. 356, p. 5 – 21, 2012.

USDA, DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS . Safra Mundial de Milho 2014/15 - 6º Levantamento, 2014.

VALDERRAMA, M.; BUZETTI, S.; BENETT, C. G. S; ANDREOTTI, M.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Fontes e doses de npk em milho irrigado sob plantio direto. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 41, n. 2, p. 254-263, 2011.

VALE, F. R.; GUAZELLI, E. M. F.; FURTINI NETO, A. E.; FERNANDES, L. A. CULTIVO DO FEIJOEIRO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA SOB PROPORÇÕES VARIÁVEIS DE AMÔNIO E NITRATO. R. Bras. Ci. Solo, v. 22, p. 35-42, 1998.

VARGAS, L. K.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S. de. Imobilização de nitrogênio em solo cultivado com milho em sucessão à aveia preta nos sistemas plantio direto e convencional. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.1, p.76-83, 2005.

VIANA, T. de O. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista-BA.** 97 f. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

VOGT, G. A.; BALBINOT JUNIOR, A. A., GALLOTTI G. J. M.; ZOLDAN S.: R; PANDOLFO, C. M. **Produtividade de genótipos de milho na presença ou ausência de inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada de cobertura** – safra 2011/12. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/93022/1/Produtividade-de-genotipos-de-milho-na-presenca-ou-ausencia-de-inoculacao-com-Azospirillum-brasilense-e-adubacao-nitrogenada-de-cobertura-safra-2011-12.pdf>>. Acesso em: Novembro de 2014.

VON WIRÉN, N., GAZZARRINI, S., FROMMER, W.B. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil*, **The Hague**, v.196, p.191-199, 1997.

WARNCKE, D. & BARBER, S. Ammonium and nitrate uptake by corn (*Zea mays*, L.) as influenced by nitrogen concentrations and NH₄⁺/NO₃⁻ ratio. *Agronomy Journal*, v.65, p.950-954, 1973.

YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. & VITTI, G.C. Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira. **IPNI: Piracicaba**, 722 p, 2007.

ZIMMER, J.B; CONSALTER, R.; VARGAS, M.; CARLOS, A.; Fixação biológica de nitrogênio em *poaceae*. *Joaçaba*, v. 12 n. 1, p. 7-18, 2012.