

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DOSES DE  
NITROGÊNIO EM MILHO PARA PRODUÇÃO DE  
SILAGEM E GRÃOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**FERNANDO REIMANN SKONIESKI**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DOSES DE  
NITROGÊNIO EM MILHO PARA PRODUÇÃO DE SILAGEM  
E GRÃOS**

**Fernando Reimann Skonieski**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Zootecnia**

**Orientador: Prof. Dr. Julio Viégas**  
**Coorientador: Prof. Dr. Thomas Newton Martin**

**Santa Maria, RS, Brasil**  
**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Skonieski, Fernando Reimann  
INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DOSES DE  
NITROGÊNIO EM MILHO PARA PRODUÇÃO DE SILAGEM E GRÃOS  
/ Fernando Reimann Skonieski.-2015.  
94 p.; 30cm

Orientador: Julio Viégas  
Coorientador: Thomas Newton Martin  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de  
Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa  
de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, 2015

1. Bactérias diazotróficas 2. Produtividade de grãos  
3. Valor nutricional da silagem 4. Fertilização com ureia I.  
Viégas, Julio II. Martin, Thomas Newton III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado**

**INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DOSES DE NITROGÊNIO  
EM MILHO PARA PRODUÇÃO DE SILAGEM E GRÃOS**

elaborada por  
**Fernando Reimann Skonieski**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor em Zootecnia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Julio Viégas, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Clair Jorge Olivo, Dr. (UFSM)**

**José Laerte Nörnberg, Dr. (UFSM)**

**Gilmar Roberto Meinerz, Dr. (UFFS)**

**Alfredo Castamann, Dr. (UFFS)**

Santa Maria, RS, 28 de agosto de 2015.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, pela vida, pelas oportunidades e aprendizados proporcionados.

À toda minha família, em especial, meus pais Sadi e Sandra, pelo apoio costumeiro e incondicional.

À minha esposa Marcela, companheira de todas as horas. Agradeço por seu apoio incondicional, por sua paciência e pelas palavras e gestos de incentivo. Sua persistência me amparou nos momentos mais difíceis.

Aos meus sogros, Helena e Renato, pelas palavras de carinho e incentivo.

Ao meu orientador Prof. Julio, pelo apoio de sempre, pela confiança depositada, pelas contribuições, pela amizade e por sua generosidade. Sua orientação foi essencial para tornar essa tese realidade.

Ao co-orientador Prof. Thomas, pelo projeto desenvolvido, pela confiança depositada, pelas contribuições prestadas, pela orientação e amizade.

Ao Prof. José Laerte pelo apoio de sempre, por suas contribuições, pela confiança, por sua generosidade, presteza e amizade.

Aos Profs. Gilmar e Alfredo pelas incessantes contribuições junto ao trabalho.

Ao Prof. Clair pelas contribuições e participação na banca.

Aos acadêmicos da Agronomia da UFFS e da Zootecnia da UFSM, em especial, Cristian, Evandro, Lucas, Anderson, Stela, Rotchyelly, Lisiani, Letícia, Ana Carolina e Suellen. Sem a participação e contribuição de vocês essa tese não existiria.

Aos colegas de pós-graduação.

Às instituições UFFS e UFSM.

Muito obrigado a todos!

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DOSES DE NITROGÊNIO EM MILHO PARA PRODUÇÃO DE SILAGEM E GRÃOS**

AUTOR: FERNANDO REIMANN SKONIESKI  
ORIENTADOR: JULIO VIÉGAS

Local e Data da Defesa: Santa Maria, RS, 28 de agosto de 2015.

Esta tese foi desenvolvida com o objetivo de avaliar o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e da fertilização nitrogenada sobre o desenvolvimento da cultura do milho para silagem e grãos. Foram conduzidos experimentos nos municípios de Erechim, RS, nas safras 2012/2013 e 2013/2014 empregando os híbridos AS 1572 e Defender e Santa Maria, RS, na safra 2013/2014 com os híbridos AS 1572 e AG 9030. Os tratamentos foram distribuídos em arranjo fatorial composto por dois híbridos de milho, diferentes níveis de N (0, 60, 120, 240 e 480 kg/ha), inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. As sementes foram inoculadas com *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na concentração de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL e  $6,6 \times 10^6$  UFC/semente. A adubação nitrogenada foi realizada com a aplicação da dose equivalente a 30 kg/ha, aplicada no sulco de semeadura, e o restante da adubação realizada em cobertura nos estádios fenológicos de 4 e 8 folhas desenvolvidas. Na safra 2012/2013 foram avaliados os teores de N mineral ( $\text{N-NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) no solo e N total na planta. Em média as concentrações de N mineral na forma de  $\text{N-NH}_3/\text{NH}_4^+$  (44,97 mg/kg de solo) foram superiores às concentrações de  $\text{N-NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  (21,90 mg/kg de solo). Na medida em que avançou o desenvolvimento da cultura e em que as doses de N em cobertura foram aplicadas, a concentração de N mineral total no solo aumentou. As doses crescentes de N em cobertura elevaram os teores de N mineral no solo, a dose de 480 kg/ha de nitrogênio associada à inoculação com *A. brasilense* apresentou os maiores teores de N mineral. Quando o estágio de maturação avançou, redução da concentração de nitrogênio na planta foi observada, enquanto que a extração de N nos solos se elevou. Interações entre inoculação com *A. brasilense* e safras, entre inoculação e doses de N e entre inoculação e híbridos de milho definiram a produtividade das silagens. As crescentes doses de N elevaram os teores proteicos das silagens, sem alterar a digestibilidade dos materiais. A inoculação com *A. brasilense* elevou a digestibilidade da matéria orgânica nas silagens em Santa Maria, RS, além de elevar os teores de EE e NDT e reduzir a FDA das silagens em Erechim, RS. Sobre a produtividade de grãos, interação entre doses de N e inoculação com *A. brasilense* foi percebida. Doses entre 60 e 120 kg/ha de N favoreceram a produtividade de grãos de plantas inoculadas com *A. brasilense* em Erechim, RS, enquanto que em Santa Maria, RS, a interação foi favorecida com doses entre 240 e 480 kg/ha. A inoculação com *Azospirillum brasilense* pode ser empregada como estratégia para promover incrementos sobre a produtividade de silagem e grãos, desde que as interações com os híbridos, doses de N e safras sejam observadas.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas. Rendimento de grãos. Valor nutricional da silagem

## ABSTRACT

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade Federal de Santa Maria

### ***Azospirillum brasilense* INOCULATION AND NITROGEN LEVELS ON MAIZE SILAGE AND GRAIN YIELD**

AUTHOR: FERNANDO REIMANN SKONIESKI

ADVISER: JULIO VIÉGAS

Date and Defense's Place: Santa Maria, RS, August 28<sup>th</sup> of 2015.

This work has been developed in order to evaluate the effect of *Azospirillum brasilense* inoculation and nitrogen fertilization on the development of the maize crop for silage and grain. Experiments were conducted in the cities of Erechim, RS, in 2012/2013 and 2013/2014 harvests employing hybrid AS 1572 and Defender and at Santa Maria, in 2013/2014 harvest with AG 1572 and AG 9030 hybrids. Treatments followed randomized blocks design model in factorial arrangement composed by two maize hybrids, N fertilization levels (0, 60, 120, 240 and 480 kg/ha), inoculated or not with *Azospirillum brasilense*. Seeds were inoculated with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 and Ab-V6 strains with  $2.0 \times 10^8$  CFU/mL and  $6.6 \times 10^6$  CFU/seed of concentration. Nitrogen fertilization was performed with 30 kg/ha dose, applied in the planting furrow, and the remaining fertilization was applied in coverage at growth stages. In the 2012/2013 harvest mineral N content (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) in the soil and total nitrogen in the plant were evaluated. Usually, ammoniacal nitrogen content (44.97 mg/kg soil) was higher than nitric nitrogen content (21.90 mg/kg soil). Insofar as the crop development advanced and wherein nitrogen doses were applied in coverage, the total mineral nitrogen in the soil increased. Increasing nitrogen doses in coverage mineral N content in the soil increased, the dose of 480 kg/ha nitrogen associated with inoculation of *A. brasilense* showed the highest mineral N in the soil. When maturation stage advanced, reduction of nitrogen concentration in the plant was observed, whereas the amount of N extraction in the soil increased. Interactions between inoculation with *A. brasilense* and harvests, among inoculation and N doses and between inoculation and maize hybrids defined silages yield. The increasing of N doses increased silage protein content, without modifying materials digestibility. Inoculation with *A. brasilense* increased silages organic matter digestibility at Santa Maria, RS, in addition to increasing the EE and TDN content and reduce the ADF silage at Erechim, RS. Concerning grain yield, interaction between nitrogen doses and inoculation with *A. brasilense* was perceived. Nitrogen doses between 60 and 120 kg/ha favored plants grain yield inoculated with *A. brasilense* at Erechim, RS. In Santa Maria, the interaction was favored at doses between 240 and 480 kg/ha. Inoculation with *Azospirillum brasilense* can be used as a strategy to promote increases in the yield of silage and grains, since interactions with hybrids, N doses and harvests are observed.

Keywords: Diazotrophic bacteria. Grain yield. Silage nutritional value

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 3 - CONCENTRAÇÃO DO NITROGÊNIO NO SOLO E NA PLANTA DE MILHO INOCULADA COM <i>Azospirillum brasilense</i> E SUBMETIDA A NÍVEIS CRESCENTES DE FERTILIZAÇÃO NITROGENADA</b> .....	34
Figura 1. Precipitação pluviométrica e temperatura média do ar durante a condução do experimento em Erechim, RS, safra 2012/2013.....	38
Figura 2. Concentrações de N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N-NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e N mineral total, em mg/kg de solo, em função das crescentes doses de N em cobertura.....	43
Figura 3. Concentrações de N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N-NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e N mineral total, em mg/kg de solo, nas camadas 0-5, 5-10 e 10-20 cm, em função das crescentes doses de N em cobertura.....	45
Figura 4. Acúmulo de biomassa de plantas de milho, em kg/ha MS, com crescentes doses de N em função do estágio de desenvolvimento da cultura. ....	46
Figura 5. Concentração de N no tecido vegetal (g/kg MS) e quantidade de N extraída (kg/ha), em diferentes estádios de desenvolvimento da cultura do milho, em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.....	48
Figura 6. Dinâmica da concentração de nitrogênio na planta de milho, submetida a doses crescentes de nitrogênio em cobertura, em função do acúmulo de biomassa da cultura. ....	49
Figura 7. Índice de nutrição do nitrogênio (INN) de plantas de milho, ao longo do ciclo vegetativo, em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura. ....	50
<b>CAPÍTULO 4 - INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> E DOSES DE NITROGÊNIO EM MILHO PARA SILAGEM</b> .....	54
Figura 1. Variáveis climáticas (precipitação pluviométrica acumulada e temperatura média do ar) durante a condução do experimento em Erechim, RS, safras 2012/2013 e 2013/2014 e Santa Maria, RS, safra 2013/2014. ....	58
Figura 2. Peso da planta verde (g) e produtividade equivalente de silagem (kg/ha MS) de híbridos de milho submetidos a doses crescentes de nitrogênio em duas safras. ....	65
Figura 3. Peso da planta verde (g) e produtividade equivalente de silagem (kg/ha MS) de híbridos de milho submetidos a doses crescentes de nitrogênio em duas safras. ....	66



Figura 4. Teor de MS, carboidratos não fibrosos (CNF), carboidratos totais (CT) e proteína bruta de silagens de híbridos de milho inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> submetidos a doses crescentes de N em cobertura. ....	67
Figura 5. Peso da planta verde (g) e produtividade estimada de silagem (kg/ha MS) de híbridos de milho inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> submetidos a crescentes doses de N. ....	70
Figura 6. Proteína bruta, recuperação de matéria seca (RMS) e fibra em detergente neutro (FDN) de híbridos de milho submetidos a doses crescentes de N em cobertura. ....	72
<b>CAPÍTULO 5 - INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> E DOSES DE NITROGÊNIO EM HÍBRIDOS DE MILHO: ESTRATÉGIAS PARA INCREMENTO DA PRODUTIVIDADE</b> .....	77
Figura 1. Variáveis climáticas (precipitação pluviométrica acumulada e temperatura média do ar) durante a condução do experimento em Erechim, RS, safra 2012/2013 e Santa Maria, RS, safra 2013/2014. ....	81
Figura 2. Produtividade estimada de grãos de híbridos de milho, inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> , em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.....	84
Figura 3. Prolifricidade (espigas/planta), comprimento da espiga (cm), quantidade de grãos por fileira, quantidade de grãos por espiga e estatura (cm) de híbridos de milho em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.....	87
Figura 4. Quantidade de grãos por fileira e grãos por espiga, de híbridos de milho inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura. ....	89
Figura 5. Produtividade equivalente de grãos e grãos por espiga de híbridos de milho em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 3 - CONCENTRAÇÃO DO NITROGÊNIO NO SOLO E NA PLANTA DE MILHO INOCULADA COM <i>Azospirillum brasilense</i> E SUBMETIDA A NÍVEIS CRESCENTES DE FERTILIZAÇÃO NITROGENADA</b> .....	34
Tabela 1. Atributos químicos do Latossolo Vermelho Aluminoférrico Húmico pertencente à unidade de mapeamento Erechim.....	38
Tabela 2. Concentrações de N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N-NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e N mineral total, em mg/kg de solo nas diferentes épocas e profundidades de coleta de solo.....	42
Tabela 3. Interação entre estágio de desenvolvimento e inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e entre híbridos e inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> sobre o a concentração de N no tecido vegetal .....	47
<b>CAPÍTULO 4 - INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> E DOSES DE NITROGÊNIO EM MILHO PARA SILAGEM</b> .....	54
Tabela 1. Atributos químicos do solo nos locais onde foram realizados os experimentos no perfil de 0-20 cm.....	59
Tabela 2. Interação entre a inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e os híbridos de milho sobre a produtividade e a composição morfológica da planta de milho para silagem .....	62
Tabela 3. Interação entre a inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e as safras sobre a produtividade equivalente de plantas para silagem, em kg/ha MS.....	63
Tabela 4. Interação entre os híbridos de milho e as safras sobre a produtividade e composição morfológica da planta de milho para silagem.....	64
Tabela 5. Parâmetros fermentativos e composição nutricional de silagens de plantas de híbridos de milho nas safras 2012/2013 e 2013/2014 .....	66
Tabela 6. Teores de extrato etéreo e fibra em detergente ácido (FDA) e nutrientes digestíveis totais (NDT) de silagens de plantas de milho inoculadas com <i>Azospirillum brasilense</i> , nas safras 2012/2013 e 2013/2014.....	68
Tabela 7. Interação entre a inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e os híbridos de milho sobre os componentes nutricionais das silagens.....	68
Tabela 8. Interação entre os híbridos de milho e as safras sobre a composição nutricional de silagens de planta de milho.....	68
Tabela 9. Produtividade e composição morfológica das plantas de híbridos de milho para silagem.....	69

Tabela 10. Parâmetros fermentativos e composição nutricional de silagens de planta de milho inoculado com <i>Azospirillum brasilense</i> .....	71
Tabela 11. Parâmetros fermentativos e composição nutricional de silagens de planta de híbridos de milho.....	71
<b>CAPÍTULO 5 - INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> E DOSES DE NITROGÊNIO EM HÍBRIDOS DE MILHO: ESTRATÉGIAS PARA INCREMENTO DA PRODUTIVIDADE</b> .....	<b>77</b>
Tabela 1. Atributos químicos do solo nos locais onde foram realizados os experimentos no perfil de 0-20 cm.....	82
Tabela 2. Características agronômicas dos híbridos de milho na safra 2012/2013.....	85
Tabela 3. Interação entre inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e híbridos de milho sobre os componentes do rendimento.....	85
Tabela 4. Interação entre a inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e os híbridos de milho sobre a produtividade equivalente de grãos corrigida para 13% de umidade .....	88
Tabela 5. Características agronômicas dos híbridos de milho na safra 2013/2014.....	89

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	14
1.1 Hipóteses.....	14
1.2 Objetivos .....	15
1.2.1 Objetivo geral.....	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
<b>CAPÍTULO 2 – ESTUDO BIBLIOGRÁFICO</b> .....	16
2.1 Produção de milho .....	16
2.2 Adubação nitrogenada em milho .....	17
2.3 Bactérias promotoras do crescimento de plantas: gênero <i>Azospirillum</i> spp. ....	19
2.3.1 Produção de fitohormônios .....	21
2.3.2 Fixação biológica do nitrogênio.....	22
2.3.3 Outros mecanismos que promovem o crescimento de plantas.....	24
2.3.4 Inoculação de plantas com bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> spp. ....	25
2.4 Referências.....	29
<b>CAPÍTULO 3 - CONCENTRAÇÃO DO NITROGÊNIO NO SOLO E NA PLANTA DE MILHO INOCULADA COM <i>Azospirillum brasilense</i> E SUBMETIDA A NÍVEIS CRESCENTES DE FERTILIZAÇÃO NITROGENADA</b> .....	34
Introdução .....	36
Material e métodos.....	37
Resultados e discussão.....	41
Conclusões .....	51
Referências.....	51
<b>CAPÍTULO 4 - INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> E DOSES DE NITROGÊNIO EM MILHO PARA SILAGEM</b> .....	54
Introdução .....	56
Material e métodos.....	57
Resultados e discussão.....	62
Conclusões .....	73
Referências.....	74

<b>CAPÍTULO 5 - INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> E DOSES DE NITROGÊNIO EM HÍBRIDOS DE MILHO: ESTRATÉGIAS PARA INCREMENTO DA PRODUTIVIDADE</b> .....	77
Introdução .....	79
Material e métodos.....	80
Resultados e discussão.....	83
Conclusões .....	90
Referências.....	91
<b>CAPITULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	93

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1 Hipóteses

A inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. e a fertilização nitrogenada elevam os teores de N mineral nos solos, proporciona maior absorção de nutrientes e contribui com o desenvolvimento vegetal.

A inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. e a adubação nitrogenada proporcionam incrementos sobre a produtividade de grãos e silagem de milho e alteram as características agronômicas e morfológica das plantas.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo geral

Reduzir a dependência da cultura do milho às fontes de N produzidas industrialmente, vislumbrando aumento da produtividade de grãos e silagem por meio da inoculação com *Azospirillum brasilense*.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Estimar a concentração do N mineral ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ) na camada arável do solo em função das diferentes doses de N e da inoculação com *A. brasilense*.

Avaliar a dinâmica do crescimento e da concentração de nitrogênio no tecido vegetal em função da inoculação com *A. brasilense* e doses de N na cultura.

Estimar a produtividade e a qualidade de silagens de milho em função das doses de nitrogênio e da inoculação com *A. brasilense*.

Avaliar o rendimento de grãos de milho e as características agronômicas da cultura em resposta à inoculação com *A. brasilense* e às diferentes doses de N.

## CAPÍTULO 2 – ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

### 2.1 Produção de milho

Não se sabe ao certo desde quando o milho é cultivado. É possível afirmar que é uma das mais antigas plantas cultivadas. Estudos arqueológicos permitem afirmar que o milho existia como cultura há cerca de 4.000 anos, e já apresentava as principais características morfológicas que o definem atualmente (PASSOS et al., 1973). Na América, o milho constituía-se como a base alimentícia dos indígenas, conforme relatado por Cristóvão Colombo. Logo após a descoberta da América, o milho foi levado para Espanha, Portugal, França e Itália, onde era cultivado em jardins como planta exótica e ornamental. Posteriormente, passou a ser cultivado como planta com fins econômicos em função de seu valor alimentício e difundiu-se para o resto do mundo (PASSOS et al., 1973).

Desde então, o milho é utilizado na alimentação humana e em grande parte é empregado na alimentação dos animais na forma de grãos e silagem e, mais recentemente, também tem sido empregado comercialmente na produção de etanol, em alguns países. No Brasil seu cultivo ocorre em todas as regiões geográficas, em condições ambientais distintas, desde o extremo norte ao extremo sul, em baixas altitudes até altitudes superiores. Dessa forma, encontra-se na espécie variabilidade genética para adaptação às mais variadas condições ambientais (TEIXEIRA et al., 2002).

De acordo com a CONAB (2014), o cultivo nacional deste cereal atingiu área de 15.800 mil hectares durante a safra 2013/2014. A produção nacional foi de 70509 mil toneladas com produtividade média de 5057 kg/ha. Houve pequena redução de área, produção total e produtividade na safra 2013/2014 em relação à safra 2012/2013 (CONAB, 2014). A redução em área plantada entre as safras deveu-se à expectativa de preços menores e ao excedente de oferta. A redução da produtividade ocorreu em virtude da má distribuição de chuvas, em períodos críticos, tais como florescimento e enchimento de grãos, associada às elevadas temperaturas que persistiram até meados de fevereiro (CONAB, 2014).

Para efeito de parâmetro, a CONAB (2014) estima que a área cultivada aumentou em 11,7% nos últimos 20 anos e a produção 140,9%. O ganho de produtividade foi de 115,7%. Atribui-se os ganhos, ao uso de tecnologia mais avançada, como emprego de sementes mais



produtivas, variedades resistentes à pragas e/ou tolerantes à doenças e adubação localizada e direcionada de acordo com análise de solo e exigência da planta.

## **2.2 Adubação nitrogenada em milho**

Depois da deficiência de água, o nitrogênio (N) pode ser considerado o fator que mais limita a produtividade de biomassa em ecossistemas nos trópicos. De acordo com Lemaire e Gastal (1997), o N é o nutriente exigido e absorvido em maior quantidade pelo milho, e o que mais frequentemente limita a produtividade de grãos, essencial para o desenvolvimento das plantas. O N serve como constituinte de muitos componentes da célula vegetal, tais como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, enzimas e coenzimas, glicoproteínas, lipoproteínas, pigmentos incluindo a clorofila e produtos secundários (MALAVOLTA, 2006; TAIZ e ZEIGER, 2009).

Portanto, a deficiência de N rapidamente inibe o crescimento vegetal, afetando o desenvolvimento de raízes, a fotossíntese e a respiração, a formação de folhas, a síntese de compostos nitrogenados, a absorção iônica, a multiplicação e diferenciação celular, dentre outras (MALAVOLTA, 2006; TAIZ e ZEIGER, 2009). O sinal mais evidente de sua deficiência na maioria das espécies é a clorose (amarelecimento das folhas), sobretudo nas folhas mais velhas, pois é possível que em folhas mais novas o N seja mobilizado a partir das folhas velhas (TAIZ e ZEIGER, 2009). Quando a deficiência de N desenvolve-se lentamente, é possível que as plantas apresentem caules pronunciadamente delgados e comumente lenhosos, em virtude do acúmulo em excesso de carboidratos, que não podem ser empregados na síntese de aminoácidos ou outros compostos nitrogenados (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Souza e Soratto (2006) verificaram aumento linear da produtividade do milho safrinha com dose de até 120 kg/ha de N. Respostas semelhantes foram obtidas por Araújo et al. (2004) com aumento linear de produtividade do milho safrinha com dose de até 240 kg/ha de N. Segundo Pavinatto et al. (2008) a máxima eficiência técnica em milho irrigado é obtida com aplicação de 283 a 289 kg/ha de N. Os autores ressaltaram que essas quantidade de N para obtenção da máxima eficiência de produtividade de grãos é observada em condições de cultivo irrigado, podendo diminuir muito em condições de sequeiro. De acordo com Amado et al. (2002) em anos nos quais as condições climáticas são favoráveis à cultura do milho, a quantidade de N requerida para otimizar a produtividade de grãos pode alcançar valores

superiores a 150 kg/ha, quantidade esta que dificilmente será suprida somente pelo solo, havendo necessidade de complementar com outras fontes deste nutriente.

Em virtude das excelentes respostas produtivas frente à adubação nitrogenada, o uso do N, principalmente na forma de ureia tem sido justificado, estando difundido em praticamente todos os estabelecimentos rurais. No entanto, segundo Ma e Dwyer (1998) a adubação nitrogenada pode ser encarada como fator com elevado índice de consumo de energia para produção agrícola, além de ser um produto obtido com a queima de combustíveis fósseis. Quando aplicado na lavoura está susceptível a perdas por volatilização e lixiviação, sendo que esta última perda pode representar contaminação de águas superficiais e subterrâneas (PRIMAVESI, et al. 2006; RAIJ, 2011).

As principais formas de N mineral disponíveis no solo e que são absorvidas pelas plantas são o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). De acordo com Malavolta (2006), a forma de N predominantemente absorvida nas condições naturais, provenientes de adubos orgânicos ou minerais adicionados, é a nítrica ( $\text{NO}_3^-$ ). Do ponto de vista ambiental, práticas de manejo que visem controlar ou reduzir as perdas de  $\text{NO}_3^-$  por lixiviação evitando a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, são fundamentais.

De acordo com Amado et al. (2002), o manejo da adubação nitrogenada deve satisfazer a necessidade da cultura com o mínimo possível de risco ambiental. O desenvolvimento de estratégias de aplicação e ciclagem de N é importante para melhorar a eficiência de uso deste elemento, aumentar o retorno econômico aos agricultores e reduzir as contaminações ambientais (ASSMANN, et al. 2007). Como medida faz-se necessário o ajuste da entrada de N de forma econômica e ecologicamente compatível com a demanda da cultura.

Nesse contexto, Hungria (2011) comenta que as projeções são de que, nos próximos anos, haverá incremento substancial no uso de fertilizantes no Brasil para atender à intensificação da agricultura e à recuperação de áreas degradadas. O mercado brasileiro de fertilizantes é frágil e com grande dependência das importações, sendo fundamental, encontrar alternativas para o uso mais eficiente dos fertilizantes (HUNGRIA, 2011). Dessa forma, alguns microrganismos, como as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, as bactérias promotoras do crescimento de plantas, os fungos micorrízicos, dentre outros, podem desempenhar um papel relevante e estratégico para garantir altas produtividades a baixo custo e com menor dependência de importação de insumos.

### 2.3 Bactérias promotoras do crescimento de plantas: gênero *Azospirillum* spp.

Diversas bactérias presentes no solo possuem capacidade de exercer efeitos benéficos sobre o crescimento das culturas. Bactérias do gênero *Azospirillum* caracterizam-se por serem de vida livre e há muitos anos são conhecidas como promotoras do crescimento de plantas. Tais microrganismos têm sido isolados na rizosfera de diversas gramíneas e cereais ao redor do mundo, tanto em espécies tropicais como temperadas, apresentando efeitos benéficos em experimentos conduzidos em casas de vegetação e também em condições de campo (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

Cinco espécies de *Azospirillum* têm sido frequentemente descritas na literatura: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferense* e *A. irakense*. Essas bactérias predominantemente colonizam a superfície das raízes e algumas cepas são capazes de infectar a planta (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). A esse respeito, Baldani et al. (1986) demonstraram que certas estirpes de *Azospirillum* spp. são capazes de colonizar o interior das raízes de trigo. Com técnicas de identificação de RNAm, Assmus et al. (1995) identificaram que a bactéria *A. brasilense* sp245 é hábil em colonizar o interior das células dos pelos radiculares em trigo, as quais mantêm a parede celular aparentemente intacta, no entanto, as bases fisiológicas para explicar o poder invasivo observado não são totalmente conhecidas. Os autores supracitados observaram também que a cepa Sp7 habita exclusivamente a superfície das raízes.

Outro trabalho, conduzido na Argentina, por Bellone e Silvia (2012), utilizando duas cultivares de cana de açúcar, mostrou que a bactéria *A. brasilense* Sp7 penetrou nas raízes laterais emergentes e promoveu mudanças na parede celular. Os autores comentaram ao observar microfotografias, que as bactérias penetraram no ambiente intercelular utilizando microfibrilas de celulose, pela ação de enzimas que clivam cadeias glicosídicas, reduzindo a rigidez da parede. As bactérias foram vistas no córtex radical. Nos espaços intercelulares as bactérias foram vistas incorporadas dentro da matriz fibrilar. No entanto, essa entrada não foi suficiente para causar danos às células.

As bactérias do gênero *Azospirillum* spp. ocorrem em distintos ambientes e são encontradas em densidades populacionais variadas dependendo da interação entre genótipo e ambiente. Essas bactérias possuem diversificadas rotas metabólicas do carbono e nitrogênio e possuem vários plasmídeos de diferentes tamanhos com propriedades associativas às plantas, tornando-as adaptadas e competitivas nos diferentes ambientes. No caso de condições

adversas como dessecação e escassez de nutrientes essas bactérias convertem-se em esporos. Além disso, são flageladas (polares ou apolares) o que favorece sua motilidade em meios sólidos ou líquidos, movendo-se em direção às zonas de maior disponibilidade de nutrientes (FRANCHE et al., 2009)

Os estudos que tratam da ocorrência de *Azospirillum* spp., verificaram populações que variaram entre  $1,69 \times 10^4$  e  $1,76 \times 10^8$ , em diferentes solos e culturas, como, campo nativo, milho, arroz, braquiária e capim elefante (REIS JUNIOR et al., 2004; PITTNER et al., 2007; CARDOSO et al., 2010; VIDEIRA et al., 2011). De acordo com Videira et al. (2011) foi encontrado um total de 204 bactérias diazotróficas em área cultivada com capim elefante. Em sua maioria, essas bactérias foram encontradas no colmo (60,8%), nas raízes (19,6%) e folhas (19,6%), com população bacteriana que variou entre  $10^2$  e  $10^6$  células/mL, sendo bastante representativas as bactérias do gênero *Azospirillum*. No Uruguai, Montañez et al. (2009) isolaram 178 bactérias de 19 cultivares de milho. Dessas, 46% foram isoladas do colmo, 30% das raízes, 17% de sementes e 11% de folhas.

De acordo com Steenhoudt e Vanderleyden (2000) o crescimento vegetal pode ser maximizado quando a concentração de *Azospirillum* na rizosfera é igual a  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Segundo Verma et al. (2011) a população de *Azospirillum* spp., sofre influência do tipo de solo e do histórico de cultivos. Em solos onde o cultivo de milho se dá há centenas de anos as populações bacterianas são superiores em torno de  $46,3 \times 10^5$  UFC/mL. A menor população de *Azospirillum* spp., em torno de  $6,5 \times 10^5$  UFC/mL, foi relatada em solos sem utilização de calcário e com histórico de cultivo de arroz.

Roesch et al. (2006) verificaram que anterior ao plantio do milho não foram detectadas bactérias diazotróficas em amostras de solo na área experimental. No entanto, após o cultivo esse grupo de bactérias foi encontrado no solo e nos tecidos vegetais. Os autores inferem que as bactérias estariam presentes nas sementes de milho utilizadas no experimento. Ao realizarem a contagem bacteriana eles observaram que a quantidade de bactérias encontradas nas raízes é sempre superior à encontrada no solo e no colmo. Os mesmos autores relatam que isso pode ocorrer em função da pequena quantidade de fontes de carbono disponíveis para essas bactérias no solo e das mudanças drásticas que podem ocorrer no ambiente do solo, tais como, umidade, pH, atividade de água, salinidade, bem como, competição com a biota. Nesse sentido, as raízes podem prover uma fonte primária de carbono a essas bactérias estimulando sua multiplicação, ou alternativamente, essas bactérias poderiam estar presentes nas sementes utilizadas no experimento.

Nesse contexto, Verma et al. (2011) demonstraram que a população de *Azospirillum* spp., de ocorrência natural, declina de forma linear em função da diminuição dos níveis de carbono no solo. Solos com 0,2-0,4% de carbono apresentaram em média  $12,5 \times 10^5$  UFC/mL contra uma população bacteriana de  $91,4 \times 10^5$  UFC/mL para solos com mais de 1,0% de carbono. De acordo com os autores, os cultivos intensivos levam à diminuição nos teores de matéria orgânica do solo a partir de áreas antes sem cultivo, e se estabilizam de acordo com as características climáticas e as produtividades da cultura, sendo considerado o mais importante elemento para a atividade e diversidade microbiana. Outra informação importante obtida pelos autores é de que o plantio direto beneficia a população bacteriana ( $61 \times 10^5$  UFC/mL), enquanto que a aração profunda diminui a população para cerca de  $12 \times 10^5$  UFC/mL.

Diversos fatores edafoclimáticos podem afetar a sobrevivência e atividade de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. Em geral, essas bactérias são microaeróbias, fixam  $N_2$  quando não há acúmulo de oxigênio em torno delas. De acordo com Oliveira et al. (2008), o ótimo crescimento em relação a temperatura está entre 32 e 37°C, sendo que *A. halopraeferens* tem crescimento ótimo a 41°C.

A acidez do solo afeta a sobrevivência e atividade de bactérias diazotróficas. Na Austrália se evidenciou isolados de *Azospirillum* spp. em solos com variação de pH entre 5,0 e 6,5. Em solos com pH entre 4,5 e 5,0 foram raros os isolados de *Azospirillum* spp. encontrados, enquanto que abaixo de 4,5 ausência de bactérias desse gênero foi observada (NEW e KENNEDY, 1989).

As espécies de *Azospirillum* spp. assemelham-se quanto à tolerância à acidez dos solos, com exceção da *A. amazonense*, que parece tolerar uma variação maior nesse sentido (OLIVEIRA et al., 2008). Especificamente, as estirpes de *A. brasilense*, apresentam boas taxas de crescimento e fixação de nitrogênio entre a faixa de pH 6 a 8. É possível considerar o pH 7,0 como ótimo para o desenvolvimento bacteriano e FBN.

### 2.3.1 Produção de fitohormônios

O principal mecanismo de promoção de crescimento de plantas, atribuído ao gênero *Azospirillum* spp., tem sido a indução hormonal, por meio da produção de auxinas, citocininas, giberelinas, dentre outras, substâncias promotoras do crescimento em plantas. O fitohormônio quantitativamente mais importante é o ácido 3-indolacético (STEENHOUDT e

VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN et al., 2004). Esses hormônios promovem o desenvolvimento de raízes (ramificações e pelos radicais), aumentando a superfície radical e, com isso, proporcionando maior capacidade de absorção de água e nutrientes, além do maior acúmulo de matéria seca em plantas inoculadas. Ainda, aumentam a tolerância das plantas a condições de estresse, tais como salinidade e deficiência hídrica (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN et al., 2004).

Os estudos realizados por Radwan et al. (2004) demonstraram que as estirpes de *Azospirillum* spp. testadas em milho e soja, produziram de três a sete vezes mais compostos indólicos (entre 300 a 500  $\mu\text{M}$ ) que as do gênero *Herbaspirillum* spp.. CASSÁN et al. (2009) observaram que a bactéria *Azospirillum brasilense* Az39 produziu maior quantidade de ácido 3-indolacético e zeatina, enquanto que *Bradyrhizobium japonicum* E109 produziu maior quantidade de giberelina.

Referente ao crescimento e aumento da superfície radical das plantas, Hungria et al. (2010) estudando diferentes cepas de *Azospirillum brasilense*, verificaram que os teores de macro e micronutrientes em folhas e grãos, dentre eles, nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) aumentaram em função da inoculação. Isso pode representar redução na suplementação de adubos minerais quando as plantas são inoculadas. Nesse mesmo contexto, Moutia et al. (2010) observaram benefícios exercidos pelo *Azospirillum* sp., como o aumento de raízes e maior absorção de nutrientes (N, P e K) em cana-de-açúcar. Estes resultaram da interação entre cultivares e condições ambientais, sendo que os benefícios foram mais evidentes em condições de estresse hídrico. Rodelas et al. (1999) observaram aumento nos teores de P no tecido vegetal quando as plantas foram inoculadas com *A. brasilense*. Os autores comentaram que o aumento na absorção de nutrientes ocorre parcialmente devido ao efeito do *Azospirillum* sobre a atividade da membrana e ao efluxo de prótons.

### 2.3.2 Fixação biológica do nitrogênio

Além da produção de fitohormônios, as bactérias do gênero *Azospirillum* spp. estimulam o crescimento das plantas através da fixação biológica do nitrogênio (FBN), convertendo o N atmosférico em amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) através da ação do complexo nitrogenase, o que envolve uma série de genes como nifH, nifK, nifA, gltDB, dentre outros, nos processos

de fixação, regulação e assimilação do N (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). No entanto, a realização da FBN por *Azospirillum* spp., não têm sido consenso na literatura.

Há evidências que a FBN, medida de maneira indireta através da redução do acetileno, sofre queda abrupta com temperaturas superiores a 37°C para a espécie de *A. brasilense* Sp7, chegando a valor igual a zero quando a temperatura foi de 39 e 41°C. As estirpes 6, 7 e 14, todas de *A. brasilense* mostraram-se mais tolerantes a elevadas temperaturas, considerando que a atividade da nitrogenase zerou quando a temperatura ambiente foi de 41, 44 e 44°C, respectivamente (DOBEREINER, 1990).

Noutro estudo, a estirpe de *A. brasilense* Sp9 apresentou-se estável quanto a atividade da enzima nitrogenase com o incremento da temperatura, apresentando elevada atividade com 42°C (TRIPATHI e KLINGMÜLLER, 1992). Em geral, estirpes de *A. brasilense* e *A. lipoferum* apresentam ótima atividade relacionada à redução do acetileno quando a temperatura varia entre 30 e 35°C. Avaliando a espécie *A. halopraeferans* Au4 verificou-se máxima atividade da enzima nitrogenase com temperatura igual a 41°C (DOBEREINER, 1990; TRIPATHI e KLINGMÜLLER, 1992).

Na Índia, verificou-se que a máxima taxa de crescimento para *Azospirillum* spp. ocorre com pH entre 7 e 8, da mesma forma a máxima fixação de nitrogênio e produção de ácido indol acético ocorre nessa faixa de pH. As bactérias em pH entre 3 e 4 apresentaram baixa taxa de crescimento, entretanto, foram capazes de fixar nitrogênio e produzir fitohormônios em valores mais modestos quando comparados aos demais (RAVIKUMAR et al., 2002).

De acordo com Videira et al. (2011) a habilidade de 204 genótipos de bactérias, isoladas de capim elefante, em fixar nitrogênio *in vitro* é bastante variável e depende da atividade da desidrogenase e do tipo de N livre usado no meio de cultivo. Já em relação à produção de fitohormônios 97% dos isolados apresentaram capacidade de produzir compostos indólicos, sendo afetada pela presença de triptofano. Os autores classificaram os isolados em incapazes, com baixa capacidade, média capacidade e elevada capacidade de fixação de N, através da avaliação da atividade da nitrogenase em função da produção em nmol de etileno h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína. Eles observaram que 41,2% dos isolados apresentam média ou alta capacidade de fixar nitrogênio, enquanto que 32,4% apresentam baixa capacidade e 26,5% são incapazes de fixar N.

A atividade da nitrogenase em vários microrganismos diazotróficos também é inibida pela adição de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de forma rápida e reversível. A expressão da atividade da FBN está sob o controle genético e, em adição, é regulada por fatores ambientais. Esse controle se faz necessário em virtude do alto custo energético da redução de N<sub>2</sub> (REIS e TEIXEIRA, 2005).

Por outro lado, os resultados obtidos por Montañez et al. (2009) no Uruguai, revelaram que existe uma significativa FBN em milho, através de estudos com  $N^{15}$  isótopo, havendo diferenças entre os genótipos estudados. O trabalho realizado por Rodrigues et al. (2008) ratifica a hipótese de haver FBN por bactéria do gênero *Azospirillum*, os autores demonstram que a inoculação com *Azospirillum amazonense* pode promover o crescimento de plantas e também o acúmulo de N em arroz via FBN.

Morais et al. (2012) estudando  $N^{15}$  isótopo em genótipos de capim elefante visando a produção de biocombustíveis, observaram que quatro desses genótipos apresentam capacidade de absorver entre 36 e 132 kg/ha/ano de N, sendo que de 18 a 70% do N pode ser provido via FBN, promovido por bactérias associadas às plantas. Salienta-se que o trabalho não identificou e quantificou a população bacteriana associada às plantas. Nesse contexto, Reis et al. (2001) isolaram e identificaram *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum serpedicae* e *H. frisingense* de 14 genótipos de capim elefante e verificaram que os genótipos mais produtivos são capazes de obter até 30% do N via FBN, promovida pelas bactérias citadas anteriormente.

### 2.3.3 Outros mecanismos que promovem o crescimento de plantas

Mecanismos que envolvem a redução do nitrato, a solubilização e mobilização do fosfato e o controle biológico sobre patógenos, também têm sido propostos para justificar o crescimento de plantas inoculadas com *Azospirillum* spp. (CORREA et al. 2008).

De acordo com Tortora et al. (2012) *A. brasilense* REC3 foi capaz de conferir proteção sistêmica contra *Colletotrichum acutatum* M11 agente causal da antracnose em morangos. Os mecanismos de defesa induzidos pela inoculação de *A. brasilense* REC3 incluem reforço à parede celular em razão do aumento da concentração de compostos fenólicos solúveis, da deposição de calose e da transitória acumulação de ácido salicílico.

Silva et al. (2004) observaram aumento da superfície das raízes e tamanho de plantas de trigo e cevada com inoculação de *A. brasilense*. Após 15 dias de desenvolvimento das plantas os autores pulverizaram sobre as folhas o patógeno *Bipolaris sorokiniana*. Todas as folhas das plantas não inoculadas apresentaram lesões típicas do patógeno do trigo ou da cevada, não constatadas nas folhas de plantas inoculadas com *A. brasilense*. Isso confirma que



as plantas inoculadas apresentam resistência ao patógeno e que as bactérias atuam como elicitores de resistência.

Trabalho avaliando a cultura do tomateiro mostrou que a inoculação com *Azospirillum brasilense* pode mitigar o efeito do estresse hídrico na planta causado pelo patógeno vascular denominado *Clavibacter michiganensis*. As plantas inoculadas apresentaram maior área dos vasos do xilema, maior tronco condutividade hidráulica específica, talos mais grossos, e menor parte aérea/matéria seca de raízes e área foliar específica (ROMERO et al. 2014).

#### 2.3.4 Inoculação de plantas com bactérias do gênero *Azospirillum* spp.

O interesse em pesquisas com *Azospirillum* spp. tem se justificado pela capacidade desses microrganismos em promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitohormônios, da FBN, e outros mecanismos descritos anteriormente. Noutro contexto, Hungria et al. (2010) citam que o uso de inoculantes com bactérias para promover o crescimento de plantas, também é interessante em virtude dos elevados custos dos fertilizantes industrializados, a crescente preocupação com a poluição ambiental e a busca por sistemas agrícolas sustentáveis.

Em uma compilação de resultados de 20 anos de estudos com *Azospirillum*, ao redor do mundo, realizada por Okon e Itzigsohn (1995), demonstraram que 60 a 70% dos trabalhos apresentam sucesso com diferença significativa e aumento de produtividade na ordem de 5 a 30% com a inoculação. Em outra revisão de literatura, envolvendo o uso de *Azospirillum* em 273 experimentos com trigo e milho na Argentina, realizada por Díaz-Zorita e Fernandez Canigia (2008), demonstrou que em 76% dos casos houve aumento de 256 kg/ha na produção de grãos trigo e em 85% dos estudos aumento na produção de grãos de milho na ordem de 472 kg/ha. Swędrzyńska (2000) concluiu que a inoculação de *Azospirillum brasilense* foi responsável por aumentar o rendimento das culturas de trigo e aveia, demonstrando durante o período vegetativo maior vigor das plantas inoculadas, manifestando-se numa maior concentração de clorofila nas lâminas foliares.

No entanto, alguns problemas são observados e envolvem a inoculação com *Azospirillum* spp.. Esses problemas referem-se que, as bactérias executam funções que muitas vezes não são específicas e a população bacteriana declina rápida e progressivamente após a inoculação. Este declínio deve-se à heterogeneidade e ao ambiente relativamente imprevisível

dos solos, incluindo características nutritivas e físico-químicas (STRIGUL e KRAVCHENKO, 2006).

Nesse contexto, os esforços têm sido direcionados na formação de um microambiente que permita o desenvolvimento das bactérias durante o armazenamento e após a aplicação no solo, no sentido de evitar o rápido declínio após o cultivo. Nas últimas décadas, muitos experimentos têm direcionado suas pesquisas, visando a formulação de inoculantes com polímeros. Esses polímeros oferecem vantagens sobre a turfa, encapsulando/protegendo os microrganismos contra os estresses ambientais (STRIGUL e KRAVCHENKO, 2006).

Joe et al. (2012) observaram que a adição de alginato na forma padrão ou floculado à formulação do inoculante foram eficientes em manter a população bacteriana mais elevada ao longo de 12 meses de avaliação. Além disso, os autores relataram que a população bacteriana é mais elevada quanto maior é a atividade de água no solo.

De acordo com Hungria et al. (2010) o Brasil possui uma longa tradição em pesquisas com *Azospirillum* que remonta aos experimentos realizados pela Dra. Johanna Döbereiner. Apesar dos avanços nas pesquisas básicas e aplicadas, os resultados em nível de campo são inconsistentes ao avaliar a eficiência agrônômica com uso de inoculantes, sendo necessária a inoculação com estirpes específicas em cada cultivo. Os autores destacaram que a escolha da cepa é o fator chave para o sucesso da inoculação com *Azospirillum* spp.

Dessa maneira, Hungria et al. (2010) estudando a produtividade de grãos de milho e trigo em 17 experimentos, em dois locais no Estado do Paraná, selecionaram 7 cepas de *A. brasiliense* (Ab-V1, Ab-V2, Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 e Ab-V8) isoladas do milho e efetivas em milho e trigo e duas cepas de *A. lipoferum* (Al-V1 e Al-V2) isoladas do milho e efetivadas somente em milho. Curiosamente todas essas cepas selecionadas tiveram melhor desempenho em promover o crescimento vegetal do que as cepas Sp7 e Sp245 as quais têm sido descritas em experimentos e utilizadas em inoculantes.

Os autores supracitados relataram que todas as cepas de *A. brasiliense* proporcionaram aumento da produção de grãos de milho em pelo menos dois experimentos de campo, com superioridade na ordem de 16 a 30% quando comparadas às produtividades sem inoculação e sem adubação nitrogenada. O rendimento médio de grãos de milho inoculados com *Azospirillum brasiliense* foi de 3407 kg/ha. Os resultados obtidos no experimento resultaram na recomendação das cepas Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 para milho, as quais não diferiram do tratamento sem inoculação e com a utilização de 80 kg/ha de N, proporcionando aumento da produção de grãos na ordem de 662 a 823 kg/ha ou 24 a 30% em relação à cultura não inoculada.

Nesse mesmo sentido, Di Ciocco e Rodríguez Cáceres (1994) na Argentina já haviam observado que a combinação de determinadas cepas de *Azospirillum* spp. poderia levar à maior produtividade de *Setaria itálica*, semelhante à dose de 55,2 kg de N/ha. Os autores mostraram haver diferenças na produtividade da cultura quando a inoculação foi realizada com diferentes cepas.

A contagem de bactérias realizada por Herschkovitz et al. (2005) mostrou que as raízes de milho quando inoculadas com *A. brasiliense* apresentam a mesma população bacteriana quando comparadas a raízes não inoculadas, sendo fortemente influenciadas pela idade da planta. Mesmo assim, de acordo com Herschkovitz et al. (2005), a inoculação com *Azospirillum brasiliense* cepa Sp 245 resultou em aumento significativo no peso de raízes frescas com média e desvio padrão de  $1,92 \pm 0,2$ ;  $2,66 \pm 0,3$  e  $2,28 \pm 0,3$  gramas para a cepa Cd, cepa Sp 245 e sem inoculação, respectivamente, desde a primeira semana após a emergência.

Os estudos com *Azospirillum* não têm se restringido a avaliar seus efeitos sobre gramíneas. Alguns estudos são conduzidos com a finalidade de avaliar a inoculação em leguminosas. Em relação à germinação de sementes inoculadas, Cassán et al. (2009) observaram aumento na germinação de sementes de milho e também de soja com *Azospirillum brasilense* Az39 e *Bradyrhizobium japonicum* E109 inoculadas de forma isolada ou combinadas, havendo melhor desenvolvimento inicial, com maior comprimento de plântulas e peso da parte aérea e de raízes para milho e soja, sendo respostas típicas à produção de giberelinas. Ainda, em relação à soja, os autores observaram que a inoculação combinada de *Azospirillum brasilense* Az39 e *Bradyrhizobium japonicum* E109 promoveu aumento no número de nódulos por planta e percentagem de plantas noduladas, favorecendo o desenvolvimento do *Rhizobium* e a FBN.

Outro estudo conduzido por Star et al. (2012) demonstrou que a inoculação combinada de *A. brasilense* e *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* aumentou a formação de pelos radiculares, nódulos e o crescimento de plantas de ervilhaca inoculada. Segundo Dardanelli et al. (2008) a inoculação com *A. brasilense* em leguminosas aumenta a produção e secreção de diversos tipos de flavonóides nas raízes, os quais provavelmente são responsáveis pelo aumento da nodulação observados nos experimentos.

Öğüt et al. (2005) conduzindo trabalhos em experimento de campo na Turquia, observaram que a inoculação de *A. brasilense* não aumentou a nodulação em feijão. No entanto, foi relatada maior massa de nódulos nas raízes até os 45 dias após a emergência, quando o experimento foi realizado em casa de vegetação. Esses resultados podem estar

relacionados às melhores condições para o crescimento das plantas e sobrevivência microbiana que a casa de vegetação oferece. Maior produção de grãos de feijão foi obtida. Essa maior resposta produtiva, frente à inoculação na cultura do trigo, não foi obtida. Os autores inferiram que essas diferenças nas respostas produtivas devem-se ao menor nível de adubação nitrogenada utilizada na cultura do feijão (20 kg/ha), quando comparada ao trigo (100 kg/ha).

Alguns resultados demonstram que as respostas produtivas frente à inoculação com *Azospirillum* e a população bacteriana apresentam correlação negativa com os níveis de nitrogênio empregados sobre a cultura. Segundo Dobbelaere et al. (2002) estudando *Azospirillum brasilense* Sp245 e *Azospirillum irakense* KBC1, em diferentes concentrações e doses de N, o desempenho inicial do trigo, como comprimento de folhas e peso de planta somente são superiores nas plantas inoculadas quando as doses de N são baixas ou intermediárias (200 – 350 mg/planta N). Os autores observaram que a inoculação com *A. brasilense* Sp245 em trigo resultou em melhor germinação das sementes, aumento do comprimento de folhas, peso de plantas, peso de panículas, número de grãos por panícula e desenvolvimento do pendão, sendo que a maior concentração de bactérias ( $10^7$ - $10^8$  UFC/planta) não estimulou ou apresentou efeitos negativos sobre as variáveis analisadas.

Em milho, os autores supracitados observaram efeitos negativos da fertilização com N sobre a germinação das sementes, mostrando considerável atraso na germinação em elevadas doses de N. As melhores respostas frente à inoculação do milho foram obtidas com as doses de 1000 e 2000 mg de N/planta, o que equivale a 100 e 200 kg de N/ha, respectivamente. Ainda, foi evidenciada maior afinidade de *A. irakense* KBC1 para inoculação em milho e *A. brasilense* Sp245 para a cultura do trigo.

O trabalho realizado por Cavallet et al. (2000) diferiu, em parte, da lógica proposta anteriormente. Quando não foi realizada adubação nitrogenada a resposta da cultura frente à inoculação foi menos acentuada e não significativa. Na medida em que a adubação nitrogenada via sulfato de amônio foi realizada, até a dose de 140 kg de N/ha a resposta foi superior e as diferenças significativas. O tratamento sem N na semeadura e com 70 kg de N/ha de cobertura proporcionou aumento de 30% na produção de grãos. A produtividade de grãos de milho foi de 5211 kg/ha sem a inoculação, quando inoculado a produtividade foi de 6067 kg/ha, superior 17%.

## 2.4 Referências

- AMADO, T.J.C. et al. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 1, p. 241-248, 2002.
- ARAÚJO, L.A.N. et al. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 39, n. 8, p. 771-777, 2004.
- ASSMANN, T.S. Fixação biológica de nitrogênio por plantas de trevo (*Trifolium* spp) em sistema de integração lavoura-pecuária no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, 2007.
- ASSMUS, B. et al. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1013-1019, 1995.
- BALDANI, V.L.D. et al. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of cell grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 90, p. 35-46, 1986.
- BASHAN, Y. et al. *Azospirillum* plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997 - 2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521 – 577, 2004.
- BASHAN, Y. Enhancement of Wheat Root Colonization and Plant Development by *Azospirillum brasilense* Cd. Following Temporary Depression of Rhizosphere Microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1067-1071, 1986.
- BELLONE, C.H.; SILVIA, C.B. Interaction of *Azospirillum brasilense* and *Glomus intraradix* in sugar cane roots. **Indian Journal Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 70-75, 2012.
- CARDOSO, I.C.M. et al. Ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em arroz irrigado no estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 9, n. 2, p. 178-186, 2010.
- CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 28-35, 2009.
- CAVALLET, L.E. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp.. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10 ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul: UFRGS, 2004. 400p.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Safra 2013/2014**. Décimo segundo levantamento, setembro de 2014. Brasília: Conab, 2014. 127 p.

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

DARDANELLI, M.S. et al. Effect of *Azospirillum brasilense* co-inoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2713–2721, 2008.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNANDEZ CANIGIA, M.V. Análisis de la producción de cereales inoculados com *Azospirillum brasilense* em la República Argentina. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. **Asociación Argentina de Microbiología**, Argentina, p. 153–164, 2008.

DI CIOCCO, C.A.; RODRÍGUEZ CÁCERES, E.A. Field inoculation of *Setaria italica* with *Azospirillum* spp. in Argentine humid pampas. **Field Crops Research**, v. 37, p. 253-257, 1994.

DOBBELAERE, S. et al. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. Irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 284–297, 2002.

DOBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 4, n. 8, p. 144-152, 1990.

FERREIRA, J.S. et al. Avaliação de duas cultivares de trigo inoculadas com bactérias diazotróficas em condições de casa de vegetação. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. 2010. 20p.

FRANCHE, C. et al. Nitrogen fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, p. 35-59, 2009.

HERSCHKOVITZ, Y. et al. Inoculation with the plant growth promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). **Microbial Ecology**, v. 50, p. 277-288, 2005.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. Lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p.

JOE, M.M. et al. Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 198-206, 2012.

LEMAIRE, G.; GASTAL F. **N uptake and distribution in plant canopies**. In: G. LEMAIRES (ed.) *Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops*. Springer-Verlag, Heidelberg, 1997. p. 3-44.

MA, B.L.; DWYER, L.M. Nitrogen uptake and use of two contrasting corn hybrids differing in leaf senescence. **Plant and Soil**, v. 199, p. 283-291, 1998.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MONTAÑEZ, A. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by <sup>15</sup>N isotope dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, p. 253-263, 2009.

MORAIS, R.F. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant and Soil**, v. 356, p. 23-34, 2012.

MOUTIA, J.F.Y. et al. In sugar cane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and Soil**, v. 337, p. 233-242, 2010.

NEW, P.B; KENNEDY, I.R. Regional distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in Eastern Australia. **Microbiology Ecology**. v. 17, p. 299-309. 1989.

ÖĞÜT, M. et al. Single and double inoculation with *Azospirillum/Trichoderma*: the effects on dry bean and wheat. **Biology and Fertility Soils**, v. 41, p. 261-272, 2005.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 415-424, 1995.

OLIVEIRA, J.P. et al. Fixação do N<sub>2</sub> associativa e em vida livre. In: FIGUEIREDO, M.V.B., BURITY, H.A., STAMFORD, N.P. SANTOS, C.E.R. S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p.97-118.

PAVINATTO, P.S. et al. Nitrogênio e potássio em milho irrigado: análise técnica e econômica da fertilização. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 358-364, 2008.

PASSOS, S.M.G. et al. **Principais culturas II**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973. 405p.

PITTNER, E. et al. Flutuação populacional de bactérias do gênero *Azospirillum* em solo cultivado com milho e em campo nativo. **Ambiência**, v. 3, n. 2, p. 243-252, 2007.

RADWAN, T.EL-S.EL-D. et al. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 987-994, 2004.

RAVIKUMAR, S. et al. Quantification of halophilic *Azospirillum* from mangroves. **Indian Journal Sciences**, v. 31, n. 2, p. 157-160, 2002.

REIS JUNIOR, F.B. et al. Identificação de isolados de *Azospirillum* amazonense associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 103-113, 2004.

REIS, V.M. et al. Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 837- 844, 2001.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. **Fixação Biológica de Nitrogênio–Estado da arte**. p. 151-180. 2005. In: AQUINO, A.N.; ASSIS, R.L. Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 368 p.

RODELAS, B. et al. Influence of *Rhizobium/Azotobacter* and *Rhizobium/Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). **Biology and Fertility Soils**, v. 29, p. 165–169, 1999.

RODRIGUES, E.P. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 302, p. 249-261, 2008.

ROESCH, L.F.W. et al. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen supply. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 967-974, 2006.

ROMERO, A.M. et al. *Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. **Applied Ecology Soil**. v. 82, p. 38-42, 2014.

SILVA, A.A.O. et al. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Conscientiae Saúde**, v. 3, p. 29-35, 2004.

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

STANFORD, G. Rationale for optimum nitrogen fertilization in corn production. **Journal Environmental Quality**, v.2, p.159-166, 1973.

STAR, L. et al. The *Vicia sativa* spp. *nigra* – *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* symbiotic interaction is improved by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, p. 165-174, 2012.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 24, p. 487-506, 2000.

STRIGUL, N.S.; KRAVCHENKO, L.V. Mathematical modeling of PGPR inoculation in to the rhizosphere, **Environmental Modelling and Software**, v. 21, n. 8, p. 1158 – 1171, 2006.



SWĘDRZYŃSKA, D. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of winter wheat and oat under different cultivation conditions. **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 9, p. 423-428, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TEIXEIRA, F.F. et al. Diversidade no germoplasma de milho coletado na Região Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 3, p. 59 – 67, 2002.

TRIPATHI, A.K.; KLINGMÜLLER, W. Temperature sensitivity of nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 1238-1241, 1992.

TORTORA, M.L. et al. Protection of strawberry plants (Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, p. 279-290, 2012.

VERMA, R. et al. Population dynamics and identification of efficient strains of *Azospirillum* in maize ecosystems of Bihar (India). **Biotech**, v. 1, p. 247-253, 2011.

VIDEIRA, S.S. et al. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. Genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, Online First, 21 December, 2011.

### **CAPÍTULO 3 - CONCENTRAÇÃO DO NITROGÊNIO NO SOLO E NA PLANTA DE MILHO INOCULADA COM *Azospirillum brasilense* E SUBMETIDA A NÍVEIS CRESCENTES DE FERTILIZAÇÃO NITROGENADA**

**Resumo** - Objetivou-se com o estudo determinar a concentração das formas disponíveis de nitrogênio no perfil do solo e da absorção do N pelas plantas, em função da inoculação de *Azospirillum brasilense* cepas Ab-V5 e Ab-V6 e doses crescentes de fertilização nitrogenada com ureia. A condição nutricional do N na planta foi determinada, em diferentes estádios de desenvolvimento, a partir da aplicação de modelo que descreve a diluição do elemento, em função do acúmulo de biomassa. Foram estabelecidas as cultivares AS 1572 e Defender. Anteriormente à sementeira, as sementes de milho foram inoculadas com *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6. A adubação nitrogenada foi realizada com dose equivalente a 30 kg/ha, no momento da sementeira, exceto nas parcelas sem nitrogênio. O restante da adubação foi dividida igualmente em duas porções, distribuídas nos diferentes níveis de N que compuseram os tratamentos (0, 60, 120, 240 e 480 kg/ha). Amostragens do solo foram realizadas nos perfis de 0-5, 5-10 e 10-20 cm de profundidade nos períodos de pré-semeadura, pós-semeadura e florescimento. Amostragens das plantas foram feitas nos estádios fenológicos entre 8 e 9 folhas desenvolvidas, 9 e 10 folhas desenvolvidas, florescimento pleno e reprodutivo. A concentração de N mineral no solo, representado pelo N nítrico aumentou à medida que o desenvolvimento da cultura avançou. Na camada de 0-5 cm foram obtidas as maiores concentrações de N mineral. Na medida em que as doses de N se tornaram maiores, incremento na concentração de N mineral foi observado, bem como em profundidade no perfil do solo. Interação entre doses de N e inoculação com *Azospirillum brasilense* foi descrita pelo modelo estatístico. As maiores concentrações de N mineral no solo foram determinadas com emprego de 480 kg/ha de N e a inoculação com *A. brasilense*, resultando em aumento na concentração de N na planta, no estágio de florescimento, quando as plantas foram inoculadas com *A. brasilense*. Isso, entretanto, não alterou o acúmulo de biomassa ao longo do ciclo vegetativo, nem mesmo alterou a produtividade de silagem e grãos. À medida que o estágio de maturação avançou, redução da concentração de N na planta foi determinada. A utilização de 240 kg/ha de nitrogênio proporcionou melhor condição nutricional de plantas de milho ao longo do ciclo vegetativo, sem, no entanto, possibilitar identificação de efeito significativo da inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre essa variável.

**Palavras-chave:** Amônia. Bactérias diazotróficas. Bactérias endofíticas. Fertilização com ureia. Nitrato.

**Nitrogen content in soil and maize plant inoculated with *Azospirillum brasilense* and submitted to increasing nitrogen fertilization levels**

**Abstract** - The aim of this work was to determine nitrogen available forms in soil layers and N plants absorption, by means of *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 and Ab-V6 strains) inoculation and increasing nitrogen fertilization levels with urea. Nutritional nitrogen content in plants was determined at different growth stages from N dilution model. AS 1572 and Defender hybrids were established. Maize seeds were inoculated with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 and Ab-V6 strains. Treatments followed randomized blocks design model in factorial arrangement composed by two maize hybrids, N fertilization levels (0, 60, 120, 240 and 480 kg/ha), inoculated or not with *Azospirillum brasilense*. Nitrogen fertilization was performed with 30 kg/ha dose, applied in the planting furrow, and the remaining fertilization was applied in coverage at growth stages. Soil samples in layers of 0-5, 5-10 and 10-20 cm were collected during pre-sowing, after sowing and flowering stages. Plants sampling in different growth stages were carried out. Nitric nitrogen content in the soil increased while crop development advanced. Mineral N content was higher in the 0-5 cm soil layer. Mineral nitrogen content in soil layers increased while N doses were applied. Interaction between nitrogen levels and *Azospirillum brasilense* inoculation was described by statistical model. The major mineral nitrogen content in soil was determined with 480 kg/ha of N dose and *A. brasilense* inoculation. This resulted in an increase in N plant content at flowering stage when plants were inoculated with *A. brasilense*. This, however, neither affected the accumulation of biomass throughout the growing stages, nor altered silage and grain yield. As the maturation stage advanced, N plant content was reduced. The 240 kg/ha nitrogen dose improved nutritional nitrogen status of maize throughout the growing stages.

**Keywords:** Ammonia. Diazotrophic bacteria. Endophytic bacteria. Nitrate. Urea fertilization.

## Introdução

A quantidade de nitrogênio (N) disponível nos solos define consideravelmente o desempenho agrônômico das culturas. Isso se deve à limitada quantidade deste elemento nos solos, que na maioria das vezes, não é compatível com a exigência nutricional das culturas, nos diferentes estádios de desenvolvimento. Segundo Fancelli e Dourado Neto (2000), de modo geral, o N é um dos elementos mais absorvidos por gramíneas, constituindo-se no elemento mais limitante, caso não seja fornecido adequadamente em tempo e na quantidade demandada pelas plantas.

A limitada quantidade de N disponível nos solos está associada às taxas de mineralização do N, as quais variam muito durante o ano, especialmente em resposta à temperatura e umidade do solo (WHITEHEAD, 1995), bem como em resposta à concentração de matéria orgânica, que por sua vez, depende do balanço entre a taxa de incorporação de resíduos vegetais e de sua decomposição. Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são as formas descritas como prontamente disponíveis à absorção das plantas, provenientes da mineralização microbiana (RAIJ, 2011).

A dinâmica de ambas as formas de N nos solos é complexa, estando ainda sujeitas a importantes interações edafoclimáticas, o que contribui para que perdas significativas sejam reportadas. O  $\text{NO}_3^-$  possui insignificante adsorção eletrostática às partículas sólidas do solo, assim permanece na solução, o que contribui para a sua lixiviação (CERETTA e FRIES, 1997). O  $\text{NH}_4^+$  apesar de ser mais estável quanto à lixiviação, devido à adsorção eletrostática aos coloides do solo, é extremamente volátil em sua forma dissociada (Da Ros, et al., 2005), que ocorre de maneira transitória, especialmente nos processos que envolvem a decomposição e mineralização da matéria orgânica e a nitrificação.

Dessa forma, a fertilização nitrogenada das culturas deve prever práticas de manejo que visem controlar ou reduzir as perdas de nitrato para o lençol freático, bem como de amônia, por volatilização, quando a ureia é solubilizada e não incorporada ao solo em fertilizações de cobertura. O manejo da adubação nitrogenada deve permitir satisfazer a necessidade da cultura com o mínimo possível de risco ambiental (AMADO et al., 2002). As estratégias de manejo podem ser variáveis, simples e complexas e não se aplicam a todas as situações de maneira arbitrária. Essas, por sua vez, variam de acordo com a época do ano, pluviosidade, grau de intensificação dos sistemas, tipos de solo, dentre outros fatores.

Nesse contexto, o emprego de inoculantes com bactérias diazotróficas, dentre elas, as do gênero *Azospirillum* spp., constitui-se em alternativa para manejar a fertilização nitrogenada de maneira mais sustentável do ponto de vista ecológico e econômico. O nitrogênio fornecido pelo processo de fixação biológica a partir de bactérias diazotróficas pode ser utilizado *in situ* (REIS e TEIXEIRA, 2005) o que contribui com a redução da lixiviação e volatilização do nutriente. Ademais, em função da síntese hormonal, aumento da superfície radical poderá incrementar a absorção do elemento (HUNGRIA et al., 2010; MOUTIA et al., 2010). Esses fatores contribuem para incrementar a eficiência na utilização do N pelas plantas em associação com a fertilização nitrogenada (DOBBELAERE et al., 2002, ARAÚJO et al., 2014).

Nesse sentido, objetivou-se determinar a concentração das formas disponíveis de N no perfil entre 0 e 20 cm do solo e da absorção do N pelas plantas, em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* cepas Ab-V5 e Ab-V6 e doses crescentes de fertilização nitrogenada com ureia. Ainda, a condição nutricional do N na planta foi determinada, em diferentes estádios de desenvolvimento, a partir da aplicação de modelo que descreve a diluição do elemento, em função do acúmulo de biomassa.

### **Material e métodos**

O experimento foi conduzido em área pertencente ao Colégio Agrícola Ângelo Emílio Grando, no município de Erechim, RS, na safra 2012/2013. O local está situado na região fisiográfica do Alto Uruguai, do Rio Grande do Sul, Brasil, à altitude de 760 m, 27° 65 de latitude Sul e 52° 30 de longitude Oeste. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Aluminoférrico Húmico pertencente à unidade de mapeamento Erechim (EMBRAPA, 2006; STRECK et al., 2008). O clima da região é classificado como Cfa (subtropical úmido) conforme classificação de Köppen, com precipitação média anual de 1869 mm, evapotranspiração potencial anual de 844,9 mm, temperatura média anual de 18,2°C, com média mínima de 13,5°C em julho e média máxima de 22,6°C em janeiro e umidade relativa do ar de 78,6% (CEMETRS, 2012). Os principais dados meteorológicos durante a condução do experimento são apresentados na Figura 1.

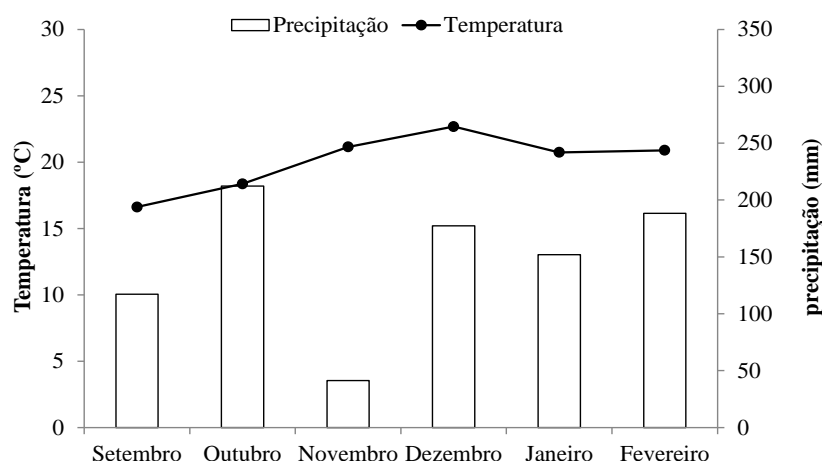


Figura 1. Precipitação pluviométrica e temperatura média do ar durante a condução do experimento em Erechim, RS, safra 2012/2013.

Durante o inverno as áreas foram cultivadas com aveia preta (*Avena strigosa* L.) cultivar Comum, como cultura de cobertura do solo destinada à formação de resíduos culturais para o sistema de plantio direto. Quando a cultura se encontrava no estágio de pleno florescimento foi realizada a dessecação da área, com herbicida Glifosato (2,0 litros ha<sup>-1</sup> de Roundup Transorb<sup>®</sup>) e CLETODIM (0,4 litros ha<sup>-1</sup> de Select<sup>®</sup> 240 EC), este último para controle do azevém (*Lolium multiflorum* L.) proveniente de ressemeadura natural e resistente ao Glifosato. Posteriormente foram realizadas coletas de amostras de solo para análise e recomendação da correção e adubação do solo. As amostras foram coletadas em diferentes estratos, correspondentes às profundidades de 0-5, 5-10 e 10-20 cm para determinação de seus atributos químicos (Tabela 1).

Tabela 1. Atributos químicos do Latossolo Vermelho Aluminoférrico Húmico pertencente à unidade de mapeamento Erechim

Perfil cm	Arg. %	pH	SMP	CTC	Al	Ca	Mg	P	K	M.O	Bases
					-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----			mg/dm <sup>3</sup>		-----%-----	
0-5	47,2	5,9	6,4	13,4	0,0	7,2	2,7	13,5	316	4,6	80
5-10	66,5	5,4	6,0	14,6	0,2	6,5	3,0	8,2	316	3,0	70
10-20	66,5	5,3	5,9	12,9	0,5	5,4	2,0	5,2	229	2,3	62

Arg. = argila; pH = pH em água; SMP = índice SMP; CTC = capacidade de troca de cátions; Al = alumínio; Ca = cálcio; Mg = magnésio; P = fósforo; K = potássio; M.O = matéria orgânica; Bases = saturação por bases.

As adubações (fósforo e potássio) foram realizadas conforme a recomendação da Comissão de Fertilidade do Solo RS/SC (2004) para alto potencial de rendimento de grãos ( $\geq 10$  t/ha). A adubação fosfatada foi realizada com a aplicação da dose equivalente a 105 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de super fosfato triplo (SFT) e a adubação potássica foi realizada com a aplicação da dose equivalente a 50 kg/ha de K<sub>2</sub>O na forma de cloreto de potássio (KCl). A

adubação nitrogenada foi realizada com a aplicação da dose equivalente a 30 kg/ha, aplicada na linha de cultivo, no momento da semeadura, sendo o restante da adubação realizada em cobertura nos estádios fenológicos de 4 e 8 folhas desenvolvidas, nas datas de 18/10/2012 e 22/11/2012, divididas igualmente, com utilização de ureia (45 % de N), distribuídas nos diferentes níveis de N que compuseram os tratamentos (doses equivalentes a 0, 60, 120, 240 e 480 kg/ha). As parcelas sem nitrogênio não foram submetidas à adubação nitrogenada, seja na semeadura ou em cobertura.

O estabelecimento do milho foi realizado em 16/09/2012 com uso de semeadora de plantio direto, regulada com espaçamento de 0,66 m entre fileiras e 0,25 m entre plantas na linha, em parcelas compostas por nove fileiras, com dimensões de 5,0 x 5,28 m. Foi realizada a semeadura de dois genótipos de milho, o AS1572 e o Defender, ambos híbridos de ciclo precoce, geneticamente modificados para resistência a lagartas do cartucho, da broca do colmo e da espiga.

Anteriormente à semeadura as sementes de milho foram inoculadas com a bactéria *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na concentração de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL e  $6,6 \times 10^6$  UFC/semente, com a utilização de 200 mL/ha de inoculante (AzoTotal® - Total Biotecnologia), com auxílio de um copo graduado. Primeiramente foram semeadas as parcelas sem inoculação e, em seguida, as parcelas com inoculação, para evitar possível contaminação das sementes.

No solo, em todas as parcelas, foram avaliados os teores de N mineral ( $\text{N-NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) em distintos períodos, por meio de coleta de amostras empregando trado calador, conforme metodologia proposta pela Comissão de Fertilidade do Solo RS/SC (2004). A amostragem foi realizada anterior à semeadura (pré-semeadura) no dia 14/09/2012 e não se apresentava sob efeito dos tratamentos. A segunda coleta foi feita 12 dias após a semeadura e adubação de base (pós-semeadura) na data de 27/09/2012. A última amostragem foi realizada no dia 14/12/2012 no momento do florescimento das plantas.

As amostragens foram realizadas nas camadas de 0-5, 5-10 e 10-20 cm de profundidade. Sete subamostras foram retiradas por parcela a partir da linha de cultivo formando uma amostra composta após homogeneização. As amostras foram imediatamente refrigeradas e posteriormente congeladas a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento da análise. As análises do N mineral foram realizadas no Laboratório de Microbiologia dos Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e envolveram o descongelamento das amostras em temperatura ambiente, a homogeneização manual e a extração do N com emprego de 20 g de solo e 80 mL

de solução de KCl 1M. O teor de N mineral no solo foi determinado a partir do conteúdo do N no extrato, com emprego da metodologia proposta em Tedesco et al. (1995).

Amostragens de plantas foram realizadas nas datas de 16/11/2012, 29/11/2012, 14/12/2012 e 23/01/2013. As datas corresponderam aos estádios fenológicos entre 8 e 9 folhas desenvolvidas, entre 9 e 10 folhas desenvolvidas, plantas em pleno florescimento e plantas em estágio reprodutivo entre grão leitoso e farináceo.

As amostras de plantas foram obtidas mediante o corte rente ao solo das mesmas, em cada um dos períodos avaliados. Após o corte procedeu-se a determinação da massa fresca de plantas. As amostras frescas foram acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa com circulação de ar forçado a 55 °C, por aproximadamente 72 horas. Posteriormente, foram novamente pesadas para determinação da biomassa e produção total de matéria seca por hectare. As amostras pré-secas foram moídas em moinho tipo *Wiley*, utilizando-se peneira com crivos de 1,0 mm, e submetidas à determinação do N total, em duplicata, pelo método micro Kjeldahl (AOAC, 1995).

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com 20 tratamentos e três repetições cada. Os tratamentos foram distribuídos em arranjo fatorial composto por dois híbridos de milho, diferentes níveis de N (0, 60, 120, 240 e 480 kg/ha), inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), testando os fatores isoladamente e suas interações, com utilização do pacote estatístico SAS (2001).

Para as características avaliadas em função da inoculação com *Azospirillum brasilense*, das épocas de coleta de solo e das profundidades de coleta de solo usou-se a comparação de médias com o emprego do teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro. As variáveis avaliadas em função das diferentes doses de N foram estimadas por equações de regressão. Os modelos estatísticos foram descritos de acordo com a significância dos coeficientes de regressão e de determinação ( $r^2$ ).

Para estimar a concentração de N ótimo na planta foi empregado o modelo de diluição do N no tecido vegetal, proposto por Plénet e Lemaire (2000), que descreve o declínio da concentração do N ótimo em função do acúmulo de biomassa em plantas de metabolismo C4, o qual utiliza comparativamente os fatores modificáveis do meio em nível ótimo:

$$N (\%) = 3,4 (MS)^{-0,37}$$



em que  $N$  (%) é a concentração de N em percentagem da massa produzida e MS é a quantidade de massa seca produzida pela parte aérea em t/ha. O coeficiente  $\alpha = 3,4$  representa a concentração de N contida na primeira tonelada da parte aérea das plantas e o coeficiente  $\beta = -0,37$  é definido como a diminuição do conteúdo de N na planta por cada unidade de MS acumulada, ou seja, caracteriza o comportamento da concentração de N na parte aérea da planta à medida que ocorre acúmulo de massa seca.

As curvas obtidas serviram de referencial para determinação do índice de nutrição de nitrogênio (INN), obtido pelo quociente entre o conteúdo de N da cultura (amostra) e a concentração crítica de N (modelo). De acordo com o modelo, qualquer concentração de N abaixo do N ótimo poderá limitar a produtividade da cultura. Os dados de campo foram confrontados ao modelo utilizando-se a análise do desvio da raiz do quadrado médio (RMSD) proposto por Kobayashi e Salam (2000).

## **Resultados e discussão**

### *Solo*

Os diferentes híbridos testados não afetaram as variáveis do solo avaliadas. Observou-se efeito isolado das épocas de coleta de solo e camada do solo ( $p < 0,0001$ ) para as variáveis  $N\text{-NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ,  $N\text{-NH}_3/\text{NH}_4^+$  e N mineral total. Interação ( $p < 0,0001$ ) entre épocas de coleta de solo e camada do solo para essas variáveis foi descrita pelo modelo estatístico (Tabela 2). Essa interação deve-se ao período de coleta do solo e ao manejo da fertilização das parcelas experimentais. Na pré-semeadura ainda não havia influência dos tratamentos sobre as parcelas experimentais, enquanto que no período pós-semeadura houve a adição do equivalente a 30 kg/ha de N na base no momento do cultivo. No período entre a pós-semeadura e o florescimento as parcelas foram fertilizadas com doses crescentes de N em cobertura nos estádios fenológicos com 4 e 8 folhas desenvolvidas. Dessa maneira, as épocas de coleta afetaram a quantidade de nitrogênio nas camadas do solo.

Tabela 2. Concentrações de  $\text{N-NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N-NH}_3/\text{NH}_4^+$  e N mineral total, em mg/kg de solo nas diferentes épocas e profundidades de coleta de solo

Épocas de coleta	$\text{N-NO}_2^-/\text{NO}_3^-$			Média
	0-5 cm	5-10 cm	10-20 cm	
Pré-semeadura	14,25	15,39	2,17	10,61 <sup>C</sup>
Pós-semeadura	25,28	17,00	12,00	18,13 <sup>B</sup>
Florescimento	48,39	39,18	23,29	36,95 <sup>A</sup>
Média	29,31 <sup>a</sup>	23,86 <sup>b</sup>	12,52 <sup>c</sup>	
Épocas de coleta	$\text{N-NH}_3/\text{NH}_4^+$			Média
	0-5 cm	5-10 cm	10-20 cm	
Pré-semeadura	66,60	32,77	42,99	47,45 <sup>A</sup>
Pós-semeadura	51,33	37,69	33,01	40,67 <sup>B</sup>
Florescimento	55,97	46,05	38,29	46,77 <sup>A</sup>
Média	57,97 <sup>a</sup>	38,84 <sup>b</sup>	38,10 <sup>b</sup>	
Épocas de coleta	N mineral total			Média
	0-5 cm	5-10 cm	10-20 cm	
Pré-semeadura	80,87	48,16	45,17	58,10 <sup>B</sup>
Pós-semeadura	76,60	54,69	45,12	58,81 <sup>B</sup>
Florescimento	104,36	85,24	59,70	83,10 <sup>A</sup>
Média	87,28 <sup>a</sup>	62,70 <sup>b</sup>	50,00 <sup>c</sup>	

Médias seguidas de letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Em média as concentrações de N mineral na forma de  $\text{N-NH}_3/\text{NH}_4^+$  (44,97 mg/kg de solo) foram superiores as concentrações de  $\text{N-NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  (21,90 mg/kg de solo). Na medida em que avançou o desenvolvimento da cultura e em que as doses de N em cobertura foram aplicadas, a concentração de N mineral total no solo aumentou (Tabela 2). Este incremento foi especialmente representado pela maior concentração de nitrato. Na média, as doses de N, representadas pelas épocas de coleta do solo, pareceram não afetar os teores de  $\text{N-NH}_3/\text{NH}_4^+$  (Tabela 2). Esse fenômeno observado com o N amoniacal no solo ocorre devido à assimilação pela planta, nitrificação, imobilização microbiana e rápida volatilização desse composto quando a ureia é solubilizada. Dessa maneira, os valores obtidos no solo nas diferentes épocas de coleta podem não representar todo o N proveniente da fertilização com ureia, pois a decomposição da matéria orgânica contribui também com a formação de N amoniacal.

Na camada de 0-5 cm foram obtidas as maiores concentrações de N mineral (Tabela 2). Em todos os períodos de coleta, incluindo a pré-semeadura, observa-se que à medida que a profundidade da coleta aumentou as concentrações de N mineral diminuíram. Isso ocorre em virtude da maior concentração de matéria orgânica nas camadas superficiais do solo, que é fonte de N devido à mineralização microbiana e pela forma de aplicação do N via ureia, que se deu sobre a superfície do solo.

As distintas doses de N influenciaram os teores de N mineral no solo. Na medida em que as doses de N se tornaram maiores, incremento nos teores de N nítrico foi observado, favorecendo a formação desse composto. A ausência de N e doses inferiores, até 120 kg/ha de N, favoreceram a formação de  $\text{N-NH}_3/\text{NH}_4^+$  (Figura 2).

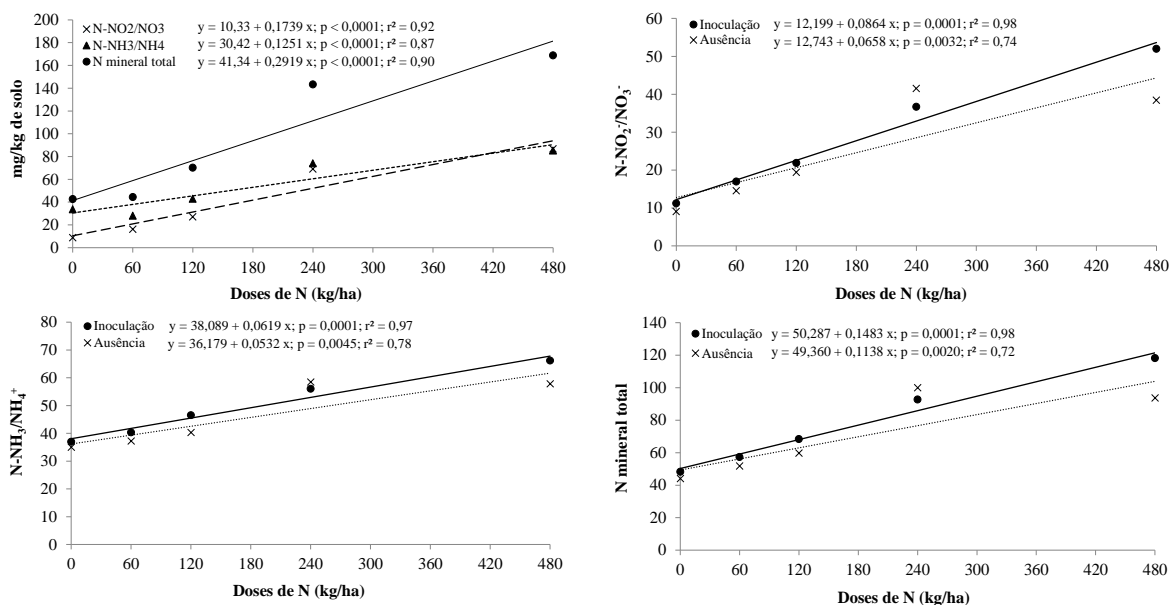


Figura 2. Concentrações de  $\text{N-NO}_2/\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N-NH}_3/\text{NH}_4^+$  e N mineral total, em mg/kg de solo, em função das crescentes doses de N em cobertura.

A inoculação com *Azospirillum brasilense* de maneira isolada não alterou as variáveis do solo estudadas, entretanto, apresentou interação com as crescentes doses/ha de N. Em virtude da interação entre período de coleta do solo e ao manejo da fertilização das parcelas experimentais, descrita anteriormente, o modelo estatístico refere-se ao período de florescimento. A dose de 480 kg/ha de N em cobertura associada à inoculação com *A. brasilense* diferiu estatisticamente da mesma dose sem inoculação (Figura 2). Em condições controladas, casa de vegetação, Das e Saha (2003), verificaram incremento nas formas disponíveis de N ( $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$ ) na rizosfera de plantas de arroz inoculadas com *Azobacter* e *Azospirillum*, o que resultou em maior produtividade da cultura inoculada.

A atividade da nitrogenase em vários microrganismos diazotróficos é inibida pela adição de  $\text{NH}_4^+$  de forma rápida e reversível (REIS e TEIXEIRA, 2005). Essa inibição é causa de interação indesejada entre doses de N e inoculação, ou seja, as elevadas doses de N podem comprometer a fixação biológica do nitrogênio. Dessa maneira, Roesch et al. (2006) avaliando duas cultivares de milho, observaram acentuado declínio da população bacteriana em colmo, raízes e solo durante o primeiro estágio de crescimento da cultura (30 dias após a

germinação) quando o nitrogênio foi adicionado ao solo, mostrando que a concentração de bactérias nas raízes possui correlação negativa com o teor de N no solo no início do desenvolvimento. Essa interação não foi verificada nos estádios reprodutivos e enchimento de grãos. A absorção de N nas duas cultivares testadas variou durante o desenvolvimento da planta, aumentando progressivamente durante o estágio vegetativo, chegando ao máximo no florescimento e regredindo durante o estágio de enchimento dos grãos.

No presente estudo, durante o florescimento da cultura, essa inibição parece não ser importante, já que os valores de  $\text{N-NH}_3/\text{NH}_4^+$  são iguais ao do período pré-semeadura. Ainda, as maiores concentrações de N mineral no solo foram determinadas com o emprego de 480 kg/ha de N e a inoculação com *A. brasilense*.

Montañez et al. (2009); Rodrigues et al. (2008); Dobbelaere et al. (2002) demonstraram que cultivares de milho, arroz e trigo, respectivamente, absorvem quantidade significativa de N via FBN, a partir de bactérias diazotróficas, havendo variação entre as cultivares e os níveis de fertilização nitrogenada.

Interação ( $p < 0,0001$ ) entre doses de N e camada do solo foi descrita pelo modelo estatístico (Figura 3). Mobilidade do N entre as camadas do solo foi percebida, especialmente dos compostos nítricos, que aumentaram na camada superficial e também em profundidade à medida que as doses de N foram aplicadas (Figura 3). O incremento percebido nas camadas inferiores ocorreu em função da infiltração da água no solo. O período de 57 dias, compreendido entre a primeira aplicação de N em cobertura e o florescimento da cultura (última amostragem de solo), registrou precipitação acumulada de 197,2 mm, o que proporcionou o deslocamento do nutriente.

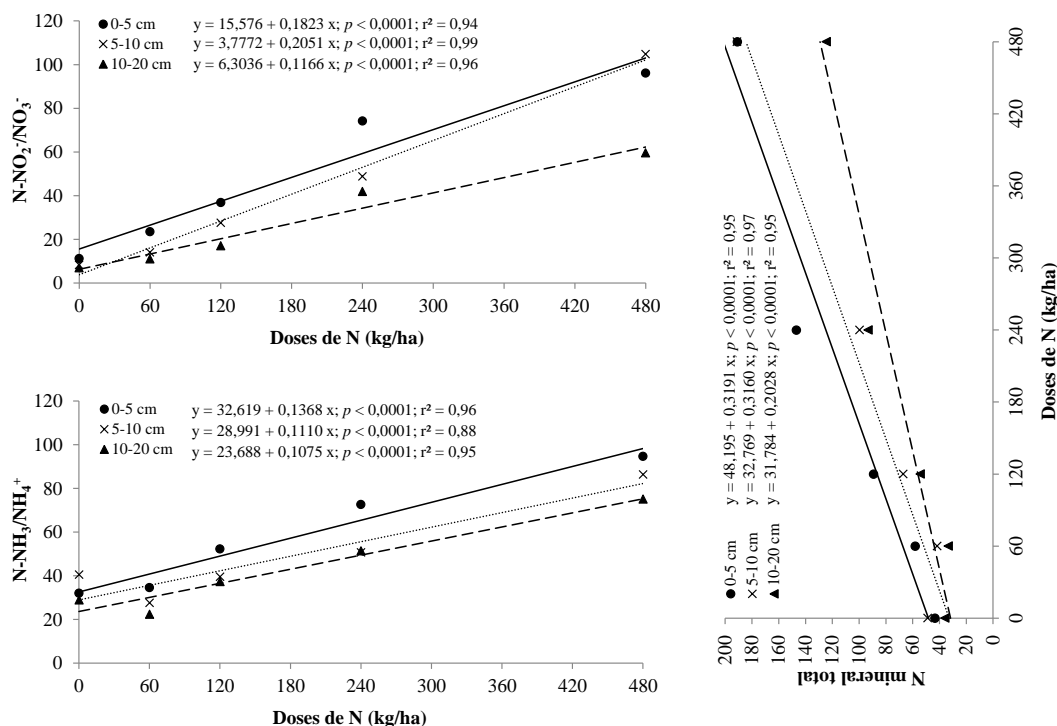


Figura 3. Concentrações de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N mineral total, em mg/kg de solo, nas camadas 0-5, 5-10 e 10-20 cm, em função das crescentes doses de N em cobertura.

Ceretta et al. (2006) relataram o rápido deslocamento do N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em profundidade dentro da camada de 0-60 cm, quando fizeram uso de distintas doses de dejetos suínos (40 e 80 cm<sup>3</sup>/ha). Os autores perceberam redução dos valores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas camadas mais superficiais e aumento das quantidades em profundidade entre 30 e 60 cm, ao longo do período de avaliação, indicando que o nitrato poderá ser lixiviado no solo e atingir o lençol freático, os quais sugerem o parcelamento de doses de dejetos.

No presente estudo, não foi possível registrar a redução do N ao longo do tempo nas camadas superficiais, nem mesmo o incremento em profundidade, devido à realização de apenas uma coleta de solo após a aplicação das doses de ureia. A coleta foi realizada 57 dias após a primeira aplicação e não se pôde perceber como os níveis evoluíram ao longo do tempo nas distintas camadas de solo.

Houve incremento dos teores de N mineral em todas as camadas avaliadas, em função das crescentes doses de N. Entretanto, quando se avaliou o comportamento do N nítrico no solo observou-se que na camada de 5-10 cm de solo ocorreu a maior formação dessa forma de N com as maiores doses de N aplicadas (Figura 3). A maior inclinação da curva, quando se compara com as demais camadas de solo, permite a admissão dessa hipótese. Isso indica que o N se movimentou com maior intensidade até a camada 5-10 cm, o que pode representar

menor lixiviação. Ademais, quando se aplicou a maior dose de N (480 kg/ha) a formação de N nítrico foi superior na camada de 5-10 cm, quando se confronta com as demais. A maior adição de N no solo na forma de ureia impulsionou a formação de N nítrico.

Interação ( $p < 0,0001$ ) entre doses de N e épocas de coleta de solo foi observada para todas as variáveis de solo avaliadas. Essa interação também pode ser atribuída ao manejo da fertilização das áreas, descrita anteriormente. Dessa maneira, os dados e figuras que se referem a tal evento foram suprimidos.

#### *Produção vegetal e concentração de N na planta*

A inoculação com *A. brasilense* não afetou o desenvolvimento da cultura nos diferentes estádios de desenvolvimento avaliados. As doses crescentes de N contribuíram para o aumento na quantidade de biomassa vegetal (kg/ha MS) durante o ciclo vegetativo (Figura 4). A análise de regressão considerando o último período de crescimento avaliado (R2) e o rendimento de grãos, descreve modelos quadráticos em função das distintas doses de N. A máxima eficiência técnica para a produção de silagem e rendimento de grãos, estimada em 16293 e 11770 kg/ha, respectivamente, poderia ser obtida com dose igual a 350 e 380 kg/ha de N. Os modelos podem ser melhor representados pelas equações descritas abaixo:

$$\text{Produtividade de silagem (R2)} = 12138 + 24,12 N - 0,035N^2; p = 0,0001; r^2 = 0,92$$

$$\text{Produtividade de grãos} = 7560 + 22,20 N - 0,02925 N^2; p = 0,0001; r^2 = 0,98$$

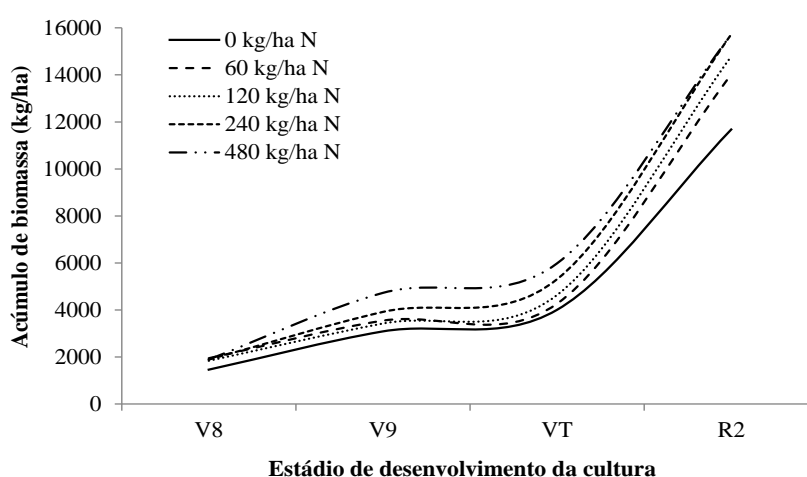


Figura 4. Acúmulo de biomassa de plantas de milho, em kg/ha MS, com crescentes doses de N em função do estágio de desenvolvimento da cultura.

O teor de N na planta foi alterado pelo estágio de desenvolvimento da cultura, pela fertilização nitrogenada e pelo híbrido de milho. Interações entre estágio de desenvolvimento e inoculação e entre híbridos e inoculação foram descritas pelo modelo estatístico (Tabela 3).

Tabela 3. Interação entre estágio de desenvolvimento e inoculação com *Azospirillum brasilense* e entre híbridos e inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre o a concentração de N no tecido vegetal

Estádio de desenvolvimento	g/kg MS		Média
	Inoculante	Ausência	
8 folhas	25,7	27,1	26,4 <sup>A</sup>
9 folhas	22,9	22,0	22,4 <sup>B</sup>
Florescimento pleno	19,5 <sup>a</sup>	17,3 <sup>b</sup>	18,4 <sup>C</sup>
Reprodutivo (R2)	12,8	13,0	12,9 <sup>D</sup>
Híbridos	Inoculante	Ausência	Média
AS 1572	20,3	20,7	20,5 <sup>B</sup>
Defender	20,2 <sup>a</sup>	18,9 <sup>b</sup>	19,6 <sup>A</sup>
Média	20,2	19,8	

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na linha, e maiúsculas distintas na coluna, diferem entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

A inoculação com *A. brasilense* favoreceu a planta durante o florescimento, contribuindo com maior absorção de N, sem, entretanto, alterar a produção de silagem, a quantidade de N extraída e o teor de N da planta na ensilagem e o rendimento de grãos. Esse resultado está condicionado à interação entre a inoculação com *A. brasilense* e as doses de N, observada e discutida para as variáveis do solo. Ademais, na média, o híbrido Defender quando inoculado apresentou maior concentração de N na planta. Mikhailouskaya e Bogdevitch (2009) observaram aumento da produção e teor proteico de grãos de cevada com a inoculação de *A. brasilense* B-4485, entre os anos de 1996 e 2000, na Polônia.

De acordo com Das e Saha (2003); Roesch et al. (2006), maior população de bactérias diazotróficas é reportada durante o período vegetativo e florescimento, com posterior declínio, com o avanço na maturidade. Das e Saha (2003) evidenciaram que houve maior mineralização da matéria orgânica e atividade microbiana, o que justificou o aumento no acúmulo de N mineral na rizosfera das plantas nesse período.

O híbrido Defender apresentou maior concentração de N na planta, ao longo do ciclo vegetativo, quando inoculado com *Azospirillum brasilense* (Tabela 3). Esse híbrido quando inoculado com *A. brasilense* apresentou maior peso da planta verde e maior produção equivalente de silagem, na média de duas safras 2012/2013 e 2013/2014.

À medida que o estágio de maturação avança, redução da concentração de N na planta é observada (Figura 5). De forma contrária, a extração de N nos solos aumenta (Figura 5). A

extração do N foi afetada pelas doses de N e pela interação entre doses de N e estágio de desenvolvimento da cultura (Figura 5). A quantidade de N extraído se correlacionou forte e positivamente com a produção de biomassa da planta e com as variáveis do solo avaliadas, especialmente com os teores de  $\text{N-NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  e N mineral total. Isso não foi observado para a concentração de N no tecido vegetal.

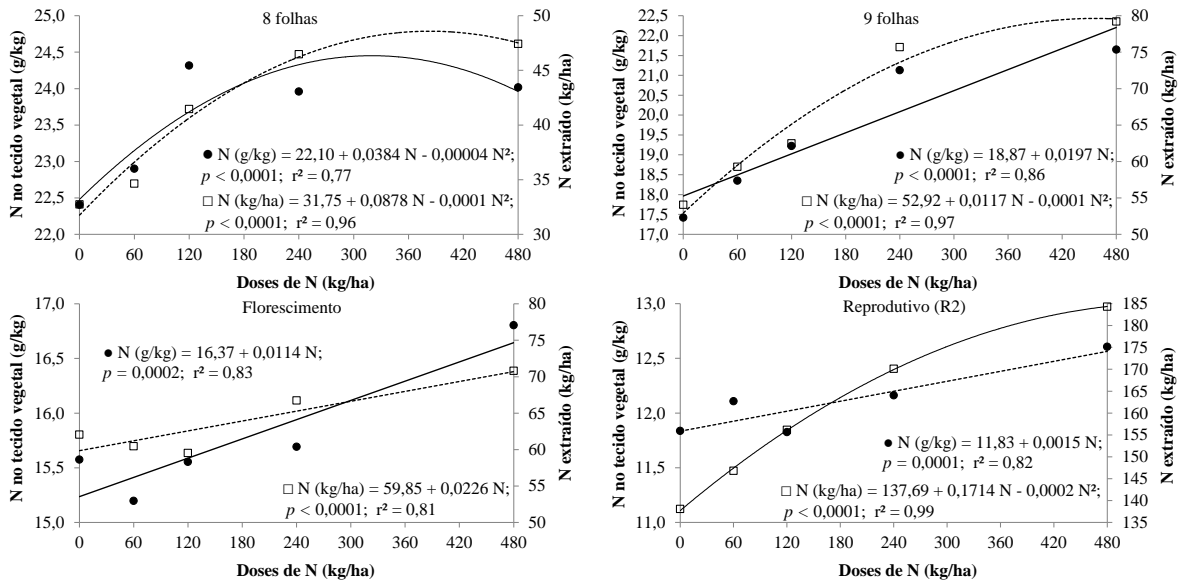


Figura 5. Concentração de N no tecido vegetal (g/kg MS) e quantidade de N extraída (kg/ha), em diferentes estádios de desenvolvimento da cultura do milho, em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.

Os fenômenos que tratam da redução da concentração de N e da extração de N pela planta, em função do tempo, podem ser mais bem compreendidos, pelo modelo que descreve o declínio das concentrações de N no tecido vegetal à medida que ocorre acúmulo de MS (Figura 6). É importante salientar que inicialmente as plantas jovens possuem elevada exigência de N por unidade de matéria seca, no entanto, quando a proporção de material estrutural aumenta o requerimento de N por unidade incremental de matéria seca diminui, o que não quer dizer que a necessidade de N em valores absolutos seja reduzida, pelo contrário.

À medida que a planta acumula biomassa ocorre decréscimo exponencial da concentração de N no tecido vegetal (Figura 6). A intensidade com que ocorre é variável, entretanto, Plénet e Lemaire (2000) descrevem certo padrão para espécies com metabolismo C4, quando há o controle sobre todos os fatores ecológicos em nível de campo passíveis de serem controlados, apesar das diferenças relatadas entre safras e anos de cultivo.



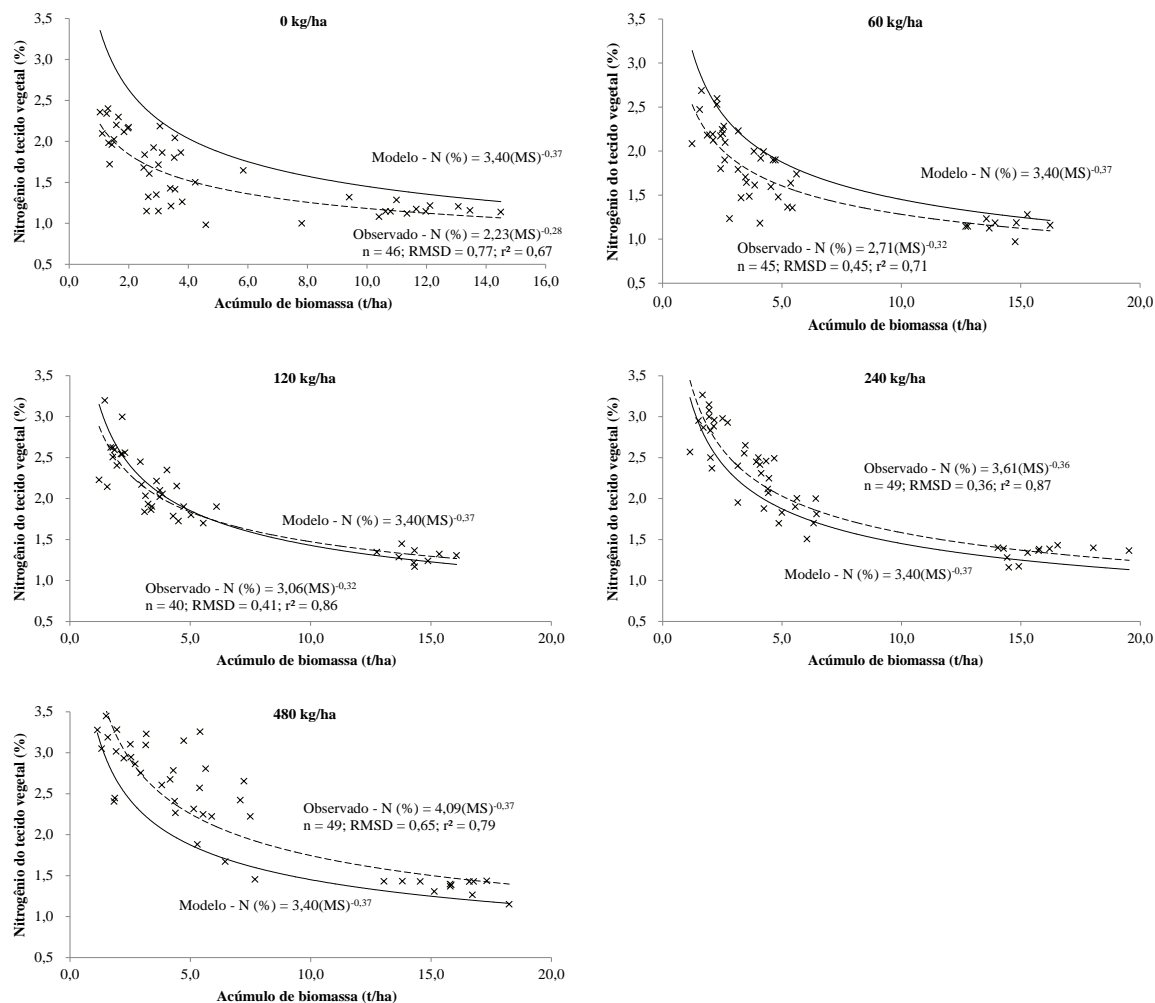


Figura 6. Dinâmica da concentração de nitrogênio na planta de milho, submetida a doses crescentes de nitrogênio em cobertura, em função do acúmulo de biomassa da cultura.

Considerando que a disponibilidade de N nos solos é o fator ecológico mais limitante para o desenvolvimento vegetal, passível de ser controlado, excetuando-se a água, o emprego do modelo caracteriza-se como importante ferramenta para diagnosticar o *status* de N ao longo do ciclo vegetativo numa cultura, com a finalidade de suprir a exigência das plantas e reduzir problemas relacionados à contaminação de águas superficiais e subterrâneas por nitrato. De acordo com Plénet e Lemaire (2000), a relação entre a porcentagem crítica de N na planta e o acúmulo de biomassa da parte aérea, obtida pelo modelo, provê um indicador nutricional do N em condição de campo em cada estágio de crescimento, contribuindo para com o manejo da fertilização nitrogenada.

O uso do equivalente a 240 kg/ha de nitrogênio proporcionou menor desvio dos dados observados a campo em relação ao modelo, com RMSD igual a 0,36. Avaliando a curva e a equação, percebe-se, que, a concentração crítica de N na planta foi superior a descrita pelo modelo proposto por Plénet e Lemaire (2000), com  $\alpha = 3,61$ . A diluição do N, representada

pelo coeficiente  $\beta = -0,36$  aproximou-se do modelo. Essa dose pode ser descrita como a que proporciona melhor relação entre a absorção, a assimilação e a síntese de tecidos pela planta de milho, dentre todas as testadas no presente estudo.

É provável que a dose ideal esteja situada entre 120 e 240 kg/ha de N. Observou-se que o emprego da dose equivalente a 120 kg/ha de N apresentou pequeno desvio em relação ao modelo (RMSD = 0,41). Entretanto, seu coeficiente  $\alpha = 3,06$  demonstra existir disponibilidade limitada do nutriente, especialmente no início do ciclo de desenvolvimento, quando se observa a curva, o que se refletiu em menor relação do elemento por unidade incremental de biomassa (Figura 6).

O evento supracitado pode ser melhor visualizado na Figura 7, onde o índice de nutrição do nitrogênio (INN) encontra-se abaixo de 100% até o florescimento na data de 13/12. Dessa maneira, observa-se que o emprego da dose equivalente a 120 kg/ha de N limita o desenvolvimento da cultura. Quando se analisa a utilização de doses equivalentes a 240 e 480 kg/ha de N, com índices acima de 100%, supõe-se que a disponibilidade de N não foi limitante para o desenvolvimento da cultura (Figura 7), contudo, a utilização da dose equivalente a 480 kg/ha pode representar elevadas perdas do ponto de vista econômico e ambiental.

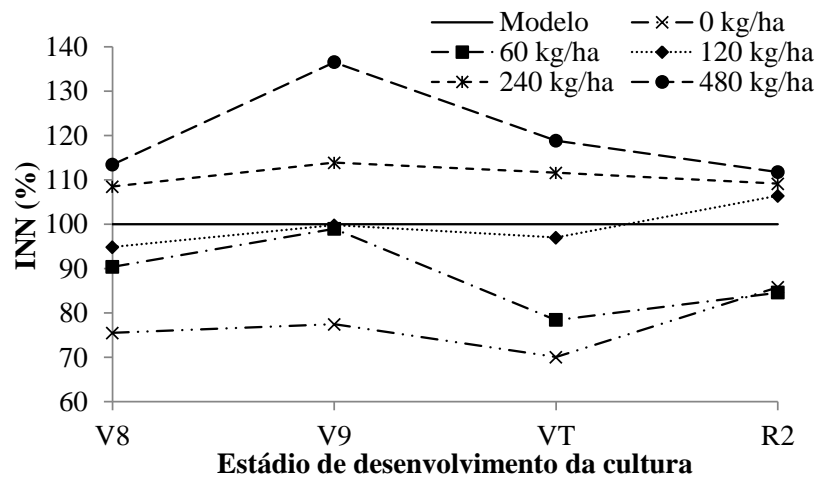


Figura 7. Índice de nutrição do nitrogênio (INN) de plantas de milho, ao longo do ciclo vegetativo, em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.

## Conclusões

A inoculação com *Azospirillum brasilense* incrementa as concentrações das formas disponíveis de nitrogênio no solo quando associada à utilização de 480 kg/ha de N na forma de uréia. Assim, a inoculação com *Azospirillum brasilense* aumenta a concentração de nitrogênio na planta de milho, no estágio de florescimento.

As crescentes doses de nitrogênio em cobertura aumentam, de forma linear, as concentrações de N nítrico e N amoniacal na camada de 0-20 cm de solo.

Redução da concentração de N na planta é percebida à medida que o estágio de maturação e a produção de biomassa vegetal são incrementados. A partir do modelo estudado, o emprego de 240 kg/ha de nitrogênio proporciona melhor condição nutricional de plantas de milho ao longo do ciclo vegetativo, dentre as doses testadas.

## Referências

ARAÚJO, R.M.; ARAÚJO, A.S.F.; NUNES, L.A.P.L.; FIGUEIREDO, M.V.B. Resposta do milho verde à inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1556-1560, 2014.

AOAC. **Official methods of analysis**. 16th Ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025 p.

AMADO, T.J.C.; MIELNICZUCK, J. AITA, C. Recomendação da adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n.1, p. 241-248, 2002.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10 ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul: UFRGS, 2004. 400p.

CEMETRS – Centro Estadual de Meteorologia. **Atlas climático do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 198 p. Acessado em 23/05/2012. <http://www.r3pb.com.br/AtlasCemetRS/#/9/zoomed>

CERETTA, C.A; FRIES, M.R. Adubação nitrogenada no sistema de plantio direto. In: NUERNBERG, N.J. **Plantio direto: conceitos, fundamentos e práticas culturais**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Núcleo Regional Sul, 1997. p. 111-120.

CERETTA, C.A.; PORT, O.; GIACOMINI, S.J. Dinâmica do nitrogênio no solo e produção de fitomassa por plantas de cobertura no outono/inverno com o uso de dejetos de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 30, p. 901-910, 2006.

DA ROS, C.O. et al. Volatilização de amônia com aplicação de uréia na superfície do solo, no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, n. 4, v. 35, p. 799-805, 2005.

DAS, A.C.; SAHA, D. Influence of diazotrophic inoculations on nitrogen nutrition of rice. **Australian Journal of Soil Research**. v. 41, p. 1543-1554, 2003.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGGHS, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. Irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 284-297, 2002.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, 1999. 412p.

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

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

KOBAYASHI, K.; SALAM, M. U. Comparing simulated and measured values using mean squared deviation and its components. **Agronomy Journal**, v. 92, p.345-352, 2000.

MIKHAILOUSKAYA N.; BOGDEVITCH I. Effect of biofertilizers on yield and quality of long-fibred flax and cereal grains. **Agronomy Research**, v. 7, n. 1, p. 412-418, 2009.

MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P.R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by <sup>15</sup>N isotope dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, p. 253-263, 2009.

MOUTIA, J.F.Y.; SAUMTALLY, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEJN, J. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. In sugar cane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and Soil**, v. 337, p. 233-242, 2010.

PLÉNET, D.; LEMAIRE, G. Relationships between dynamics of nitrogen uptake and dry matter accumulation in maize crops. Determination of critical N concentration. **Plant and Soil**, v. 216, p. 65-82, 2000.

PRIMAVESI, O. et al. Lixiviação de nitrato em pastagem de coastcross adubada com nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 1, v. 3, p. 683-690, 2006.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e manejo dos nutrientes**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2011. 420p.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. **Fixação Biológica de Nitrogênio—Estado da arte**. p. 151-180. 2005. *In*: Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 368 p.

RODRIGUES, E.P.; RODRIGUES, L.S.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 302, p. 249-261, 2008.

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

SAS Institute. **Statistical analysis system user's guide**. Version 8.02 Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001.

STRECK, V. E.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P. GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. – Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222 p.

TEDESCO, M.J., GIANELLO, C., BISSANI, C.A., BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2<sup>a</sup> ed. Ver. Ampl. Porto Alegre: **Departamento de Solos, UFRGS (Boletim nº 5)**, 1995. 174 p.

WHITEHEAD, D.C. **Grassland Nitrogen**. ed. Wallingford: CAB International. 1995, 397p.

#### CAPÍTULO 4 - INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DOSES DE NITROGÊNIO EM MILHO PARA SILAGEM

**Resumo** - Objetivou-se determinar o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e distintas doses nitrogênio em cobertura sobre a produtividade de plantas de milho e o valor nutritivo de silagens. Dois experimentos foram realizados. O primeiro experimento foi conduzido durante as safras 2012/2013 e 2013/2014, avaliando-se os híbridos AS 1572 e Defender, no município de Erechim, RS. O segundo experimento foi desenvolvido em Santa Maria, RS, na safra 2013/2014 com os híbridos AS 1572 e AG 9030. Os tratamentos foram distribuídos no delineamento de blocos ao acaso, em arranjo fatorial composto por dois híbridos de milho, diferentes níveis de N (0, 60, 120, 240 e 480 kg/ha), inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. As sementes foram inoculadas com *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na concentração de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL e  $6,6 \times 10^6$  UFC/semente. No experimento de Erechim, RS, a inoculação com *A. brasilense* apresentou interação com híbridos, safras e doses de nitrogênio para a produtividade de silagem. Na safra 2012/2013 a inoculação promoveu incremento de 6,16 % sobre a produtividade estimada de silagem do híbrido AS 1572, enquanto que na safra 2013/2014 a inoculação com *A. brasilense* proporcionou aumento de 16,15 % para o híbrido Defender. A resposta à inoculação se mostrou eficiente na safra 2013/2014, devido aos efeitos favoráveis junto ao híbrido Defender. As doses entre 60 e 120 kg/ha de N favoreceram a produtividade de plantas inoculadas com *A. brasilense*. A inoculação com *Azospirillum brasilense* elevou os teores de extrato etéreo e NDT e reduziu a quantidade de fibra em detergente ácido das silagens. Ainda, a inoculação reduziu os valores de celulose da silagem confeccionada a partir do híbrido Defender o que elevou a quantidade de CNF no tratamento inoculado. No experimento conduzido em Santa Maria, RS, verificou-se interação entre inoculação com *A. brasilense* e doses de N sobre a produtividade da planta de milho para silagem, com efeitos positivos nas doses entre 240 e 480 kg/ha de N. Nesse experimento os híbridos apresentaram diferenças significativas entre os componentes morfológicos, devido a diferenças observadas na maturidade fisiológica. Dessa maneira, o híbrido AG 9030 apresentou melhor constituição química relativa aos componentes da parede celular. A inoculação promoveu aumento da digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica. Ainda, a inoculação reduziu os teores de celulose junto ao híbrido AS 1572 e promoveu incremento dos valores junto ao híbrido Defender. Em ambos os experimentos, o teor proteico das silagens foi elevado em função das doses de N, apresentando interação com os híbridos de milho. Evidenciou-se que a inoculação com *A.*

*brasilense* pode exercer efeito sobre o conteúdo da parede celular de plantas e alterar qualitativamente os materiais ensilados.

**Palavras-chave:** Bactérias diazotróficas. Composição nutricional. Fitohormônios. Ureia.

### **Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation and nitrogen levels in maize silage**

**Abstract** - The aim of this work was to determine maize silage yield and nutritive value when inoculated with *Azospirillum brasilense* and submitted to different nitrogen fertilizer levels. Two experiments were conducted. The first experiment was conducted during 2012/2013 and 2013/2014 harvests, evaluating AS 1572 and Defender hybrids at Erechim, RS. The second experiment was developed at Santa Maria, RS, on 2013/2014 harvest, using AS 1572 and AG 9030 hybrids. Treatments followed randomized blocks design model in factorial arrangement composed by two maize hybrids, N fertilization levels (0, 60, 120, 240 and 480 kg/ha), inoculated or not with *Azospirillum brasilense*. Seeds were inoculated with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 and Ab-V6 strains with  $2.0 \times 10^8$  CFU/mL and  $6.6 \times 10^6$  CFU/seed of concentration. In Erechim, *A. brasilense* inoculation showed interaction with hybrid, harvestings and nitrogen levels for silage yield. On 2012/2013 harvest *A. brasilense* inoculation increased 6.16 % of AS 1572 hybrid silage yield, while on 2013/2014 harvest the *A. brasilense* inoculation increased 16.15 % of Defender hybrid. *A. brasilense* inoculation response was efficient on 2013/2014 harvest due to favorable effects of Defender hybrid. *A. brasilense* inoculation favored plants yield with 60 and 120 kg/ha nitrogen fertilization levels. *A. brasilense* inoculation increased ether extract and TDN and reduced acid detergent fiber content of silage. Furthermore, *A. brasilense* inoculation reduced cellulose content of Defender hybrid silage what increased NFC. Concerning Santa Maria, RS, experiment, there is interaction between *A. brasilense* inoculation and N levels, with positive effects between 240 and 480 kg/ha N levels. In this experiment the hybrids showed significant differences between morphological components due to differences in physiological maturity. Thus, AG 9030 hybrid showed better chemical composition on cell wall components. *A. brasilense* inoculation increased *in vitro* organic matter digestibility. Furthermore, *A. brasilense* inoculation reduced cellulose content of AS 1572 hybrid silage. In both experiments, N fertilization levels increased silage protein content, presenting interaction with maize hybrids. It was shown that *A. brasilense* inoculation can have an effect on cell wall plants content and alter silage quality.

**Keywords:** Diazotrophic bacteria. Nutritional composition. Phytohormones. Urea.

## Introdução

O emprego de bactérias diazotróficas em cultivos com a finalidade de aumentar o rendimento das culturas tem sido descrito na literatura (BASHAN e BASHAN, 2010; HUNGRIA et al., 2010; MOUTIA et al., 2010). Atribui-se a diversos mecanismos o incremento sobre a produtividade vegetal de plantas inoculadas, entretanto, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) (MORAIS et al., 2012) e a síntese de fitohormônios (CASSÁN et al., 2009) avultam-se como as de maior relevância. Retrata-se vantagens sobre a eficiência da utilização de nutrientes, com incremento da absorção e das concentrações de nitrogênio (N) e outros elementos minerais pelas plantas (DOBBELAERE et al., 2002; MOUTIA et al. 2010), inclusive milho (HUNGRIA et al. 2010), quando sementes são inoculadas com *Azospirillum* sp., seja pela FBN ou pelo aumento da superfície radical.

Dentre os nutrientes demandados pelas plantas, o N, é o elemento mais importante para o desenvolvimento de gramíneas (FONTOURA e BAYER, 2009). Em virtude da baixa concentração das formas disponíveis do elemento nos solos, a fertilização nitrogenada quando aplicada, altera de forma significativa a morfogênese da parte aérea das gramíneas, promovendo alongamento de colmos, emissão e expansão foliar, maior quantidade de folhas verdes e aumento da área foliar e capacidade fotossintética, dentre outras (PATÊS et al. 2007; SILVEIRA e MONTEIRO, 2007). Assim, a inoculação com *Azospirillum brasilense* associada ou não à fertilização nitrogenada pode trazer benefícios sobre a cultura, apesar dessa interação não estar totalmente esclarecida.

Dessa maneira, tanto a inoculação com *A. brasilense*, quanto a fertilização nitrogenada ou a associação dos dois fatores, podem definir, em parte, o desenvolvimento de estruturas morfológicas e reprodutivas e a participação de colmo, folhas e espigas/grãos sobre a cultura. Ademais, podem promover mudanças sobre a anatomo-histologia dos tecidos vegetais, como, por exemplo, sobre a deposição de células do mesófilo, parênquima, esclerênquima, dentre outras, que por sua natureza, possuem distintas concentrações de parede e conteúdo celular, dentre outras. Tanto as alterações morfológicas, quanto as anatomo-histológicas, afetam os conteúdos de proteína bruta, carboidratos estruturais, carboidratos solúveis, energia, dentre outros nutrientes necessários à nutrição animal. Com isso, tem-se a expectativa de alterações sobre a digestibilidade e a qualidade do material ensilado e, por fim, sobre a produtividade de carne e/ou leite de animais ruminantes.



Nesse contexto, objetivou-se com este trabalho determinar a produtividade de plantas e o valor nutricional de silagens de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 e submetidas a doses crescentes de N em cobertura.

### **Material e métodos**

Foram realizados dois experimentos em locais distintos. O primeiro experimento foi realizado em área pertencente ao Colégio Agrícola Ângelo Emílio Grando, no município de Erechim, RS, nas safras 2012/2013 e 2013/2014. O local está situado na região fisiográfica do Alto Uruguai, do Rio Grande do Sul, Brasil, à altitude de 760 m, 27° 65' de latitude Sul e 52° 30' de longitude Oeste. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Aluminoférrico Húmico pertencente à unidade de mapeamento Erechim (EMBRAPA, 2006; STRECK et al., 2008). O clima da região é classificado como Cfa (subtropical úmido) conforme classificação de Köppen, com precipitação média anual de 1869 mm, evapotranspiração potencial anual de 844,9 mm, temperatura média anual de 18,2 °C, com média mínima de 13,5 °C em julho e média máxima de 22,6 °C em janeiro e umidade relativa do ar de 78,6 % (CEMETRS, 2012).

O segundo experimento foi desenvolvido em área pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, na safra agrícola de 2013/2014. O local está fisiograficamente situado na Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, à altitude de 95 m, 29° 43' de latitude Sul e 53° 42' de longitude Oeste. O solo é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico Arênico pertencente à unidade de mapeamento São Pedro (EMBRAPA, 2006; STRECK et al., 2008). O clima da região é Cfa (subtropical úmido), conforme classificação de Köppen, com precipitação média anual de 1769 mm, temperatura média anual de 19,2 °C, com média mínima de 9,3 °C em julho e média máxima de 24,7 °C em janeiro, insolação de 2212 horas anuais e umidade relativa do ar de 82 % (CEMETRS, 2012). Os atributos químicos dos solos e os principais dados meteorológicos durante a condução dos experimentos são apresentados na Tabela 1 e Figura 1, respectivamente.

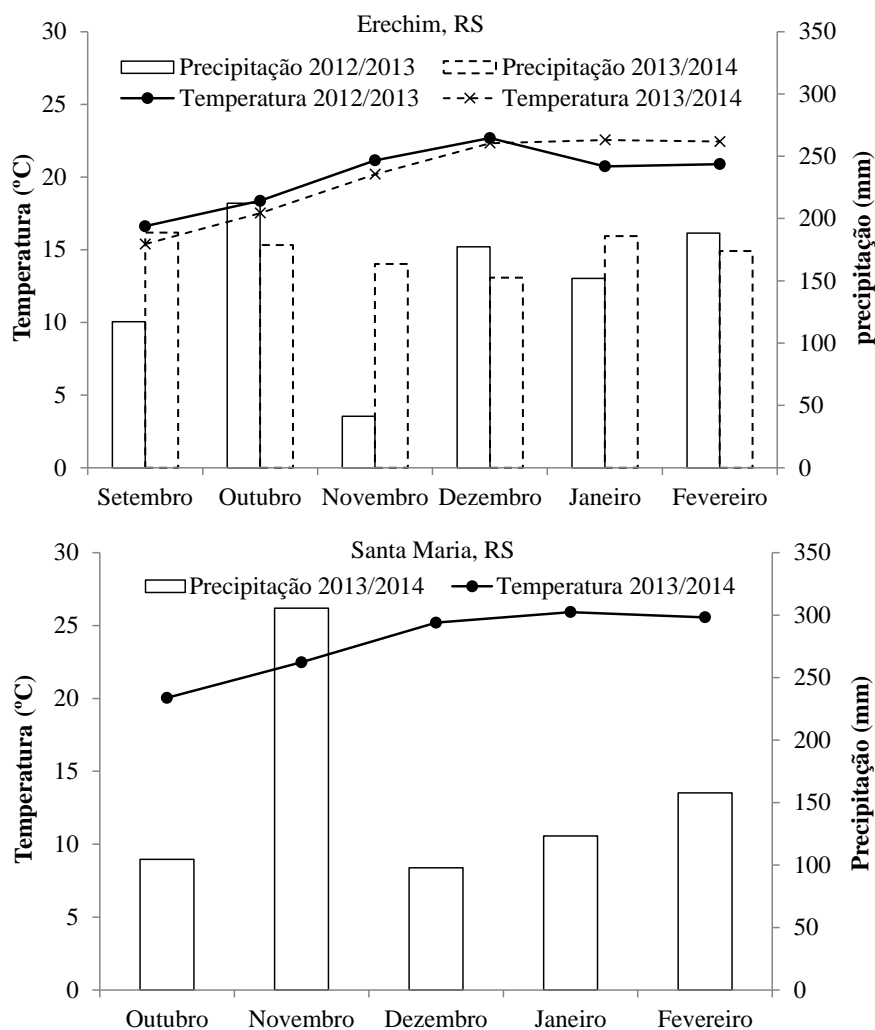


Figura 1. Variáveis climáticas (precipitação pluviométrica acumulada e temperatura média do ar) durante a condução do experimento em Erechim, RS, safras 2012/2013 e 2013/2014 e Santa Maria, RS, safra 2013/2014.

Durante o inverno, as áreas foram cultivadas com aveia preta (*Avena strigosa* L.) cultivar Comum, para a formação de palhada auxiliar para o sistema de plantio direto. Quando as culturas apresentaram pleno florescimento foi realizada a dessecação da área, com herbicida Glifosato (2,0 L/ha).

Coletas de amostras de solo para análise dos atributos químicos e recomendação da adubação do solo foram realizadas (Tabela 1). As coletas foram feitas à profundidade de 0,0 a 20,0 cm. As adubações (Fósforo e Potássio) foram realizadas conforme as indicações da Comissão de Fertilidade do Solo RS/SC (2004). A adubação fosfatada foi realizada com a aplicação da dose equivalente a 105 e 90 kg/ha de  $P_2O_5$  na forma de super fosfato triplo (SFT) em Erechim, RS e Santa Maria, RS, respectivamente. A adubação potássica foi realizada com a aplicação da dose equivalente a 50 e 60 kg/ha de  $K_2O$  na forma de cloreto de potássio (KCl), em Erechim, RS e Santa Maria, RS, respectivamente.

Tabela 1. Atributos químicos do solo nos locais onde foram realizados os experimentos no perfil de 0-20 cm

Local	Arg.	pH	SMP	CTC	Al	Ca	Mg	P	K	M.O	Bases
	%			-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----				--mg/dm <sup>3</sup> --		-----%	
Erechim	60,0	5,5	6,0	13,6	0,2	6,4	2,6	9,0	287	3,3	70,7
Santa Maria	23,0	5,0	5,5	7,5	0,7	4,5	2,1	17,5	84	2,2	47,8

Arg. = argila; pH = pH em água; SMP = índice SMP; CTC = capacidade de troca de cátions; Al = alumínio; Ca = cálcio; Mg = magnésio; P = fósforo; K = potássio; M.O = matéria orgânica; Bases = saturação por bases.

Nos dois experimentos, a adubação nitrogenada foi realizada com a aplicação da dose equivalente a 30 kg/ha, aplicada na linha de cultivo, no momento da semeadura, sendo o restante da adubação realizada em cobertura nos estádios fenológicos de 4 e 8 folhas desenvolvidas, nas datas de 18/10/2012 e 22/11/2012, divididas igualmente, com utilização de ureia (45% de N), distribuídas nos diferentes níveis de N que compuseram os tratamentos (doses equivalentes a 0, 60, 120, 240 e 480 kg/ha). Nas parcelas sem nitrogênio, não foi realizada a adubação nitrogenada, seja na semeadura ou em cobertura.

O estabelecimento do milho, em Erechim, RS, foi realizado em 16/09/2012 e 26/09/2013, com uso de semeadora de plantio direto, regulada com espaçamento de 0,66 m entre fileiras e 0,25 m entre plantas na linha, em parcelas compostas por nove fileiras, com dimensões de 5,0 x 5,28 m. Foi realizada a semeadura de dois genótipos de milho, o AS1572 e o Defender, ambos híbridos de ciclo precoce, geneticamente modificados para resistência a lagartas do cartucho, da broca do colmo e da espiga.

Em Santa Maria, o estabelecimento ocorreu no dia 16/10/2013, ajustando-se a semeadora com 0,45 m entre fileiras e 0,37 m entre plantas na linha, em parcelas com quatro fileiras cada, com dimensões de 6,5 x 1,8 m. Foi realizada a semeadura de dois genótipos de milho, o AS1572 de ciclo precoce e o AG 9030 de ciclo superprecoce, ambos geneticamente modificados para resistência a lagartas do cartucho, da broca do colmo e da espiga. Nos dois experimentos as bordaduras foram desprezadas das avaliações e a regulagem do implemento agrícola visou a obtenção de população aproximada de 60.000 plantas/ha.

Prontamente anterior ao plantio, as sementes de milho foram inoculadas com a bactéria *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na concentração de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL e  $6,6 \times 10^6$  UFC/semente, com a utilização de 200 mL/ha de inoculante (AzoTotal<sup>®</sup> – Total Biotecnologia), com auxílio de um copo graduado. Primeiramente foram semeadas as parcelas sem inoculação e, em seguida, as parcelas com inoculação, para evitar possível contaminação das sementes.

A colheita das plantas foi realizada quando a maior parte dos grãos se encontrava entre os estádios pastoso e farináceo, a 20 cm de altura do solo, utilizando uma das fileiras centrais das parcelas. No experimento em Erechim, RS, as silagens foram confeccionadas 121 e 119 dias após a emergência das plantas, com soma térmica acumulada igual a 1241,4 e 1291,6 graus dia, nas safras 2012/2013 e 2013/2014, respectivamente. Em Santa Maria, RS, as silagens foram confeccionadas 96 dias após a emergência das plantas com soma térmica acumulada igual a 1324,7 graus dia.

Foram coletadas três plantas representativas para avaliação da composição morfológica da planta, através da separação manual dos componentes, colmo, folhas, espiga, palha da espiga e material senescente. As amostras contendo os componentes estruturais foram picadas, bem como três plantas inteiras e acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por aproximadamente 72 horas para obtenção da estimativa de matéria parcialmente seca (MPS) e determinação da produtividade da cultura e dos componentes morfológicos em kg/ha de MS.

O restante da forragem das fileiras centrais das parcelas, foi triturado, em partículas de tamanho médio de 2 cm, ensiladas em mini silos laboratoriais, com densidade de compactação aproximada de 550 kg/m<sup>3</sup> de matéria verde e abertos cerca de setenta dias após a ensilagem. As análises foram realizadas no Núcleo Integrado de Desenvolvimento de Análises Laboratoriais (NIDAL) do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA) e no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes (LABRUMEN) do Departamento de Zootecnia (DZ), ambos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

No experimento de Santa Maria, RS, o conjunto composto por saco, areia e silagem foram pesados, separadamente e juntos, antes e após a elaboração da silagem, para posterior determinação das perdas por efluentes, perdas por gases, perdas totais e recuperação de matéria seca durante o processo fermentativo. O conjunto continha 2 kg de areia lavada e seca em estufa para absorção do efluente e aproximadamente 8 kg de silagem. A determinação da densidade de compactação foi realizada a partir do conhecimento do volume e da massa de silagem de cada silo.

De cada silo, uma amostra fresca foi utilizada para determinação do pH (potenciômetro digital) e outra porção para a extração do efluente da silagem (prensa Carver), no qual foi determinado o nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (N-NH<sub>3</sub>/NT) através de destilação com óxido de magnésio (AOAC, 1995).

Outra amostra contendo aproximadamente 500 gramas foi seca em estufa com ventilação de ar forçada a 55°C por 72 horas para obtenção da estimativa de matéria

parcialmente seca (MPS) e moídas em moinho tipo *Wiley* em peneira com crivos de um milímetro. Das amostras pré-secas foram efetuadas determinações de matéria seca (MS) em estufa a 105°C durante 16 horas, proteína bruta (PB) pelo método micro Kjeldahl, extrato etéreo (EE) em extrator Soxhlet com éter de petróleo, matéria mineral (MM) através de incineração em mufla a 550°C durante 4 horas, fibra em detergente neutro (FDN) obtida segundo Van Soest et al. (1991), com posterior correção para cinzas e proteína (FDNcp), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) conforme Goering e Van Soest (1970). A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e orgânica (DIVMO) foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Tilley e Terry (1963).

Os carboidratos não-fibrosos (CNF) e os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram estimados de acordo com o NRC (2001) pelas seguintes equações:  $CNF (\%) = 100 - (PB + MM + FDNcp + EE)$  e  $NDT_{1x} = CNFvd + PBvd + (EE - 1) \times 2,25 + FDNvd - 7$ , em que  $NDT_{1x} (\%)$  = nutrientes digestíveis totais para o consumo de 1 vez a manutenção; CNFvd = carboidratos não-fibrosos verdadeiramente digestíveis; PBvd = proteína bruta verdadeiramente digestível; FDNvd = fibra em detergente neutro verdadeiramente digestível e o valor sete refere-se à constante de desconto de constituintes metabólicos fecais. O nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram estimados de acordo com Licitra et al. (1996).

Em ambos experimentos o delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com 20 tratamentos e três repetições cada. A declividade do terreno foi o critério utilizado para o bloqueamento. No experimento de Erechim, RS, os tratamentos foram distribuídos em arranjo fatorial composto por dois híbridos de milho (AS 1572 e Defender), diferentes níveis de N (0, 60, 120, 240 e 480 kg/ha), inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*, em dois anos agrícolas (2012/2013 e 2013/2014). No experimento de Santa Maria, RS, os tratamentos foram distribuídos em arranjo fatorial composto por dois híbridos de milho (AS 1572 e AG 9030), diferentes níveis de N (0, 60, 120, 240 e 480 kg/ha), inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), testando os fatores isoladamente e suas interações, com utilização do pacote estatístico SAS (2001). Para as características avaliadas em função dos híbridos de milho e da inoculação com *Azospirillum brasilense* usou-se a comparação de médias com o emprego do teste F, enquanto que as variáveis avaliadas em função das diferentes doses de N foram estimadas por equações de regressão, em nível de 5% de significância. Os modelos estatísticos foram escolhidos de acordo com a significância dos coeficientes de regressão e de determinação ( $r^2$ ) e com o

fenômeno biológico estudado. O teste de correlação de Person foi realizado entre todas as variáveis.

## Resultados e discussão

### *Experimento 1: Erechim, RS*

O estande médio de plantas foi de 59954 por hectare não ocorrendo diferença significativa entre as safras. O peso médio da planta verde foi de 765,14 g, enquanto que a produtividade equivalente de silagem apresentou valor igual a 14360 kg/ha MS. Não se verificou diferença entre as safras para as duas variáveis.

A proporção média dos componentes morfológicos na planta de milho foi igual a 0,84, 1,09, 9,33, 16,19, 32,20 e 39,10 % de material senescente, pendão, palha da espiga, folha, colmo e espiga, respectivamente. A espiga é o componente que apareceu em maior proporção na massa ensilada.

Interação entre a inoculação com *Azospirillum brasilense* e híbridos de milho foi observada para peso da planta verde e produtividade equivalente de plantas para silagem (Tabela 2). O híbrido Defender quando inoculado com *Azospirillum brasilense* apresentou maior peso da planta verde e produtividade equivalente de silagem. Nesse caso, a inoculação promoveu incremento de 4,29 % sobre a produtividade equivalente de plantas.

Tabela 2. Interação entre a inoculação com *Azospirillum brasilense* e os híbridos de milho sobre a produtividade e a composição morfológica da planta de milho para silagem

Variáveis	<i>Azospirillum brasilense</i>		Controle		Pr > F
	AS 1572	Defender	AS 1572	Defender	
Peso da planta verde (g)	754,98 <sup>b</sup>	785,00 <sup>a</sup>	773,00 <sup>a</sup>	747,60 <sup>b</sup>	0,0001
Produtividade (kg/ha MS)	14208 <sup>b</sup>	14593 <sup>a</sup>	14620 <sup>a</sup>	14019 <sup>b</sup>	0,0001
Espiga (%)	36,76 <sup>c</sup>	38,38 <sup>b</sup>	42,39 <sup>a</sup>	38,87 <sup>b</sup>	0,0406
Folha (%)	15,87 <sup>b</sup>	16,16 <sup>b</sup>	15,09 <sup>b</sup>	17,28 <sup>a</sup>	0,0103

Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey.

Quando se estuda a interação entre a inoculação e híbridos, dentro de cada safra, verifica-se, na safra 2012/2013 o incremento de 6,16 % sobre a produtividade estimada do híbrido AS 1572 quando inoculado com *A. brasilense*. Já na safra 2013/2014 a inoculação com *A. brasilense* proporcionou aumento de 16,15 % para o híbrido Defender. Evidencia-se efeito associativo entre as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 e os híbridos estudados. Essa interação parece ser definida pelas condições edafoclimáticas específicas em cada safra, que favorece a

associação entre bactérias e plantas, ora beneficiando determinado híbrido, ora favorecendo outro. A busca por estirpes de *Azospirillum brasilense* capazes de crescer e beneficiar plantas em condições edafoclimáticas específicas parece ser terreno fértil às pesquisas, com a finalidade de reduzir a variabilidade das respostas com o uso de inoculantes.

É possível que a colonização das bactérias, bem como as respostas produtivas estejam associadas aos tipos de exsudatos radiculares liberados pelos diferentes genótipos, os quais podem servir como fonte de carbono para o crescimento microbiano. De acordo com Oliveira et al. (2003) os microrganismos direcionam-se às raízes em função de um reconhecimento químico, sendo atraídos pelo gradiente de fontes de carbono existentes entre o solo e a rizosfera. Segundo Liebersback et al. (2004), em condições de estresse hídrico e nutricional há um incremento na liberação de exsudatos radiculares. Hungria et al. (1997) observaram que exsudatos oriundos de feijão (*Phaseolus vulgares* L.) e milho (*Zea mays* L.) incrementaram as taxas de multiplicação de *Rhizobium* sp. e *Azospirillum lipoferum*, estimulando a nodulação e a fixação biológica do nitrogênio no feijoeiro.

A resposta à inoculação também se mostrou dependente da safra. A produtividade equivalente de plantas para silagem foi positivamente afetada na safra 2013/2014, enquanto que na safra 2012/2013 o mesmo efeito não foi observado (Tabela 3). Na safra 2013/2014 a inoculação promoveu incremento na ordem de 4,35 % sobre a produtividade equivalente de plantas. Isso ocorreu, devido ao efeito produzido da inoculação com *A. brasilense* sobre o híbrido Defender, discutido anteriormente.

Tabela 3. Interação entre a inoculação com *Azospirillum brasilense* e as safras sobre a produtividade equivalente de plantas para silagem, em kg/ha MS

Produtividade de plantas	2012/2013	2013/2014	Média
<i>Azospirillum brasilense</i>	14107 <sup>b</sup>	14722 <sup>a</sup>	14414
Controle	14561 <sup>a</sup>	14051 <sup>b</sup>	14306
Média	14334	14387	

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

A variação nas respostas e as interações observadas entre as safras e os híbridos com a inoculação com *A. brasilense* no presente estudo é possível de ocorrer, sendo reportada na literatura. A sobrevivência do *A. brasilense* varia de acordo com o solo, clima e condições da planta (BASHAN et al., 2004; HUNGRIA et al., 2010). Parece não haver um padrão definido de colonização rizosférica pelas bactérias introduzidas através de inoculantes em nível de campo, as bactérias rizosféricas são fortemente afetadas pelas condições edafoclimáticas e pela competição com cepas/microbiota nativas o que justifica os resultados contraditórios e as

variações encontradas em condição de campo (ABRIL et al., 2006). Os autores definiram que o grau de colonização de raízes por *Azospirillum* spp. é afetado, especialmente, pelo estresse hídrico e pela origem das cepas dos inoculantes.

Zemrany et al. (2006) afirmaram que a sobrevivência de bactérias em inoculantes é pré-requisito para a obtenção de efeitos benéficos sobre a planta. Ao avaliarem a estirpe CRT1 de *A. lipoferum* na rizosfera do milho durante dois anos, verificaram que a estirpe sobreviveu bem, especialmente durante os primeiros dois meses após a inoculação. Isso significa que, pelo menos, a partir desse ponto de vista as condições ecológicas foram adequadas para esperar efeito positivo no crescimento das plantas. Aumentos da profundidade do enraizamento e da biomassa radical foram relatados, sem, entretanto, alterar peculiaridades da parte aérea das plantas, incluindo a produtividade de grãos.

Tal insucesso foi atribuído à elevada disponibilidade de N no solo, já que as práticas de agricultura na França promovem o uso de grandes quantidades de nitrogênio, o que permitiu que a cultura se beneficiasse do N empregado em cultivos e anos que antecederam o experimento. Dessa forma, os resultados com a inoculação serão obtidos quando a disponibilidade de N no solo for limitante, com o uso mais sustentável da fertilização nitrogenada.

Interação entre safras e híbridos de milho foi verificada para as variáveis, peso da planta verde, produtividade equivalente de plantas para silagem, espiga, colmo e senescência (Tabela 4). O híbrido AS 1572 apresentou maior peso da planta verde e produtividade de silagem em 2012/2013, enquanto que na safra 2013/2014 o híbrido Defender mostrou-se superior para essas variáveis.

Tabela 4. Interação entre os híbridos de milho e as safras sobre a produtividade e composição morfológica da planta de milho para silagem

Variáveis	Safr 2012/2013		Safr 2013/2014		Pr > F
	AS 1572	Defender	AS 1572	Defender	
Peso da planta verde (g)	785,85 <sup>a</sup>	753,51 <sup>b</sup>	754,12 <sup>b</sup>	767,08 <sup>ab</sup>	0,0001
Produtividade (kg/ha MS)	14653 <sup>a</sup>	14015 <sup>b</sup>	14148 <sup>b</sup>	14625 <sup>a</sup>	0,0001
Espiga (%)	45,39 <sup>a</sup>	40,00 <sup>b</sup>	29,75 <sup>c</sup>	41,26 <sup>b</sup>	0,0001
Colmo (%)	25,85 <sup>c</sup>	29,31 <sup>c</sup>	45,08 <sup>a</sup>	35,09 <sup>b</sup>	0,0001
Senescência (%)	0,00 <sup>c</sup>	0,00 <sup>c</sup>	2,02 <sup>a</sup>	1,33 <sup>b</sup>	0,0188

Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey.

O híbrido AS 1572 apresentou maior proporção de espigas na safra 2012/2013, enquanto que na safra 2013/2014 o mesmo híbrido mostrou-se inferior para essa característica quando comparado ao híbrido Defender (Tabela 4). O híbrido Defender apresentou maior



proporção de colmo na safra 2012/2013, enquanto que na safra 2013/2014 a maior proporção foi observada para o híbrido AS 1572.

Na safra 2012/2013 não foi observada senescência no material a ser ensilado. Já na safra 2013/2014 a proporção de material senescente foi de 2,02 e 1,33 % nos híbridos AS 1572 e Defender, respectivamente (Tabela 4). A presença de material senescente na safra 2013/2014 deve-se à maior média de temperatura do ar e maior acúmulo de temperatura no período.

As crescentes doses de N alteraram as respostas à inoculação com *A. brasilense*. Doses crescentes, entre 60 e 120 kg/ha, favoreceram o desenvolvimento de plantas inoculadas (Figura 2). Dentre as hipóteses, elevadas doses de N podem comprometer a fixação biológica do nitrogênio. Esse efeito pode ser atribuído à rápida e reversível redução da atividade da nitrogenase, a qual é inibida pela adição de  $\text{NH}_4^+$  no meio, em virtude do alto custo energético da redução do  $\text{N}_2$  (REIS e TEIXEIRA, 2005). Isso significa que os resultados obtidos frente à inoculação são dependentes das baixas concentrações de N mineral nos solos ou das baixas e médias doses de N aplicadas em cobertura.

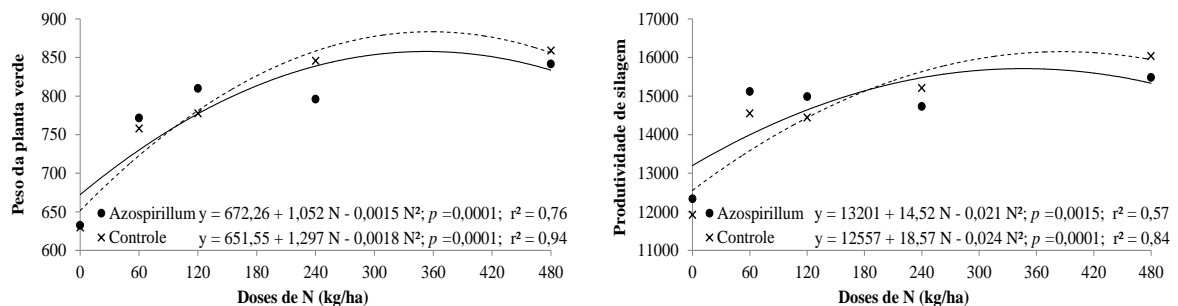


Figura 2. Peso da planta verde (g) e produtividade equivalente de silagem (kg/ha MS) de híbridos de milho submetidos a doses crescentes de nitrogênio em duas safras.

As doses crescentes de N afetaram de forma quadrática o peso da planta verde e a produtividade equivalente de plantas para silagem em ambas as safras. Verificou-se interação entre as safras e as doses de N para essas variáveis (Figura 3). As doses de N além de afetarem o peso da planta verde e a produtividade equivalente de plantas também incrementaram de forma quadrática a produtividade absoluta de espiga, folhas e colmo, sem, entretanto, alterar a proporção dos componentes morfológicos.

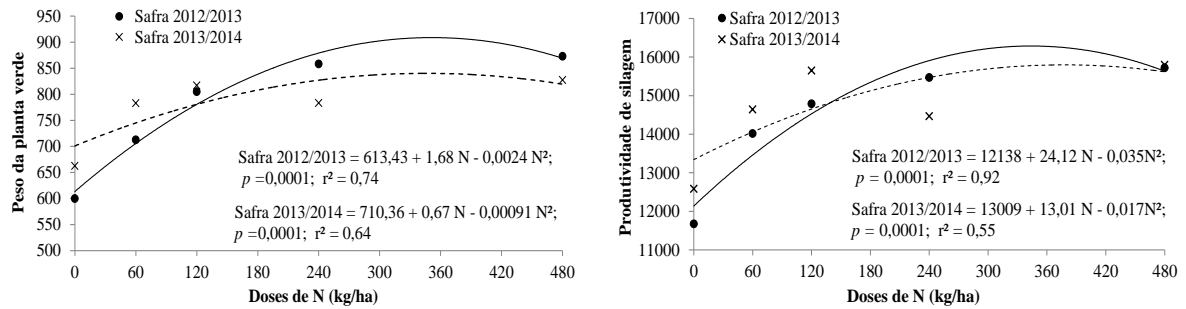


Figura 3. Peso da planta verde (g) e produtividade equivalente de silagem (kg/ha MS) de híbridos de milho submetidos a doses crescentes de nitrogênio em duas safras.

Evidenciam-se diferenças quanto a resposta à adubação nitrogenada nas diferentes safras. Esse fenômeno pode se relacionar a períodos específicos que determinaram déficit hídrico, por exemplo, dentre outras variáveis ecológicas, entretanto, não possíveis de serem explicadas com exatidão, considerando a inexistência de diferenças importantes relacionadas à precipitação, temperatura média do ar e radiação solar entre as safras.

A fermentação dentro dos silos ocorreu de maneira satisfatória (Tabela 5). Houve interação entre safras e doses de nitrogênio para o teor de MS das silagens (Figura 4). Somente na safra 2012/2013 as crescentes doses de N exerceram efeito sobre os valores de MS, reduzindo-os de forma quadrática.

Tabela 5. Parâmetros fermentativos e composição nutricional de silagens de plantas de híbridos de milho nas safras 2012/2013 e 2013/2014

Variáveis	Média	CV (%)	$p \leq 0,05$
pH	3,90	2,45	-
N-amoniacal (N-NH <sub>3</sub> /%NT)	4,48	4,56	-
Matéria seca (%)	30,64	5,67	s*n
Proteína bruta (%)	8,28	9,15	s*n
Extrato etéreo (%)	2,95	10,88	i; s*h
Fibra em detergente neutro (%)	46,39	4,00	s*h
Fibra em detergente ácido (%)	26,54	4,93	i; s*h
Hemicelulose (%)	20,81	6,98	s*h
Celulose (%)	22,28	4,93	s*h; i*h
Lignina (%)	3,28	11,92	s*h
Carboidratos não fibrosos (%)	37,62	5,66	n; i*h; s*h
Carboidratos totais (%)	84,01	1,11	s; n
NIDA (NIDA/%NT)	9,10	15,72	s*h
NIDN (NIDN/%NT)	22,90	9,44	s; i*h
NDT (%)	72,79	1,62	i; s*h

s = efeito associado a safra; n = efeito associado as doses de nitrogênio; i = efeito associado a inoculação com *A. brasilense*; h = efeito associado ao híbrido de milho; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NDT = nutrientes digestíveis totais.

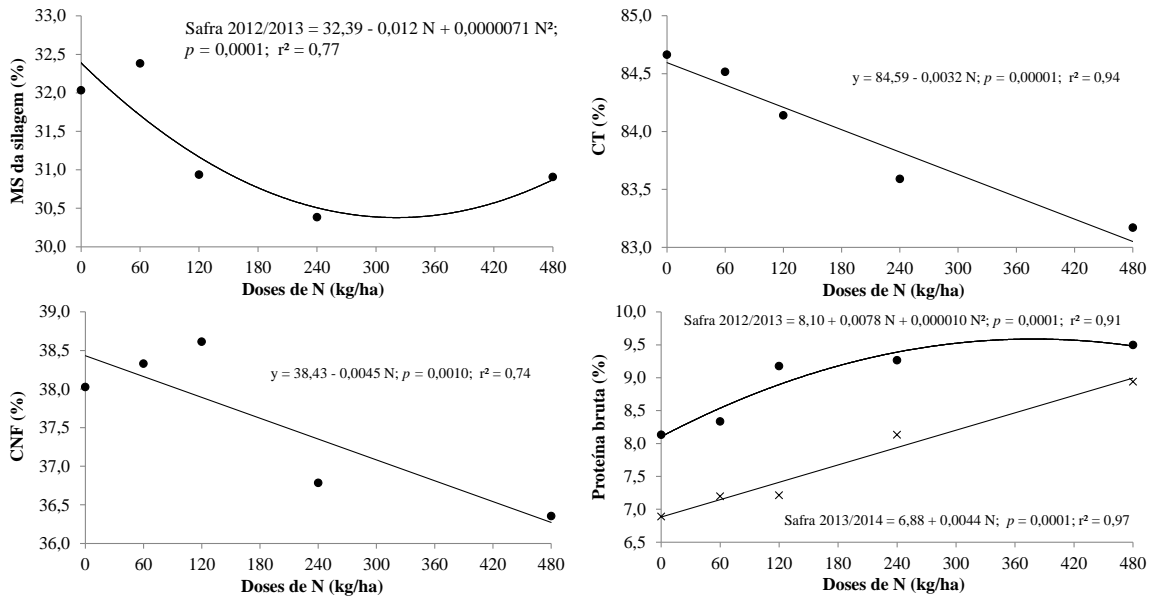


Figura 4. Teor de MS, carboidratos não fibrosos (CNF), carboidratos totais (CT) e proteína bruta de silagens de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense* submetidos a doses crescentes de N em cobertura.

Sobre a composição nutricional das silagens, os teores de carboidratos não fibrosos e carboidratos totais apresentaram redução linear em função das doses crescentes de nitrogênio em cobertura (Figura 4). Isso se deve ao aumento dos teores proteicos das silagens. Interação entre safras e doses de nitrogênio também foi percebida para o teor de PB das silagens (Figura 4). A safra 2012/2013 apresentou silagens com maior teor proteico e comportamento quadrático em função das crescentes doses de N, enquanto que na safra 2013/2014 os teores de PB foram inferiores e os valores cresceram de maneira linear.

A inoculação com *Azospirillum brasilense* elevou os teores de extrato etéreo e NDT e reduziu a quantidade de fibra em detergente ácido das silagens (Tabela 6). Interação entre a inoculação com *A. brasilense* e os híbridos de milho foi descrita para as variáveis, celulose e carboidratos não fibrosos (Tabela 6). A inoculação reduziu os valores de celulose junto ao híbrido Defender o que elevou a quantidade de CNF nesse híbrido inoculado. Apesar de sutis, as mudanças percebidas referem-se a duas safras de experimentação, em anos distintos, o que garante certa robustez aos valores observados, evidenciando que a inoculação pode exercer efeito sobre o conteúdo da parede celular de plantas e alterar qualitativamente os materiais ensilados.

Tabela 6. Teores de extrato etéreo e fibra em detergente ácido (FDA) e nutrientes digestíveis totais (NDT) de silagens de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense*, nas safras 2012/2013 e 2013/2014

Variáveis	<i>Azospirillum</i>	Controle	Pr > F
Extrato etéreo (%)	3,02	2,88	0,0217
FDA (%)	21,94	22,63	0,0041
NDT (%)	73,00	72,60	0,0500

Tabela 7. Interação entre a inoculação com *Azospirillum brasilense* e os híbridos de milho sobre os componentes nutricionais das silagens

Variáveis	<i>Azospirillum brasilense</i>		Controle		Pr > F
	AS 1572	Defender	AS 1572	Defender	
Celulose (%)	21,58 <sup>b</sup>	21,65 <sup>b</sup>	20,64 <sup>c</sup>	23,61 <sup>a</sup>	0,0097
CNF (%)	38,22 <sup>ab</sup>	37,30 <sup>b</sup>	38,70 <sup>a</sup>	36,26 <sup>c</sup>	0,0383

Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey.

Interação entre híbridos de milho e safras foi determinada pelo modelo estatístico (Tabela 8). Em grande parte, a variação dos componentes nutricionais das silagens depende dessa interação. O híbrido Defender na safra 2012/2013 mostrou-se inferior em termos de composição da parede celular e qualidade do material ensilado, quando cotejado ao híbrido AS 1572. Entretanto, na safra 2013/2014 o híbrido Defender mostrou-se superior à outra safra e ao híbrido AS 1572, com valores superiores de CNF e NDT e inferiores em termos de parede celular. Esses resultados conjecturam com a interação observada entre os híbridos e as safras sobre a produtividade e a composição morfológica da planta, descrita anteriormente.

Tabela 8. Interação entre os híbridos de milho e as safras sobre a composição nutricional de silagens de planta de milho

Variáveis	Safra 2012/2013		Safra 2013/2014		Pr > F
	AS 1572	Defender	AS 1572	Defender	
FDN (%)	44,05 <sup>d</sup>	48,96 <sup>a</sup>	47,34 <sup>b</sup>	45,21 <sup>c</sup>	0,0001
FDA (%)	25,81 <sup>b</sup>	29,92 <sup>a</sup>	25,74 <sup>b</sup>	24,69 <sup>c</sup>	0,0001
Hemicelulose (%)	20,23 <sup>b</sup>	20,92 <sup>ab</sup>	21,59 <sup>a</sup>	20,51 <sup>b</sup>	0,0016
Celulose (%)	20,64 <sup>d</sup>	24,20 <sup>a</sup>	22,59 <sup>b</sup>	21,69 <sup>c</sup>	0,0001
Lignina (%)	3,12 <sup>b</sup>	3,84 <sup>a</sup>	3,15 <sup>b</sup>	2,99 <sup>b</sup>	0,0012
CNF (%)	38,13 <sup>b</sup>	33,17 <sup>c</sup>	38,79 <sup>b</sup>	40,41 <sup>a</sup>	0,0001
NDT (%)	73,17 <sup>b</sup>	70,51 <sup>c</sup>	73,07 <sup>b</sup>	74,41 <sup>a</sup>	0,0001

Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey.

*Experimento 2: Santa Maria, RS*

O estande médio de plantas foi de 61196 por hectare. O peso médio da planta verde foi de 682,64 g. A produtividade equivalente média de plantas para silagem foi de 14792 kg/ha MS. A espiga foi o componente morfológico que apresentou, em média, a maior participação na massa ensilada com valor igual a 48,16 %, seguido dos componentes, colmo, folhas e palha da espiga, com proporções iguais a 25,05, 17,33 e 10,01 %, respectivamente.

O híbrido AG 9030 apresentou menor peso da planta verde quando comparado ao híbrido AS 1572, havendo a mesma produtividade equivalente de plantas para ambos (Tabela 9). Isso é explicado porque o corte dos materiais ocorreu com o mesmo acúmulo térmico, assim, o híbrido AG 9030 apresentou maior percentual de MS, que será descrito posteriormente, por se caracterizar como híbrido de ciclo superprecoce, enquanto que o AS 1572 se caracteriza como precoce e apresentou maior umidade no momento do corte.

Tabela 9. Produtividade e composição morfológica das plantas de híbridos de milho para silagem

Variáveis	AS 1572	AG 9030	Média	Pr > F	CV (%)
Peso da planta verde (g)	754,38	610,91	682,64	0,0001	8,96
Produtividade (kg/ha MS)	15061 <sup>NS</sup>	14523 <sup>NS</sup>	14792	0,2593	12,32
Espiga (%)	40,46	55,86	48,16	0,0001	15,52
Folha (%)	19,06	15,60	17,33	0,0001	16,16
Colmo (%)	29,96	20,14	25,04	0,0001	21,77
Palha (%)	10,34 <sup>NS</sup>	9,69 <sup>NS</sup>	10,01	0,2180	20,10

NS = não diferem entre si pelo teste F.

As diferenças entre os híbridos, especialmente sobre espiga e colmo (Tabela 9) podem ser explicadas pelas variações no crescimento das plantas. O AG 9030, por apresentar ciclo superprecoce, possui enchimento do grão e secagem anterior quando comparado ao híbrido AS 1572. A colheita na mesma época favoreceu o híbrido AG 9030 para a característica produtividade de plantas e percentagem de espiga e reduziu a participação de colmo pela provável antecipação na translocação de nutrientes para a espiga. Esses fatores possivelmente contribuirão para o maior teor energético das silagens provenientes desse material.

As crescentes doses de N em cobertura incrementaram de forma quadrática o peso da planta verde e a produtividade equivalente de plantas para silagem (Figura 5). Foi observada interação para produtividade equivalente de plantas entre a inoculação com *Azospirillum brasilense* e a fertilização nitrogenada. Evidenciou-se efeito positivo significativo da inoculação em doses superiores de fertilização nitrogenada entre 240 e 480 kg/ha de N.

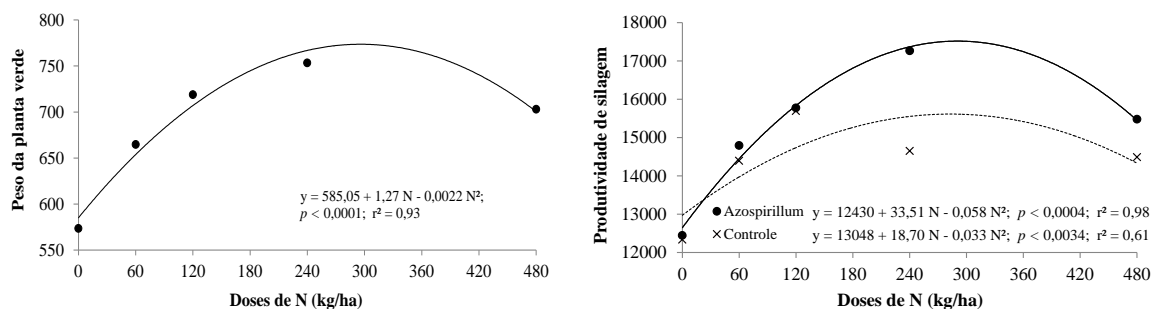


Figura 5. Peso da planta verde (g) e produtividade estimada de silagem (kg/ha MS) de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense* submetidos a crescentes doses de N.

Esse fenômeno está apoiado na hipótese da maior disponibilidade de N no solo que permitiu melhor desenvolvimento das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 e síntese de indutores hormonais do crescimento. Assim, é possível que haja maior absorção do elemento quando as plantas são inoculadas com *A. brasilense* e submetidas a elevadas doses de N, tornando-as mais eficientes. Isso pode ser de importância prática para sistemas intensivos de produção que fazem uso de tecnologias como irrigação e elevadas doses de fertilizantes, reduzindo as perdas pela fertilização nitrogenada com ureia.

Resultado semelhante foi descrito por Araújo et al. (2014) que verificaram aumento em torno de 30% sobre o rendimento de espigas comerciais de milho verde e redução em 15% da adubação nitrogenada com a combinação *A. brasilense* e adubação nitrogenada em cobertura. A maior quantidade e a maior massa de espigas foram obtidas com o uso da inoculação associada a altas doses de N (150 kg/ha).

Segundo Dobbelaere et al. (2002) a inoculação com *A. brasilense* Sp245 melhorou significativamente a eficiência com que as plantas de trigo absorveram o N aplicado via adubação nitrogenada, incrementando a eficiência de uso do N pela planta. O mecanismo por trás dessa melhoria deve ser atribuído ao aumento geral do sistema radical, permitindo que a planta explore maior volume de solo.

As doses de N além de afetarem o peso da planta verde e a produtividade equivalente de silagem também incrementaram de forma quadrática a produtividade absoluta de espiga, folha e colmo, sem, entretanto, alterar a proporção dos componentes morfológicos.

Os parâmetros fermentativos das silagens são considerados adequados, o que garantiu boa fermentação. Os parâmetros fermentativos foram afetados pelos híbridos de milho, pelas doses de nitrogênio em cobertura e por suas interações (Tabela 10).

Tabela 10. Parâmetros fermentativos e composição nutricional de silagens de planta de milho inoculado com *Azospirillum brasilense*

Variáveis	Média	CV (%)	$p \leq 0,05$
Densidade (kg MV/m <sup>3</sup> )	544,64	9,88	h
Matéria seca (%)	33,02	5,04	h
pH	3,75	1,42	h
N amoniacal (%N-NH <sub>4</sub> /NT)	1,50	12,74	-
RMS (%)	87,81	4,96	h*n
Perdas por gases (%)	11,87	32,67	h
Perdas por efluentes (kg/t MV)	13,64	15,75	h; n
Proteína bruta (%)	8,66	7,53	h*n
Fibra em detergente neutro (%)	45,20	7,33	n
Fibra em detergente ácido (%)	27,93	9,28	h
Hemicelulose (%)	17,65	15,39	h
Celulose (%)	24,79	6,35	i*h
Lignina (%)	3,17	25,70	h
Digestibilidade <i>in vitro</i> MS (%)	67,91	3,84	-
Digestibilidade <i>in vitro</i> MO (%)	65,16	3,66	i

s = efeito associado à safra; n = efeito associado às doses de nitrogênio; i = efeito associado à inoculação com *A. brasilense*; h = efeito associado ao híbrido de milho; RMS = recuperação de matéria seca

No momento da ensilagem os híbridos de milho apresentaram distinção quanto à maturidade fenológica, evento discutido anteriormente. O maior teor de MS do híbrido AG 9030 (Tabela 11) reduziu a densidade de compactação e elevou o pH, sem, entretanto, comprometer o processo fermentativo dentro do silo, proporcionando menores perdas por gases e por efluentes (Tabela 11). Ambos os híbridos apresentaram teores de MS adequados para garantir apropriada compactação e fermentação dentro dos silos (Tabela 11). A principal diferença pode residir na abreviação de perdas ao ensilar com valores de MS mais elevados. Essa hipótese é válida desde que se considerem materiais com semelhante constituição nutricional e intervalo aproximado entre 30 e 40% de MS.

Tabela 11. Parâmetros fermentativos e composição nutricional de silagens de planta de híbridos de milho

Variáveis	AS 1572	AG 9030	Média	Pr > F	CV (%)
Densidade (kg MV/m <sup>3</sup> )	562,40	526,88	544,64	0,0143	9,88
Matéria seca (%)	29,95	36,09	33,02	0,0001	5,04
pH	3,71	3,80	3,75	0,0001	1,42
Perdas por efluentes (kg/t MV)	14,47	12,80	13,64	0,0042	15,75
Fibra em detergente ácido (%)	29,70	26,16	27,93	0,001	9,28
Lignina (%)	3,40	2,93	3,17	0,0283	25,70

Devido à maior participação de espigas na massa ensilada e menor proporção de colmo (Tabela 9), o híbrido AG 9030 apresentou melhor constituição química relativa aos

componentes da parede celular (Tabela 11), entretanto, a menor quantidade desses constituintes químicos não foi suficiente para alterar a digestibilidade *in vitro* do material.

Interação entre híbridos e doses de nitrogênio em cobertura foi descrita para recuperação de matéria seca e proteína bruta (Figura 6). A recuperação de matéria seca foi menor em função das doses crescentes de N em cobertura, no entanto, o modelo foi significativo somente para o híbrido AS 1572. As crescentes doses de N aumentaram de maneira linear os teores de proteína bruta das silagens (Figura 6).

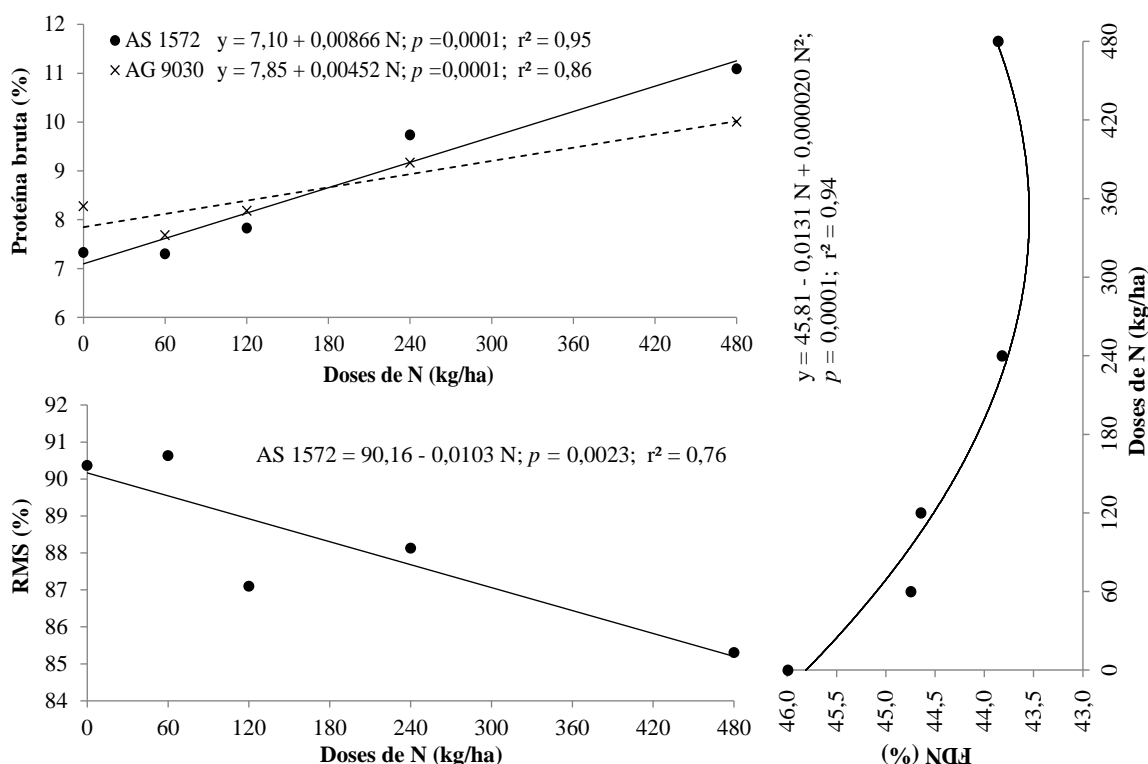


Figura 6. Proteína bruta, recuperação de matéria seca (RMS) e fibra em detergente neutro (FDN) de híbridos de milho submetidos a doses crescentes de N em cobertura.

A absorção crescente e linear de N pela planta, em função das doses crescentes de fertilização nitrogenada ocorreu em virtude da maior disponibilidade do nutriente próximo às raízes. A maior absorção pela planta não indica necessariamente maior assimilação e síntese de tecidos, como descreve o modelo obtido para a produtividade equivalente de silagem, o qual se comportou de maneira quadrática. A absorção além da capacidade de síntese proporciona certo grau de ineficiência por obrigar o organismo vegetal a expulsar íons que se acumulam, com gasto de energia.

As crescentes doses de N em cobertura contribuíram para a precipitação de maneira quadrática dos níveis de FDN (Figura 6). Essa redução está associada à maior síntese de compostos solúveis e proteicos. Alterações sobre a proporção morfológica da planta não



foram detectadas em função das crescentes doses de N. A hipótese de que alterações anatomo-histológicas nos tecidos da planta, respondam pelas diferenças observadas, em função das crescentes doses de N, parece definitiva. Entretanto, essas diferenças descritas sobre as características bromatológicas não foram suficientes para alterar a digestibilidade *in vitro* da MS das silagens.

De acordo com Basso (2009) reduções lineares da epiderme abaxial e tecido vascular foram retratadas, em função de doses crescentes de N, em folhas de cultivar de *Panicum maximum*. Esses tecidos são constituídos por elevada quantidade de fibra e lignina e possuem lenta e parcial degradação e por isso apresentam, em geral, menor digestibilidade. De maneira contrária, o autor verificou aumento linear de células do mesófilo em função das crescentes doses de N. Células do mesófilo apresentam rápida degradação ruminal, por ser sítio da fotossíntese e concentrar elevada quantidade de clorofila, açúcares solúveis e proteínas (TAIZ e ZEIGER, 2013), as quais possuem parede celular primária delgada e não lignificada.

Silagens de plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* apresentaram maior digestibilidade da matéria orgânica (65,87%) em relação às silagens de plantas não inoculadas (64,45%). Novamente, de maneira sutil, a inoculação alterou componente envolvido com o valor nutricional das silagens. Interação entre a inoculação e híbridos de milho foi determinada para a variável celulose. A inoculação reduziu os teores de celulose junto ao híbrido AS 1572. De forma contrária, a inoculação promoveu incremento dos valores junto ao híbrido Defender.

### Conclusões

No experimento de Erechim, RS, a obtenção de resultados positivos com a inoculação de *Azospirillum brasilense* esteve condicionada aos híbridos, à fertilização nitrogenada e às safras. A interação entre a inoculação com *Azospirillum brasilense* e híbridos de milho parece estar associada às condições edafoclimáticas específicas em cada cultivo, não permitindo definir um padrão para a associação entre as cepas Ab-V5 e Ab-V6 e os híbridos estudados nas diferentes safras. A inoculação com *Azospirillum brasilense* incrementa a eficiência da fertilização nitrogenada com ureia, que se reflete em maior produtividade da cultura para silagem em dosagens baixas e médias.

No experimento de Santa Maria, RS, os resultados positivos com a inoculação de *Azospirillum brasilense* estão condicionados a fertilização nitrogenada. A inoculação com *Azospirillum brasilense* eleva a eficiência da fertilização nitrogenada com ureia, que se reflete em maior produtividade da cultura para silagem em dosagens elevadas.

Em ambos os experimentos, a inoculação com *A. brasilense* exerceu alterações sobre o conteúdo da parede celular de plantas e a qualidade dos materiais ensilados.

### Referências

ABRIL, A.; BIASUTTI, C.; MAICH, R.; DUBBINI, L.; NOE, L. Inoculación con *Azospirillum* spp. en la Región Semiárida-Central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. **Ciência del Suelo**, v. 24, n. 1, p. 11-19, 2006.

ARAÚJO, R.M. et al. Resposta do milho verde a inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1556-1560, 2014.

AOAC. **Official methods of analysis**. 16th Ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025 p.

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.

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

BASSO, K.C. Morfogênese e anatomia foliar de *Panicum maximum* Jacq. cv IPR-86 Milênio submetido a doses crescentes de nitrogênio. 209. 71 f. Tese. Doutorado em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2009.

CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 28-35, 2009.

CEMETRS – Centro Estadual de Meteorologia. **Atlas climático do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 198 p. Acessado em 23/05/2012. <http://www.r3pb.com.br/AtlasCemetRS/#/9/zoomed>

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10 ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul: UFRGS, 2004. 400p.

DOBBELAERE, S. et al. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. Irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 284-297, 2002.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, 1999. 412p.

FONTOURA, S.M.V; BAYER, C. Adubação nitrogenada para alto rendimento de milho em plantio direto na região Centro-Sul do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 33, p, 1721-1732, 2009.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis**. Washington: Agricultural Research Service, USDA, 1970. 20 p.

HUNGRIA, M. et al. Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura ou consórcio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 807-818, 1997.

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

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, p. 347-358, 1996.

LIEBERSBACK, H. et al. Roots regulate ion transport in the rhizosphere to counteract reduced mobility in dry soil. **Plant and Soil**, v. 10, p. 79-88, 2004.

MORAIS, R.F. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant and Soil**, v. 356, p. 23-34, 2012.

MOUTIA, J.F.Y.; SAUMTALLY, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEJN, J. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. In sugar cane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and Soil**, v. 337, p. 233-242, 2010.

NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th. Ed., National Academy Press: Washington D.C., 2001. 405 p.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA S.; BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**. 2003.40 p.

PATÊS, N.M.S. et al. Características morfogênicas e estruturais do capim-tanzânia submetido a doses de fósforo e nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1736-1741, 2007.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. **Fixação Biológica de Nitrogênio—Estado da Arte**. p. 151-180. 2005. *In*: Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 368 p.

SAS Institute. **Statistical analysis system user's guide**. Version 8.02 Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001.

SILVEIRA, C.P.; MONTEIRO, F.A. Morfogênese e produção de biomassa do Capim-tanzânia adubado com nitrogênio e cálcio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 335-342, 2007.

STRECK, V. E.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P. GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. – Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TILLEY, J.M.A., TERRY, R.A. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

ZEMRANY, H. et al. Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1712–1726, 2006.

## **CAPÍTULO 5 - INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E DOSES DE NITROGÊNIO EM HÍBRIDOS DE MILHO: ESTRATÉGIAS PARA INCREMENTO DA PRODUTIVIDADE**

**Resumo** - A utilização de estratégias que possam ampliar a produtividade de grãos na cultura do milho com reduzido custo deve ser prioridade dentro de sistemas produtivos equilibrados. A adubação com nitrogênio deve ser planejada, elevando a eficiência e reduzindo a contaminação ambiental. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e da adubação nitrogenada sobre as características agrônômicas e a produtividade da cultura do milho. Dois experimentos foram realizados. O primeiro experimento foi conduzido na safra 2012/2013, avaliando-se os híbridos AS 1572 e Defender em Erechim, RS. O segundo foi desenvolvido em Santa Maria, RS, com os híbridos AS 1572 e AG 9030. Os tratamentos foram distribuídos em arranjo fatorial composto por dois híbridos de milho, diferentes níveis de nitrogênio em cobertura (0, 60, 120, 240 e 480 kg/ha), inoculados ou não com *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 com concentração de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL e  $6,6 \times 10^6$  UFC/semente. A produtividade equivalente de grãos não foi afetada pelos diferentes híbridos, em ambas os experimentos. No experimento de Erechim interação entre doses de N, inoculação com *A. brasilense* e híbridos de milho foi observada para a produtividade equivalente de grãos. Nesse caso, o híbrido AS 1572 respondeu à inoculação com *A. brasilense* com utilização de 60 e 120 kg/ha de N, retratando o incremento da eficiência da fertilização nitrogenada com ureia nessas dosagens. No experimento de Santa Maria houve incremento na produtividade de grãos, em 1,14 t/ha ou 13,94 %, proporcionado pela inoculação com *A. brasilense* junto ao híbrido AS 1572. Esse incremento não foi descrito para o híbrido Defender. Os resultados evidenciaram, em ambas os experimentos, efeito associativo entre as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 e o híbrido AS 1572.

**Palavras-chave:** Bactérias endofíticas. Bactérias promotoras do crescimento. Fitohormônios. Fixação biológica do nitrogênio. Massa de grãos.

## ***Azospirillum brasilense* inoculation and nitrogen levels in maize hybrids: strategies for improving yield**

**Abstract** - Strategies to enhance maize grain yield with low economic cost, should be a priority within balanced productive systems. Nitrogen fertilization should be planned, increasing efficiency and reducing environmental contamination. Thus, the aim of this work was to evaluate *Azospirillum brasilense* inoculation effect and nitrogen fertilization on agronomic characteristics and maize grain yield. Two experiments were developed. The first experiment was conducted during 2012/2013 harvest, evaluating AS 1572 and Defender hybrids at Erechim, RS. The second experiment was developed at Santa Maria, RS, on 2013/2014 harvest, using AS 1572 and AG 9030 hybrids. Treatments followed randomized blocks design model in factorial arrangement composed by two maize hybrids, N fertilization levels (0, 60, 120, 240 and 480 kg/ha), inoculated or not with *Azospirillum brasilense*. Seeds were inoculated with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 and Ab-V6 strains with  $2.0 \times 10^8$  CFU/mL and  $6.6 \times 10^6$  CFU/seed of concentration. Maize grain yield was not affected by the different hybrids in both experiments. In Erechim experiment interaction among N levels, *A. brasilense* inoculation and maize hybrids was observed for maize grain yield. Thus, AS 1572 hybrid responded to *A. brasilense* inoculation with 60 and 120 kg/ha of N dose, enhancing nitrogen fertilization efficiency by using urea. In Santa Maria experiment AS 1572 hybrid inoculated with *A. brasilense* increased maize grain yield at 1.14 t/ha or 13.94 %. For Defender hybrid this increasing was not observed. The results showed, in both experiments, associative effect between Ab-V5 and Ab-V6 strains and AS 1572 hybrid.

**Keywords:** Biological nitrogen fixation. Endophytic bacteria. Grain weight. Phytohormones. Plant growth promoting bacteria.

## Introdução

O cultivo do milho ocorre em todas as regiões geográficas, em condições ambientais distintas, do extremo norte ao extremo sul do Brasil, adaptando-se tanto a grandes propriedades rurais, como em pequenas propriedades da agricultura familiar, representando mais uma fonte de renda, tendo em vista a diversificação das atividades agrícolas. Dessa forma, encontram-se na espécie variabilidade genética para adaptação às mais variadas condições ambientais (TEIXEIRA et al., 2002).

O N é um dos elementos minerais requerido em maior quantidade pelas plantas, sua disponibilidade é quase sempre um fator limitante para o crescimento vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2013). Em virtude das excelentes respostas produtivas do milho frente à adubação nitrogenada, o uso do N, principalmente na forma de ureia tem sido justificado, estando difundido em praticamente todos os estabelecimentos rurais. O problema reside na quantidade de N disponibilizado por unidade de tempo, que se torna incompatível com a assimilação pelos vegetais. Além disso, as fontes industriais de N, além de serem produtos importados obtidos com a queima de combustíveis fósseis, quando aplicadas na lavoura estão susceptíveis a elevadas perdas por volatilização e lixiviação (BASSO e CERETTA, 2000), sendo a última representante da contaminação de águas superficiais e subterrâneas.

O N serve como constituinte de muitos componentes da célula vegetal, tais como aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos, enzimas e coenzimas, glicoproteínas, lipoproteínas, pigmentos incluindo a clorofila, produtos secundários e fitohormônios (TAIZ e ZEIGER, 2013). De acordo com Duete et al. (2008), o suprimento insuficiente a partir do estágio com quatro a cinco folhas pode afetar negativamente a produtividade de grãos, reduzindo a diferenciação do número de óvulos nos primórdios da espiga e o número de espigas por planta.

Nesse contexto, o emprego de bactérias diazotróficas, as quais incluem também espécies do gênero *Azospirillum* spp., que realizam a fixação biológica do nitrogênio (FBN) pode se constituir em alternativa para aportar N de maneira adequada e sustentável para gramíneas, a fim de garantir altas produtividades com reduzido custo e menor dependência da importação de insumos (HUNGRIA et al., 2011). O nitrogênio fornecido pela FBN é menos propenso a lixiviação e volatilização já que o nutriente pode ser utilizado *in situ* (REIS e TEIXEIRA, 2005).

Ademais, a indução hormonal através da produção de auxinas, citocininas, giberelinas, dentre outras, substâncias promotoras do crescimento em plantas pode ser determinante para

expressão da maior produtividade de plantas inoculadas. De acordo com Steenhoudt e Vanderleyden (2000) e Bashan et al. (2004) o fitohormônio quantitativamente mais importante é o ácido 3-indolacético (auxina), o qual está envolvido na regulação da taxa de alongamento celular, no tropismo vegetal, na dominância apical, na inibição de gemas laterais, no desenvolvimento de gemas florais, dentre outros (TAIZ e ZEIGER, 2013). Ainda, Silverman et al. (1998) observaram que a produção de cinetina favoreceu a percepção e o transporte iônico através da membrana plasmática de células da raiz de alfafa, promovendo aumento de pelos radiculares, que proporcionou incremento de 300% na área da superfície de contato.

Objetivou-se avaliar o efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* e da adubação com nitrogênio mineral em cobertura sobre as características agronômicas e produtivas de híbridos de milho.

### **Material e métodos**

Foram realizados dois experimentos em distintos locais. O primeiro experimento foi desenvolvido em Erechim, RS, na safra 2012/2013, à altitude de 760 m, 27° 65 de latitude Sul e 52° 30 de longitude Oeste. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Aluminoférrico Húmico pertencente à unidade de mapeamento Erechim (EMBRAPA, 2006; STRECK et al., 2008). O clima da região é classificado como Cfa (subtropical úmido) conforme classificação de Köppen, com precipitação média anual de 1869 mm, evapotranspiração potencial anual de 844,9 mm, temperatura média anual de 18,2 °C, com média mínima de 13,5 °C em julho e média máxima de 22,6 °C em janeiro e umidade relativa do ar de 78,6 % (CEMETRS, 2012).

O segundo experimento foi realizado em Santa Maria, RS, na safra agrícola de 2013/2014, com altitude de 95 m, 29° 43' de latitude Sul e 53° 42' de longitude Oeste. O solo é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico Arênico pertencente à unidade de mapeamento São Pedro (EMBRAPA, 2006; STRECK et al., 2008). O clima da região é Cfa (subtropical úmido), conforme classificação de Köppen, com precipitação média anual de 1769 mm, temperatura média anual de 19,2 °C, com média mínima de 9,3 °C em julho e média máxima de 24,7 °C em janeiro, insolação de 2212 horas anuais e umidade relativa do ar de 82 % (CEMETRS, 2012). Os atributos químicos dos solos e os principais dados meteorológicos durante a condução dos experimentos são apresentados na Figura 1 e Tabela 1, respectivamente.



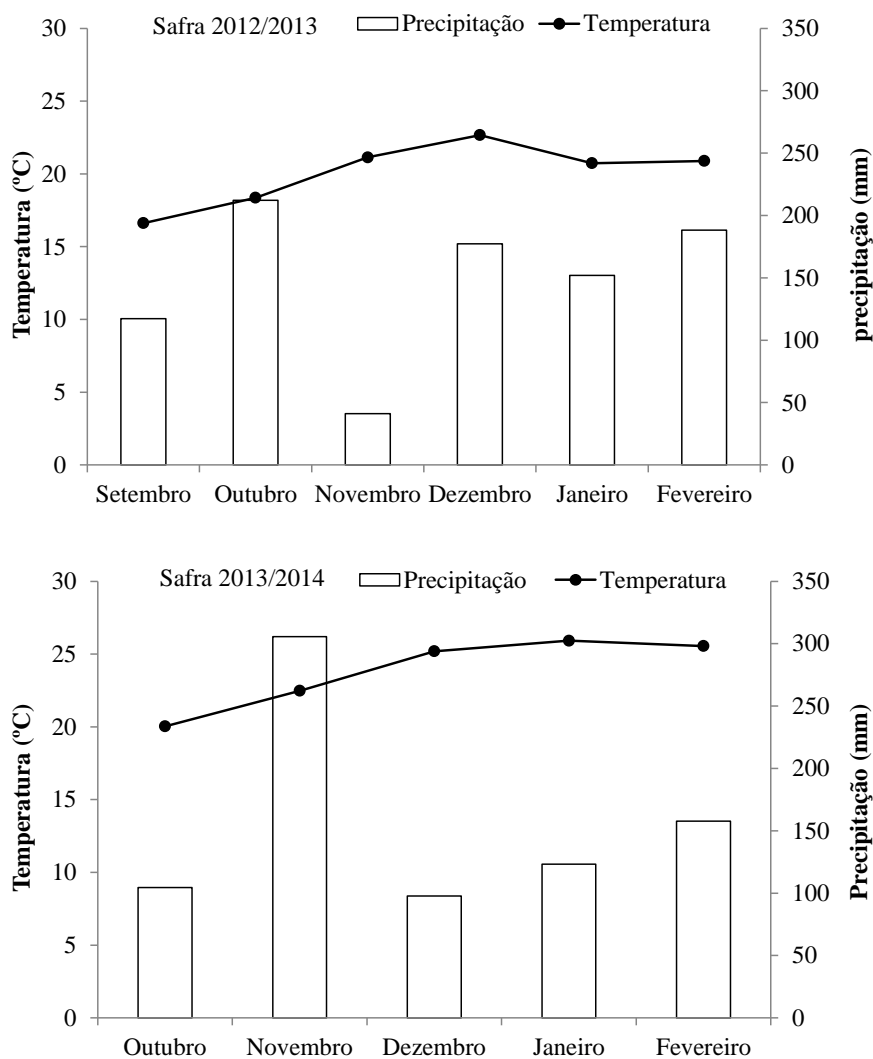


Figura 1. Variáveis climáticas (precipitação pluviométrica acumulada e temperatura média do ar) durante a condução do experimento em Erechim, RS, safra 2012/2013 e Santa Maria, RS, safra 2013/2014.

Durante o inverno, as áreas foram cultivadas com aveia preta (*Avena strigosa* L.) cultivar Comum, para a formação de palhada auxiliar para o sistema de plantio direto. Quando as culturas apresentaram pleno florescimento foi realizada a dessecação da área, com herbicida Glifosato (2,0 litros/ha).

O laudo das análises de solo (0–20 cm) está apresentado na Tabela 1. Coletas de amostras de solo para análise dos atributos químicos e recomendação da adubação do solo foram realizadas (Tabela 1). As coletas foram feitas à profundidade de 0,0 a 20,0 cm. As adubações (Fósforo e Potássio) foram realizadas conforme as indicações da Comissão de Fertilidade do Solo RS/SC (2004) para alto potencial de rendimento de grãos ( $\geq 10$  t/ha). A adubação fosfatada foi realizada com a aplicação da dose equivalente a 105 e 90 kg/ha de  $P_2O_5$  na forma de super fosfato triplo (SFT) em Erechim, RS e Santa Maria, RS,

respectivamente. A adubação potássica foi realizada com a aplicação da dose equivalente a 50 e 60 kg/ha de K<sub>2</sub>O na forma de cloreto de potássio (KCl), em Erechim, RS e Santa Maria, RS, respectivamente.

Tabela 1. Atributos químicos do solo nos locais onde foram realizados os experimentos no perfil de 0-20 cm

Local	Arg.	pH	SMP	CTC	Al	Ca	Mg	P	K	M.O	Bases
	%				-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----			--mg/dm <sup>3</sup> --		-----%	
Erechim	60,0	5,5	6,0	13,6	0,2	6,4	2,6	9,0	287	3,3	70,7
Santa Maria	23,0	5,0	5,5	7,5	0,7	4,5	2,1	17,5	84	2,2	47,8

Arg. = argila; pH = pH em água; SMP = índice SMP; CTC = capacidade de troca de cátions; Al = alumínio; Ca = cálcio; Mg = magnésio; P = fósforo; K = potássio; M.O = matéria orgânica; Bases = saturação por bases.

Nos dois locais, a adubação nitrogenada foi realizada com a aplicação da dose equivalente a 30 kg/ha, aplicada no sulco de semeadura, e o restante da adubação realizada em cobertura nos estádios fenológicos de 4 e 8 folhas desenvolvidas, nas datas de 18/10/2012 e 22/11/2012, divididas igualmente, com utilização de ureia (45% de N), distribuídas nos diferentes níveis de N que compuseram os tratamentos (doses equivalentes a 0, 60, 120, 240 e 480 kg/ha). Nas parcelas sem nitrogênio, não foi realizada a adubação nitrogenada, seja na semeadura ou em cobertura.

A semeadura do experimento em Erechim foi realizada em 16/09/2012 com uso de semeadora de plantio direto regulada com espaçamento de 0,66 m entre fileiras e 0,25 m entre plantas na fileira em parcelas compostas por nove fileiras, com dimensões de 5,0 x 5,28 m. Foi realizada a semeadura de dois genótipos de milho, o AS1572 e o Defender, pertencentes ao ciclo precoce, geneticamente modificados para resistência a lagartas do cartucho, da broca do colmo e da espiga.

Em Santa Maria a semeadura foi realizada no dia 16/10/2013 ajustando-se a semeadora com 0,45 m entre fileiras e 0,37 m entre plantas na fileira, em parcelas com quatro fileiras cada, com dimensões de 6,5 x 1,8 m. Foi realizada a semeadura de dois genótipos de milho, o AS1572 de ciclo precoce e o AG 9030 de ciclo superprecoce, ambos geneticamente modificados para resistência a lagartas do cartucho, da broca do colmo e da espiga. Nos dois locais as bordaduras foram desprezadas das avaliações e a regulagem do implemento agrícola visou a obtenção de população aproximada de 60.000 plantas/ha.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com 20 tratamentos e três repetições cada. Os tratamentos foram distribuídos em arranjo fatorial composto por dois híbridos de milho, diferentes níveis de N (0, 60, 120, 240 e 480 kg/ha), inoculados ou não com *Azospirillum brasilense*. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA),

testando os fatores isoladamente e suas interações, com a utilização do pacote estatístico SAS (2001). As sementes de milho foram inoculadas com a bactéria *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na concentração de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL e  $6,6 \times 10^6$  UFC/semente, com a utilização de 200 mL/ha de inoculante (Azotal – Total Biotecnologia). Primeiramente foram semeadas as parcelas sem inoculação e em seguida as parcelas inoculadas.

A colheita dos grãos foi realizada de forma manual com a utilização de uma das fileiras centrais de cada parcela após o estágio de maturação fisiológica, nas datas de 09/03/2013 e 26/03/2014, em Erechim e Santa Maria, respectivamente. Ao acaso foram escolhidas cinco plantas para determinação da estatura da planta, da inserção da espiga e do comprimento da espiga com auxílio de trena graduada e diâmetro do colmo e diâmetro médio da espiga com a utilização de um paquímetro. Nessas espigas, foi realizada a contagem do número de fileiras de grãos por espiga e o número de grãos por fileira. Por meio da multiplicação desses valores foi possível obter o número de grãos por espiga. A prolificidade das plantas foi avaliada pela razão entre o número de espigas e o número de plantas da fileira de cultivo. Produtividade de grãos por hectare foi obtida após a debulha das espigas em trilhadeira estacionária, posterior pesagem e determinação do teor de umidade. A produtividade foi ajustada para 13% de umidade. A massa de mil grãos foi obtida pela contagem manual, pesagem e posterior ajuste para 13% de umidade.

Para as características avaliadas em função dos híbridos de milho e da inoculação com *Azospirillum brasilense* usou-se a comparação de médias com o emprego do teste F, enquanto que as variáveis avaliadas em função das diferentes doses de N foram estimadas por equações de regressão, em nível de 5% de significância. Os modelos estatísticos foram escolhidos de acordo com a significância do maior grau (terceiro, segundo e primeiro, respectivamente). O teste de correlação de Person foi realizado entre todas as variáveis.

## **Resultados e discussão**

### *Experimento 1: Erechim, RS, safra 2012/2013*

O estande médio de plantas foi de 59065 por hectare, sem diferença significativa para os fatores testados. A produtividade média de grãos corrigida para 13% de umidade foi de 9,77 t/ha. Nessa safra, interação ( $p = 0,0071$ ) entre doses de N, inoculação e híbridos foi observada para a produtividade equivalente de grãos (Figura 1). Os níveis crescentes de adubação nitrogenada incrementaram de forma quadrática a produtividade. O híbrido AS

1572 respondeu a inoculação com *A. brasilense* com utilização de 60 e 120 kg/ha de N, incrementando a eficiência da fertilização nitrogenada com ureia nessas dosagens.

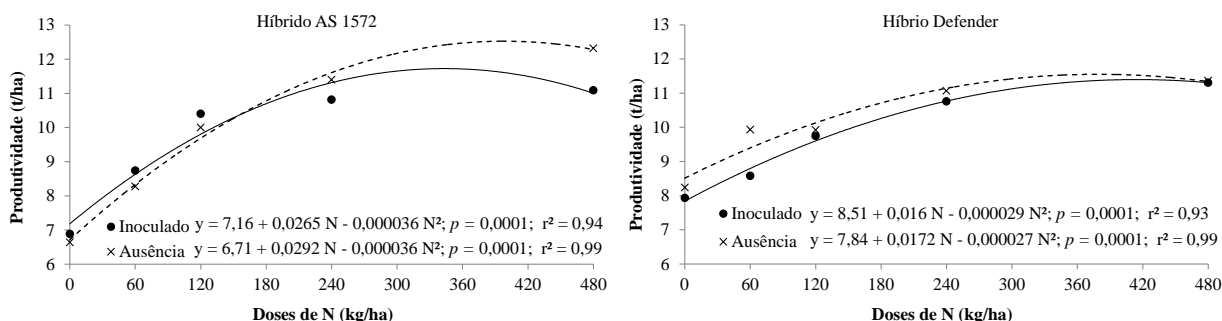


Figura 2. Produtividade estimada de grãos de híbridos de milho, inoculados com *Azospirillum brasilense*, em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.

Por ora, a interação entre doses elevadas de N e inoculação com *Azospirillum brasilense* pode ser negativa. Isso significa que os resultados obtidos frente à inoculação são dependentes das baixas concentrações de N mineral nos solos ou das baixas e médias doses de N aplicadas em cobertura. Resultados dessa natureza podem ser encontrados nos trabalhos realizados por Dobbelaere et al. (2002), Roesch et al. (2006) e Lana et al. (2012). Esse efeito pode ser atribuído à rápida e reversível redução da atividade da nitrogenase, a qual é inibida pela adição de  $\text{NH}_4^+$  no meio, com redução sobre a fixação biológica do nitrogênio, em virtude do alto custo energético da redução do  $\text{N}_2$  (REIS e TEIXEIRA, 2005).

De forma contrária, há a hipótese de que a maior biodisponibilidade de N no solo via fertilização poderá favorecer o desenvolvimento bacteriano e, portanto, aumentar o rendimento das culturas em função da produção de fitohormônios, aumentando a eficiência no uso do elemento. De acordo com Dobbelaere et al. (2002) o efeito mais importante da inoculação com *A. brasilense* é o incremento na eficiência de uso do N pela planta, além dos incrementos na produção vegetal e de grãos. A inoculação com *A. brasilense* Sp245 melhorou significativamente a eficiência com que as plantas de trigo absorveram o N aplicado via adubação nitrogenada. O mecanismo por trás dessa melhoria deve ser atribuído ao aumento geral do sistema radical, permitindo que a planta explore maior volume de solo. Isto resulta em aumento na quantidade de N total presente na planta e maior produção de biomassa.

A partir da análise de correlação de Pearson pode-se verificar que a prolificidade ( $r = 0,76$ ;  $p < 0,0001$ ), o comprimento da espiga ( $r = 0,64$ ;  $p < 0,0001$ ), o diâmetro da espiga ( $r = 0,57$ ;  $p < 0,0001$ ), a massa de mil grãos ( $r = 0,41$ ;  $p = 0,0014$ ) e a altura da espiga ( $r = 0,29$ ;  $p = 0,0230$ ) são as variáveis que se relacionam com a produtividade de grãos de milho. A partir da análise de regressão múltipla verificou-se que o modelo com as cinco variáveis acima

descritas representa 71,81% da variação associada à produtividade de grãos ( $r^2 = 0,7181$ ). A prolificidade ( $r^2 = 0,56$ ) é a variável que exerce maior efeito sobre a variância associada à produtividade, seguida do comprimento da espiga ( $r^2 = 0,41$ ), do diâmetro da espiga ( $r^2 = 0,38$ ), da massa de mil grãos ( $r^2 = 0,17$ ) e da altura da espiga ( $r^2 = 0,09$ ).

A produtividade equivalente de grãos não foi afetada pelos diferentes híbridos, no entanto, o híbrido Defender apresentou massa de mil grãos superior, enquanto que o híbrido AS 1572 possuiu maior prolificidade (Tabela 2). Essas características agrônômicas, apesar de distintas entre os híbridos, complementam-se definindo a produtividade e permitiram similar produção para ambos nessa safra.

Tabela 2. Características agrônômicas dos híbridos de milho na safra 2012/2013

Variáveis	AS 1572	Defender	Pr > F	CV (%)
Massa de mil grãos (g)	314,43	377,90	0,0001	7,53
Prolificidade	1,21	1,13	0,0053	8,14

CV (%) = coeficiente de variação.

A inoculação com *A. brasilense* apresentou interação com híbridos de milho para as variáveis, grãos por espiga, grãos por fileira, comprimento da espiga e estatura da planta (Tabela 3). A inoculação com *A. brasilense* promoveu aumento na quantidade de grãos por espiga, grãos por fileira e comprimento da espiga junto ao híbrido AS 1572. Esse fenômeno não ocorreu no híbrido Defender, pelo contrário. Essas variáveis como descrito anteriormente, apresentaram, nessa safra, menor importância como agentes causais da produtividade de grãos, o que limitou a produtividade para o híbrido AS 1572 inoculado com *Azospirillum brasilense*.

Tabela 3. Interação entre inoculação com *Azospirillum brasilense* e híbridos de milho sobre os componentes do rendimento.

Variáveis	AS 1572		Defender		Pr > F	CV***
	<i>Azospirillum</i>	Controle	<i>Azospirillum</i>	Controle		
Grãos por espiga	568,80 <sup>a</sup>	553,00 <sup>b</sup>	457,23 <sup>d</sup>	482,79 <sup>c</sup>	0,0044	7,71
Grãos por fileira	36,16 <sup>a</sup>	35,14 <sup>b</sup>	29,56 <sup>d</sup>	30,41 <sup>c</sup>	0,0151	6,21
Comprimento*	16,61 <sup>a</sup>	16,04 <sup>b</sup>	16,14 <sup>ab</sup>	16,50 <sup>ab</sup>	0,0043	4,18
Estatura**	178,25 <sup>d</sup>	189,86 <sup>c</sup>	199,42 <sup>b</sup>	200,83 <sup>a</sup>	0,0009	4,32

Médias com letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey. \*Comprimento da espiga (cm); \*\* Estatura da planta (cm); \*\*\* Coeficiente de variação (%).

O aumento da fertilidade das plantas frente à inoculação com *A. brasilense* tem sido descrito na literatura. Em estudo em casa de vegetação em Israel, Bashan (1986) já havia relatado incremento na produtividade e na fertilidade das espiguetas de trigo inoculado com

*Azospirillum brasilense* Cd. Segundo Kappes et al. (2013) no Estado do Mato Grosso do Sul maior produtividade de grãos, comprimento da espiga e prolificidade foram observadas para plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, as mesmas estirpes empregadas no presente estudo. De acordo com Dobbelaere et al. (2002) ocorre, de maneira geral, incrementos na produtividade, na prolificidade, no comprimento da espiga e no número de grãos por espiga quando se pratica a inoculação com *A. brasilense* em trigo e milho.

A estatura da planta foi menor para ambos os híbridos inoculados com *A. brasilense*, constituindo-se em efeito contrário ao previsto ou esperado (Tabela 3). Isso porque a síntese de giberelinas possivelmente promovida pela inoculação de *A. brasilense* poderia afetar o tamanho da parte aérea, bem como o estabelecimento e o crescimento dos frutos, visto que estimulam a divisão celular (TAIZ e ZEIGER, 2013). No entanto, o emprego de giberelinas pode não ter efeito sobre o alongamento do caule em plantas que já são “altas”, pois a giberelina bioativa pode não ser limitante em algumas dessas plantas. Contudo, quando aplicadas em espécies anãs modificadas geneticamente, promovem o crescimento dos entrenós e alongamento do caule, de modo que se assemelham às variedades mais altas da mesma espécie (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Interação entre adubação nitrogenada e híbridos de milho foi descrita para as variáveis prolificidade, comprimento da espiga, grãos por fileira, grãos por espiga e estatura da planta (Figura 2). As crescentes doses de N incrementaram de forma quadrática a prolificidade e o comprimento de espigas no híbrido AS 1572, enquanto que incrementos de mesma ordem foram observados para a quantidade de grãos por fileira e quantidade de grãos por espiga no híbrido Defender. Em ambos os híbridos a estatura da planta foi incrementada em função das doses de N, entretanto, essa característica foi mais responsiva no híbrido Defender (Figura 2).

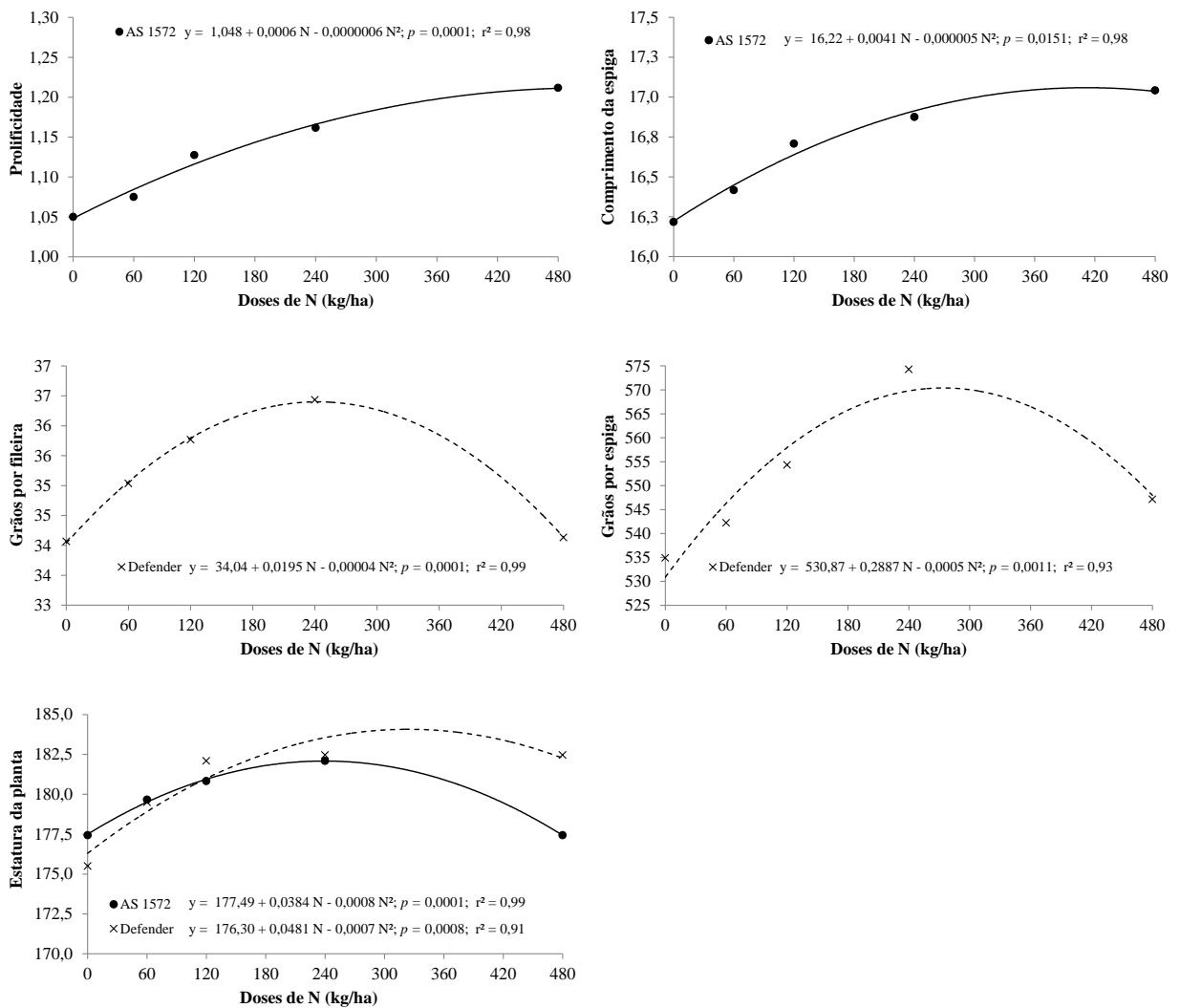


Figura 3. Proliferidade (espigas/planta), comprimento da espiga (cm), quantidade de grãos por fileira, quantidade de grãos por espiga e estatura (cm) de híbridos de milho em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.

### Experimento 2: Santa Maria, RS, safra 2013/2014

O estande médio de plantas foi de 61196 por hectare. A produção média de grãos corrigida para 13% de umidade foi de 7,50 t/ha. A inoculação com *A. brasilense* proporcionou incremento médio de 0,57 t/ha ou 7,20% sobre a produtividade equivalente de grãos ajustada a 13% de umidade. Essa diferença se deve à interação com os híbridos (Tabela 4). O híbrido AS 1572 respondeu positivamente à inoculação com *A. brasilense*. O incremento proporcionado pela inoculação para o híbrido AS 1572 foi de 1,14 t/ha ou 13,94% superior em relação ao híbrido sem inoculação, mostrando evidente afinidade entre as estirpes testadas e o híbrido nessa safra.

Tabela 4. Interação entre a inoculação com *Azospirillum brasilense* e os híbridos de milho sobre a produtividade equivalente de grãos corrigida para 13% de umidade

Produtividade (t/ha)	Híbridos		Média
	AS 1572	AG 9030	
<i>Azospirillum brasilense</i>	8,18 <sup>a</sup>	7,64 <sup>ab</sup>	7,91 <sup>A</sup>
Controle	7,04 <sup>b</sup>	7,64 <sup>ab</sup>	7,34 <sup>B</sup>
Média	7,61	7,64	

Médias seguidas de letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Nesse contexto, Ferreira et al. (2010) também observaram que a reposta à inoculação depende da relação específica entre a cultivar e a estirpe, sendo que a variedade de trigo BRS 296 respondeu à inoculação com bactérias diazotróficas, dentre elas, *Azospirillum brasilense* Sp245 em dois anos de ensaio em casa de vegetação, enquanto que a cultivar BRS 276 não foi responsiva à inoculação. Dobbelaere et al. (2001) e Dobbelaere et al. (2002) verificaram tanto em condições de campo, como em casa de vegetação, a existência de afinidade de *A. brasilense* Sp245 para trigo e de *A. irakense* KBC1 para milho, auxiliando-nos na ilustração do referido cenário.

A análise de correlação de Pearson mostrou que as variáveis que afetaram o rendimento de grãos de maneira significativa e decrescente na safra 2013/2014 foram a quantidade de grãos por espiga ( $r = 0,33$ ;  $p = 0,0106$ ) e a quantidade de grãos por fileira ( $r = 0,29$ ;  $p = 0,0203$ ). A partir do estudo da regressão múltipla observou-se que as duas variáveis juntas determinaram apenas 10,85% da variação presente na produtividade de grãos.

Interação entre inoculação com *A. brasilense* e doses de N foi descrita pelo modelo estatístico para as variáveis, quantidade de grãos por fileira e quantidade de grãos por espiga (Figura 3). As doses crescentes de N incrementaram de forma quadrática essas variáveis somente em plantas inoculadas com *A. brasilense*, as quais apresentaram maior quantidade de grãos por fileira e grãos por espiga quando cotejadas as plantas sem inoculação.

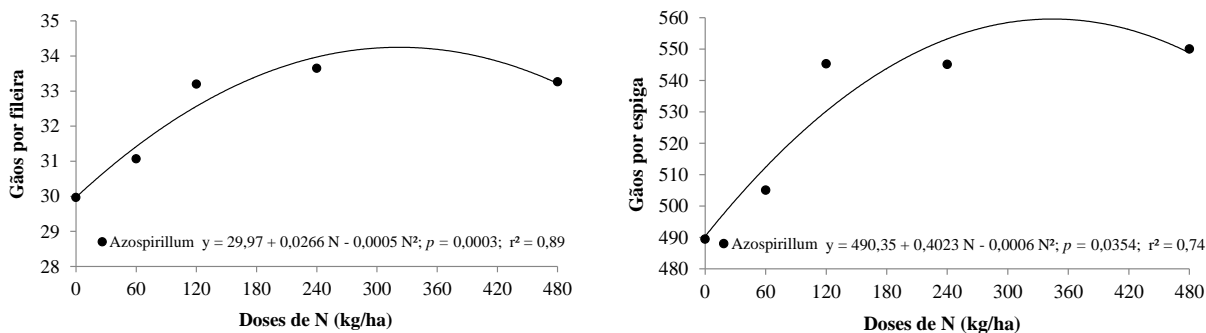


Figura 4. Quantidade de grãos por fileira e grãos por espiga, de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense* em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.



De modo geral, a adubação nitrogenada afetou a produtividade e os componentes de rendimento do milho. Interação entre doses de N em cobertura e híbridos de milho foi observada para a produtividade estimada de grãos e número de grãos por espiga (Figura 4). O modelo estatístico foi significativo para o híbrido AS 1572 que apresentou comportamento quadrático em função das doses de N em cobertura.

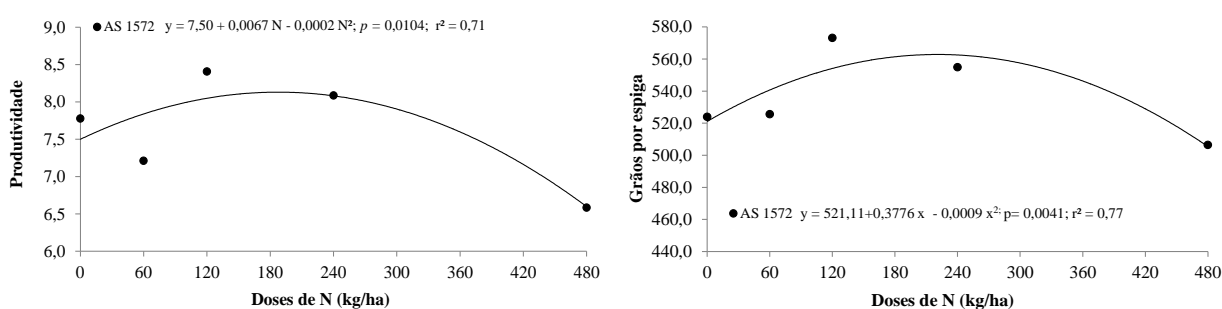


Figura 5. Produtividade equivalente de grãos e grãos por espiga de híbridos de milho em função de doses crescentes de nitrogênio em cobertura.

O híbrido AS 1572 possui endosperma do grão com textura mais farinácea (dentada), enquanto o AG 9030 possui endosperma vítreo (duro). Isso resultou em maior massa de mil grãos e prolificidade para o híbrido AG 9030 (Tabela 3). O AS 1572 novamente apresentou valores superiores para as variáveis, grãos por espiga e grãos por fileira, além de maior altura de inserção da espiga, estatura da planta e diâmetro do colmo.

Tabela 5. Características agronômicas dos híbridos de milho na safra 2013/2014

Variáveis	AS 1572	AG 9030	Pr > F	CV (%)
Massa de mil grãos (g)	292,28	313,93	0,0001	4,08
Grãos por espiga	542,75	479,26	0,0001	8,14
Grãos por fileira	32,38	30,16	0,0003	7,02
Prolificidade	0,91	1,00	0,0006	9,03
Circunferência da espiga (cm)	48,04	46,71	0,0001	2,40
Estatura da planta (cm)	229,23	195,37	0,0001	3,61
Altura de inserção da espiga (cm)	131,53	96,53	0,0001	6,74
Diâmetro do colmo (cm)	2,11	1,91	0,0001	8,19

CV (%) = coeficiente de variação.

Acréscimo na produtividade de grãos atribuída à inoculação com *A. brasilense* é relatado por diversos autores em diferentes culturas (KAPPES et al., 2013; DARTORA et al., 2013; LANA et al., 2012; HUNGRIA et al., 2010; DOBBELAERE et al., 2002; BASHAN,

1986). A variação observada entre as safras ou locais no presente estudo é possível de ocorrer, sendo frequentemente constatada na literatura.

Inúmeras interações edafoclimáticas podem ser observadas e até certo ponto estudadas, as quais afetaram de maneira significativa a sobrevivência das bactérias na rizosfera das plantas e a resposta à inoculação. Abril et al. (2006) estudando a inoculação com *A. brasilense* estirpe Az 39 INTA em nove cultivares de trigo na safra de 2003 na Argentina, observaram diferenças significativas na taxa de colonização da bactéria com elevado coeficiente de variação, o que indica não existir um padrão definido de colonização rizosférica pelas bactérias introduzidas a campo. Os autores comentaram que as bactérias são fortemente afetadas pelas condições edafoclimáticas e pela competição com cepas/microbiota nativas o que justifica os resultados contraditórios e as variações encontradas em condição de campo.

Atribui-se que as diferenças na interação entre doses de N e inoculação com *A. brasilense* nos distintos locais ocorreram em função de aspectos relacionados à textura dos solos, teor de matéria orgânica e regime hídrico após a fertilização nitrogenada, dentre outros agentes edafoclimáticos não determinados. Nesse caso, não se pode generalizar e admitir um padrão nas respostas quando se avalia a interação entre doses de N e a inoculação com *A. brasilense*.

## Conclusões

A inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 adequa-se aos pacotes tecnológicos existentes e pode ser empregada como estratégia para promover alterações nas características agronômicas da cultura e incrementos sobre a produtividade. Entretanto, as vantagens da inoculação com *Azospirillum brasilense* estão condicionadas ao híbrido, evidenciando em ambos os experimentos, associação entre as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 e o híbrido AS 1572.

No experimento de Erechim, RS, a inoculação com *Azospirillum brasilense* promove maior produtividade de grãos junto ao híbrido AS 1572 em doses de 60 e 120 kg/ha de nitrogênio em cobertura, incrementando a eficiência da fertilização nitrogenada com ureia.

As crescentes doses de nitrogênio incrementam até certo limiar a produtividade de grãos e as principais variáveis agronômicas.

## Referências

- ABRIL, A.; BIASUTTI, C.; MAICH, R.; DUBBINI, L.; NOE, L. Inoculación con *Azospirillum* spp. en la Región Semiárida-Central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. **Ciência del Suelo**. v. 24, n. 1, p. 11-19, 2006.
- BASHAN, Y. Enhancement of Wheat Root Colonization and Plant Development by *Azospirillum brasilense* Cd. Following Temporary Depression of Rhizosphere Microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1067-1071, 1986.
- BASHAN, Y., HOLGUIN, G., BASHAN, L.E. *Azospirillum* plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997 - 2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521 -577, 2004.
- BASSO, C.J.; CERETTA, C.A. Manejo do nitrogênio no milho em sucessão a plantas de cobertura de solo, sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 905-915, 2000.
- CEMETRS – Centro Estadual de Meteorologia. **Atlas climático do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 198 p. Acessado em 23/05/2012. <http://www.r3pb.com.br/AtlasCemetRS/#/9/zoomed>
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10 ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul: UFRGS, 2004. 400p.
- DARTORA, J. GUIMARÃES, V.F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 17, n. 10, p. 1023–1029, 2013.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGGHS, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. Irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 284–297, 2002.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal Plant and Physiology**, v. 28, p. 871–879, 2001.
- DUETE, Robson R. C.; MURAOKA, Takashi; SILVA, Edson C.; TRIVELIN, Paulo C. O. ; AMBROSANO, Edmilson José. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (15N) pelo milho em Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.32, n.1, p.161-171, 2008.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, 1999. 412p.

FERREIRA, J.S. et al. Avaliação de duas cultivares de trigo inoculadas com bactérias diazotróficas em condições de casa de vegetação. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. 2010. 20p.

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

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p.

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**, v. 34, n. 2, p. 527-538, 2013.

LANA, 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.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. **Fixação Biológica de Nitrogênio–Estado da arte**. p. 151-180. 2005. *In*: Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 368 p.

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

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 24, p. 487-506, 2000.

SILVERMAN, F.P.; ASSIAMAH, A.A.; BUSCH, D.S. Membrane transport and cytokinin action in root hairs at *Medicago sativa* L. **Planta**, v.205, p.23-31, 1998.

STRECK, V. E.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P. GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. – Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

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

## CAPITULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas produtivos no Brasil, em virtude do modelo de desenvolvimento, de modo geral, carecem de tecnologias de baixo custo, de reduzido impacto ambiental e que sejam efetivamente sustentáveis no amplo contexto. Percebe-se o emprego intensivo de agroquímicos para elevação da produtividade, em detrimento da preservação ambiental, da qualidade dos produtos agrícolas, da diversidade de espécies e variedades, da renda das famílias no campo, dentre tantos outros fatores.

Nesse contexto, a adoção de tecnologias e práticas que visem reduzir o emprego maciço de agrotóxicos, fertilizantes industrializados, dentre outros, pode contribuir para manter ou reduzir os custos de produção e a contaminação de solos, águas e produtos agrícolas, ampliar a produtividade e elevar o nível de sustentabilidade dos sistemas. O emprego de inoculantes contendo bactérias do gênero *Azospirillum* spp. apresenta custo reduzido, tecnologia brasileira e pode ser encarado como alternativa ao uso dos agroquímicos, visando maior sustentabilidade, além de apresentar facilidade de uso e adoção por agricultores.

A inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 promoveu incrementos sobre a produtividade da planta para silagem e de grãos em determinadas situações. Foi possível averiguar que a interação entre *A. brasilense* e fertilização nitrogenada é um fenômeno de extrema relevância e precisa ser mais bem estudado e compreendido. Os resultados sugerem maior eficiência da fertilização nitrogenada em plantas inoculadas com *A. brasilense*.

As respostas à inoculação nem sempre foram positivas em virtude da enorme complexidade que envolve a sobrevivência e o crescimento desse grupo de bactérias em condições edafoclimáticas instáveis ou não controladas. Dessa forma, a interação entre inoculação com *A. brasilense* e anos agrícolas foi evidenciada. Isso representa variabilidade em termos de respostas de uma safra para outra. Além disso, a inoculação com *A. brasilense* mostrou-se dependente do híbrido de milho, beneficiando um ou outro híbrido em função da safra e dos diferentes experimentos. Possivelmente a associação entre bactérias e plantas esteja atrelada aos tipos de exsudatos radiculares liberados por plantas, que por sua vez se alteram em função das condições edafoclimáticas específicas de cada safra, dentre outras, ampliando a complexidade descrita acima.

Conforme esperado, a fertilização nitrogenada na forma de ureia aumenta a produtividade das plantas para silagem e grãos até certo limiar e altera algumas variáveis nutricionais da silagem, especialmente os teores proteicos. Esses resultados reafirmam que o emprego de ureia nos sistemas produtivos exerce efeitos positivos sobre a produtividade das culturas e que por essa ótica justifica-se o emprego como fertilizante na maioria dos estabelecimentos rurais.

Por fim, pode-se considerar satisfatória a inclusão de inoculantes contendo *A. brasilense*, bem como sua associação com a ureia, nos sistemas convencionais de produção de milho. Acredita-se que a identificação, o isolamento e a seleção de estirpes de *A. brasilense* adaptadas às condições edafoclimáticas regionais pode ser terreno fértil às pesquisas no tocante a abreviar as interações observadas no presente estudo.