

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
COLÉGIO POLITÉCNICO DA UFSM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA DE  
PRECISÃO

Marlo Markus Lopes

**PULVERIZAÇÃO DIRIGIDA NO SULCO E INOCULAÇÃO NA  
SEMENTE DE MILHO COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE***

Santa Maria, RS  
2016

**Marlo Markus Lopes**

**PULVERIZAÇÃO DIRIGIDA NO SULCO E INOCULAÇÃO NA SEMENTE DE  
MILHO COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura de Precisão da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agricultura de Precisão**.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Zucuni Pes

Santa Maria, RS  
2016

**Marlo Markus Lopes**

**PULVERIZAÇÃO DIRIGIDA NO SULCO E INOCULAÇÃO NA SEMENTE DE  
MILHO COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura de Precisão da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agricultura de Precisão**.

**Aprovado em 30 de dezembro de 2016:**



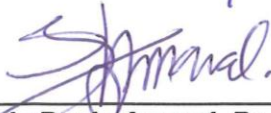
---

**Luciano Zucuni Pes, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



---

**Benjamin Dias Osório Filho, Dr. (UERGS)**



---

**Lúcio de Paula Amaral, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

## **DEDICATÓRIA**

A todos os agricultores que trabalham de sol a sol na luta constante de produzir alimentos.

Aos meus avós, pais e todos os familiares, que tiveram suas vidas atreladas e sempre enraizadas no solo gaúcho, bem como às demais pessoas a quem essa pesquisa possa interessar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste estudo e, de uma maneira especial, agradeço:

- Meus pais: Paulo Vianna Lopes e Maristela Markus Lopes, por me apoiarem incondicionalmente, por toda a educação, compreensão e carinho.

- Meus irmãos: Paulo Guilherme Markus Lopes e Carla Markus Lopes e cônjuges, por também me ajudarem nessa jornada da vida.

- A minha namorada Biane de Castro, por ser essa pessoa magnífica que és, que sem ela não seria possível ter realizado este trabalho.

- Ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura de Precisão, desde a coordenação, secretaria, docentes e discentes, onde encontrei um núcleo de pessoas que além de serem excelentes profissionais, se tornaram grandes amigos (levarei para o resto da vida). Mas em especial meu agradecimento ao orientador Luciano Zucuni Pes e o professor Lucio de Paula Amaral.

- Ao agricultor Claudir Klein, juntamente com seus parentes, que se dispôs a executar o experimento. Também ao Márcio e ao Eduardo Fattore.

- Ao amigo Benjamin Dias Osório.

## EPÍGRAFE

O segredo da vida é o solo, porque do solo dependem as plantas, a água, o clima e nossa vida. Tudo está interligado. Não existe ser humano sadio se o solo não for sadio.

Ana Primavesi  
**O manejo ecológico do solo:**  
A agricultura em regiões tropicais.  
9. ed. São Paulo: Nobel, 2002. 549p.

## RESUMO

### PULVERIZAÇÃO DIRIGIDA NO SULCO E INOCULAÇÃO NA SEMENTE DE MILHO COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

Autor: Marlo Markus Lopes  
Orientador: Luciano Zucuni Pes

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do emprego de diferentes métodos de inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento vegetativo e na produção de grãos da cultura do milho em diferentes zonas de relevo. O experimento foi conduzido em Cruzeiro do Sul (RS), com a semeadura mecanizada do híbrido de milho Velox TL<sup>®</sup>, de ciclo superprecoce, na safra 2015/2016, mediante a inoculação direta das sementes e aplicação de nitrogênio (T1); inoculação dirigida no sulco e aplicação de nitrogênio (T2) e a testemunha, com a aplicação de nitrogênio e sem inoculação das sementes (T3). O delineamento experimental foi um fatorial 3x3, considerando três métodos de inoculação (inoculação de sementes, aplicação dirigida no sulco e sem inoculação) e três distintas zonas de relevo (alta, média e baixa altitude), com três repetições. Foram determinadas as variáveis altura de planta, diâmetro do colmo, matéria seca total e número de grãos por planta. Os dados foram submetidos ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Não houve interação entre os métodos de inoculação e as zonas de relevo. A inoculação da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*, tanto no tratamento de aplicação dirigida no sulco, como na inoculação direta das sementes de milho, proporcionou apenas maior altura média final das plantas, quando comparadas ao manejo tradicional, sem a utilização de inoculação das sementes. Dessa forma, o *Azospirillum brasilense* proporcionou maior altura do milho híbrido Velox TL<sup>®</sup>, sem, contudo, influenciar no diâmetro do colmo, matéria seca total e número de grãos por planta. A variável diâmetro do colmo foi influenciada pela posição no relevo, que apresentou maior tamanho na zona de média altitude, em comparação com a de baixa altitude, demonstrando a importância da agricultura de precisão, ao não considerar as áreas como sendo homogêneas.

Palavras-chave: bactérias promotoras de crescimento de plantas; adubação nitrogenada; *Zea mays*.

## ABSTRACT

### DIRECTED SPRAYING IN FURROW AND CORN SEED INOCULATION WITH *AZOSPIRILLUM BRAZILENSE*

Author: Marlo Markus Lopes

Advisor: Luciano Zucuni Pes

The present work aimed to evaluate the influence of different methods of plant growth promoting bacterium (PGPB) *Azospirillum brasilense* inoculated at vegetative development and grain yield of corn in different relief zones. The research was carried in Cruzeiro do Sul (RS) with mechanized sowing of Velox TL<sup>®</sup> very early hybrid corn, in the 2015/2016 harvest. The treatments were: seed inoculation and nitrogen fertilization (T1); directed spraying in furrow and nitrogen fertilization (T2); and control, only with nitrogen fertilization (T3). The experimental design was a factorial 3x3, considering three inoculation methods (seed inoculation, directed spraying in furrow and no inoculation) and three relief zones (high, medium and low levels), with three replications. The following variables were determinate: plant height, stem diameter, total dry matter and number of grains per plant. The data were submitted to the Tukey test, at 5% probability of error level. There was no interaction between inoculation methods and relief zones. Both directed spraying in furrow and corn seed inoculation with diazotrophic bacterium *Azospirillum brasilense* provided only a higher final average height of the plants, when compared to the traditional management, without the use of seed inoculation. Thus, *Azospirillum brasilense* promotes greater height development of Velox TL<sup>®</sup> hybrid corn, without, however, influence on stem diameter, total dry matter and number of grains per plant. Stem diameter variable was influenced by relief zones, which presents greater development in the average zone in comparison to the low zone, demonstrating the importance of precision agriculture that not consider areas as being homogeneous.

Key words: plant growth promoting bacterium; nitrogen fertilization; *Zea mays*.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rendimento médio da cultura do milho por município, no estado do Rio Grande do Sul, expresso em $\text{kg ha}^{-1}$ .....	16
Figura 2 - Épocas recomendadas para o início da semeadura do milho em diferentes regiões do RS.....	20
Figura 3 - Vista parcial da área experimental.....	35
Figura 4 - Precipitação pluviométrica durante o período experimental.....	36
Figura 5 - Temperatura média do ar durante o período experimental.....	36
Figura 6 - Vista frontal da semeadora adaptada com pulverizador para inoculação dirigida no sulco. ....	37
Figura 7 - Vista lateral da semeadora adaptada com pulverizador para inoculação dirigida no sulco. ....	38
Figura 8 - Vista parcial da área experimental.....	40
Figura 9 - Área do experimento, com os tratamentos: normal (inoculação direta na semente), sulco (inoculação dirigida no sulco) e testemunha (sem inoculação). ....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação no número de graus-dia das cultivares de milho disponíveis no mercado brasileiro, na safra 2012/13, dentro de cada grupo de maturação (ciclo), conforme informações das empresas e respectivos valores de referência. ....	19
Tabela 2 - Pontos de amostragem, com as respectivas coordenadas geográficas. ....	39
Tabela 3 - ANOVA da altura média de plantas (cm). ....	43
Tabela 4 - Altura média de planta (cm) nas diferentes formas de inoculação e zonas de relevo. ....	44
Tabela 5 - Resultado da comparação de médias dos postos para a quantidade de grãos por planta, quilogramas por hectare ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) e sacos por hectare ( $\text{sacos ha}^{-1}$ ) com a inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> na semente, dirigida no sulco e sem inoculação (testemunha). ....	45
Tabela 6 - ANOVA do diâmetro médio do colmo de plantas (cm). ....	46
Tabela 7 - Diâmetro médio do colmo (cm) entre as diferentes formas de inoculação e zonas de relevo. ....	47
Tabela 8 - ANOVA da matéria seca da parte aérea das plantas (g). ....	48
Tabela 9 - ANOVA da matéria seca das raízes das plantas (g). ....	49
Tabela 10 - ANOVA da matéria seca total das plantas (g). ....	49
Tabela 11 - Produção de matéria seca das plantas nos diferentes tratamentos. ....	49

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1 HIPÓTESE .....	13
1.2 OBJETIVOS .....	13
1.2.1 Objetivo geral.....	13
1.2.2 Objetivos específicos .....	13
1.3 JUSTIFICATIVA .....	13
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO.....	14
2.2 ASPECTOS AGRONÔMICOS DA CULTURA DO MILHO.....	16
2.3 INOCULAÇÃO COM <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> .....	23
2.4 AGRICULTURA DE PRECISÃO E A INOCULAÇÃO DIRIGIDA NO SULCO ....	31
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1 LOCALIZAÇÃO .....	35
3.2 IMPLANTAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	37
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
4.1 ALTURA DE PLANTA.....	43
4.2 NÚMERO DE GRÃOS POR PLANTA.....	45
4.3 DIÂMETRO DO COLMO .....	46
4.4 MATÉRIA SECA DA PLANTA .....	48
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

# 1. INTRODUÇÃO

O milho, *Zea mays* L., é uma espécie diploide e alógama, sendo um dos vegetais superiores mais estudados. Devido ao alto custo dos fertilizantes químicos e a uma conscientização em prol de uma agricultura sustentável e menos poluente, existe um interesse crescente pelo uso de inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), as quais também podem incrementar a produtividade.

Para que isso ocorra em larga escala, na agricultura comercial, o mercado deve disponibilizar máquinas que efetuem este tipo de operação, pois a mão de obra é cada vez mais escassa e onerosa. O processo de inoculação mecanizada é uma ferramenta que otimiza o processo de inoculação (MIGUEL et al., 2016).

Para o sucesso da inoculação destas bactérias é importante a escolha de genótipos adaptados às condições locais e propensos à colonização. Além da concentração de microrganismos no inoculante, a forma de inoculação também pode interferir na resposta destes tipos de bactérias. As BPCP necessitam de um acondicionamento ideal para a sobrevivência das colônias, garantindo um número de microrganismos viáveis para que ocorra de forma satisfatória a colonização nos tecidos das plantas (HUNGRIA et al., 2015).

As BPCP *Azospirillum brasilense* são endofíticas facultativas (HUERGO et al., 2008), denominadas diazotróficas, por aportarem nitrogênio às plantas via fixação biológica e aumentarem a eficiência de utilização dos fertilizantes. Associam-se em diferentes graus de especificidade às espécies da família Poaceae, como ocorre com o milho e o sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), representando uma estratégia viável economicamente, além dos benefícios ambientais associados à redução do uso de fertilizantes (HUNGRIA et al., 2015).

Nesse sentido, os equipamentos de inoculação dirigida são ferramentas mecanizadas voltadas para esse processo, que proporcionam um acondicionamento favorável à manutenção da viabilidade dos insumos biológicos e a dinamização dos processos de aplicação destes insumos.

## 1.1 HIPÓTESE

A inoculação dirigida no sulco de *Azospirillum brasilense*, em diferentes zonas de relevo, influencia positivamente no desempenho agrônômico da cultura do milho.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar formas de inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho, em diferentes zonas de relevo.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Verificar a influência de diferentes formas de inoculação de *Azospirillum brasilense* em variáveis fenotípicas da cultura do milho;
- Verificar a influência das zonas de relevo nas variáveis fenotípicas da cultura do milho submetidas a diferentes formas de inoculação de *Azospirillum brasilense*.

## 1.3 JUSTIFICATIVA

A aplicação de insumos biológicos na agricultura é uma ferramenta que acarreta em diversos benefícios, tanto no que diz respeito aos ganhos econômicos, como aos ambientais.

As lavouras de milho necessitam de elevadas doses de fertilizantes químicos para alcançar altas produtividades. A eficiência da utilização destes fertilizantes está diretamente relacionada à precisão da aplicação dos mesmos, pois irá influenciar no custo econômico e ambiental dessa lavoura. Para tanto, a aplicação de *Azospirillum brasilense* dirigida no sulco de semeadura surge como uma ferramenta para tornar o processo de inoculação mais ágil, se comparado à inoculação tradicional direta na semente. Portanto, além de ser uma técnica de custo baixo, pois para a aquisição deste insumo (inoculante) o agricultor não precisa realizar grande investimento, traz inúmeros benefícios que corroboram para sua utilização em larga escala.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO

O desenvolvimento da produção e do mercado do milho deve ser analisado sob a ótica das cadeias produtivas ou dos sistemas agroindustriais. O milho é insumo para a produção de diversos produtos, onde na cadeia produtiva de suínos e aves, são consumidos aproximadamente 70% do milho produzido no mundo e entre 70 e 80% do milho produzido no Brasil (GARCIA et al., 2006).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, com a participação média de 6% na oferta mundial deste produto, superado pelos Estados Unidos (cerca de 40%), maior produtor mundial, e pela China, cuja produção equivale a aproximadamente 20% da oferta mundial de milho. No contexto do MERCOSUL, o Brasil e a Argentina correspondem por mais de 90% da oferta total deste produto (SOUZA e BRAGA, 2004).

A cultura do milho para o Rio Grande do Sul (RS) tem significativa importância socioeconômica, ocupando aproximadamente 20% do total das áreas semeadas com cultivos de primavera-verão. O seu cultivo é típico da pequena propriedade rural, visto que 90,5% dos estabelecimentos que cultivaram milho no ano de 2006 possuíam menos de 50 hectares. Esses estabelecimentos foram responsáveis por 67,9% da área total cultivada e por 62,7% da produção (IBGE, 2006).

É tamanha a expressividade da cultura do milho para a agricultura familiar no RS, que desde 1988 existe uma política estadual, executada através do Programa Troca Troca de Sementes, subsidiando a aquisição de sementes pelos agricultores familiares. Na safra 2015/2016, os financiamentos operacionalizados por esse programa contribuíram para cerca de 1/3 da área plantada no estado, perfazendo 238.485 ha, de uma área total de 751.900 ha cultivada com milho no RS (SDR, 2016).

A área total colhida com milho no RS em 2001 foi de 1.672.923 ha, com produção de 6.134.207 t e rendimento médio de 3,66 t ha<sup>-1</sup>. Na safra de 2014, a área colhida foi 924.363 ha, com produção de 5.389.520 t e rendimento médio de 5,83 t ha<sup>-1</sup>. Fazendo uma comparação com a cultura da soja, na mesma safra foram colhidas 13.041.226 t em 4.986.542 ha (IBGE, 2016). Esses dados comprovam que

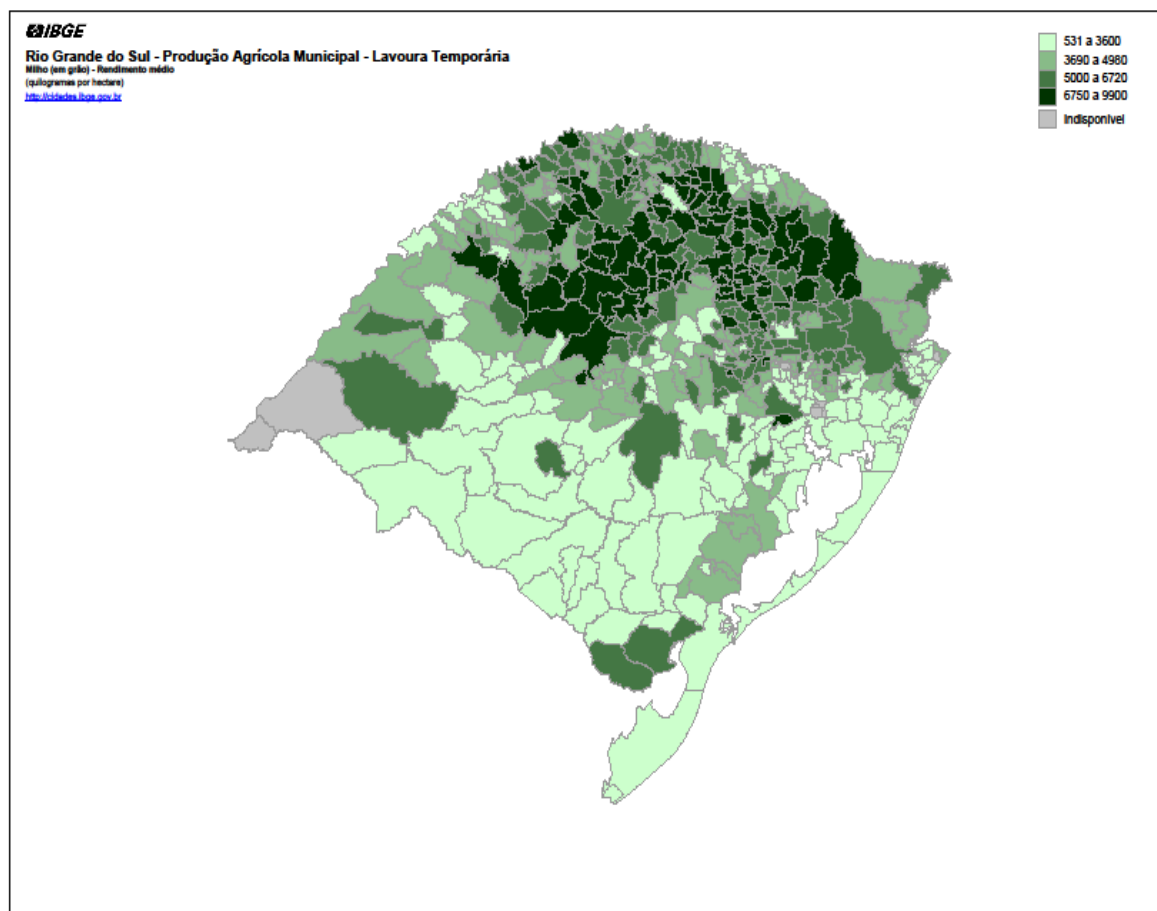
cada vez mais o cultivo da soja está avançando frente a outras espécies, como a cultura do milho, reduzindo, conseqüentemente, a oferta do grão de milho no estado e ocasionando uma diminuição na rotação de culturas nos cultivos de verão.

Por outro lado, houve um grande incremento de produtividade na lavoura de milho nos últimos anos, um ganho por área muito importante para a pequena propriedade rural, a qual objetiva mais a produção de silagem para a nutrição animal do gado leiteiro. Informações do Censo Agropecuário apontam que em 2006, 35,6% da produção desta cultura não foi comercializada (IBGE, 2006), sendo provavelmente destinada à nutrição animal. Esse percentual representa mais de 1,8 milhões de toneladas transformados dentro da propriedade em produtos de origem animal (REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, 2013).

Em áreas que se cultiva o milho, geralmente não se realiza o pousio, pois são realizados plantios sucessivos da cultura, não se executando nem mesmo a rotação com outras culturas. Essa prática de manejo acaba influenciando na utilização de insumos químicos e na disseminação de pragas e de doenças, proporcionando elevadas perdas econômicas e ambientais (EMBRAPA, 2015).

Conforme Amado et. al (2002), o maior emprego de tecnologias convencionais intensivas nas lavouras de milho no RS ocorre em anos com condições climáticas mais favoráveis à cultura do milho, em que a produtividade de grãos pode alcançar valores superiores a  $9 \text{ t ha}^{-1}$ . No entanto, a baixa produtividade média do estado (Figura 1) está principalmente vinculada à reduzida adoção de tecnologias intensivas para cultivares que demandam tais práticas, muito aquém do que poderia ser produzido nessas lavouras. Comparativamente, dentro do território gaúcho, a metade norte do estado tem aderido mais às práticas agrícolas intensivas, independentemente da área disponível para propriedades agrícolas.

Figura 1 - Rendimento médio da cultura do milho por município, no estado do Rio Grande do Sul, expresso em  $\text{kg ha}^{-1}$ .



Fonte: IBGE (2016).

## 2.2 ASPECTOS AGRONÔMICOS DA CULTURA DO MILHO

De acordo com estudos arqueológicos, o milho já era utilizado pelo homem como alimento de 7 a 10 mil anos atrás, no México. Quando Cristóvão Colombo chegou a América, o milho era cultivado pelas populações indígenas desde o Chile até o sul do Canadá, inclusive no Brasil. Cristóvão Colombo notou a presença do milho na costa Norte de Cuba no dia cinco de novembro de 1492 e o introduziu na Europa. Após 50 anos dessa introdução, o milho espalhou-se pelo mundo rapidamente, sendo atualmente a espécie com maior área cultivada no mundo (SOUZA e BRAGA, 2004).

A evidência mais consistente é a de que o milho descende do teosinto (*Zea mexicana* L.) (GALINAT, 1995). O genoma do teosinto é semelhante ao do milho e



eles se cruzam facilmente. Além disso, o teosinto possui características que conferem menor grau de domesticação do que as variedades modernas de milho (SOUZA e BRAGA, 2004).

O milho (*Zea mays* L.) pertence à tribo Maydaceae, que está incluída na subfamília Panicoideae, da família Poaceae. É uma espécie diploide e alógama, sendo um dos vegetais superiores mais estudados. Possui a caracterização genética mais detalhada dentre as espécies cultivadas, em virtude da separação das inflorescências masculina e feminina (monoíca), do número de sementes produzidas por inflorescência feminina, da facilidade de manipulação, da natureza dos cromossomos e do baixo número de cromossomos ( $n=10$ ). O milho foi uma das primeiras espécies cultivadas a ser levada aos laboratórios de genética para que se obtivessem conhecimentos básicos de mitose, meiose, segregação cromossômica, ligação gênica e efeitos de *crossing over*. Pela suma importância social, econômica e pela informação genética acumulada desde o início do século passado, o milho continua a ser objeto de extensivos estudos de biologia molecular, sendo a hibridação um aspecto fundamental utilizado no melhoramento e na produção do milho (SOUZA e BRAGA, 2004).

O milho evoluiu como espécie de polinização livre e, até o século XIX, as suas variedades eram de polinização aberta. As cultivares de milho hoje existentes podem ser subdivididas em dois tipos principais: híbridos e variedades, sendo que os híbridos podem ser simples, triplos ou duplos (EMBRAPA, 2015). Na escolha do tipo de híbrido a ser utilizado, deve-se considerar o nível de tecnologia a ser adotado (EMBRAPA, 2013).

Os diferentes tipos de cultivares de milho apresentam vantagens e desvantagens, que podem ser analisadas sob três aspectos principais: uniformidade, produtividade e estabilidade em diferentes ambientes (REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, 2013). O híbrido simples é o resultado do cruzamento entre duas linhagens puras e é indicado para sistemas de produção que utilizam alta tecnologia, pois possui o maior potencial produtivo e uniformidade, sendo também o de maior custo (EMBRAPA, 2015; REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, 2013). O híbrido triplo é obtido a partir do cruzamento entre uma linha pura e um híbrido simples e é indicado para média a alta tecnologia, enquanto que o híbrido duplo é o resultado do

cruzamento entre dois híbridos simples, sendo indicado para média tecnologia (EMBRAPA, 2015).

As plantas geneticamente modificadas são aquelas cujo genoma foi alterado pela introdução de DNA exógeno. Este DNA exógeno pode ser derivado de outros indivíduos, da mesma espécie ou de outra espécie completamente diferente. Os híbridos transgênicos de milho têm sido desenvolvidos, dentre outros aspectos, de forma a disponibilizar aos produtores novas alternativas no controle de pragas e de espécies daninhas e para agregar maior qualidade nutricional aos consumidores. Embora as variedades transgênicas tenham despertado grande interesse dos produtores, os consumidores têm manifestado preocupação com as plantas geneticamente modificadas e produtos delas obtidos. Uma série de riscos dos organismos geneticamente modificados tem sido levantada, dentre os quais: criação de novas espécies daninhas, alergenicidade dos alimentos, redução da biodiversidade e efeito nocivo sobre insetos não alvo (SOUZA e BRAGA, 2004).

O maior potencial de rendimento de grãos dos híbridos ocorre devido ao chamado vigor híbrido ou efeito de heterose, que se manifesta na primeira geração (F1). Desta forma, para pleno uso do vigor híbrido, é necessário adquirir novas sementes a cada ano de cultivo. A redução do potencial de produtividade de plantas da segunda geração (F2), em relação à da primeira, é de 10 a 15%. Contudo, para os híbridos expressarem seu potencial de rendimento, precisam de manejo adequado, práticas culturais específicas, tratamentos fitossanitários, disponibilidade de água e elevada adubação de base e de nitrogênio em cobertura, razão pela qual se tornam mais adequados para produtores com expectativa de elevado rendimento. Resultados de pesquisa obtidos recentemente com híbridos simples modernos mostram que há vantagens técnico-econômicas com sua adoção, mesmo em condições de risco de estresse por condições não ideais de desenvolvimento (EMBRAPA, 2013).

Para a obtenção de maiores rendimentos, através da máxima expressão do potencial genético de produção, a cultura do milho necessita que os índices dos parâmetros meteorológicos, especialmente a temperatura, precipitação pluviométrica e fotoperíodo, atinjam níveis considerados ótimos. A planta de milho precisa acumular quantidades distintas de energia ou unidades calóricas necessárias a cada etapa de crescimento e desenvolvimento. A unidade calórica é obtida através da

soma térmica (graus-dia) necessária para cada etapa do ciclo da planta, desde o plantio até o florescimento (SOUZA e BRAGA, 2004) e é calculado através das temperaturas máximas e mínimas diárias, sendo 30° C e 10° C, respectivamente, as temperaturas referenciais ótimas consideradas para o cálculo (EMBRAPA, 2016).

Assim, o ciclo de cada cultivar de milho é definido em função de soma térmica específica e constante de unidades de calor, sem a qual não completa o ciclo (EMBRAPA, 2013). Com relação ao ciclo, as cultivares são classificadas pelas empresas produtoras de sementes em normais ou tardias, semiprecoces, precoces e superprecoces, de acordo com o zoneamento agrícola para a cultura de milho (EMBRAPA, 2016).

As cultivares de milho indicadas para cultivo no RS podem apresentar ciclo superprecoce, precoce ou normal. Também é possível encontrar cultivares classificadas como hiperprecoces e semiprecoces, sendo as cultivares de ciclo precoce e superprecoce as mais demandadas. Nesse sentido, classificar cultivares nestes grupos de maturação pode ser uma estratégia de *marketing* interessante. Por esta razão, é recomendado usar os valores de referência da Tabela 1 como critério para identificação do ciclo da cultivar (EMBRAPA, 2013).

Tabela 1 - Variação no número de graus-dia das cultivares de milho disponíveis no mercado brasileiro, na safra 2012/13, dentro de cada grupo de maturação (ciclo), conforme informações das empresas e respectivos valores de referência.

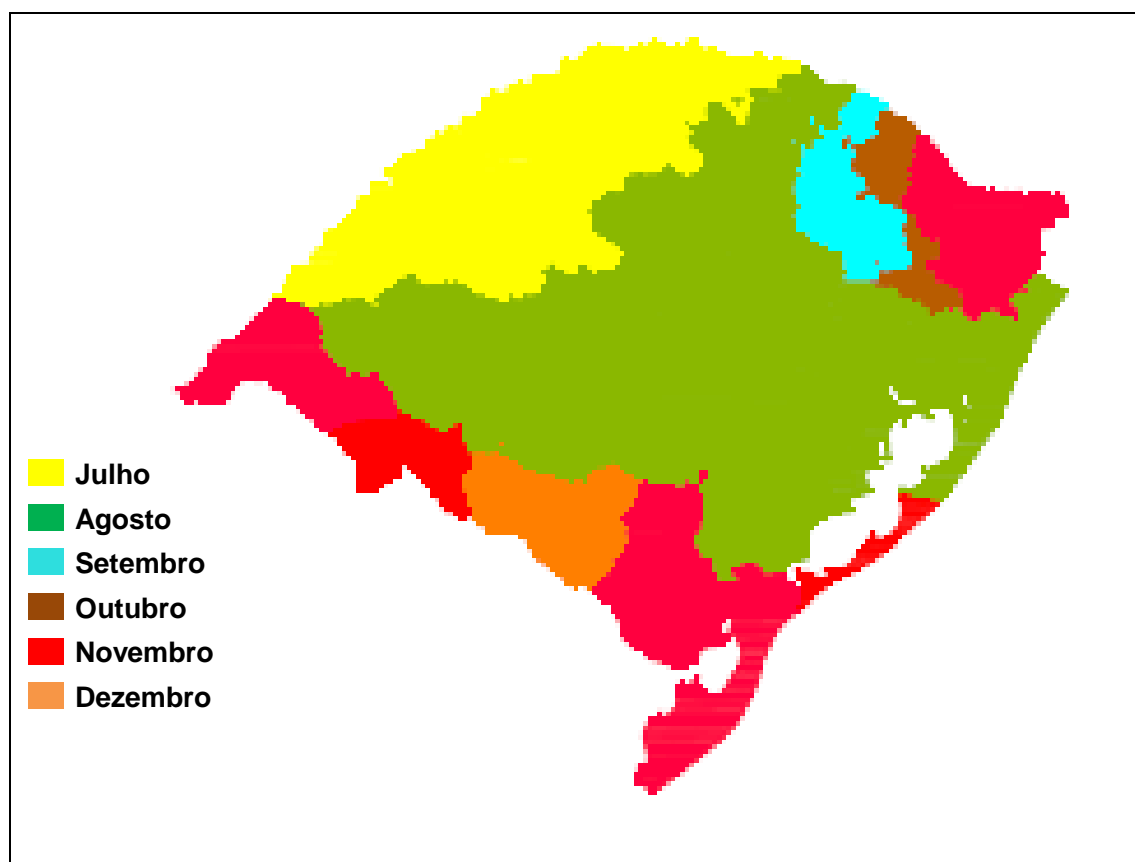
Ciclo	Soma térmica (graus-dia)	
	Valor encontrado	Valor de referência*
Hiperprecoce	entre 760 e 800	Inferior a 780
Superprecoce	entre 730 e 860	entre 780 e 830
Precoce	entre 635 e 904	entre 831 e 890
Semiprecoce	entre 860 e 960	-
Normal	entre 862 e 900	superior a 890

\*Valores de referências estabelecidos por Francelli e Dourado-Neto (2000).

Quase a totalidade das cultivares classificadas como hiperprecoces não acrescentam qualquer vantagem sobre as superprecoces quanto à soma térmica mínima exigida para alcançar o florescimento. As cultivares classificadas como semiprecoces apresentam ciclo normal ou tardio, conforme os valores de referência (EMBRAPA, 2013).

Como as diversas fases do desenvolvimento do milho e o fechamento do ciclo são dependentes do acúmulo diário de temperatura, o ciclo de uma dada cultivar pode ser prolongado ou encurtado em razão da época de semeadura e da região de cultivo (EMBRAPA, 2013). O zoneamento agrícola da cultura do milho no RS (Figura 2) indica os períodos recomendados de semeadura, considerando os fatores edafoclimáticos, tais como precipitação pluvial e temperatura, evapotranspiração potencial, ciclo e fase fenológica da cultura, coeficiente de cultura e disponibilidade máxima de água no solo, que é estimada em função da profundidade efetiva das raízes e da capacidade de água disponível no solo (EMBRAPA, 2016). Estas informações são fundamentais ao produtor rural, devendo ser utilizadas para a recomendação das práticas de agricultura convencional ou de precisão, respeitando os aspectos culturais, econômicos e tecnológicos de cada região.

Figura 2 - Épocas recomendadas para o início da semeadura do milho em diferentes regiões do RS.



Fonte: Adaptado de EMBRAPA (2016).

O plantio deve ser muito bem planejado, pois determina o início de um processo de cerca de 120 dias que afetará todas as operações envolvidas, além de determinar as possibilidades de sucesso ou insucesso da lavoura. É por ocasião do plantio que se obtêm boas ou más distribuições de plantas e densidades de semeadura (CRUZ et al., 1996). Neste contexto, o cuidado com a semeadura representa um importante elemento dentro do processo de produção, uma vez que afeta a distribuição e a localização do adubo, a distribuição de sementes nas fileiras, a profundidade de plantio e o espaçamento entre fileiras (CRUZ et al., 2007).

A produção de grãos da cultura do milho pode ser afetada pela população e espaçamento de plantas adotados, época de semeadura e híbridos selecionados, qualidade do solo e adubações realizadas, disponibilidade hídrica e outros fatores climáticos, interferência por plantas daninhas, pragas e doenças. Condições desfavoráveis desses fatores resultam em perdas de até 70% em produtividade (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

Entre os fatores ambientais, a altitude do local onde será implantada a lavoura é extremamente importante, por estar associada às temperaturas médias diurnas e noturnas, interferindo na fotossíntese e na respiração do milho. Em áreas tropicais, maiores rendimentos estão associados a altitudes intermediárias ou altas, que no Brasil correspondem às regiões por volta de 1.000 m acima do nível do mar, onde ocorrem temperaturas diurnas e noturnas ideais (DURÃES, 2007).

Maiores produtividades são verificadas em locais com temperaturas mais amenas e elevada radiação solar incidente. Nas regiões baixas, temperaturas diurnas superiores aos 35° C estão relacionadas à diminuição da atividade da redutase do nitrato e da taxa fotossintética, enquanto que temperaturas noturnas maiores que 24° C elevam a taxa de respiração celular, reduzindo a área folhar, pelo menor acúmulo de fotossintatos (FANCELLI, 2003).

Práticas que visem a aproveitar mais eficientemente a radiação solar incidente, como uma melhor distribuição espacial de plantas, podem significar acréscimos de produtividade. Vantagens adicionais de ajustes no arranjo de plantas podem ser obtidas em razão do melhor controle de plantas daninhas e da possibilidade de se trabalhar com maiores densidades de plantas de milho, sendo estes ajustes dependentes de outros fatores, como qualidade de colmo e tipo de híbrido (SILVA et al., 1999).

De maneira geral, híbridos de porte baixo permitem menores espaçamentos e maiores densidades populacionais, com menor risco de haver competição intraespecífica. Populações de 60 a 90 mil plantas ha<sup>-1</sup> têm resultado em aumento de produtividade para genótipos de arquitetura folhar ereta, porte baixo e ciclo precoce ou semiprecoce, o que não se verifica na mesma intensidade no caso de híbridos de arquitetura folhar semiereta ou aberta (DOURADO NETO et al., 2003).

O estado do RS apresenta alta radiação solar, considerando sua latitude. O aproveitamento ideal da radiação solar se dá quando o pré-florescimento e o enchimento de grãos da cultura coincidem com o período de maior radiação solar, que ocorre de meados de novembro a meados de fevereiro. Isso é possível quando se cultiva milho em outubro com irrigação ou em regiões com adequada disponibilidade e distribuição hídrica na estação de crescimento (EMBRAPA, 2013).

O milho é uma espécie que utiliza grande quantidade de água durante o ciclo de desenvolvimento, devido a sua elevada produção de matéria seca. Trata-se, no entanto, de uma cultura eficiente no uso de água, medida pela massa seca produzida por unidade de água utilizada. O elevado consumo de água não é devido apenas a elevada produção de matéria seca, mas também pelo fato de tratar-se de um cereal de estação estival. Isto significa que a maior demanda de água pela planta coincide com a maior demanda evaporativa da atmosfera (EMBRAPA, 2013).

A disponibilidade hídrica é considerada crítica nas fases de emergência, florescimento e formação de grãos, especialmente no período compreendido entre os 15 dias prévios e posteriores ao aparecimento do pendão. No solo, o déficit hídrico restringe fortemente o desenvolvimento radicular, sobretudo ao elevar a resistência do solo à penetração das raízes. Nesse aspecto, a presença de matéria orgânica no solo assume importância ao favorecer a exploração do solo pelas raízes e aumentar a quantidade de água disponível à cultura (FANCELLI, 2006).

É importante assinalar que a ocorrência de doenças, plantas daninhas e de pragas, juntos ou individualmente, podem afetar significativamente o potencial produtivo da planta de milho. As pragas, em especial, podem afetar de maneira total ou parcial esse potencial produtivo. É possível encontrar em determinada região ou determinado ano agrícola, a presença de espécies de pragas que têm a capacidade de reduzir o número ideal de plantas, seja por danificar e matar a semente logo após o plantio ou a plântula antes ou após a emergência (EMBRAPA, 2015).

Dentre as doenças que atacam a cultura do milho, merecem destaque a mancha branca, cercosporiose, ferrugem polissora, ferrugem tropical, os enfezamentos vermelho e pálido, as podridões de colmo e os grãos ardidos. Além destas, nos últimos anos, algumas doenças como a antracnose folhar e a mancha folhar de diplodia, consideradas de menor importância, têm ocorrido com elevada severidade em algumas regiões produtoras (EMBRAPA, 2015).

### 2.3 INOCULAÇÃO COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

O nitrogênio (N) é o nutriente mais exigido pela cultura do milho e o exportado em maior quantidade nos grãos. Segundo Oliveira (2004), a concentração adequada de N no tecido foliar é de 28 a 35 g kg<sup>-1</sup>. De acordo com as indicações de Sousa e Lobato (2004), para se produzir uma tonelada de grãos, são necessários cerca de 20 kg de N, o que corresponde a 180 kg ha<sup>-1</sup> do nutriente, para uma produtividade de 9 t ha<sup>-1</sup>, quantidade que normalmente não pode ser suprida exclusivamente pelo solo. Consequentemente, a adubação nitrogenada assume papel de grande importância, por ser o N o elemento absorvido em maior quantidade pelo milho (TAIZ e ZEIGER, 2014).

O manejo do N em sistemas agrícolas deve considerar os elevados riscos ambientais, uma vez que este nutriente está sujeito a perdas por erosão, lixiviação e volatilização. Além disso, existe uma dificuldade de avaliar sua disponibilidade no solo, devido às múltiplas reações que está sujeito, mediadas por microrganismos e afetadas por fatores climáticos de difícil previsão (HUERGO et al., 2013).

A aplicação do N na cultura do milho ocorre principalmente na forma de ureia. O Brasil importa grande parte da ureia utilizada na agricultura, portanto se faz necessário o uso de alternativas viáveis que visem à redução do seu uso. Deste modo, a inoculação das sementes de milho com bactérias diazotróficas pode ser uma alternativa biotecnológica na busca desta redução, visto que estes microrganismos podem atuar na disponibilização de N para a planta do milho e do sorgo (REIS, 2007).

Dentre as diferentes formas do N absorvidas pelas plantas, as mais importantes são a nítrica (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e a amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Entretanto, a forma de nitrato

é a que predomina durante o processo de absorção, por ser a mais abundante na solução do solo, devido à atividade da microbiota dos solos tropicais em realizar o processo de nitrificação ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$ ) (BARBER, 1995).

O uso da fonte de N na forma amoniacal promove a acidificação do solo, por extrusão de um próton ( $\text{H}^+$ ) e, associado com a inibição do processo da nitrificação, promove reação ácida no solo rizosférico (perto da raiz). A relação ideal de nitrato e amônio para as plantas depende da espécie, da idade da planta e do pH médio de crescimento da cultura (HAYNES e GOH, 1978).

Assim, o N desempenha um papel importante para o crescimento e produção das culturas, participando de diversos processos fisiológicos vitais para o ciclo de vida das plantas. O N, em quantidades adequadas, pode favorecer o crescimento da raiz, pelo fato de que o crescimento da parte aérea aumenta a área folhar e a fotossíntese e, com isso, ocorre um maior fluxo de carboidratos para raiz, favorecendo o seu crescimento (VEIGA-JUNIOR e MELLO, 2008).

Embora o N gasoso ( $\text{N}_2$ ) constitua 78% da composição da atmosfera, nenhum animal ou planta consegue utilizá-lo como nutriente, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do  $\text{N}_2$ , que é uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza. Contudo, os gases atmosféricos também se difundem para o espaço poroso do solo e o  $\text{N}_2$  pode ser aproveitado por alguns microrganismos que conseguem fazer a quebra dessa ligação dos átomos, graças à ação de enzima chamada dinitrogenase, que é capaz de romper a tripla ligação do  $\text{N}_2$  e reduzi-lo à amônia, a mesma forma obtida no processo de produção industrial (FIGUEIREDO et al., 2008).

Sobre este aspecto, as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) correspondem a um grupo de microrganismos benéficos às plantas de interesse agrônômico, ecológico e econômico. Dentre elas, o gênero *Azospirillum* abrange um grupo de BPCP de vida livre, que é encontrado em quase todos os lugares. Essas bactérias, também denominadas como diazotróficas ou fixadoras de  $\text{N}_2$ , se associam a diversas espécies de plantas, em diferentes graus de especificidade, levando à classificação como bactérias associativas endofíticas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os pesquisadores têm definido de várias formas os microrganismos endofíticos. Petrini (1991) define microrganismos endófitos aqueles que habitam o



interior das plantas, sem aparentemente causar qualquer efeito negativo aos seus hospedeiros. Mais tarde, Halmman et al. (1997) sugerem que endófitos são todos aqueles microrganismos que podem ser recuperados no interior de plantas saudáveis, após desinfecção externa. De acordo com Strobel e Daisy (2003), microrganismos endofíticos são aqueles isolados de tecidos vegetais internos e que não causam danos imediatos ao hospedeiro.

Os microrganismos endofíticos possuem, da mesma forma que os patógenos, a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistemicamente o hospedeiro. Com essa colonização sistêmica da planta, esses microrganismos podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de atuar sobre as populações de outros organismos presentes no interior da planta (ANDREOTE et al., 2006).

Há vários efeitos positivos atribuídos às bactérias endofíticas, como a promoção do crescimento vegetal, fixação de  $N_2$  e controle biológico de pragas e doenças (VERMA et al., 2001). A presença de endófitos já foi constatada em inúmeras espécies vegetais de interesse econômico. De acordo com Misaghi e Donndelinger (1990), a íntima relação entre os microrganismos endofíticos e seus hospedeiros envolve processos coevolutivos, podendo influenciar mecanismos fisiológicos da planta.

A fixação assimbiótica de N depende da capacidade do microrganismo estabelecer-se endofiticamente no interior da planta e, para que isso ocorra, o microrganismo deve ser capaz de invadir e se proliferar nos tecidos da planta hospedeira, ultrapassando as barreiras físicas e químicas que a planta estabelece, instituindo vias de infecção e sítios de colonização. Contudo, não deve induzir uma resposta drástica da planta à infecção, o que impediria a colonização dos tecidos. O estabelecimento desta relação depende de uma sequência de etapas e de uma relação específica entre planta e bactéria (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

As BPCP associam-se a diversas espécies de plantas da família Poaceae, inclusive o milho e o sorgo, em diferentes graus de especificidade, levando à classificação como bactérias associativas, endofíticas ou simbióticas. Em termos agrícolas, a maior contribuição do processo de fixação biológica do  $N_2$  ocorre pela associação simbiótica de plantas da família Leguminosae (Fabaceae) com bactérias pertencentes a diversos gêneros e que são denominadas de modo popular como

rizóbios (HUNGRIA et al., 2007). A simbiose com essas bactérias pode ser facilmente identificada, pois estruturas altamente especializadas, chamadas nódulos, são formadas nas raízes das leguminosas, especificamente para o processo de fixação biológica. No caso das bactérias endofíticas ou associativas, o mesmo complexo da dinitrogenase realiza a conversão do  $N_2$  da atmosfera para amônia.

A nitrogenase é uma enzima relativamente lenta, que para produzir níveis adequados de nitrogênio fixado, o conteúdo enzimático em bactérias diazotróficas deve ser de aproximadamente 10% da proteína celular total (KLUGKIST et al., 1985). A enzima nitrato redutase atua no primeiro passo da redução do N nítrico por plantas superiores. A maior parte do N é absorvida pelas plantas na forma de nitrato, que, ao ser absorvido pelas raízes, pode ser reduzido ou armazenado nos vacúolos, ou translocado para a parte aérea, onde será reduzido ou armazenado nos vacúolos folhares (TAIZ e ZEIGER, 2014). A redução de nitrato ocorre no citosol e envolve a ação da enzima nitrato redutase (NR), produzindo nitrito, o qual adentra nos plastídeos, nas raízes, ou cloroplastos, em folhas, sendo reduzido à amônia, por ação da enzima nitrito redutase (NR), a qual é fixada via glutamato sintase / glutamina sintase (GS/GOGAT) nos aminoácidos. A glutamina e o glutamato, por sua vez, servem de substrato para reações de transaminação, para a produção de aminoácidos necessários à síntese de proteínas (DONATO et al., 2004). A via de assimilação do nitrato é um processo biológico essencial, por ser a principal rota pela qual o N inorgânico é incorporado em compostos orgânicos (FALCÃO, 2006). Portanto, a atuação da enzima nitrato redutase é de fundamental importância na incorporação de N inorgânico em moléculas orgânicas complexas, sendo a etapa limitante nesse processo.

Porém, ao contrário das bactérias simbióticas, bactérias associativas excretam somente uma parte do N fixado diretamente para a planta associada. Após a mineralização das bactérias, é possível haver contribuição de aportes adicionais de N para as plantas. Contudo, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Desse modo, deve-se lembrar que, ao contrário das leguminosas, a inoculação de não leguminosas com bactérias endofíticas ou associativas, ainda que

essas consigam fixar N, não consegue suprir totalmente as necessidades das plantas em N (HUNGRIA et al., 2015).

A partir das descobertas de Döbereiner e Day (1976), quando foi identificada a espécie *Spirillum lipoferum* em *Digitaria*, posteriormente houve uma reclassificação e o gênero *Azospirillum* foi proposto, apresentando duas espécies: *A. brasilense* e *A. lipoferum*. Com o passar do tempo, outras espécies foram descritas como a *A. amazonense* (MAGALHÃES et al. 1983).

O gênero *Azospirillum* possui 17 espécies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. halopraeferens*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zaeae*, *A. rugosum*, *A. picise*, *A. thiophilum*, *A. formosense*, *A. humicireducense*, *A. fermentarium* (TARRAND et al., 1978). Organismos pertencentes a esse gênero são classificados como organismos rizosféricos, colonizando principalmente a zona de alongação e os pelos radiculares. Algumas estirpes de *Azospirillum* podem ser encontradas no interior de vegetais, por isso denominados de endofíticos facultativos (DÖBEREINER et al., 1995).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são  $\alpha$ -proteobactérias gram-negativas e de vida livre, conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal há muitos anos, tendo sido isoladas da rizosfera de gramíneas e cereais em várias regiões do mundo, desde clima tropical até temperado. É uma bactéria aeróbica, espiralada, móvel, com flagelo polar e cílios laterais, que realiza todas as fases do ciclo do N, exceto a nitrificação, e transfere apenas 20% do N fixado para a planta. Esta última característica é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento de produtos, embora não anule a utilidade da tecnologia (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

A distribuição ecológica de *Azospirillum* sp. é extremamente ampla, podendo ser considerada uma bactéria universal, encontrada colonizando plantas crescidas em diferentes *habitats*. Estirpes têm sido encontradas em associação com plantas monocotiledôneas, incluindo milho, arroz (*Oryza sativa* L.), sorgo, gramíneas forrageiras e com as dicotiledôneas (FIGUEIREDO et al., 2008).

A riqueza de compostos orgânicos na rizosfera produz intensas atividades e interações microbianas. A movimentação dos microrganismos em direção às raízes ocorre quando existe um reconhecimento químico, denominado quimiotaxia. Estudos indicam que a quimiotaxia aos exsudatos da rizosfera é responsável pela chegada

dos microrganismos. Em *A. lipoferum* e *A. brasilense* verificou-se grande atividade quimiostática a diversos açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos aromáticos e exsudatos radiculares (TARRANT et al., 1978). Observam-se também respostas aerotáxicas a diferentes fontes de carbono e concentração de oxigênio, que variam conforme as espécies de *Azospirillum* (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

A fixação de N foi a proposta inicial sobre o mecanismo pelo qual o *Azospirillum* promovia o crescimento vegetal. Os trabalhos atuais têm focado no ciclo do N dentro da célula, a partir dos genes envolvidos. Segundo Steenhoudt e Vanderleyden (2000), a capacidade do *Azospirillum* em converter N atmosférico em amônio, em condições microaeróbicas e com baixos níveis de N, é decorrente da ação do complexo nitrogenase. Esse complexo é constituído por dois componentes: a proteína dinitrogenase, a qual contém um cofator ferro-molibdênio e o sítio de redução do N<sub>2</sub> e a proteína dinitrogenase redutase, que transfere elétrons de um doador para a proteína nitrogenase (HUERGO et al., 2013).

Os diazotróficos são capazes de produzir fitohormônio, sendo essa característica um dos fatores responsáveis pelo efeito estimulatório observado em plantas que se associam a essas bactérias. Vários experimentos foram realizados utilizando-se o gênero *Azospirillum* e foi observada a estimulação do crescimento de plantas em diferentes solos e condições climáticas. São produzidos três tipos de substâncias que estimulam o crescimento de plantas em culturas de *Azospirillum*, como as auxinas (ácido 3-indolacético), as citocininas e as giberelinas, sendo a auxina quantitativamente a mais importante (FIGUEIREDO et al., 2008).

A influência das espécies de *Brachiaria* sobre a presença e número de bactérias da espécie *A. amazonense*, associadas às raízes dessas plantas, foram relatadas por Reis Júnior et al. (2004). Diferentes pastagens (*B. humidicola*, *B. decumbens* e *B. brizantha*) foram introduzidas em regiões dos biomas Cerrado e Mata Atlântica. Foi observado que a *A. amazonense* se encontra associada à *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. humidicola*.

Em estudos realizados em cana-de-açúcar, Reis Júnior et al. (2000) analisaram a localização e o número de bactérias endofíticas em quatro diferentes genótipos. Houve a presença das bactérias *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum* spp e *Acetobacter diazotrophicus* nos quatro genótipos

e em todas as partes amostradas (raízes, colmos e folhas). Em todos os genótipos de cana-de-açúcar estudados houve maior frequência de isolamento de diazotróficos nas raízes, seguido dos colmos e folhas, sendo mais acentuada as do gênero *Azospirillum*.

Já foram relatados em trabalhos com inoculação de *Azospirillum spp.*, onde houveram incrementos na absorção da água e minerais, maior tolerância a estresses, como salinidade e seca, resultando em uma planta mais vigorosa e produtiva. Provavelmente pelo maior crescimento radicular e melhor nutrição das plantas, também há vários relatos de maior tolerância a agentes patogênicos de plantas (CORREA et al., 2008).

Existe um interesse crescente pelo uso de inoculantes contendo bactérias que promovam o crescimento e que incrementem a produtividade, devido ao alto custo dos fertilizantes químicos e a uma conscientização em prol de uma agricultura sustentável e menos poluente. Para o sucesso da inoculação, é importante a escolha de genótipos adaptados às condições locais e propensos à colonização de bactérias diazotróficas, assim como selecionar bactérias eficientes em fixar N e em produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas (FIGUEIREDO et al., 2008).

O uso de linhagens com *Azospirillum* como inoculantes tem apresentado bons resultados. Perrig et al. (2007) realizaram experimentos com duas linhagens de *A. brasilense*, Cd e Az39, ambas usadas na formulação de inoculantes na Argentina. Os resultados obtidos mostraram que ambas as linhagens promoveram aumentos nos níveis de ácido indol-3-acético (AIA), ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), ácido abscísico (ABA), zeatina e etileno, indicando que *A. brasilense* é potencialmente capaz de promover diretamente o crescimento da planta e aumentar o rendimento agrônômico.

O emprego na forma de inoculante no campo de *A. brasilense* ainda é pequeno. Porém, grandes avanços têm sido observados nessa área. Já está sendo identificado um número considerável de bactérias em vários ecossistemas e a sua presença em várias culturas. Com o avanço de novas ferramentas, como a biologia molecular e a genética de microrganismos, o emprego dessas bactérias chegará a um nível de emprego equivalente ao que se utiliza hoje com relação ao rizóbio (FIGUEIREDO et al., 2008).

Além da reinoculação, uma nova técnica está sendo difundida pela EMBRAPA, que é a de co-inoculação ou também denominada de inoculação mista. Ela consiste na utilização de combinações de diferentes microrganismos, aos quais produzem um efeito sinérgico, em que se superam os resultados produtivos obtidos com os mesmos, quando utilizados na forma isolada (FERLINI, 2006). Deste modo, produtos à base de *A. brasilense* têm sido recomendados para co-inoculação de soja, juntamente com *Bradyrhizobium* (REIS, 2007). De maneira geral, ocorre a potencialização da nodulação e maior crescimento radicular, em resposta a interação positiva entre as bactérias simbióticas (*Bradyrhizobium*) e as bactérias diazotróficas, em especial às pertencentes ao gênero *Azospirillum* (FERLINI, 2006). O mesmo autor cita que nos casos onde se tem utilizado *A. brasilense*, tem se demonstrado que o efeito benéfico da associação se deve em maior parte à capacidade que a bactéria tem de produzir reguladores de crescimento, que determinam um maior desenvolvimento do sistema radicular, com a possibilidade de explorar um volume mais amplo de solo (FERLINI, 2006).

Em vários ensaios a campo com *A. brasilense*, verificaram-se incrementos nos rendimentos das leguminosas com a inoculação mista, obtendo-se valores superiores aos obtidos somente com a inoculação com *Bradyrhizobium* (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Estes resultados coincidem com os citados por Okon e Vanderleyden (1997), os quais reportam os efeitos positivos para diversos tipos de leguminosas. Entretanto, a inoculação mista pode mostrar respostas contraditórias, ou seja, tanto estimular como inibir a formação de nódulos e o crescimento radicular em um sistema simbiótico, variando em função do nível de concentração do inóculo e do tipo de inoculação (FERLINI, 2006).

Hungria et al. (2010), ao inocularem espécies selecionadas de *A. brasilense* em milho e trigo, encontraram incrementos de 26 e 30% na produtividade de grãos dessas culturas, respectivamente. Especificamente para a cultura do milho, Quadros et al. (2014), aborda que a inoculação de *A. brasilense* aumentou o teor relativo de clorofila e o rendimento da matéria seca da parte aérea dos híbridos AS 1575 e SHS 5050, o peso de 1000 grãos do híbrido P32R48 e a estatura de planta do híbrido AS 1575. As bactérias inoculadas permaneceram em quantidade viável nas raízes até o final do ciclo do milho, demonstrando uma boa sobrevivência pós-inoculação. Para

algumas características agronômicas, a resposta do milho à inoculação depende do híbrido testado.

## 2.4 AGRICULTURA DE PRECISÃO E A INOCULAÇÃO DIRIGIDA NO SULCO

O termo agricultura de precisão (AP) tem aproximadamente 25 anos, mas os fundamentos que levaram ao seu surgimento são de longa data. Desde que a agricultura existe, sempre houveram motivos para se diferenciar os tratamentos culturais nas pastagens, pomares e lavouras, em razão de algumas diferenças internas das áreas. Com a expansão territorial da agricultura, promovida pelo auxílio da mecanização, que permitiu que áreas cada vez maiores fossem cultivadas, esse detalhamento foi sendo relegado e grandes áreas passaram a ser geridas como se fossem homogêneas (MOLIN et al., 2015).

O cenário atual da agricultura brasileira caminha para uma produção eficiente de milho e soja, com proteção ao meio ambiente, onde se insere a AP. Para isso, o atual conhecimento do tratamento localizado deve ser aplicado nas mais diversas etapas do cultivo, como: preparo do solo, correção do solo e adubação, no controle de plantas daninhas, semeadura, irrigação, pulverizações para o controle de pragas e doenças (EMBRAPA, 2015).

A princípio, qualquer ação agronômica pode ser gerida localmente, desde que o fator de interesse varie espacialmente e de forma significativa, que a mensuração e mapeamento sejam viáveis tecnicamente e economicamente e que existam soluções mecanizadas para a intervenção localizada. Sem dúvida, algumas aplicações têm sido mais comuns do que outras, conforme os diferentes níveis de complexidade de cada tipo de tratamento, disponibilidade de equipamentos e pesquisas que embasem os métodos de investigação e aplicação (AMADO et al., 2000).

A agricultura de precisão auxilia na melhoria da gestão da propriedade rural, com o uso de sensores ópticos, adubação e semeadura a taxa variável em tempo real, piloto automático, tráfego controlado, plantio na mesma linha, aproveitando a adubação residual e permitindo a semeadura noturna. Essas ferramentas contribuem para tornar as práticas agropecuárias cada vez mais precisas e as

decisões mais acertadas, para melhor gerenciamento da unidade produtiva (EMBRAPA, 2016).

As aplicações de fertilizantes e corretivos, em doses variadas, são as que apresentam maior facilidade, tanto na análise e elaboração da recomendação, como nas intervenções. São também as que mais recebem incentivos da pesquisa e da indústria de máquinas e de equipamentos, desde as primeiras iniciativas da AP. A elaboração de mapas de recomendação é relativamente ágil e a disponibilidade de máquinas e de recursos eletrônicos é sensivelmente maior do que para outros insumos (MOLIN et al., 2015).

Segundo Molin (2015), pensando em AP como uma filosofia de gestão, que considera a heterogeneidade do campo, pode-se concluir que ela tem raízes antigas e desvinculadas da mecanização. Há séculos, as variações naturais em pequenos campos de produção eram reconhecidas e tratadas manualmente pelos agricultores. A mecanização e a automação se tornaram importantes à medida que o aumento da escala de produção dificultou a percepção do agricultor sobre o campo e os tratamentos agrônômicos passaram a demandar alto rendimento operacional.

Atualmente, sob a pressão global para aumentar a produção de grãos, minimizando simultaneamente os riscos ambientais, a eficiência do fertilizante nitrogenado em diferentes agroecossistemas tornou-se uma questão relevante (AMADO et al., 2002). O N é um dos nutrientes com interações ambientais complexas e perdas que geram ameaças econômicas e ambientais. O risco de perdas de N e os problemas ambientais subsequentes dependem do tipo de solo, clima, manejo da cultura, a taxa de aplicação e a fonte de N (CANTARELLA e MONTEZANO, 2010). Para tanto, é importante que a quantidade de N por aplicar nas culturas seja a mais exata possível, minimizando tanto os excessos, que prejudicam a qualidade ambiental e oneram o produtor, quanto aos déficits, que comprometem o rendimento projetado (AMADO et al., 2002).

Há uma forte demanda da sociedade pela produção de alimentos, associada à manutenção da qualidade ambiental, o que trouxe para a atualidade um grande desafio, que é a integração dos fatores biológicos nos sistemas de produção, com alta produtividade. Nesse contexto, o conceito de sustentabilidade toma como base seis dimensões, sendo elas: sustentabilidade ecológica, econômica, social, espacial, cultural, psicológica, política nacional e internacional. Dessa forma, parte-se da



premissa de que o desenvolvimento deve transcender o significado econômico (SACHS, 2002).

Atualmente, busca-se mecanismos para que a sustentabilidade ecológica seja atingida. Para tanto, deve objetivar a utilização dos recursos potenciais dos vários ecossistemas, com um mínimo de dano aos sistemas de sustentação da vida, limitando o consumo de combustíveis fósseis e de outros recursos e produtos facilmente esgotáveis ou ambientalmente prejudiciais, substituindo-os por recursos ou produtos renováveis e/ou abundantes e ambientalmente inofensivos; reduzindo o volume de resíduos e de poluição (DALY, 2004).

Para isso, os pulverizadores de inoculação dirigida no sulco são uma ferramenta mecanizada auxiliar desse processo. A pulverização dirigida no sulco se realiza com a sucção dos produtos colocados no tanque, sendo enviados através de um sistema de mangueiras até a plantadeira, onde são fixadas por um pingente que irá efetuar a pulverização na semente diretamente no sulco de semeadura.

Nessa visão, o aumento do uso de insumos biológicos (microrganismos vivos), demandam um acondicionamento e um meio propício à sobrevivência das colônias, para que assim haja uma maior eficiência do produto inoculado, garantindo um número satisfatório de microrganismos no processo da inoculação.

Há pouca informação disponível sobre a toxicidade dos pesticidas utilizados para o tratamento de sementes e a compatibilidade ou incompatibilidade destes produtos e os inoculantes (YANG et al., 2011). Alguns produtos químicos podem ser muito prejudiciais para os rizóbios (HUNGRIA et al., 2005; CAMPO et al., 2009), inofensivos (ELSLAHI et al., 2014) ou muito tóxicos (MOHIUDDIN e MOHAMMED, 2013) para *Azospirillum*.

A substituição parcial ou total de fertilizantes químicos por BPCP pode não só reduzir custos, mas também ajudar a mitigar os impactos ambientais negativos das atividades agrícolas. Há muito conhecimento sobre formulações e tecnologias de inoculação com BPCP, mas mais estudos são necessários para avaliar a facilidade e a viabilidade das estratégias de inoculação em grande escala, tendo em conta que a semeadura é uma fase crítica da atividade agrícola. Além disso, uma vez que o tratamento de sementes com produtos químicos continue sendo praticado, as estratégias de inoculação devem tentar evitar danos às bactérias. Fukami et al. (2016) identificaram métodos alternativos de inoculação, que evitam o contato de

*Azospirillum* com os pesticidas aplicado às sementes, com ênfase em pulverização foliar no início da fase vegetativa. Os autores concluíram que os métodos alternativos de inoculação podem aumentar a eficiência de tais bactérias e ajudar a reduzir custos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCALIZAÇÃO

O experimento foi realizado no município de Cruzeiro do Sul, situado na região do Vale do Taquari, no estado do Rio Grande do Sul, em uma lavoura de milho de 10 hectares (Figura 3), de propriedade de Claudir Klein. A área total do experimento foi de 2,5 ha, instalado em agosto de 2015, durante a implantação da cultura do milho.

Figura 3 - Vista parcial da área experimental.



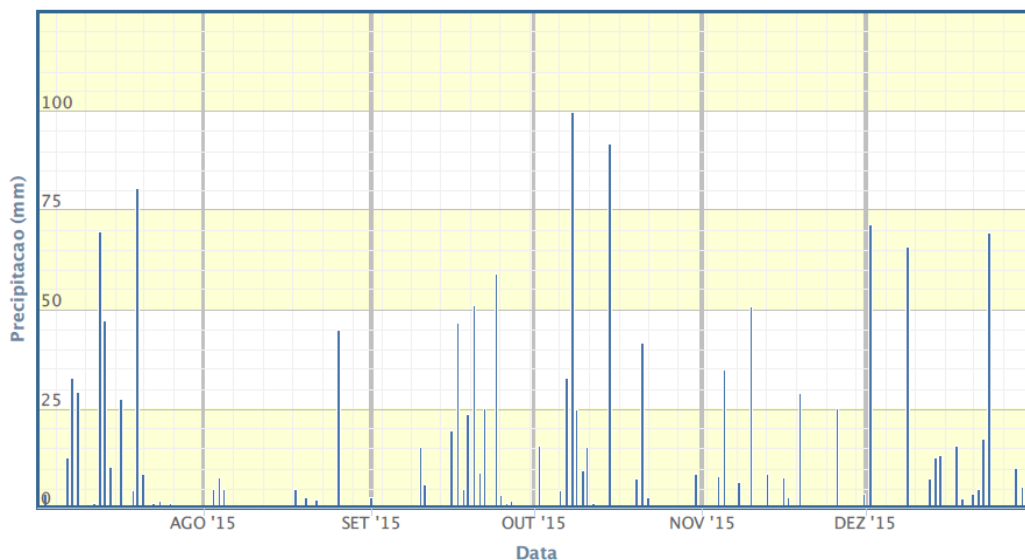
Fonte: Arquivo pessoal.

O clima da região é, segundo a classificação de Köppen, mesotérmico, tipo subtropical, da classe Cfa (PEREIRA et al., 2001). A temperatura média anual é de 17,8°C, sendo a média do mês mais quente de 23,9°C (janeiro) e do mês mais frio de 12,1°C (junho e julho), podendo ocorrer temperaturas extremas. Os invernos são frios, com temperaturas que chegam a 0°C e, no verão, registram-se temperaturas elevadas, chegando aos 40°C.

Os valores dos índices pluviométricos (Figura 4) e de temperatura (Figura 5) foram obtidos a partir da Estação Meteorológica de Teutônia (RS), distante

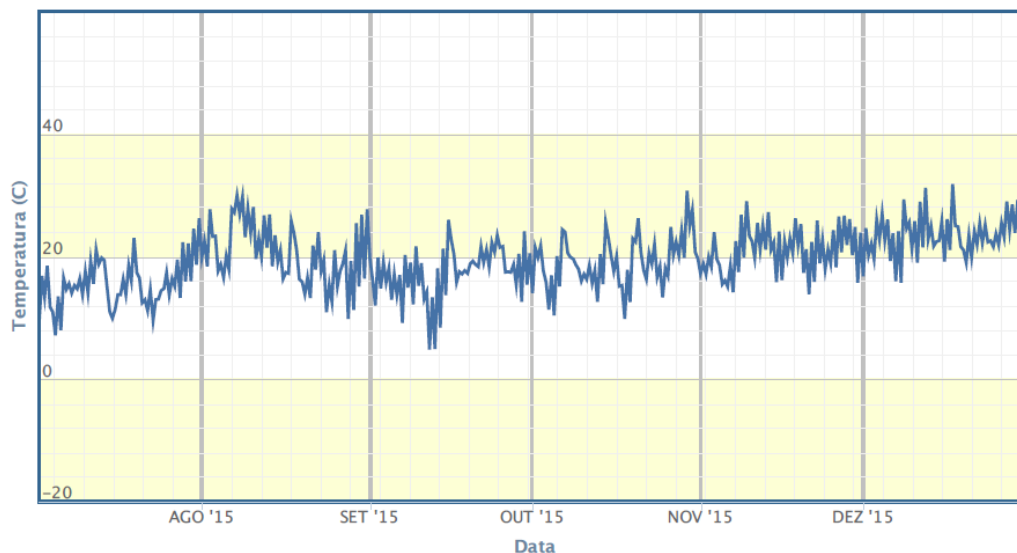
aproximadamente 25 km do local do experimento. É importante assinalar que o experimento foi afetado por chuva de granizo no dia 08/10/2015.

Figura 4 - Precipitação pluviométrica durante o período experimental.



Fonte: Estação Meteorológica de Teutônia – INMET (2016).

Figura 5 - Temperatura média do ar durante o período experimental.



Fonte: Estação Meteorológica de Teutônia – INMET (2016).

O solo predominante na área experimental é classificado como Chernossolo Háplico Órtico típico (Unidade de Mapeamento Vila) (STRECK et al., 2008).

### 3.2 IMPLANTAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O milho implantado foi um híbrido, de ciclo superprecoce, o Velox TL<sup>®</sup>. A semeadura foi realizada no dia 09 de agosto de 2015, em sistema de semeadura direta, utilizando-se tratamento industrial das sementes com inseticida, sendo o espaçamento entre linhas de 0,80 m e o espaçamento entre plantas de 0,21 m, em uma densidade de 75.000 plantas ha<sup>-1</sup>.

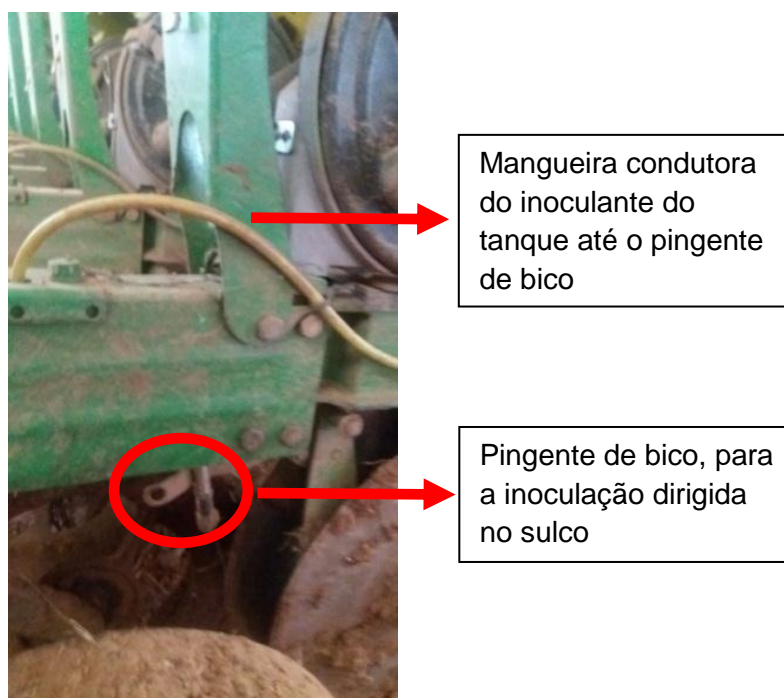
O experimento consistiu em três tratamentos: inoculação direta na semente e aplicação de nitrogênio (T1); inoculação dirigida no sulco e aplicação de nitrogênio (T2); e a testemunha, sem inoculação e com aplicação de nitrogênio (T3). O inoculante empregado foi um produto comercial da Simbiose Agrotecnologia Biológica<sup>®</sup>, composto pelas cepas Ab-V5 e Ab-V6 da bactéria *Azospirillum brasilense*, na concentração de 5 x10<sup>8</sup> células por mL de produto. O equipamento utilizado para realizar a inoculação dirigida no sulco foi o pulverizador de inoculação da H3M250<sup>®</sup>, com tanque de capacidade de 250 L (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Vista frontal da semeadora adaptada com pulverizador para inoculação dirigida no sulco.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 7 - Vista lateral da semeadora adaptada com pulverizador para inoculação dirigida no sulco.



Fonte: Arquivo pessoal.

Para a inoculação com *A. brasilense* nas sementes, aplicou-se  $100 \text{ mL ha}^{-1}$  do inoculante, distribuído de maneira uniforme nas sementes, que foram semeadas no mesmo dia. Para a inoculação no sulco foi utilizada quatro vezes a dose de inoculante recomendada para aplicação direta na semente, correspondendo a  $400 \text{ mL ha}^{-1}$  aplicados de maneira direcionada no sulco de semeadura.

No preparo da área para a semeadura houve o controle das plantas daninhas, com aplicação do herbicida glifosato (Roundup<sup>®</sup>), utilizando-se  $720 \text{ g ha}^{-1}$  em quantidade de ingrediente ativo (i. a.), antes da semeadura.

Após a semeadura, o controle das plantas daninhas foi realizado com aplicação do herbicida mesotriona (Callisto<sup>®</sup>), na dosagem de  $0,4 \text{ L i.a. ha}^{-1}$ , mais  $1750 \text{ L i.a ha}^{-1}$  de atrazina (Atrazinax<sup>®</sup>), quando as plantas de milho apresentavam quatro folhas totalmente expostas e as plantas daninhas tinham de duas a seis folhas ou até dois perfilhos (EMBRAPA, 2006). No controle de pragas da área foi utilizado o inseticida piretróide Karate Zeon 50 CS<sup>®</sup>, na dosagem de  $7,5 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ .

A adubação da área foi realizada na base, a qual se aplicou  $280 \text{ kg ha}^{-1}$  da fórmula comercial (NPK) 9-25-15 e, em cobertura, foi realizada uma aplicação de N,

no estágio fenológico V6, na dose de 350 kg ha<sup>-1</sup> de ureia. As adubações seguiram as indicações do Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFS – RS/SC, 2004).

As coordenadas geográficas e as zonas de relevo dos pontos de coleta das plantas de milho, realizada em 29/12/2015, constam na Tabela 2.

Tabela 2 - Pontos de amostragem, com as respectivas coordenadas geográficas.

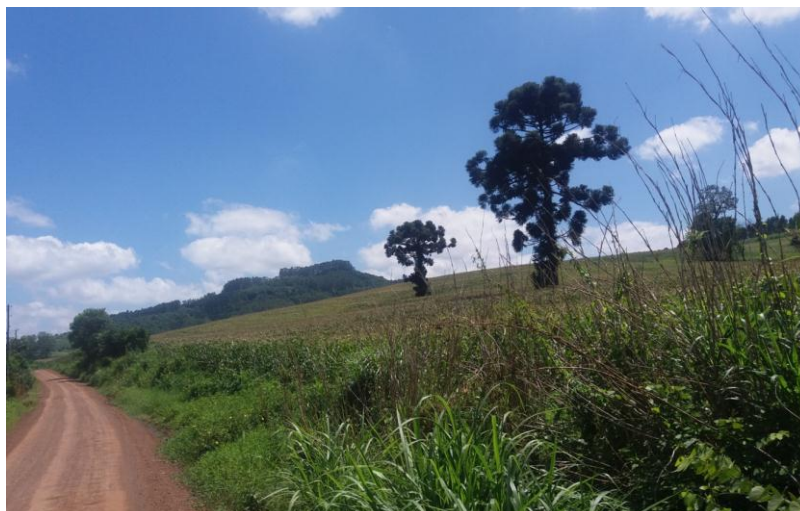
Tratamentos	Latitude (S)*	Longitude (O)*	Altitude (m)
T <sub>1</sub> Z <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	29°29'45,39"	52°07'50,35"	95
T <sub>1</sub> Z <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	29°29'46,68"	52°07'50,18"	96
T <sub>1</sub> Z <sub>1</sub> R <sub>3</sub>	29°29'52,68"	52°07'50,35"	96
T <sub>1</sub> Z <sub>2</sub> R <sub>1</sub>	29°29'53,32"	52°07'50,37"	94
T <sub>1</sub> Z <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	29°29'53,90"	52°07'50,30"	92
T <sub>1</sub> Z <sub>2</sub> R <sub>3</sub>	29°29'62,03"	52°07'49,84"	97
T <sub>1</sub> Z <sub>3</sub> R <sub>1</sub>	29°29'62,66"	52°07'49,85"	93
T <sub>1</sub> Z <sub>3</sub> R <sub>2</sub>	29°29'62,67"	52°07'49,86"	93
T <sub>1</sub> Z <sub>3</sub> R <sub>3</sub>	29°49'63,35"	52°07'50,33"	88
T <sub>2</sub> Z <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	29°49'45,18"	52°07'48,50"	94
T <sub>2</sub> Z <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	29°49'46,30"	52°07'48,32"	87
T <sub>2</sub> Z <sub>1</sub> R <sub>3</sub>	29°49'47,43"	52°07'48,46"	102
T <sub>2</sub> Z <sub>2</sub> R <sub>1</sub>	29°49'54,62"	52°07'48,57"	89
T <sub>2</sub> Z <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	29°49'56,44"	52°07'48,48"	86
T <sub>2</sub> Z <sub>2</sub> R <sub>3</sub>	29°49'57,51"	52°07'48,40"	89
T <sub>2</sub> Z <sub>3</sub> R <sub>1</sub>	29°49'63,34"	52°07'47,90"	90
T <sub>2</sub> Z <sub>3</sub> R <sub>2</sub>	29°49'65,14"	52°07'47,83"	82
T <sub>2</sub> Z <sub>3</sub> R <sub>3</sub>	29°49'66,20"	52°07'47,94"	87
T <sub>3</sub> Z <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	29°49'45,86"	52°07'46,85"	93
T <sub>3</sub> Z <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	29°49'46,37"	52°07'46,89"	98
T <sub>3</sub> Z <sub>1</sub> R <sub>3</sub>	29°49'47,41"	52°07'46,86"	98
T <sub>3</sub> Z <sub>2</sub> R <sub>1</sub>	29°49'53,95"	52°07'46,93"	101
T <sub>3</sub> Z <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	29°49'54,11"	52°07'46,78"	97
T <sub>3</sub> Z <sub>2</sub> R <sub>3</sub>	29°49'55,43"	52°07'46,71"	99
T <sub>3</sub> Z <sub>3</sub> R <sub>1</sub>	29°49'62,96"	52°07'46,73"	98
T <sub>3</sub> Z <sub>3</sub> R <sub>2</sub>	29°49'63,48"	52°07'46,24"	97
T <sub>3</sub> Z <sub>3</sub> R <sub>3</sub>	29°49'63,65"	52°07'46,29"	97

\*Sistema de referência geodésica WGS 84.

A vista parcial da área experimental pode ser visualizada na Figura 8. Já a localização da área experimental e dos pontos no talhão podem ser observadas na Figura 9, conforme imagem retirada do Google Earth<sup>®</sup>. As coordenadas geográficas foram obtidas através do aplicativo CR Campeiro - C7 GPS Dados<sup>®</sup>, sendo classificadas as zonas de relevo em: Z1, considerada a zona de maior altitude, com valores entre 87 e 102 m (média de 95,4 m); Z2, considerada a zona de média

altitude, com valores entre 86 e 101 m (média de 93,8 m) e Z3, considerada a zona de baixa altitude, com valores de 82 a 98 m (média de 91,7 m).

Figura 8 - Vista parcial da área experimental.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 9 - Área do experimento, com os tratamentos: normal (inoculação direta na semente), sulco (inoculação dirigida no sulco) e testemunha (sem inoculação).



Fonte: Google Earth®.



Em cada ponto de amostragem foram determinadas as variáveis altura de planta, diâmetro do colmo, número de grãos por planta e matéria seca da parte aérea e do sistema radicular. A altura da planta foi medida da inserção do pendão até a superfície do solo e o diâmetro do colmo foi determinado a 10 cm da superfície do solo, com auxílio de uma trena.

Para a determinação da matéria seca, as amostras de material vegetal foram secadas em estufa, com temperatura controlada a 68°C, até haver a estabilização do peso das amostras. A matéria seca foi determinada em balança eletrônica, com precisão de centésimos de grama, no dia 09 de janeiro de 2016.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi do tipo fatorial (3x3), com dois fatores, sendo o fator 1 a forma de inoculação, com três níveis (T1 - aplicação na semente, T2 - aplicação no sulco e T3 - testemunha) e o fator 2 as zonas de relevo, também com três níveis (Z1 - zona de maior altitude, Z2 - zona de média altitude e Z3 - zona de baixa altitude). Foram realizadas três repetições por tratamento para a análise dos parâmetros altura média de plantas, diâmetro do colmo e número de grãos.

Por questões relacionadas à falta de disponibilidade de estufa para a realização da secagem do material coletado para análise da matéria seca das plantas de milho, tanto da parte aérea, quanto da parte radicular, as três plantas coletadas, componentes das repetições do experimento, foram secas juntas. Dessa forma, não houve a possibilidade de se analisar os dados conforme um experimento fatorial, por falta de repetições dos tratamentos componentes de cada fator. Sendo assim, se optou por analisar esses dados como sendo um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), composto por três tratamentos e três repetições.

As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA), com aplicação do teste “F” e, no caso de diferença significativa, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. O software estatístico utilizado foi o Assistat 7.7 Beta<sup>®</sup> (SILVA e AZEVEDO, 2006).

Precedendo a ANOVA, testes de homogeneidade de variâncias e normalidade dos dados foram realizados, sendo, respectivamente, o teste de Bartlett ( $\chi^2$ ) e Shapiro-Wilk (W), ambos com nível de significância de 5%, para altura, diâmetro do colmo e matéria seca das plantas, já para o número de grãos foi utilizada a estatística não paramétrica, com o teste de Kruskal-Wallis (SCHNEIDER et al., 2009).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ALTURA DE PLANTA

Os dados de altura de planta foram, em um primeiro momento, submetidos ao teste de Bartlett, para verificação da homogeneidade da variância e ao teste de Shapiro-Wilk, para verificação da normalidade. O teste de Bartlett mostrou haver homogeneidade de variância, pois  $\chi^2_{calculado}$  (9,51426) foi menor que o  $\chi^2_{tabelado}$ (20,09016), sendo  $p < 0,05$ . O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os dados possuem normalidade ( $W = 0,97180$ ), já que p-valor (0,64982) é maior que o nível de significância (0,05).

Os resultados da ANOVA da altura de plantas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - ANOVA da altura (cm) média de plantas.

FV	GL	SQ	QM	F
Fator 1	2	3965,68519	1982,84259	20,5417**
Fator 2	2	437,62963	218,81481	2,2669ns
Interação F1xF2	4	678,81481	169,70370	1,7581ns
Tratamentos	8	5082,12963	635,26620	6,5812**
Resíduo	18	1737,50000	96,52778	
Total	26	6819,62963		

Fv: fonte de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística do teste F.

Fator 1 = Forma de inoculação.

Fator 2 = Zonas de relevo.

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ).

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ).

ns = não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

A forma de inoculação (Fator 1) apresentou significância, ao nível de 1% de probabilidade de erro (Tabela 3). Já a diferença na altura das plantas entre as zonas de relevo (Fator 2) não apresentou significância ( $p \geq 0,05$ ), bem como não foi observada interação entre os fatores ( $p \geq 0,05$ ).

Na Tabela 4 são apresentados os valores médios da altura de planta (cm) entre as diferentes formas de inoculação e zonas de relevo.

Tabela 4 – Altura (cm) média de planta nas diferentes formas de inoculação e zonas de relevo.

Fator	Tratamento	Altura de planta (cm)
Fator 1	Inoculação direta na semente	236,05 a
	Inoculação dirigida no sulco	229,00 a
	Sem inoculação	207,55 b
Fator 2	Zona de maior altitude	228,28 a
	Zona de média altitude	225,61 a
	Zona de baixa altitude	218,72 a

Fator 1 = Forma de inoculação.

Fator 2 = Zona de relevo.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, dentro do mesmo fator.

Pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), as formas de inoculação (direta na semente e a dirigida no sulco) apresentaram resultados estatisticamente iguais, mas superiores à não realização da prática da inoculação (testemunha).

A semeadura mecanizada do híbrido Velox TL<sup>®</sup> de ciclo super precoce submetido às condições edafoclimáticas de Cruzeiro do Sul (RS) e mediante a inoculação das sementes com *A. brasilense*, tanto por meio do método de aplicação dirigida no sulco, como pelo tratamento de sementes, propiciaram maior estatura das plantas na fase de maturação dos grãos do que nas plantas em que não se adotou a inoculação. Assim, pode-se inferir que tanto o genótipo cultivado, como a metodologia de aplicação do inoculante e as condições edafoclimáticas foram propícias ao crescimento das plantas em altura.

Resultado semelhante foi obtido por Quadros et al. (2014), que inocularam sementes de milho com *A. brasilense* e realizaram semeadura manual em Eldorado do Sul (RS), porém, com o emprego de máquina manual (saraquá) para semeadura. Os autores atribuíram à inoculação o aumento do teor relativo de clorofila e o rendimento da matéria seca da parte aérea dos híbridos AS 1575 e SHS 5050, do peso de 1000 grãos do híbrido P32R48 e da estatura de planta do híbrido AS 1575.

Entretanto, Mello (2012) não verificou influência da inoculação de *A. brasilense* na estatura de plantas de milho na fase de maturação dos grãos em cultivo em Passo Fundo (RS). Segundo o autor, o resultado foi influenciado pelas doses de N.

É importante salientar que o presente trabalho realizou a semeadura mecanizada, condição experimental que favorece a celeridade do processo de

implantação, bem como pode ter propiciado condições térmicas mais favoráveis e de proteção das bactérias endofíticas contra os raios ultravioleta, sendo indiferente se as sementes foram inoculadas pelo método tradicional ou dirigido no sulco.

#### 4.2 NÚMERO DE GRÃOS POR PLANTA

Para a variável número de grãos por planta, que não apresentaram dados com homogeneidade de variâncias e normalidade, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação de média por postos (estatística não paramétrica). Os resultados estão dispostos na Tabela 5, onde não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos para o número de grãos por planta. Porém, foi observada uma tendência de se manter uma média dos postos mais elevadas com a inoculação de *Azospirillum brasilense*.

Tabela 5 - Comparação de médias para o número de grãos por planta nas diferentes formas de inoculação.

<b>Tratamento</b>	<b>Soma dos postos</b>	<b>Média dos postos</b>
Inoculação direta na semente	153,5000	17,0556 a
Inoculação dirigida no sulco	137,0000	15,2222 a
Sem inoculação	87,5000	9,7222 a

Médias dos postos seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Segundo Bento (2006), a produção de grãos da cultura do milho está relacionada diretamente a uma série de caracteres, os denominados componentes da produção. Compreendem esses componentes: prolificidade ou número de espigas por planta, peso médio do grão, número de fileiras de grãos na espiga e número de grãos por fileira, comprimento e profundidade de grãos, este último referindo-se à diferença entre os valores dos diâmetros da espiga e do sabugo.

Corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho, em que não foi encontrada diferença entre os tratamentos com e sem inoculação, Salomone e Döbereiner (1996), avaliando diferentes genótipos de milho inoculados com *Azospirillum*, obtiveram respostas diferenciadas da inoculação sobre a

produtividade, destacando que existem variações nas interações entre os genótipos de milho e as bactérias diazotróficas.

Os benefícios do uso de *Azospirillum* em milho foram demonstrados em pesquisa realizada pela Embrapa no Cerrado, que concluiu que a utilização da bactéria promoveu um acréscimo substancial na produtividade do milho, quando se aplicou também a dose recomendada de N, de 100 kg ha<sup>-1</sup>, resultando em um aumento de 20% na produtividade (REIS JÚNIOR et al., 2008).

Segundo Repke (2013), a aplicação da bactéria diazotrófica *A. brasilense* via solução nas sementes, acompanhada ou não de doses de nitrogênio sintético, não interfere no desenvolvimento das plantas e na produtividade da cultura do milho, e também a inoculação da bactéria diazotrófica *A. brasilense* não interfere na expressão dos efeitos da adubação com N sintético na cultura do milho.

#### 4.3 DIÂMETRO DO COLMO

O teste de Bartlett mostrou haver homogeneidade de variância, pois  $\chi^2_{calculado}(7,70425)$  foi menor que o  $\chi^2_{tabulado}(15,50731)$ , sendo  $p < 0,05$ . O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os dados possuem normalidade ( $W = 0,92815$ ), já que o p-valor (0,06225) é maior que o nível de significância (0,05).

Os resultados da ANOVA do diâmetro do colmo estão na Tabela 6.

Tabela 6 - ANOVA do diâmetro (cm) médio do colmo de plantas.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Fator 1	2	1,50889	0,75444	1,6521ns
Fator 2	2	3,56222	1,78111	3,9002*
Interação F1xF2	4	0,87556	0,21889	0,4793ns
Tratamentos	8	5,94667	0,74333	1,6277ns
Resíduo	18	8,22000	0,45667	
Total	26	14,16667		

Fv: fonte de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística do teste F.

Fator 1 = Forma de inoculação.

Fator 2 = Zona de relevo.

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ).

ns = não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

Não houve significância no Fator 1 (formas de inoculação) em relação diâmetro do colmo, bem como não houve interação entre os fatores ( $p \geq 0,05$ ), conforme a Tabela 6. Apenas houve significância para o Fator 2 (zonas de relevo).

Na Tabela 7 são apresentados os valores do diâmetro médio do colmo das plantas entre as diferentes formas de inoculação e zonas de relevo. Pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), na comparação entre as zonas de relevo, o diâmetro do colmo foi estatisticamente superior na zona de média altitude, em comparação à zona de baixa altitude. Os resultados indicam que a inoculação de *A. brasilense*, independentemente do método de aplicação, não interferiu no diâmetro médio final do colmo das plantas de milho híbrido Velox TL<sup>®</sup>.

Tabela 7 - Diâmetro médio do colmo (cm) entre as diferentes formas de inoculação e zonas de relevo.

Fator	Tratamento	Diâmetro do colmo
		----- cm -----
Fator 1	Inoculação direta na semente	8,17 a
	Inoculação dirigida no sulco	8,42 a
	Sem inoculação	7,84 a
Fator 2	Zona de maior altitude	8,17 ab
	Zona de média altitude	8,58 a
	Zona de baixa altitude	7,69 b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, dentro do mesmo fator.

Nakao et al. (2014) também não verificaram influência da aplicação de *A. brasilense* no diâmetro do colmo do sorgo granífero em diferentes estádios de desenvolvimento. Contudo, a concentração de inoculante afetou esse parâmetro, bem como houve interação entre os estádios de aplicação e as concentrações.

As bactérias diazotróficas *Azospirillum* spp. têm a capacidade de colonizar, além do sistema radicular, também o colmo das gramíneas (SIQUEIRA e FRANCO, 1988). Mendonça et al. (2006) observaram que estas bactérias se localizam mais frequentemente nas raízes, seguida pelos colmos e folhas de milho. Possivelmente, nas condições experimentais do presente trabalho, não tenha ocorrido a colonização dos colmos das plantas em níveis suficientes para alterar significativamente a morfologia. No entanto, o diâmetro do colmo não está necessariamente relacionado à produção final de grãos, como evidenciado no trabalho de Nakao et al. (2014), em

que as BPCP proporcionaram o aumento da produtividade de grãos sem, contudo, alterarem o diâmetro do colmo do sorgo granífero.

#### 4.4 MATÉRIA SECA DA PLANTA

Em relação aos dados da matéria seca da parte aérea de planta, o teste de Bartlett mostrou haver homogeneidade de variância, pois  $\chi^2_{calculado}(2,63518)$  foi menor do que o  $\chi^2_{tabulado}(5,99148)$ , sendo  $p < 0,05$ . O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os dados possuem normalidade ( $W = 0,90220$ ), já que p-valor ( $0,26501$ ) é maior que o nível de significância ( $0,05$ ).

Os resultados da ANOVA da matéria seca da parte aérea de planta estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - ANOVA da matéria seca da parte aérea das plantas (g).

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamentos	2	13107,05609	6553,52804	2,4231ns
Resíduo	6	16227,48120	2704,58020	
Total	8	29334,53729		

Fv: fonte de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística do teste F.

ns = não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

Já em relação aos dados da matéria seca das raízes de planta, o teste de Bartlett mostrou haver homogeneidade de variância, pois  $\chi^2_{calculado}(0,40863)$  foi menor que o  $\chi^2_{tabulado}(5,99148)$ , sendo  $p < 0,05$ . O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os dados possuem normalidade ( $W = 0,93825$ ), já que p-valor ( $0,56358$ ) é maior que o nível de significância ( $0,05$ ).

Os resultados da ANOVA da matéria seca das raízes de planta estão apresentados na Tabela 9.



Tabela 9 - ANOVA da matéria seca das raízes das plantas (g).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	328,33047	164,16523	0,3117ns
Resíduo	6	3160,23453	526,70576	
Total	8	3488,56500		

Fv: fonte de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística do teste F.

ns = não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

Sobre os dados obtidos de matéria seca total da planta (parte aérea + raízes), o teste de Bartlett mostrou haver homogeneidade de variância, pois  $\chi^2_{calculado}(1,00433)$  foi menor que o  $\chi^2_{tabelado}(5,99148)$ , sendo  $p < 0,05$ . O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os dados possuem normalidade ( $W = 0,90220$ ), já que p-valor (0,26501) é maior que o nível de significância (0,05).

Os resultados da ANOVA da matéria seca total das plantas são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - ANOVA da matéria seca total das plantas (g).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	17066,86882	8533,43441	1,9503ns
Resíduo	6	26252,40700	4375,40117	
Total	8	43319,27582		

Fv: fonte de variação; GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: estatística do teste F.

ns = não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

Pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), na comparação entre as diferentes formas de inoculação, não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos sobre a produção de matéria seca da parte aérea, raízes e total pelas plantas (Tabela 11).

Tabela 11 - Produção de matéria seca das plantas nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Parte aérea	Raízes	Total
	----- g -----		
Inoculação direta na semente	311,64 a	101,60 a	413,24 a
Inoculação dirigida no sulco	309,72 a	108,49 a	418,20 a
Sem inoculação	229,74 a	93,70 a	323,44 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Apesar de não haver diferença estatística entre os tratamentos, houve uma tendência de incremento na matéria seca total das plantas de milho, tanto na parte área, como na raiz (Tabela 11) nos tratamentos com inoculação. O mesmo ocorreu com o número de grãos por planta (Tabela 5), que apesar de não ser detectada diferença estatística significativa, os tratamentos com inoculação proporcionaram uma tendência de maior produção do que pelas plantas da testemunha (sem inoculação). Se estes dados fossem extrapolados para a produção de uma lavoura, possivelmente se tornariam economicamente importantes. Além disso, a automatização da inoculação (dirigida no sulco) proporciona um acondicionamento favorável para a manutenção da viabilidade das BPCP e a dinamização dos processos de aplicação destes insumos (DENARDIN, 2006; PINHEIRO et al., 2013), podendo ainda congrega a aplicação de outros insumos biológicos, contribuindo assim para uma agricultura mais eficiente e com menor impacto ambiental.

Neste sentido, Miguel et al. (2016) afirmam que a viabilidade do uso de inoculantes na cultura do milho não deve ser apenas avaliada pela produtividade física, devendo ser agregada a análise econômica, porque estas variáveis são fundamentais à tomada de decisão de produtores e técnicos.

Também é importante assinalar que a tendência no mercado de semeadoras é por máquinas maiores, sem os sistemas de adubação (caixa para adubo), para otimizar a semeadura, tornando os equipamentos mais leves e seguindo a adubação sistêmica, na qual a área é adubada a taxa variável uma vez por ano, aplicando-se o fertilizante em uma operação separada ao da semeadura. Seria importante que as empresas fabricantes dessas máquinas também oferecessem equipamentos que efetuassem o plantio concomitantemente com a inoculação no sulco de semeadura, para que seja feita não apenas a inoculação ou co-inoculação, mas sim a aplicação de insumos biológicos no momento da semeadura.

## 5. CONCLUSÕES

A inoculação da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*, tanto no tratamento dirigido no sulco, como no tratamento das sementes de milho do híbrido Velox TL<sup>®</sup>, submetido às condições edafoclimáticas de Cruzeiro do Sul (RS), proporcionou maior altura média final das plantas, quando comparadas ao manejo tradicional, sem a utilização de inoculação das sementes.

A variável diâmetro do colmo foi influenciada pela posição no relevo, que apresentou maior tamanho na zona de média altitude, demonstrando a importância da agricultura de precisão, ao não considerar as áreas como sendo homogêneas.

## REFERÊNCIAS

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

AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; FERNANDES, S. B. V. **Leguminosas e adubação mineral como fontes de nitrogênio para o milho em sistemas de preparo do solo**. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 179-189, 2000.

ANDREOTE, F.D. et al. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.

BALASTREIRE, L. A. Avaliação do desempenho de um sistema de georreferenciamento portátil de baixo custo para Agricultura de Precisão. In: AVANÇOS NA AGRICULTURA DE PRECISÃO NO BRASIL NO PERÍODO DE 1999-2001, 2001, Piracicaba, SP. **Anais...**Piracicaba, SP: 2001. p. 282-284.

BARBER, S. A. **Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach**. 2<sup>nd</sup>ed, New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995. 414p.

BENTO, D. A. V. **Mapeamento de QTLs para produção de grãos e seus componentes em uma população de milho tropical**. 133f. 2006. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**. Philadelphia, v. 48, n. 1-3, p. 154-163, 2009.

CANTARELLA, H.; MONTEZANO, F. Z. Nitrogênio e Enxofre. In: PROCHNOW, L. I.; CASARIN, V.; STRIPP, S. R. (Ed.). **Boas práticas para o uso eficiente de fertilizantes**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, v. 2, 2010. p. 5-46.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO (CQFS – RS/SC). SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10. ed., Porto Alegre: SBCS, 2004. 394 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.; SALAMONE, I. G. (Ed.) ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 87-95.

CRUZ, J. C. et al. Resposta de cultivares de milho à variação em espaçamento e densidade. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 1, p. 60-73, 2007.

CRUZ, J. C.; MONTEIRO, J. A.; SANTANA, D. P. **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 1996. p. 15-20.

DALY, H. E. Crescimento sustentável? Não, obrigado. **Ambiente & Sociedade**, Campinas, ANPPAS, v. 7, n. 2, p. 197-201, 2004.

DENARDIN, N. D. Aplicação de inoculantes define sucesso da nodulação. **Visão Agrícola**, Piracicaba, USP/ESALQ, v. 5, p. 35-37, 2006.

DONATO, V. M. T. S. et al. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1087-1093, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v39n11/22580.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L.; MANFRON, P. A.; PALHARES, M.; VIEIRAJÚNIOR, P. A. População e distribuição espacial de plantas de milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (Org.) **Milho: estratégias de manejo para alta produtividade**. Piracicaba: ESALQ/USP/LPV, 2003. p. 116-133.

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

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. T. (Ed.) **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION**, 2, 1976, Pullman. **Proceedings...** Pullman: Washington State University Press, 1976. p. 518-538.

DURÃES, F. O. M. **Limitações fisiológicas do milho nas condições de plantio nas regiões tropicais baixas**. 2007. Disponível em: <[http://www.infobiboscom/artigos/2007\\_1/limitemilho/indez.htm](http://www.infobiboscom/artigos/2007_1/limitemilho/indez.htm)>. Acesso em: 14 mai. 2016.

EISLAHI, R. H.; OSMAN, A. G., SHERIF, A. M., ELHUSSEIN, A. A. Comparative study of the fungicide benomyl toxicity on some plant growth promoting bacteria and fungi in pure cultures. **Interdisciplinary Toxicology**, Bratislava, v. 7, p. 12-16, 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Indicações técnicas para o cultivo do milho e do sorgo no Rio Grande do Sul: safras 2013/2014 e 2014/2015**. EMYGDIO, B. M.; ROSA, A. P. S. A.; TEIXEIRA, M. C. C. (Ed.) Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2013. 124 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Principais herbicidas indicados para cultura de milho no sistema plantio direto e no**

**preparo convencional do solo.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do61\\_13.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do61_13.htm)>. Acesso em: 03 abr. 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Agência Embrapa de Informação Tecnológica (AGEITEC). **Zoneamento agrícola de risco climático: instrumento de gestão de risco utilizado pelo seguro agrícola do Brasil.** Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Zoneamento\\_agricola\\_000fl7v6vox02wyiv80ispcrruh04mek.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Zoneamento_agricola_000fl7v6vox02wyiv80ispcrruh04mek.pdf)>. Acesso em: 20 de jan. 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Sistema de produção Embrapa**, 2015. Disponível em: <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducaolf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-2&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaold=7905&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicold=8658](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=7905&p_r_p_-996514994_topicold=8658)>. Acesso em: 13 mai. 2016.

FALCÃO, V. R. **Aspectos moleculares de nitrato redutase da macroalga marinha *Gracilaria tenuistipitata* (RHODOPHYTA): sequenciamento do gene e estudo da expressão do RNA mensageiro.** 2006. 132f. Tese (Doutorado em Química) - Curso de Pós-graduação em Química, Universidade de São Paulo, SP.

FANCELLI, A. L. Estratégias de manejo para alta produtividade de milho no Brasil. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 113, p. 2-3, 2006.

FANCELLI, A. L. Milho: ambiente e produtividade. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (Ed.). **Milho: estratégias de manejo para alta produtividade.** Piracicaba: ESALQ/USP/LPV, 2003. p. 174-208.

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

FERLINI, H. A. Co-inoculación en soja (*Glycyne max*) con *Bradyrhizobium japonicum* *Azospirillum brasilense*. **Artículos Técnicos:** Agricultura, Chacabuco, 2006. Disponível em: <[http://www.engormix.com/co\\_inoculacion\\_soja\\_glycyne\\_s\\_articulos\\_800\\_AGR.htm](http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycyne_s_articulos_800_AGR.htm)>. Acesso em: 10 abr. 2016.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Fatores bióticos e abióticos à fixação do N<sub>2</sub>. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. (Org.). **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura.** Guaíba: AGROLIVROS, v. 1, 2008. p. 39-64.

FUKAMI, J., NOGUEIRA, M.A., ARAUJO, R.S., HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, Münster, v.6, n. 3, 13 p., 2016.

GALINAT, W. C. The origin of maize: grain of humanity. **New York Botanical Garden Journal**, New York, v. 44, p. 3-12, 1995.

GARCIA, J. C. et al. **Aspectos econômicos da produção e utilização do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2006.12 p. (Circular Técnica, 74).

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HAYNES, R.; GOH, K. M. Ammonium and nitrate of plants. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 53, p. 465-510, 1978.

HUERGO, L. F. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. (Ed.) ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Córdoba: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.17-28.

HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 251-283, 2013.

HUNGRIA M. et al. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, W.; NEWTON, W. E. (Ed.) **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 223-254.

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**, Crawley, v. 331, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soy bean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 6, p. 811-817, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Contém informações sobre a produção de milho brasileira**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>>. Acesso em: 26 jun. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Contém informações sobre o censo agropecuário 2006**. Disponível em: <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em: 10 mar. 2016.

KLUGKIST, J.; HAAKER, H.; WASSINK, H.; VEEGER, C. The catalytic activity of nitrogenase in intact *Azotobacter vinelandii* cells. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 146, p. 433-441, 1985.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MIGUEL, F. B.; BÁRBARO – TORNELI; I. M.; TICELLI, M. Estudo econômico da inoculação com *Azospirillum brasiliense* e da adubação nitrogenada em milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 31., p. 16-19, 2016, Bento Gonçalves. **Anais...** Disponível em: <[http://www.abms.org.br/cnms2016\\_trabalhos/docs/1065.pdf](http://www.abms.org.br/cnms2016_trabalhos/docs/1065.pdf)>. Acesso em: 14 mai. 2016.

MELLO, N. **Inoculação de *Azospirillum brasiliense* nas culturas de milho e trigo**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

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

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 808-811, 1990.

MOHIUDDIN, M.; MOHAMMED, M. K. Influence of fungicide (Carbendazim) and herbicides (2,4-D and Metribuzin) on non-target beneficial soil microorganisms of rhizospheric soil of tomato crop. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 5, n.1, p. 47-50, 2013.

MOLIN, J. P.; AMARAL, L. P.; COLAÇO, A. F. **Agricultura de Precisão**. 1ª ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2015. 224 p.

MOREIRA, F. S., SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora UFLA, Lavras, MG, Brasil, 2006. 729 p.

NAKAO, A. H. et al. Resposta do sorgo granífero à aplicação de diferentes doses e épocas de inoculante (*Azospirillum brasiliense*) via foliar. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 2702-2714, 2014.

OKON, Y; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **American Society of Microbiology News**, Washington, v. 63, n. 7, p. 364-370, 1997.

OLIVEIRA, S. A. Análise foliar. In: SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. p. 245-256.

PEREIRA, A. R.; ANGELOCCI, L. R.; SENTELHAS, P. C. (Ed). **Agrometeorologia: fundamentos e aplicações práticas**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 478 p.



PERRIG, D. et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 75, n. 5, p. 1143-1150, 2007.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, 1991. p. 179-197.

PINHEIRO, M. S. ; SOUZA, J. B.; FEITOSA, R. M. Resistência de estirpes de rizóbios isoladas do semiárido a elevadas temperaturas. In: CONGRESSO NACIONAL DO FEIJÃO CAUPI, 3., 2013, Recife. **Anais...** Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco, 2013, 4p. Disponível em: <<http://www.conac2012.org/resumos/pdf/216b.pdf>>. Acesso em: 14 mai. 2016.

QUADROS, P. D. et al. Desempenho agrônomo a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 2, p. 209-218, 2014.

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

REIS JÚNIOR, 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**, Viçosa, v. 28, p. 103-113, 2004.

REIS JÚNIOR, F. B. et al. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, Crawley, v. 210, p. 153-159, 2000.

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

REPKE, R. A. Eficiência da *Azospirillum brasilense* na fixação de nitrogênio em milho. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Agricultura, Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Disponível em: <[http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/86464/repke\\_ra\\_me\\_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/86464/repke_ra_me_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 13 set. 2016.

REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE MILHO. Indicações técnicas para o cultivo de milho e de sorgo no Rio Grande do Sul safras 2013/2014 e 2014/2015. In: EMYGDIO, B. M.; ROSA, A. P. S. A.; TEIXEIRA, M. C. C. (Ed.) **Reunião Técnica Anual de Milho, 58 e Reunião Técnica Anual de Sorgo**, 41., Brasília, 2013. 124p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/98253/1/livro-indicacoes-milho-sorgo.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2016.

SACHS, I. **Caminhos para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: Garamond, 2002. 96 p.

SALOMONE, I.E. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 23, p. 249-256, 1996.

SECRETARIA DO DESENVOLVIMENTO RURAL, PESCA E COOPERATIVISMO (SDR). **Contém informações sobre o financiamento de sementes de milho pelo Programa Estadual Troca Troca de Sementes do RS**. 2016. Disponível em: <<http://www.feaper.rs.gov.br/>>. Acesso em: 03 abr. 2016.

SCHNEIDER, P. R.; SCHNEIDER, P. S. P.; SOUZA, C. A. M. **Análise de regressão**: aplicação à engenharia florestal. 2. ed. Santa Maria: FACOS, 2009. 294 p.

SILVA, P. R. F.; ARGENTA, G.; REZERA, F. Resposta de híbridos de milho irrigado à densidade de plantas em três épocas de semeadura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 4, p. 585-592, 1999.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. A new version of the Assistat-statistical assistance software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., 2006, Orlando. **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006, p. 393-396.

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

SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. Adubação com nitrogênio. In: SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado**: correção do solo e adubação. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. p. 129-145.

SOUZA, P. M.; BRAGA, M. J. Aspectos econômicos da produção e comercialização do milho no Brasil. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). **Tecnologia de produção de milho**. Viçosa: UFV, 2004. p. 13-53.

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

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222p.

STROBEL, G. A.; DAIS, Y. B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **American Society of Microbiology News**, Washington, v. 67, p. 491-502, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J. A taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two

species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 967-980, 1978.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 3, p. 464-471, 2008.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 91, p. 127-141, 2001.

YANG, J. L. et al. Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 155, p. 1885-1892, 2011.