

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* NAS
CULTURAS DE MILHO E TRIGO

NAIANA DE MELLO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, fevereiro de 2012

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* NAS
CULTURAS DE MILHO E TRIGO**

NAIANA DE MELLO

**Orientador: Prof. Dr. Geraldo Luiz Chavarria Lamas Junior
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Alexandre Varella Escosteguy**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, fevereiro de 2012



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

ppgAgro

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

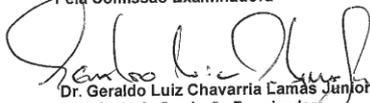
"Inoculação de *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio em milho e trigo"

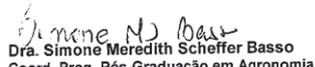
Elaborada por

NAIANA DE MELLO

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Agronomia – Área de Produção Vegetal

Aprovada em: 30/03/2012
Pela Comissão Examinadora


Dr. Geraldo Luiz Chavarria Lamas Junior
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia


Dr. Pedro Alexandre Varella Escosteguy
Coorientador
FAMV/UPF


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dr. Mauro Antonio Rizzardi
FAMV/UPF


Dr. José Pereira da Silva Junior
Embrapa Trigo

CIP – Catalogação na Publicação

M527i Mello, Naiana
Inoculação de azospirillum brasiliense nas culturas de
milho e trigo / Naiana Mello. – 2012.
90 f. : il. ; 25 cm.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Luiz Chavarria Lamas Junior.
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Alexandre Varella Escosteguy.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade
de Passo Fundo, 2012.

1. Milho - Rio Grande do Sul. 2. Trigo - Rio Grande do
Sul. 3. Nitrogênio – Fixação. 4. Plantas – Melhoramento
genético – Rio Grande do Sul. I. Lamas Júnior, Geraldo Luiz
Chavarria, orientador. II. Escosteguy, Pedro Alexandre
Varella, coorientador. III. Título.

CDU: 631.543

Catalogação: Bibliotecária Marciéli de Oliveira - CRB 10/2113

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade e pela força nos momentos de dificuldade que por muitas vezes foram enfrentados neste percurso.

Ao orientador Professor Geraldo e ao Co-orientador Professor Pedro, pelos ensinamentos e contribuição para realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, que não mediram esforços na implantação, colheita e avaliação dos experimentos.

Ao meu, sempre companheiro Oda, pela paciência nos meus momentos difíceis, pela ajuda nas avaliações em finais de semana e feriados, sacrificando seu descanso por mim.

A minha família pelo apoio e incentivo para continuar a caminhada de estudante.

A Cooperativa Agrícola Água Santa Ltda. pela liberação de muitos dias de trabalho para que eu pudesse me dedicar à continuação da minha formação, é imensurável a minha gratidão.

A todos meus amigos que me acompanharam nesta caminhada e me deram apoio e compreenderam as vezes que não pude participar das sociais.

Aos funcionários da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, pela ajuda e disposição.

E os meus agradecimentos até aqueles que se opuseram a esta caminhada, pois também destes tira-se a força de vontade de continuar e mostrar que tudo é possível.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
CAPÍTULO I.....	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	22
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4 CONCLUSÕES.....	44
CAPÍTULO II.....	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	47
1 INTRODUÇÃO.....	48
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICES.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Massa de espiga, em milho, híbridos DKB 245 e AG 8025 e adubação com doses de nitrogênio na safra 2010/2011, média com e sem inoculação, Passo Fundo, RS.....	29
2	Número de grãos por espiga, em milho, híbridos DKB 245 e AG 8025, com (CI) e sem (SI) inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação com doses de nitrogênio, na safra 2010/2011, Passo Fundo, RS.....	30
3	Número de linhas por espiga, em milho, híbridos DKB 245 e AG 8025, com (CI) e sem (SI) inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação com doses de nitrogênio, na safra 2010/2011, Passo Fundo, RS.....	31
4	Rendimento de grãos em milho, híbridos DKB 245 e AG 8025, com (CI) e sem (SI) inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação com doses de nitrogênio, na safra 2010/2011, Passo Fundo, RS.....	33
5	Teor de clorofila nas folhas (A), diâmetro da espiga (B), comprimento da espiga (C), massa da espiga (D), número de grãos por espiga (E) e rendimento de grãos (F) de milho, média dos híbridos DKB 245 e AG 8025 com e sem inoculante em função de doses de nitrogênio em cobertura, na safra 2009/2010, Passo Fundo, RS.....	36
6	Teor de clorofila nas folhas (A), diâmetro da espiga (B), comprimento da espiga (C) e massa de mil grãos (D) de milho, média dos híbridos DKB 245 e AG 8025 com e sem inoculante em função de doses de nitrogênio em cobertura, na safra 2010/2011, Passo Fundo, RS.....	38
7	Massa de mil grãos de milho, híbridos DKB 245 e AG 8025 na safra 2009/2010, média com e sem inoculação e diferentes doses de N em cobertura, Passo Fundo, RS.	40
8	Número de linhas por espiga em milho, híbridos DKB 245 e AG 8025 na safra 2009/2010, média com e sem inoculação e diferentes doses de N em cobertura, Passo Fundo, RS.....	41
1	Teor de clorofila nas folhas de trigo cultivar Marfim,	54

	com e sem inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação com doses de N, na safra 2011, Passo Fundo, RS.....	
2	Peso do hectolitro em trigo cultivar Marfim, com e sem inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação com doses de N, na safra 2010, Passo Fundo, RS.....	56
3	Peso do hectolitro em trigo cultivar Marfim, com e sem inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> e adubação com doses de N, na safra 2011, Passo Fundo, RS.....	57
4	Número de perfilhos (nº) por planta (A), estatura de planta (B), teor de clorofila nas folhas (C), massa de grãos por espiga (D), massa de mil grãos (E) e rendimento de grãos (F) de trigo cultivar Marfim em função de doses de N em cobertura na safra 2010, média com e sem inoculação, Passo Fundo, RS.....	59
5	Número de perfilhos (nº) por planta (A), estatura de planta (B), massa de grãos por espiga (C), massa de mil grãos (D) e rendimento de grãos (E) de trigo da cultivar Marfim em função de doses de N em cobertura na safra 2011, média com e sem inoculação, Passo Fundo, RS....	60

INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* NAS CULTURAS DE MILHO E TRIGO

Naiana de Mello¹

RESUMO - O objetivo do trabalho foi avaliar a contribuição da inoculação de *Azospirillum* sp. no rendimento de grãos e componentes do rendimento das culturas de milho e trigo, em associação com doses de nitrogênio em cobertura. Quatro experimentos foram conduzidos no Campo Experimental na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo. Para todos os experimentos foi utilizado delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições. Foram testados dois híbridos de milho e uma cultivar de trigo. Os tratamentos aplicados em milho foram com e sem inoculação e doses de nitrogênio (N) em cobertura (0, 60, 90, 150 e 180 kg N ha⁻¹). As variáveis avaliadas foram: teor de clorofila nas folhas, número de linhas e grãos por espiga, massa, comprimento e diâmetro da espiga, massa de mil grãos e rendimento de grãos. Em trigo os tratamentos foram com e sem inoculação e doses de N em cobertura (0, 30, 60, 90 e 120 kg N ha⁻¹). As variáveis analisadas foram número de perfilhos por planta, teor de clorofila nas folhas, estatura de planta, massa de grãos por espiga, massa de mil grãos, peso do hectolitro e rendimento de grãos. Em milho houve efeito da interação dos híbridos e doses de N em massa de espiga (safra

¹Engenheira Agrônoma, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração Produção Vegetal.

2010/2011) e dos híbridos, doses de N e inoculação em número de grãos e linhas por espiga e rendimento de grãos. Em trigo houve efeito da interação da inoculação e doses de N nas variáveis clorofila (safra 2011) e peso do hectolitro (safra 2010 e 2011). O fator inoculante teve efeito sobre rendimento de grãos de trigo na safra 2010. Com base nos dois anos de estudo em áreas diferentes conclui-se que a inoculação das estirpes de *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6 em sementes não influenciam o rendimento de grãos e nos componentes do rendimento de milho, híbridos DKB 245 e AG 8025 e trigo, cultivar Marfim.

Palavras-chave: *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., bactérias promotoras de crescimento, fixação assimbiótica de nitrogênio, rendimento de grãos.

Azospirillum sp. INOCULATION IN CORN AND WHEAT CROPS

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the contribution of inoculation with *Azospirillum* sp. on yield and yield components in wheat and corn in interaction with nitrogen levels. Four experiments were conducted in the field at Agronomy and Veterinary Medicine College, Passo Fundo University. For all experiments it was used an experimental design of randomized blocks with four replications. In the field, two corn hybrids and one cultivar of wheat were tested. In corn experiment the treatments were with and without inoculation and nitrogen (N) topdressing fertilization, 0, 60, 90, 150 and 180 kg N ha⁻¹ and the variables evaluated were: chlorophyll content in leaves, number of lines and grains per ear, ear weight, length and diameter, thousand-seed weight and yield. In wheat the treatments were with and without inoculation and nitrogen (N) topdressing fertilization, 0, 30, 60, 90 and 120 kg N ha⁻¹. The variables evaluated were number of tillers, chlorophyll content in leaves, plant height, grain weight per ear, thousand-seed weight, hectoliter weight and yield. In corn there were interaction between hybrids and N levels on ear weight (in 2010/2011) and triple interaction on number of lines and grains per ear and yield. In wheat, there were interaction between inoculation and N levels on chlorophyll content (in 2011) and hectoliter weight (in 2010 and 2011). Inoculation had effect on yield in 2010. According the results, seed inoculation with *Azospirillum brasilense* strains AbV5 AbV6 do not influence plant

growth and yield components of maize hybrids DKB 245 and AG 8025 and wheat cv. Marfim.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., growth-promoting bacteria, yield, biological nitrogen fixation.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas tecnologias conta com inúmeras alternativas que buscam substituir os sistemas agrícolas tradicionais que se baseiam no uso massivo de fertilizantes e agroquímicos em busca de maior produção e qualidade de produtos. O desenvolvimento e a adoção destas tecnologias visam aumentar a produção de alimentos sem que se aumentem os custos de produção, de maneira a ser viável e sem que ocorra agressão ao meio ambiente, sendo desta forma sustentável.

Porém, para alcançar altos rendimentos de grãos é necessário o uso de alguns recursos, um destes é o investimento na nutrição das plantas, de forma a suprir suas necessidades. Neste contexto, o nitrogênio (N) é um dos elementos necessários em maior quantidade para o funcionamento adequado das plantas, pois faz parte, por exemplo, de nucleosídeos de fosfato e aminoácidos, que compõe a estrutura dos ácidos nucléicos e das proteínas. É um dos nutrientes mais importantes, pois a maioria dos ecossistemas depois de serem fertilizados com N apresenta expressivos ganhos de produtividade (TAIZ & ZEIGER, 2004). É sem dúvida um limitante da produção, principalmente de gramíneas de alto rendimento de grãos, como o milho e o trigo.

Desta forma, o uso de fertilizante nitrogenado é uma prática comum e responsável por elevar os custos da produção agrícola, além de poder gerar danos ao ambiente, uma vez que parte do total aplicado é geralmente perdido. Calcula-se que a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados é em média 50%, devido à ação de processos como a lixiviação, volatilização de amônia,

desnitrificação, erosão e imobilização microbiana (REIS JUNIOR et al., 2010). Ao contrário, o N fornecido pelo processo de fixação biológica é menos propenso a lixiviação e volatilização já que ele é utilizado *in situ*, sendo assim, o processo biológico é uma alternativa barata, limpa e sustentável para o fornecimento de N na agricultura comercial (HUERGO, 2006).

A fixação biológica de nitrogênio, nada mais é que a conversão de N gasoso (N_2) em outras espécies químicas nitrogenadas promovidas por alguns organismos, que empregam o N fixado na biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos (NUNES et al., 2003). Para isso, existem rizobactérias, consideradas promotoras do crescimento de plantas, que proporcionam diversos benefícios devido às alterações que podem causar no metabolismo das mesmas (BURDMAN et al., 2000), dentre estes benefícios pode-se citar a fixação biológica de nitrogênio.

Foi principalmente no início da década de sessenta que bactérias diazotróficas associadas à rizosfera foram isoladas pelo grupo de pesquisa da Dr. Johana Dobreiner (BALDANI et al., 1997), e a partir daí intensificaram-se os estudos de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a outras espécies que não as leguminosas.

As bactérias fixadoras de N são encontradas na natureza na forma de vida livre ou em associação com plantas, e estão em geral amplamente distribuídas no solo (DIDONET et al., 2000). Existem inúmeras bactérias, chamadas diazotróficas, identificadas e capazes de fixarem N_2 e fornecê-lo às plantas através de associação, principalmente com raízes, às gramíneas. Todavia, as mais estudadas são as do gênero *Azospirillum*.

Os benefícios destas bactérias podem ser diretos e indiretos. Dos quais os primeiros são destacados o processo de fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios (sobretudo auxinas) e solubilização de fosfato inorgânico. Os benefícios indiretos estão relacionados à indução sistêmica de resistência a doenças, controle biológico e produção de compostos orgânicos que captam ferro (sideróforos) (DOBBELAERE & OKON, 2007).

A utilização em práticas agrícolas das bactérias do gênero *Azospirillum* está tornando-se relevante. A inoculação com a bactéria *Azospirillum* spp. tem sido alternativa para aumentar o rendimento de grãos de muitos cereais no campo em até 30%, e ainda maiores em condições controladas (BASHAN & HOLGUIN, 1997). No entanto, estes resultados têm sido difíceis para repetir. Os fatores responsáveis por essas irregularidades não foram ainda bem identificados, principalmente porque as características básicas da interações planta e *Azospirillum* não são bem compreendida (HOLGUIN et al., 1999).

Porém, apesar de diversos trabalhos de pesquisa serem realizados no sentido de aprimorar os conhecimentos em relação às bactérias diazotróficas, à fixação e contribuição de N para as culturas, esta tecnologia ainda não está consolidada entre os produtores, devido ao fato dos resultados obtidos serem ainda inconsistentes, existindo um debate sobre o real papel destas bactérias em relação às gramíneas.

O fato do uso de *Azospirillum* no campo ainda não gerar resultados totalmente positivos, dificulta sua adoção como técnica complementar à adubação de N. Isto provavelmente se deve a bactéria estar sujeita à diversidade de ambientes e tipos de competições inerentes as condições de solo e de planta (genótipo), tendo como

consequência uma maior ou menor atividade de fixação de N₂ pela bactéria (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

A hipótese deste trabalho é que a inoculação de sementes com as estirpes AbV5 e AbV6, da bactéria *Azospirillum brasilense* em sementes de trigo e de milho possa aumentar o rendimento de grãos em relação a plantas não inoculadas, ou ainda que a adubação nitrogenada possa, pelo menos em parte, ser substituída pela inoculação de sementes sem decréscimo no rendimento de grãos de grãos.

O objetivo do trabalho foi avaliar a contribuição da inoculação de *Azospirillum* sp. rendimento de grãos e componentes do rendimento das culturas do milho e trigo , em associação com doses de nitrogênio em cobertura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A principal fonte de N na natureza é a atmosfera constituída de aproximadamente 78% de N₂ (TAIZ & ZEIGER, 2004). Porém, segundo os mesmos autores, esta quantidade não está diretamente disponível aos seres vivos, precisando de fixação através de processo industrial ou natural. No solo o N encontra-se nas formas orgânicas (matéria orgânica e resíduos culturais), mineral (solução do solo e adsorvido a argilas) e gasosa (nos poros). As principais formas disponíveis são amônio (NH₄⁺) e nitrato (NO₃⁻). Este nutriente é extremamente limitante para o rendimento de grãos de gramíneas como o trigo e milho.

A reação de redução do N₂ atmosférico a amônia requer energia de ativação alta, e não ocorre espontaneamente. Na indústria o processo de fixação de N emprega como catalisador o ferro, temperaturas entre 300 a 500 °C e altas pressões. Na natureza alguns poucos microrganismos diazotróficos, ou fixadores de N tem a capacidade de reduzir o N₂ atmosférico à amônia, processo chamado de fixação biológica de N (FBN) (SILVA et al., 2004).

A fixação biológica de nitrogênio é a conversão de N₂ em outras espécies químicas nitrogenadas, promovida por alguns organismos, que empregam o N fixado na biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos (NUNES et al., 2003). A FBN representa a principal forma de fixar N₂ atmosférico em amônio, é ponto chave de ingresso do N molecular no ciclo biogeoquímico do nitrogênio (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Bactérias fixadoras de N são encontradas na natureza na forma de vida livre ou em associação com plantas, e estão em geral

amplamente distribuídas no solo (DIDONET et al., 2000). Alguns microrganismos fixadores de N podem ser citados por associarem-se as raízes das plantas como o gênero *Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Frankia*, *Burkholderia*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter* e *Azospirillum*.

Discute-se que de 30 a 90 % das amostras de solo coletadas no planeta contenham *A. brasilense* ou *A. lipoferum*. O potencial para uso na agricultura do gênero *Azospirillum* já foi bastante estudado, assim como sua ecofisiologia (KEFALOGIANNI & AGGELIS, 2002; BASHAN et al., 2004).

O gênero atualmente possui quatorze espécies identificadas: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (TARRAND et al., 1978); *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983); *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987); *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989); *A. largomobile* (DEKHILL et al., 1997); *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001); *A. oryzae* (XIE & YOKOTA, 2005); *A. melinis* (PENG et al., 2006); *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007a); *A. zae* (MEHNAZ et al., 2007b); *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008); *A. picis* (LIN et al., 2009) e *A. thiophilum* (LAVRINENKO et al., 2010).

As bactérias do gênero *Azospirillum* pertencem à subclasse α das Proteobactérias, são gram-negativas, espiraladas e estão presentes em todos os tipos de solo, possuem diâmetro de um micrômetro (μm) e o comprimento de 2,1 a 3,8 μm (SILVA et al., 2004), são curvas, móveis e de várias origens geográficas (HUERGO, 2006). Tem formato de bastonete, na maioria das vezes apresentam-se uniflageladas e com movimento vibratório característico. A temperatura ótima de crescimento varia entre 28 e 41°C, dependendo

da espécie (ECKERT et al., 2001). São aeróbicos típicos quando supridos com fonte de N combinado, e microaerofílicos quando crescem dependente da fixação de N₂ (DONZELI, 2002).

Segundo DOBEREINER (1992), as fontes de carbono de maior preferência pelo *Azospirillum* são ácidos orgânicos como o malato, piruvato, succinato, glicose e frutose. Já as fontes de nitrogênio advém de amônia, aminoácidos, nitrato e nitrito e nitrogênio atmosférico (N₂). Todavia, são microrganismos capazes de crescer utilizando o N atmosférico como fonte única de N (HUERGO, 2006). Algumas bactérias fixadoras de N₂ ocorrem na superfície de raízes, já as espécies do gênero *Azospirillum* podem ocorrer no interior das raízes, entre os espaços intercelulares ou até dentro de algumas células da raiz, como no protoxilema, que pode ser completamente preenchido pela bactéria (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). As bactérias diazotróficas *Azospirillum* sp. tem a capacidade de colonizar, além do sistema radicial, o colmo das gramíneas. Dentro das raízes a bactéria fica protegida dos estresses do solo, como competição com outros organismos, acidez do solo e deficiência de P (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). O fator intrínseco que determinará a maior mobilidade no solo e nas plantas será a presença de flagelos (DE WEERT et al., 2002).

Em relação ao pH do solo, destaca-se a exceção do gênero *Acetobacter* que é capaz de crescer em meio extremamente ácido (pH abaixo de 3,0). Contudo, as demais bactérias fixadoras de N₂ são pouco tolerantes a acidez, tanto no solo como nos meios de cultura (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

KAVADIA et al. (2008) demonstraram que altas concentrações de amônia (NH_3^+) e baixas concentrações de oxigênio e carbono inibem o complexo nitrogenase das bactérias do gênero *Azospirillum* reduzindo a sua população.

A grande importância da fixação biológica de N em gramíneas é a maior facilidade de aproveitamento de água das mesmas, em relação às leguminosas, pela maior eficiência fotossintética, estas apresentam sistema radicular fasciculado, tendo vantagens sobre o sistema pivotante das leguminosas, para extrair água e nutrientes do solo (CAMPOS et al., 2000).

Dependendo da espécie de gramínea a qual a bactéria esteja associada, o *Azospirillum* apresenta maior ou menor atividade de fixação de N_2 , a exemplo do que ocorre na simbiose das leguminosas com rizóbio (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Durante o ciclo vegetativo do milho e do sorgo a concentração de *Azospirillum* nas raízes e no solo é alta, ficando entre 10^{-6} e 10^{-7} células por grama de solo ou de raízes. Este aumento também é verificado no interior das raízes e coincide com o pico de fixação de N_2 (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). Sendo considerado o mínimo para níveis adequados de fixação de nitrogênio (DOBBELARE & OKON, 2007). Em trabalho realizado por Mendonça et al. (2006) observou-se que as bactérias se localizam mais frequentemente nas raízes, seguida pelos colmos e folhas de milho.

O sistema de fixação de N_2 pelo *Azospirillum*, assim como do *Azotobacter*, é predominantemente realizado através de associação, onde a fonte de energia são os exsudatos das raízes das plantas

hospedeiras, estimando-se que este tipo de fixação forneça entre 40 a 200 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹ (MARSCHNER, 1995).

Na inoculação de bactérias diazotróficas em sementes deve levar em consideração que estas estão amplamente distribuídas nos solos. Portanto, a inoculação à base de bactérias do gênero *Azospirillum* deve competir satisfatoriamente com as bactérias diazotróficas nativas e com a microflora do solo (DIDONET et al., 2000). A capacidade competitiva das bactérias diazotróficas com outras é alta somente quando as condições são de baixa disponibilidade de N no ambiente (SILVA et al., 2007). Em um trabalho desenvolvido com *Azospirillum brasilense* (SILVA et al., 2004), o efeito nas raízes de trigo e cevada foi observado em solo pobre em nutrientes.

Segundo Didonet (1993), é possível que os efeitos benéficos atribuídos à inoculação da planta com *Azospirillum* resultem da combinação de diferentes mecanismos que em conjunto desencadeiam vários fenômenos. Segundo o mesmo autor, as substâncias capazes de desencadear estes efeitos são os fitormônios, que como resultado final promovem o crescimento da planta.

Há produção de fitormônios por microrganismos, e alguns estudos já foram efetuados. Destaca-se a descoberta do fitormônio giberelina em plantas de arroz pelo ataque de fungos e o estímulo da produção deste fitormônio e alongamento em excesso das plantas (TAIZ & ZEIGER, 2004). Em relação ao gênero *Azospirillum* há estudos que demonstram a biossíntese de fitormônios, sobretudo auxinas, e este aspecto fitoestimulante pode favorecer o crescimento e o desenvolvimento das plantas (MARTÍNEZ-MORALES et al.,

2003). Bottini et al. (1989) citam a produção de pequenas quantidades de giberelinas e citocininas pela rizobactérias *Azospirillum* sp..

O balanço entre auxinas e citocininas na planta como um todo determina o maior crescimento da raiz ou parte aérea. Quando o balanço tende para maior concentração de auxinas há indução ao crescimento radicial, ao passo que, a maior concentração de citocininas favorece o crescimento da parte aérea (SPAEPEN et al., 2009). Deve ser destacado que o estímulo de biossíntese de auxinas nas raízes das plantas é de extrema relevância, pois este fitormônio se tratando de um composto que estimula a divisão e o crescimento celular, a área superficial de raízes pode aumentar e conseqüentemente a capacidade de absorção de água e nutrientes. Assim como, o incremento na tolerância ao déficit hídrico destas plantas inoculadas. Em testes com plântulas de milho foi observada promoção de raízes laterais e inibição da elongação das raízes. A aplicação exógena de auxina obteve massa seca média de raízes de 0,0379 g e com *Azospirillum brasilense* (UAP 154) 0,0658 g (MARTÍNEZ-MORALES et al., 2003).

O problema da salinização de lavouras pode ser mitigado pela utilização de *Azospirillum* sp. em função de seus efeitos sobre a tolerância ao estresse hídrico. Creus et al. (1998) observaram que plantas de trigo inoculadas sofreram menos com a salinidade quando inoculadas com *Azospirillum brasilense* sp245. Os autores enfatizam que os efeitos na tolerância a salinização não são obtidos em função de variação de potencial osmótico no interior das células, mas sim, pelo alongamento das raízes. Contudo, foi observado que o

Azospirillum restringe o influxo de sódio para as raízes através da produção de exopolissacarídeos (ASHRAF et al., 2004).

Poliaminas que são consideradas também compostos reguladores do crescimento, estão também relacionados diretamente ao crescimento radicial, como também, à osmorregulação. Resultados de pesquisa na Argentina indicam que a cadaverina, uma poliamina, incrementou o crescimento radicial e ajudou plântulas de arroz na redução do estresse hídrico baseado no aumento da absorção de água e também redução na biossíntese de ácido abscísico, estas tendo sua produção induzida pela inoculação de *Azospirillum brasilense* Az 39 (CASSÁN et al., 2009). Esta poliamina não pode ser considerada como único agente ou o maior fator de mudanças fisiológicas em plantas inoculadas com *Azospirillum* sp., todavia, é mais aspecto positivo associado à produção de fitormônios e fixação de nitrogênio (BASHAN et al., 2004).

Em trigo, a resposta à inoculação com *Azospirillum* é em grande parte creditada ao fitormônios, principalmente a auxina (DIDONET, 1993), devido a sua reconhecida ação na expansão das células vegetais. Segundo o mesmo autor, a inoculação de sementes de trigo com bactérias do gênero *Azospirillum* promoveu o crescimento das raízes, avaliado através do comprimento, peso da matéria fresca e número de raízes. Estes resultados podem ser atribuídos as substâncias que interferem no crescimento como auxinas e outros compostos. Segundo Didonet et al. (2000), mesmo não ocorrendo incremento em rendimento de grãos, de maneira em geral, têm ocorrido melhor uso dos fertilizantes, decorrente do maior desenvolvimento radicial nos

estádios iniciais de crescimento das plantas proporcionado pelas bactérias.

Em experimentos realizados, com a cultura do trigo, de 2002 a 2006, em 297 localidades na região dos Pampas argentinos (precipitação pluvial na faixa de 500-1.000 mm anuais) observou-se incremento no rendimento entre as médias dos locais estudados de 260 kg por hectare com utilização de inoculante líquido a base de *Azospirillum brasilense*. Os autores destacam que em 70% dos locais estudados houve incremento no rendimento (DÍAZ-ZORITA et al., 2009). Também enfatizaram correlação positiva entre os maiores rendimentos e maiores acúmulos de matéria seca na parte aérea e raízes, assim como, no número e peso do hectolitro de grãos.

O uso mais eficiente do N disponível promovido pela inoculação é refletido em maior índice de colheita para N, proporciona maior aproveitamento da biomassa em benefício dos grãos, em trigo, aumenta o índice de colheita e resulta em maior massa de mil grãos (DIDONET et al., 2000).

A inoculação modifica a morfologia do sistema radicial, incrementa além do número de radículas, o diâmetro das raízes laterais e adventícias, provavelmente devido à produção, pela bactéria, de substâncias promotoras do crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas, e não somente pela FBN (CAVALLET et al., 2000). Essa produção de fitormônios interfere no crescimento das plantas e altera a morfologia das raízes de modo que possibilite maior volume de exploração do solo.

As alterações morfológicas proporcionam a alongação da zona para formação de raízes, e promovem dessa maneira, aumento

total do tamanho da raiz e da planta e maior desenvolvimento (SILVA et al., 2004)

Segundo trabalho descrito por SILVA et al. (2004), com trigo e cevada, as plantas não apresentaram nodulação, mas ocorreu aumento na superfície das raízes, observando-se diferenças entre a densidade de raízes secundárias e o surgimento das principais. As secundárias em plantas inoculadas apresentaram menor número, no entanto, maior superfície de contato.

O incremento do sistema radicial em plantas inoculadas proporciona maior longevidade aos tecidos verdes, em consequência ocorre maior período de atividade fotossintética, o que resulta em quantidades maiores de fotoassimilados para os grãos ou para a própria assimilação de N, em relação às plantas não inoculadas (DIDONET et al., 2000).

Um dos efeitos da inoculação de *Azospirillum* é o aumento da absorção de nutrientes. Resultados obtidos por Didonet (1993) demonstraram que as raízes de plantas de trigo inoculadas apresentaram taxa mais elevada de excreção de prótons, resultando na queda de pH da rizosfera, devido a isso é associado a troca de prótons por cátions.

Em trabalho desenvolvido por Saikia et al. (2007), plantas inoculadas com *Azospirillum* apresentaram maior taxa de fotossíntese e maior condutância estomática, resultando em maior rendimento de grãos em comparação com plantas não inoculadas, assim como o teor de nutrientes nos grãos foi maior em plantas inoculadas.

Didonet et al. (2000), em experimento conduzido com trigo, concluíram que a inoculação proporciona translocação mais

eficiente da biomassa das plantas para os grãos, produzindo grãos com maior massa.

Devido ao processo de fixação biológica de N ser altamente oneroso para as células bacterianas, a adubação com N mineral sobre as bactérias fixadoras pode causar inibição do processo, com N disponível na forma mineral o complexo nitrogenase não é sintetizado e elas passam a utilizar o N disponível (SILVA et al., 2007). Devido à presença da nitrato redutase, a fixação de N_2 é prejudicada em altas concentrações de nitrato no solo ou na planta, o que desfavorece a complementação da fertilização nitrogenada com FBN (DOBEREINER, 1990).

Segundo Dobereiner (1990), assim como nas leguminosas, o efeito da inoculação de cereais com estas bactérias depende do estabelecimento destas sob condições de campo. Diferentes estirpes da bactéria *Azospirillum* comportam-se distintamente conforme sua adaptação às condições em que é mantida, apresentando melhor crescimento quando isoladas de uma mesma região e de uma mesma espécie daquela que será utilizada (DIDONET, 1993).

Dobereiner (1990) sugere que as diferenças entre genótipos de gramíneas na obtenção de N_2 pela fixação biológica, mostram grande potencial para a sua melhor exploração através do melhoramento vegetal. Para Reis Junior et al. (2004), a sustentabilidade nos sistemas de pastagens é dependente do manejo adequado, relacionado a escolha de plantas (genótipos), que além de serem adaptadas as condições edafoclimáticas existentes, seja eficiente na captação do N atmosférico.

Os fatores ambientais, principalmente o estresse hídrico, têm grande influência sobre a população de microrganismos diazotróficos do solo e sobre o processo de fixação biológica de N (REIS JUNIOR et al., 2004). Como constatado pelo autor, em *Brachiaria*, a distribuição dos microrganismos fixadores de N₂ sofreu influência de acordo com o período do ano.

A interação com outras bactérias é sinérgica nos efeitos benéficos a fisiologia das plantas. A literatura científica apresenta alguns trabalhos, onde a inoculação de *Azospirillum* associado ao *Rhizobium* mostrou efeito significativo sobre o número de nódulos, maior fixação de nitrogênio (caracterizado pelo incremento da redução do acetileno), maior teor de N mineral e macro e micronutrientes de maneira geral quando comparada a inoculação efetua somente com o *Rhizobium* (BURDMAN et al., 1998; RODELAS et al., 1999).

CAPÍTULO I

RENDIMENTO DE GRÃOS DE HÍBRIDOS DE MILHO INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense*

Naiana de Mello

RESUMO – O nitrogênio é um dos nutrientes o qual a aplicação tem maior resposta em rendimento de grãos de milho, mas não apenas nesta características, também em qualidade de grãos. Uma das alternativas para suprir parte do N necessário é o uso de inoculantes contendo bactérias do gênero *Azospirillum*, capazes, dentre outros benefícios, de fixarem nitrogênio atmosférico e fornecerem às plantas. Para avaliar a contribuição da inoculação da bactéria *Azospirillum brasilense* e diferentes doses de nitrogênio (N) no rendimento de grãos e nos componentes do rendimento da cultura do milho dois cultivos experimentais foram realizados nas safras 2009/2010 e 2010/2011 utilizando os híbridos DKB 245 e AG 8025. Os tratamentos foram: inoculação das sementes com *A. brasilense* (estirpe AbV5 e AbV6) e cinco doses de N em cobertura (0, 60, 90, 150 e 180 kg de N ha⁻¹). As variáveis avaliadas foram: teor de clorofila nas folhas, número de linhas e grãos por espiga, massa, comprimento e diâmetro da espiga, massa de mil grãos e rendimento. A adubação nitrogenada não apresentou diferenças significativas para número de linhas por espiga, em nenhuma das safras, e massa de mil grãos na safra 2009/2010. Entre os híbridos não houve diferença significativa, exceto para o conteúdo de clorofila total na safra 2009/2010, enquanto na safra

2010/2011, houve diferenças nas variáveis teor de clorofila nas folhas, comprimento de espiga e rendimento. A inoculação de sementes não foi significativa em nenhuma das safras e para nenhuma das variáveis estudadas. Houve interações de híbrido, inoculação e doses de nitrogênio no rendimento, número de linhas e grãos por espiga, e interação de híbridos e doses de nitrogênio para massa de espiga na safra 2010/2011. Com base nos dois anos de estudo em áreas diferentes conclui-se que a inoculação das estirpes de *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6 em sementes não influenciam o rendimento de grãos e os componentes do rendimento dos híbridos de milho DKB 245 e AG 8025.

Palavras-chave: *Zea mays* L., bactérias promotoras de crescimento, fixação assimbiótica de nitrogênio.

YIELD OF CORN HYBRIDS INOCULATED WITH
Azospirillum brasilense

ABSTRACT - To evaluate the contribution of bacteria as *Azospirillum brasilense* and different nitrogen (N) levels in yield and yield components two experimental crops were carried out in 2009/2010 and 2010/2011, in Passo Fundo, with corn hybrids DKB 245 and AG 8025. The treatments were: seed inoculation with *A. brasilense* (strain AbV5 and AbV6) and five nitrogen (N) topdressing fertilization (0, 60, 90, 150 and 180 kg N ha⁻¹). The variables evaluated were: chlorophyll content in leaves, number of lines and grains per ear, weight, ear length and diameter, thousand-seed weight and yield. Nitrogen fertilization did not show significant differences in both crops for number of lines per ear and thousand-seed weight in 2009/2010. There was no difference between the hybrids, except for the chlorophyll content in 2009/2010, moreover in 2010/2011 there were differences for chlorophyll content, ear length and yield. Seed inoculation was not significant in any crops and variables evaluated. There were interactions between hybrid, inoculation and nitrogen levels for number of lines and grains per ear and yield, and interaction between hybrids and nitrogen levels for mass of ear in 2010/2011. According to the results, seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, strains AbV5 AbV6, do not influence plant growth and yield components of corn, hybrids DKB 245 and AG 8025.

Key words: *Zea mays* L., growth-promoting bacteria, assymbiotic nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO

A cultura do milho no Brasil tem um forte impacto social e econômico, visto que são cultivados cerca de 13 milhões de hectares (safra 2009/2010) e a produção é de 56 milhões de toneladas (CONAB, 2012). É uma cultura que assim como as demais, o rendimento de grãos está sob dependência de fatores ambientais, fertilidade do solo e manejo.

Em relação à fertilidade do solo a adubação nitrogenada é um fator limitante para a maioria das culturas de importância econômica, especialmente a cultura do milho. O teor médio de nitrogênio de uma tonelada de grãos de milho é de 16 kg (CQFS-RS/SC, 2004). Segundo Moraes Sá et al. (2010), estudando a extração de nutrientes pela cultura em função de diferentes quantidade de palha na superfície, encontraram valores que variaram entre 239 a 271 kg de nitrogênio extraídos por hectare. O milho é altamente responsivo a esse nutriente, apresenta incrementos em várias características que influenciam no rendimento de grãos (OHLAND et al. 2005). Conforme comprovado por Melgar et al. (1991), o nitrogênio é um dos nutrientes que apresentam os maiores efeitos no rendimento de grãos do milho. A adubação nitrogenada influencia não só no rendimento de grãos, mas também a qualidade do produto em consequência do teor de proteína nos grãos (AMARAL FILHO et al., 2005).

A fixação biológica representa a principal forma de obtenção de N_2 atmosférico, representando um ponto importante de ingresso de N_2 no ciclo biogeoquímico do N (TAIZ & ZEIGER, 2004). Existem inúmeras bactérias, chamadas diazotróficas,

identificadas e capazes de fixarem N_2 e fornecê-lo às plantas através de associação, principalmente com raízes, às gramíneas. Sua utilização em práticas agrícolas está tornando-se relevante, visto que a adubação nitrogenada representa uma parcela importante dos custos de produção de culturas não-leguminosas. E parte do que é aplicado no solo é perdido do sistema solo-planta, o que resulta em impactos negativos ao ambiente, principalmente, através da contaminação de águas superficiais e subterrâneas por nitratos (REJESUS; HORNBAKER, 1999).

Uma destas bactérias é as do gênero *Azospirillum* que ocorrem no interior das raízes, entre os espaços intercelulares ou até dentro de algumas células da raiz (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). Estas bactérias são de vida livre e estão amplamente distribuídas no solo, e podem estabelecer associação com as plantas, promover seu crescimento e fornecer nitrogênio através da fixação biológica ou posteriormente através da sua mineralização (HUNGRIA, 2011).

Segundo Didonet (1993), provavelmente os efeitos benéficos atribuídos à inoculação da planta com *Azospirillum* resultem da combinação de diferentes mecanismos que em conjunto desencadeiam vários fenômenos. A inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum*, frequentemente, resultam em plantas mais saudáveis, mais produtivas, com maior capacidade fotossintética (BASHAN et al., 2004).

Estudos feitos com bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* revelaram a importância destes microrganismos, principalmente quando associados a gramíneas, por que podem fornecer parte do nitrogênio necessário ao desenvolvimento da planta,

através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Outro efeito é a produção de fitormônios que estimulam o crescimento das raízes, favorecendo assim, a absorção de nutrientes (BRASIL et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a contribuição da inoculação de *Azospirillum brasilense* no rendimento de grãos e componentes do rendimento da cultura do milho, em associação com diferentes doses de adubação nitrogenada.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Campo Experimental da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, no município de Passo Fundo, região do Planalto Médio do Rio Grande do Sul situada na latitude 28° 15' S, longitude 52° 24' W e 687 m acima do nível do mar, nas safras de 2009/2010 e 2010/2011.

O solo é classificado como Latossolo Vermelho distrófico húmico (STRECK et al., 2008), pertencente à unidade de mapeamento Passo Fundo do estado do Rio Grande do Sul. Os atributos químicos do solo estão descritos no Apêndice 13.

O clima da região é classificado por Köppen-George como subtropical Cfa (PEEL et al., 2007). A precipitação média anual é de 1.787 mm, a temperatura mínima é de 13,2°C, média de 17,5°C e máxima de 23,6°C (EMBRAPA TRIGO, 2012). As condições meteorológicas ocorridas durante a condução dos experimentos pode ser observadas nos Apêndices 1, 2 e 3 para a safra 2009/2010 e Apêndices 7, 8 e 9 para a safra 2010/2011.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com quatro repetições e os tratamentos foram dispostos em fatorial 2 x 2 x 5. Foram testados dois híbridos de milho, DKB 245 e AG 8025, escolhidos em função de ocuparem áreas comerciais na região e representarem dois genótipos diferentes como oportunidade de testar a especificidade das estirpes constituintes do inoculante. Os tratamentos aplicados foram com e sem inoculação nas sementes associadas a cinco doses de N em cobertura: 0, 60, 90, 150 e 180 kg N ha⁻¹, na forma de ureia divididas em duas aplicações, em igual quantidade, quando as plantas estavam com quatro e oito folhas expandidas. Estas doses de N foram escolhidas em função da necessidade média da cultura, levando em conta o teor de matéria orgânica do solo e expectativa de rendimento de grãos de 7.000 kg.ha⁻¹, posicionando doses acima e abaixo da necessidade.

O inoculante líquido utilizado foi a base de *Azospirillum brasilense* das estirpes AbV5 e AbV6, da empresa Stoller[®], marca MasterFix[®] L Gramíneas, na dose recomendada para a cultura do milho (100 mL ha⁻¹) (200 milhões de bactérias mL⁻¹ de produto comercial). O procedimento de inoculação foi realizado imediatamente antes da semeadura. Calculou-se a dose do inoculante líquido necessários para cada quilograma de sementes, com base na quantidade de sementes necessárias para implantação de um hectare, e a população de plantas indicada para os híbridos. A concentração de bactérias estimada foi de 286.700 bactérias por sementes. Além do inoculante foi adicionado 5 mL de água kg⁻¹ de sementes, como veículo. Foram tratados quatro kg de sementes, necessárias a implantação das parcelas com inoculação, adicionando a mistura de

inoculante e água, agitando as sementes para uniformizar a inoculação.

A semeadura do milho foi realizada manualmente, em resteva de aveia em ambas as safras, em parcelas de 5,4 x 5 m, com seis linhas, com espaçamento entre linhas de 0,9 m, com espaçamento entre plantas de 0,16 m, totalizando 70.000 plantas por hectare. As parcelas foram dispostas a um metro de distância entre si e os blocos a 2,5 m. A adubação de semeadura foi com a fórmula 2-20-20 (N-P-K), 200 kg ha⁻¹ (safra 2009/2010) e 300 kg ha⁻¹ (safra 2010/2011), conforme interpretação da análise de solo (Apêndice 13), expectativa de rendimento de grãos de 7.000 kg ha⁻¹ e de acordo com o Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFS-RS/SC, 2004).

Durante o desenvolvimento das plantas foi efetuado o controle das plantas daninhas e pragas, sempre que necessário (REUNIÃO..., 2009).

Foi avaliada leitura correspondente ao teor de clorofila na folha com um clorofilômetro da marca Konica Minolta, modelo SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development). A leitura foi feita no terço médio da folha abaixo da inserção da espiga no estágio R1, na escala de Ritchie et al. (1993).

A colheita foi realizada quando os grãos apresentavam aproximadamente 18% de umidade, na área útil da parcela, excluído a 1ª e a 6ª linhas e a bordadura de 0,5 m no início e no final da parcela. Foram escolhidas ao acaso 10 espigas de cada parcela para contagem do número de linhas e número de grãos por espiga, massa da espiga, medição do comprimento das espigas (distância entre o primeiro e o

último grão da linha mais longa) e diâmetro da espiga (medido através de um paquímetro digital da marca Panambra, modelo Pantec).

O restante das espigas da parcela foram trilhadas para obter a massa de grãos por parcela, corrigindo a umidade para 13% e extrapolando a massa para um hectare. Destes grãos também foi determinada a massa de mil através de contagem e pesagem.

Os resultados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância (F-teste) e as médias submetidas à análise de regressão, sendo escolhido o modelo significativo de menor grau.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado interação de híbridos e doses de nitrogênio na variável massa de espiga (safra 2010/2011) (Figura 1). Também houve efeito da interação de híbridos, doses de nitrogênio e inoculação das sementes nas variáveis: número de grãos por espiga, número de linhas por espiga e rendimento de grãos (safra 2010/2011) (Figuras 2, 3 e 4). As demais variáveis analisadas foram somente influenciadas pelos fatores isoladamente.

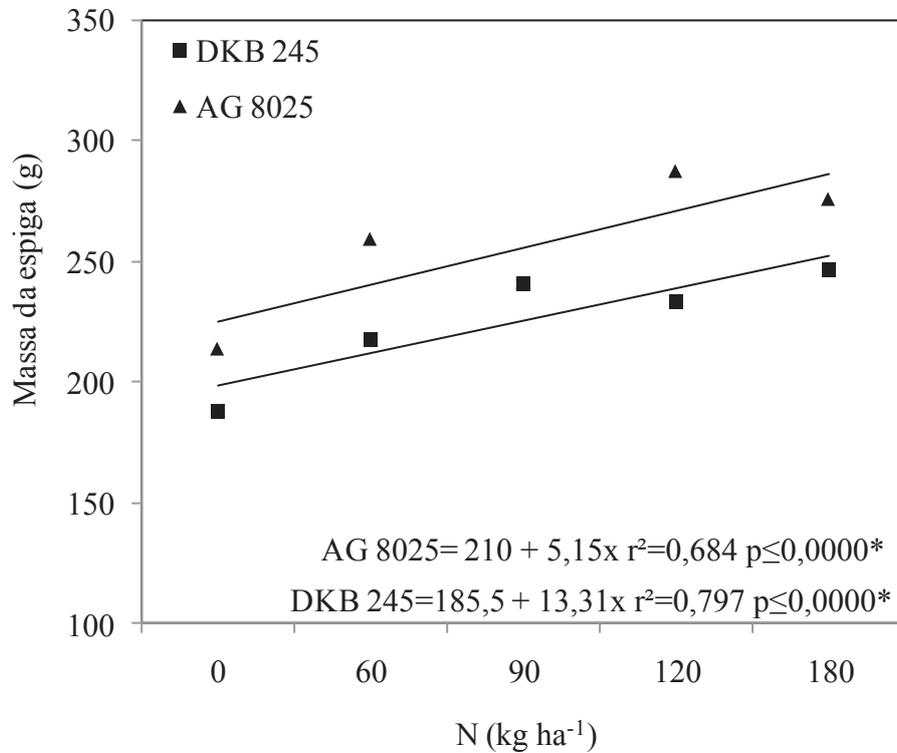


Figura 1 - Massa de espiga, em milho, híbridos DKB 245 e AG 8025 e adubação com doses de nitrogênio na safra 2010/2011, média com e sem inoculação, Passo Fundo, RS

Na safra 2009/2010 em massa de espiga, não houve interação dos fatores, mas houve diferença entre as doses de N (Figura 5 D), com ajuste da regressão linear, havendo incremento na massa da espiga em função do aumento das doses de N. Houve também diferença entre os híbridos. O híbrido DKB 245 a espiga apresentou 200 g de massa e o híbrido AG 8025 apresentou 177 g, na média entre as doses de N e com e sem inoculação.

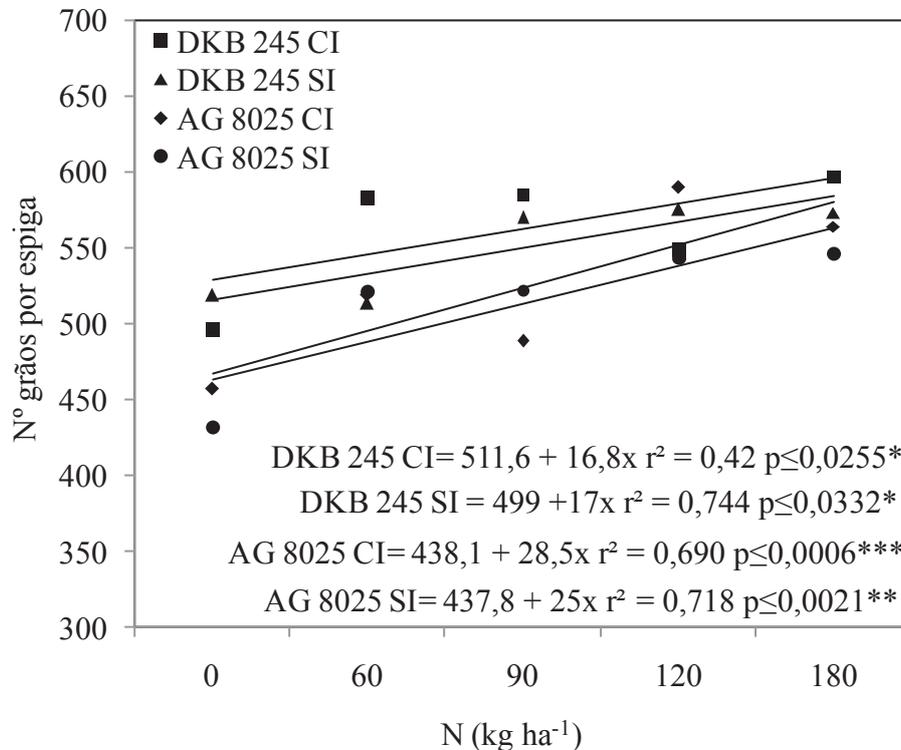


Figura 2 – Número de grãos por espiga, em milho, híbridos DKB 245 e AG 8025, com (CI) e sem (SI) inoculação de *Azospirillum brasilense* e adubação com doses de nitrogênio, na safra 2010/2011, Passo Fundo, RS

Na safra 2010/2011 houve interação entre híbridos e doses de nitrogênio em massa de espigas, ambos os híbridos responderam linearmente, com o aumento das doses de nitrogênio em cobertura (Figura 1). Também houve efeito das doses de nitrogênio, na dose de máxima as espigas pesaram 261 g e sem nitrogênio em cobertura as espigas pesaram 201 g. Houve diferença também entre os híbridos, no híbrido DKB 245 as espigas pesaram em média 225 g e no híbrido AG 8025 255 g. Segundo estudo desenvolvido por Ferreira et al. (2001),

além do rendimento de grãos ser positivamente influenciada pela adubação nitrogenada, a massa das espigas com e sem palha e a massa de mil grãos aumentaram de forma quadrática com o incremento das doses do adubo nitrogenado.

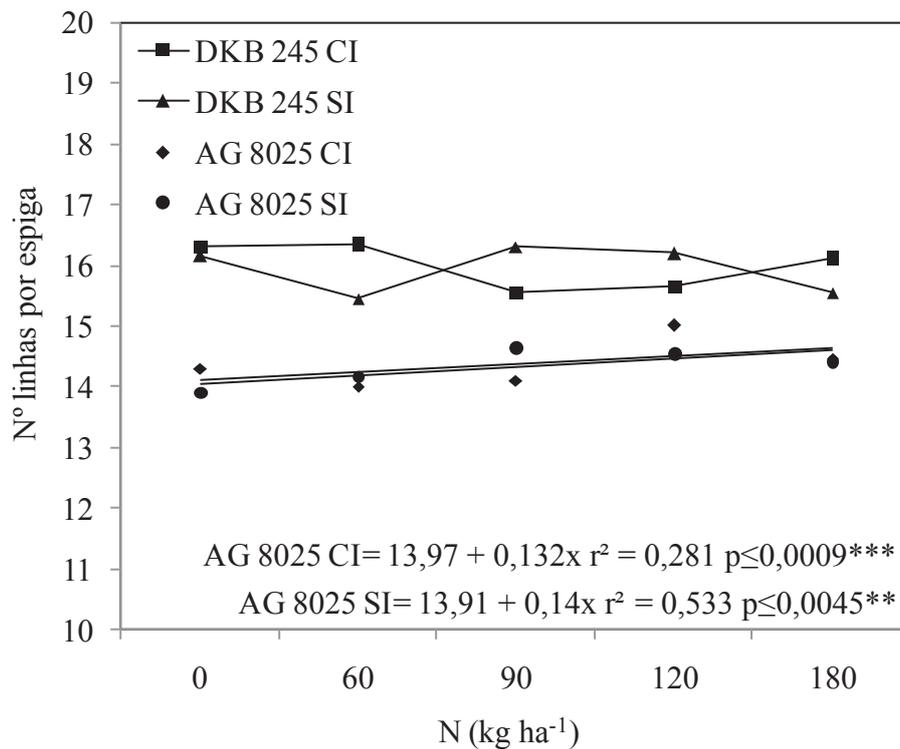


Figura 3 – Número de linhas por espiga, em milho, híbridos DKB 245 e AG 8025, com (CI) e sem (SI) inoculação de *Azospirillum brasilense* e adubação com doses de nitrogênio, na safra 2010/2011, Passo Fundo, RS.

Na safra 2009/2010, o número de grãos por espiga foi influenciado linearmente pelas doses de N, que aumentou em função deste fator (Figura 5E). Houve diferença entre híbridos, no híbrido

DKB 245 o número de grãos por espiga foi 470 grãos e no híbrido AG 8025 foi de 497 grãos, média entre doses de N e com e sem inoculação. Na safra 2010/2011 ocorreu interação da inoculação de sementes, híbridos e doses de nitrogênio (Figura 2), com ajuste linear, com aumento do número de grãos por espiga em função do aumento das doses de N. O que também ocorreu em trabalho desenvolvido por Amaral Filho et al. (2005), na dose de 150 kg de N ha⁻¹, independente do arranjo de plantas, o número de grãos por espiga foi superior a 500 (híbrido 9010).

Na safra 2009/2010, na avaliação de número de linhas por espiga houve diferença entre híbridos (Figura 8). O híbrido DKB 245 apresentou em média 14 linhas por espiga e o híbrido AG 8025 apresentou 16, na média com e sem inoculação e doses de N. Na safra 2010/2011 ocorreu interação dos fatores avaliados. Não houve ajuste da equação do híbrido DKB 245, ao contrário do híbrido AG 8025, que obteve ajuste da equação linear, com tendência de aumento do número de linhas em função do aumento das doses de N (Figura 3). A inoculação isoladamente não teve efeito sobre esta variável, o que também foi observado por CAVALLET et al. (2000).

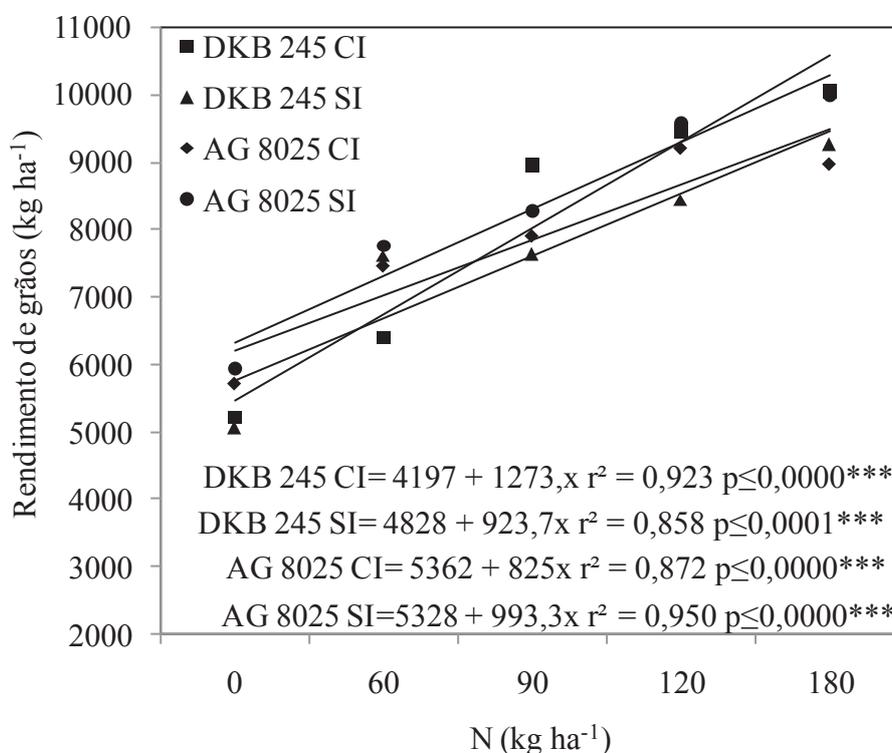


Figura 4 – Rendimento de grãos em milho, híbridos DKB 245 e AG 8025, com (CI) e sem (SI) inoculação de *Azospirillum brasilense* e adubação com doses de nitrogênio, na safra 2010/2011, Passo Fundo, RS

Com relação ao rendimento de grãos na safra 2009/2010 ocorreu diferença entre as doses de nitrogênio (Figura 5F), com ajuste linear, a produção foi positivamente influenciada pela adubação nitrogenada. Ocorreu diferença entre os híbridos, o DKB 245, em média, obteve rendimento de grãos de $10.753 \text{ kg ha}^{-1}$ e o híbrido AG 8025 foi de 9.432 kg ha^{-1} , média com e sem inoculação e diferentes doses de N. Na safra 2010/2011 ocorreu interação dos três fatores. Em ambos os híbridos, tanto quando inoculado quanto quando não

inoculado as doses crescentes de nitrogênio foram importantes para o incremento do rendimento, com ajuste linear das equações. O híbrido DKB 245, na dose de 90 e 120 kg N ha⁻¹ a inoculação teve efeito positivo em relação ao não inoculado. No híbrido AG 8025, o melhor desempenho aconteceu quando não inoculada as sementes (Figura 4).

Na safra 2009/2010 o teor de clorofila nas folhas indicou que somente o fator nitrogênio teve efeito nesta variável (Figura 5A), com aumento linear em função do incremento das doses de N. Da mesma forma, na safra 2010/2011, o teor de clorofila nas folhas também indicou que somente o fator nitrogênio teve efeito (Figura 6A), com ajuste linear, com o aumento do teor de clorofila nas folhas em função do aumento das doses de N. Não houve interação entre os fatores, nem diferença entre híbridos e efeito da inoculação, em ambas as safras. A clorofila é um importante parâmetro de absorção de nitrogênio, pois a sua molécula apresenta quatro átomos de nitrogênio no núcleo central, onde ocorre a absorção de radiação solar (TAIZ & ZEIGER, 2004). O teor de clorofila na folha é utilizado para prever o nível nutricional de nitrogênio em plantas, devido ao fato de a quantidade desse pigmento correlacionar-se positivamente com teor de N (BOOIJ et al., 2000). Este pigmento absorve radiação na faixa de 400 a 700 nm (exceto a faixa da cor verde), e está diretamente associada ao potencial de atividade fotossintética, assim como o estado nutricional das plantas está associado, geralmente, a quantidade e qualidade da clorofila (ZORATELI et al., 2002).

Jordão et al. (2010) observaram diferença significativa entre os tratamentos em relação ao teor de clorofila nas folhas no milho, medido com o clorofilômetro. As leituras médias do índice

SPAD nas folhas aumentaram linearmente com as doses do fertilizante nitrogenado aplicado. Estes mesmos autores concluíram que as médias de clorofila total de todos os tratamentos que receberam a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* foram maiores que os tratamentos não inoculados. Folhas bem nutridas de nitrogênio tem maior capacidade de assimilar CO₂ e sintetizar carboidratos durante a fotossíntese, resultando em maior acúmulo de biomassa e rendimento de grãos (FERREIRA et al., 1997).

Na safra 2009/2010, a diâmetro da espiga apresentou diferença em função das doses de nitrogênio (Figura 5B), porém não houve ajuste de equações em função da análise de regressão. Não houve diferença entre híbridos e nem efeito da inoculação. Na safra 2010/2011, o fator doses de N também influenciou na diâmetro da espiga (Figura 6B), com ajuste da equação linear, com aumento da diâmetro da espiga em função do aumento das doses de N. Nesta safra houve diferença entre os híbridos, o híbrido DKB 245 a espiga mediu em média 50 mm de diâmetro e o híbrido AG 8025 mediu 49 mm ($p \leq 0,0003$).

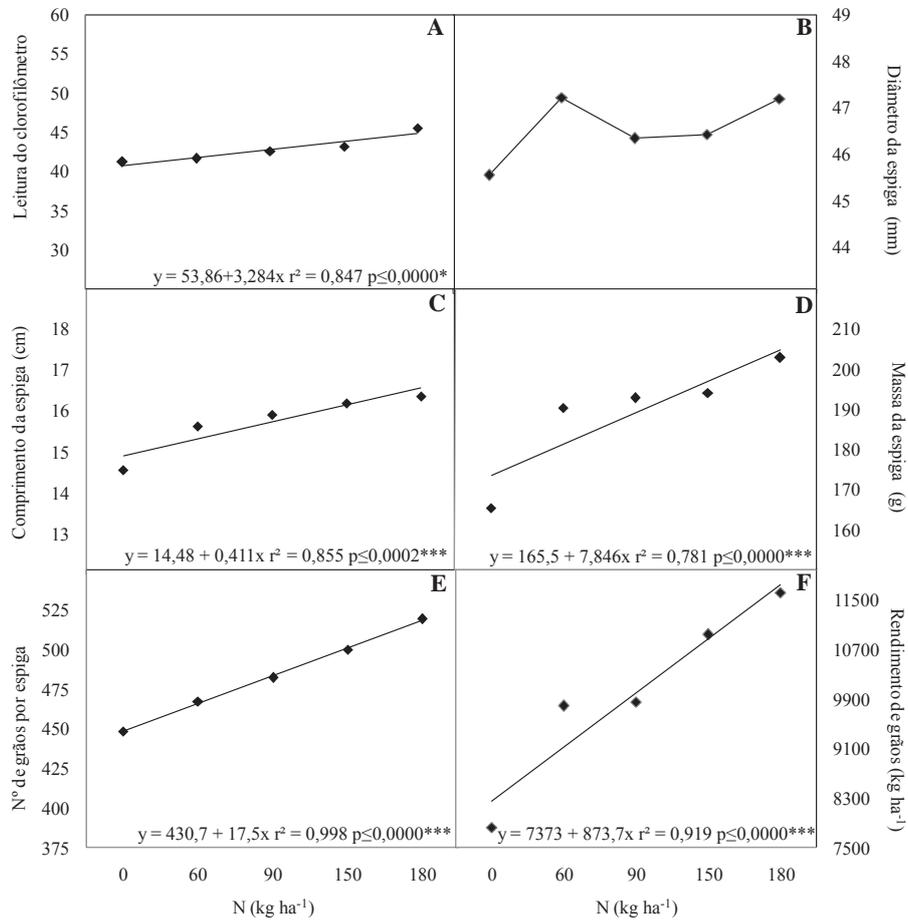


Figura 5 – Teor de clorofila nas folhas (A), diâmetro da espiga (B), comprimento da espiga (C), massa da espiga (D), número de grãos por espiga (E) e rendimento de grãos (F) de milho, média dos híbridos DKB 245 e AG 8025 com e sem inoculante em função de doses de nitrogênio em cobertura, na safra 2009/2010, Passo Fundo, RS.

O rendimento de grãos de milho é determinado por diversas variáveis, com destaque as relacionadas à espiga e às características dos grãos (LOPES et al., 2007). Estes autores destacam, principalmente, o número de grãos por planta e por unidade de área, e, em menor escala, pela massa do grão. Os autores também concluíram, que as relações entre as características de espigas são dependentes dos genótipos. Se levado em consideração estas conclusões, pode-se explicar o fato das diferenças observadas entre os híbridos nas seguintes variáveis relacionadas as características das espigas: diâmetro, comprimento e massa da espiga, número grãos, linhas por espiga, massa de mil grãos (Figuras 7 e 8).

Na safra 2009/2010, no comprimento de espiga houve efeito das doses de N (Figura 5C), com resposta positiva em relação ao aumento das doses de N, com ajuste linear da equação de regressão. Também houve diferenças em relação aos híbridos, sendo que as espigas do híbrido DKB 245 mediram em média 16,6 cm de comprimento e do híbrido AG 8025, 14,8 cm.

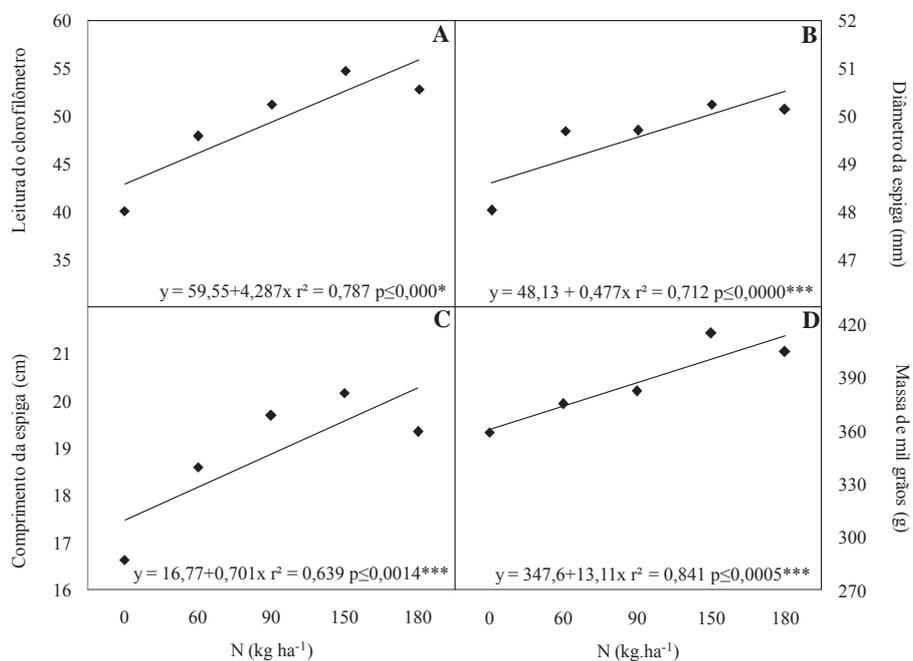


Figura 6 – Teor de clorofila nas folhas (A), diâmetro da espiga (B), comprimento da espiga (C) e massa de mil grãos (D) de milho, média dos híbridos DKB 245 e AG 8025 com e sem inoculante em função de doses de nitrogênio em cobertura, na safra 2010/2011, Passo Fundo, RS.

Na safra 2010/2011, houve diferença apenas entre as doses de N (Figura 6C), também com resposta linear em relação ao aumento das doses de N. Cavallet et al. (2000) utilizando a inoculação de um produto comercial (Graminante[®]) à base de *Azospirillum* spp. obtiveram como resultado um aumento médio de 6% no comprimento de espigas. Aumento este que não foi observado no presente trabalho (dados não apresentados).

Diferente dos resultados encontrados, em relação à inoculação, em experimentos de campo na Argentina, onde os milhos inoculados com *Azospirillum lipoferum* apresentaram o dobro dos grãos por espiga em comparação ao não inoculado, um aumento em 59% da massa seca de sementes, e um estímulo significativo no desenvolvimento das raízes (Fulchieri e Frioni 1994 apud BASHAN e HOLGUIN 1997).

A avaliação de massa de mil grãos foi significativa apenas para o fator híbrido na safra 2009/2010 (Figura 7). O híbrido DKB 245, apresentou massa de mil grãos de 354 g e o híbrido AG 8025 309 g, média com e sem inoculação e diferentes doses de N. Na safra 2010/2011 ocorreu diferença entre as doses de nitrogênio (Figura 6D), com aumento linear com o incremento das doses de N. Os híbridos também foram diferentes entre si, no híbrido DKB 245, a massa de mil grãos foi 349 g e no híbrido AG 8025 424 g, média com e sem inoculação e diferentes doses de N. Segundo estudos realizados por Ferreira et al. (1997) a massa de grãos foi a característica que mais se correlacionou positivamente com o rendimento de grãos. Enfatizando a importância desta variável na composição do rendimento de grãos.

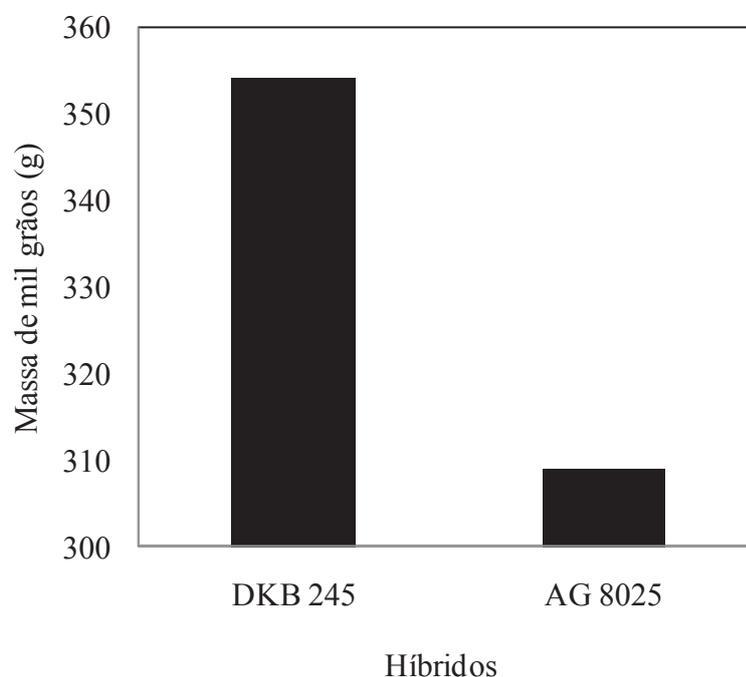


Figura 7 - Massa de mil grãos de milho, híbridos DKB 245 e AG 8025 na safra 2009/2010, média com e sem inoculação e diferentes doses de N em cobertura, Passo Fundo, RS.

Resultados positivos e negativos quanto ao uso da inoculação de *Azospirillum* podem ser atribuídos a alguns fatores já discutidos na literatura. Um estudo mostrou que a inoculação com a bactéria isolada não teve efeito no rendimento de matéria seca, mas quando houve combinação com nitrogênio a produção de matéria seca aumentou significativamente, também em relação ao uso isolado de nitrogênio (BASHAN & HOLGUIN, 1997). Também efeitos significativos no crescimento e produção das plantas de milho foram obtidos com uma combinação de bactérias indicando uma interação desconhecida ou talvez uma especificidade entre o genótipo da planta

e a estirpe bacteriana (BASHAN & HOLGUIN, 1997). Outro estudo foi realizado em sorgo por García-Olivares et al. (2006) testando diversas cepas de *A. brasilense* que observaram um incremento na biomassa de grãos quando utilizada a inoculação, segundo os autores houve diferenças significativas entre as cepas na produção de grãos, devido principalmente às condições ambientais variáveis durante a colonização de cada cepa, segundo eles a inconsistência de resultados se deve a diversos fatores que são difíceis de identificar.

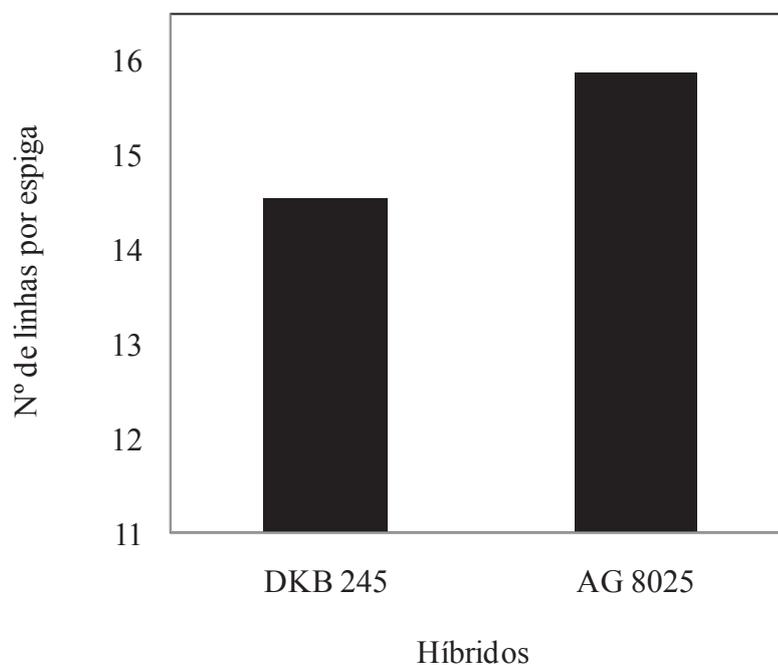


Figura 8 – Número de linhas por espiga em milho, híbridos DKB 245 e AG 8025 na safra 2009/2010, média com e sem inoculação e diferentes doses de N em cobertura, Passo Fundo, RS.

Em estudos realizados por Campos et al. (2000) na cultura do milho, testando inoculante à base de uma estirpe de *Azospirillum* sp., os autores observaram, que o produto testado não incrementou o rendimento de grãos. Estes resultados foram atribuídos a escolha da estirpe que não foi suficientemente eficiente, e destacam a necessidade de se buscar e testar estirpes adaptadas a cada região em termos de clima, sistema de manejo e cultivares.

Em um extenso estudo em um conjunto de nove ensaios realizados em Londrina e Ponta Grossa, sul do Brasil, com nove estirpes de *Azospirillum*, Hungria et al. (2010) concluíram que as cepas de *A. brasilense* AbV4, AbV5, AbV6 e AbV7 aumentaram o rendimento de grãos de milho de 662 a 823 kg ha⁻¹, 24 a 30%, em relação ao controle não inoculado. Em um segundo ensaio conjunto, com oito experimentos em Londrina e Ponta Grossa, com inoculantes a base de *A. brasilense*, as cepas AbV5 e AbV6 aumentaram o rendimento de milho em 26% (HUNGRIA et al., 2010). Os autores afirmam que os efeitos da inoculação foram atribuídos ao aumento geral da absorção de macro e micronutrientes e não especificamente a fixação biológica de nitrogênio. Também Cavallet et al. (2000) utilizando a inoculação de um produto comercial (Graminante[®]) à base de *Azospirillum* sp. teve como resultado um aumento significativo rendimento de grãos de milho de 17%.

Ainda, outro fator chave apresentado também para o sucesso da inoculação com *Azospirillum* é a escolha da estirpe bacteriana, embora, sem qualquer especificidade entre as espécies vegetais e estirpes bacterianas, foi demonstrado, alguma afinidade existe entre as bactérias e espécies de plantas (Penot et al. 1992 apud

HUNGRIA et al., 2010) ou mesmo cultivares (Wani et al. 1985 apud HUNGRIA et al., 2010). Efeito também demonstrado em um estudo realizado por Bergamaschi (2006) com diversos genótipos de sorgo que pode concluir que a distribuição de bactérias diazotróficas está em função do genótipo. No entanto outros dados publicados, mostram o contrário, estirpes de *Azospirillum* sem nenhuma preferência por espécies vegetais ou as ervas daninhas, ou anuais ou perenes, e pode ser aplicado com sucesso em plantas sem história prévia de *Azospirillum* em suas raízes, pois o *Azospirillum* é um colonizador geral de raízes e não é uma bactéria específica (BASHAN e HOLGUIN, 1997).

Porém, a imprevisibilidade dos resultados de inoculação, positivos e negativos, como o demonstrado por este trabalho, é o que tem limitado o uso comercial destes organismos como inoculantes na agricultura. Os possíveis fatores desta imprevisibilidade podem ser: a competitividade do inoculante com a população nativa de microrganismos, dificuldades na formulação de inoculantes (manutenção da viabilidade, alto número de células e estágio do crescimento), baixa sobrevivência das estirpes inoculadas nos diferentes solos, agentes microbianos adversos, especificidade do inoculante, entre outros (BASHAN e HOLGUIN, 1997). Com relação a sobrevivência das bactérias inoculadas, Bashan (1999) escreveu que em muitos casos (e às vezes em *Azospirillum* spp.), há uma diminuição geral na populações bacterianas após a inoculação do solo. Estas bactérias são provavelmente localizada em espaços mais abertos no solo do que as populações nativas. Lá, elas são afetadas em maior escala por fatores nutricionais e físico-químicos do solo. As bactérias

introduzidas, como *Azospirillum* spp., são afetadas por fatores de estresse mais do que as bactérias nativas, que estão adaptadas para tais condições. No entanto, ao contrário de muitas outras bactérias do solo, o *Azospirillum* spp. não é limitado pela adsorção nas partículas de solo, pois são capazes de mover-se através do solo para a plantas-alvo (BASHAN, 1999).

CONCLUSÃO

Com base nos dois anos de estudo em áreas diferentes conclui-se que a inoculação das estirpes de *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6 em sementes não influenciam o rendimento de grãos e os componentes do rendimento dos híbridos de milho DKB 245 e AG 8025.

CAPÍTULO II

RENDIMENTO DE GRÃOS DE TRIGO INOCULADO COM *Azospirillum brasilense*

Naiana de Mello

RESUMO - O nitrogênio é um fator limitante para o rendimento de grãos em cereais. Sua aplicação impacta nos custos de produção do trigo e por vezes, não atende as necessidades das plantas em relação à quantidade e momento de aplicação. Uma alternativa, a isso, é uso de inoculantes contendo bactérias capazes de fixarem N atmosférico e fornecerem às plantas. Dentre estas, se destacam as do gênero *Azospirillum*. O objetivo do trabalho foi avaliar a contribuição da inoculação de *Azospirillum brasilense* no rendimento de grãos e componentes do rendimento da cultura do trigo, em associação com doses de nitrogênio. Foram realizados dois cultivos experimentais, nas safras 2010 e 2011, no Campo Experimental da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo. Foi utilizada a cultivar de trigo Marfim e os tratamentos foram com e sem inoculação das sementes e cinco doses de N em cobertura (0, 30, 60, 90 e 120 kg de N ha⁻¹), na forma de ureia. O inoculante utilizado continha *Azospirillum brasilense* estirpe AbV5 e AbV6, na dose de 100 mL ha⁻¹. As variáveis analisadas foram número de perfilhos por planta, teor de clorofila nas folhas, estatura de planta, massa de grãos por espiga, massa de mil grãos, peso do hectolitro e rendimento de grãos. O peso do hectolitro (safras 2010 e 2011) e teor de clorofila nas

folhas (safra 2011) foram influenciadas pela interação de doses de nitrogênio e inoculação. Rendimento de grãos foi influenciado pelo fator inoculante na safra 2010. Com base nos dois anos de estudo em áreas diferentes conclui-se que a inoculação das estirpes de *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6 em sementes não influenciam o rendimento de grãos e os componentes do rendimento de trigo da cultivar Marfim.

Palavras-Chave: manejo, *Triticum aestivum* L., bactérias promotoras de crescimento, fixação biológica de nitrogênio.

YIELD OF WHEAT INOCULATED WITH *Azospirillum* *brasiliense*

ABSTRACT - Nitrogen is a limiting factor for grain production. An alternative is the use of inoculants with bacteria capable of transforming atmospheric nitrogen into fixed nitrogen and provide the plants. Among these, the genus *Azospirillum*, is a diazotrophic bacteria, also known as plant growth-promoting bacteria. To evaluate the contribution of *Azospirillum brasiliense* inoculation on wheat yield components and yield, in interaction with different nitrogen levels, two experimental crops, in 2010 and 2011, were carried out in Passo Fundo. It was used the wheat cv. Marfim and the treatments were: seed inoculation and five nitrogen (N) topdressing fertilization (0, 30, 60, 90 and 120 kg N ha⁻¹) as urea. The inoculant contained *Azospirillum brasiliense* strain AbV5 AbV6, used at the culture recommended dose by the company (100 mL ha⁻¹). The variables analyzed were number of tillers per plant, chlorophyll content, plant height, grain weight per ear, thousand-seed weight, hectoliter weight and yield. There was interaction between nitrogen levels and inoculation for the variables hectoliter weight (in 2010 and 2011) and chlorophyll content in leaves (in 2011). The seeds inoculation with *Azospirillum brasiliense* strain AbV5 AbV6 does not affect the yield and yield components of wheat cultivar Marfim.

Key words: growth-promoting bacteria, yield compounds, biological nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO

A cultura do trigo no Brasil ocupa uma área de aproximadamente 2,4 milhões de hectares (safra 2009/2010), com uma produção de 5 milhões de toneladas (CONAB, 2012), tendo a maior parte cultivada na região sul do país. Fatores bióticos e abióticos influenciam a produtividade e a qualidade dos grãos de trigo. Um destes importantes fatores é a fertilidade do solo e a disponibilidade de nutrientes durante o desenvolvimento das plantas de trigo. Em relação aos nutrientes o nitrogênio é fundamental para a produção. Porém, por vezes a aplicação deste nutriente não atende as necessidades da planta em relação à quantidade e ao momento de aplicação. As necessidades totais dos nutrientes da planta de trigo segundo estudos conduzidos por Gargantini et al. (1973), é de 200 kg.ha⁻¹ de nitrogênio (grãos e palha). Sendo que destes estima-se que cerca de 22 kg de nitrogênio são necessárias para a produção de cada tonelada de grãos (CQFS-RS/SC, 2004).

A aplicação da adubação nitrogenada influencia nas características produtivas da cultura do trigo. Segundo dados levantados por Bennett et al. (2011) o nitrogênio incrementa o número de espiguetas, de grãos por espiga e peso do hectolitro. Também é fundamental para determinar o rendimento de grãos, número de espigas por área e teor de proteínas nos grãos (PÖTTKER & ROMAN, 1998).

Porém, o uso de fertilizante nitrogenado contribui significativamente para o aumento dos custos de produção da cultura. Neste sentido, o uso de alternativas se faz necessária para tornar a produção do trigo sustentável ambiental e economicamente.

Uma alternativa é a inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) que podem auxiliar por diversos mecanismos na nutrição nitrogenada das culturas. As bactérias diazotróficas mais estudadas como BPCPs associativas, ou seja, que não estabelecem simbiose com a planta hospedeira, são as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* (BASHAN & DE-BASHAN, 2005). É importante destacar a produção de hormônios proporcionado pela bactéria, que interferem no crescimento das plantas e altera a morfologia das raízes, possibilitando a exploração de maior volume de solo (BASHAN & HOGUIN, 1997), o que contribui para maior absorção de água e nutrientes.

As bactérias do gênero *Azospirillum* são de vida livre e estão amplamente distribuídas no solo, estabelecem associação com as plantas, promovem seu crescimento e fornecem nitrogênio através da fixação biológica ou posteriormente através da sua mineralização (HUNGRIA, 2011). Didonet et al. (2000) concluíram que a inoculação em trigo proporciona uma translocação mais eficiente da biomassa das plantas para os grãos, e produzindo grãos com maior massa e maiores níveis de reservas.

Os resultados das experiências de inoculação com *Azospirillum* a campo dos últimos vinte anos permitem concluir que estas bactérias são capazes de aumentar o rendimento da agricultura, em diferentes solos, climas e regiões (PITTNER et al., 2007). Resultados obtidos por Didonet (1993) demonstraram que as raízes de plantas de trigo inoculadas apresentaram uma taxa mais elevada de excreção de prótons, que resultou na queda de pH da rizosfera,

associado a troca de prótons por cátions aumentando a absorção de nutrientes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a contribuição da inoculação de *Azospirillum* sp. no rendimento de grãos e componentes do rendimento da cultura do trigo em associação com doses de nitrogênio em cobertura.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Campo Experimental da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, no município de Passo Fundo, região do Planalto Médio do Rio Grande do Sul situada na latitude 28° 15'S, longitude 52° 24'W e 687 m acima do nível do mar, nas safras de 2010 e 2011. O solo é classificado como Latossolo Vermelho distrófico húmico (STRECK et al., 2008), pertencente à unidade de mapeamento Passo Fundo do estado do Rio Grande do Sul. Os atributos químicos do solo estão descritos no Apêndice 13.

O clima da região é classificado por Köppen-George como subtropical Cfa (PEEL et al., 2007). A precipitação pluvial média anual é de 1.787 mm, a temperatura mínima é de 13,2°C, média de 17,5°C e máxima de 23,6 °C (EMBRAPA TRIGO, 2012). As condições meteorológicas ocorridas durante a condução dos experimentos podem ser observadas nos Apêndices 4, 5 e 6 (safra 2010) e Apêndices 10, 11 e 12 (safra 2011).

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, dispostos em fatorial 2 x 5. A cultivar de trigo utilizada foi a Marfim, extensamente cultivada na região e apreciada

pela qualidade dos grãos. Os tratamentos aplicados foram com e sem inoculação nas sementes associados a cinco doses de N em cobertura: 0, 30, 60, 90 e 120 kg N kg ha⁻¹, na forma de ureia, divididas em duas aplicações em igual quantidade, no início do perfilhamento e no final do perfilhamento (início da elongamento). Estas doses de N foram escolhidas em função da necessidade média da cultura, levando em conta o teor de matéria orgânica do solo e expectativa de rendimento de grãos de 3.500 kg.ha⁻¹, posicionando doses acima e abaixo da necessidade.

O inoculante líquido utilizado continha *Azospirillum brasilense*, estirpes AbV5 e AbV6, da empresa Stoller[®], marca MasterFix[®] L Gramíneas, na dose recomendada pela empresa para a cultura (100 mL ha⁻¹) (200 milhões de bactérias mL⁻¹ de produto comercial).

O procedimento de inoculação foi realizado imediatamente antes da semeadura. Calculou-se a dose do inoculante líquido necessários para cada quilograma de sementes, com base na quantidade de sementes necessárias para implantação de um hectare, e a população de plantas indicada para a cultivar. A concentração de bactérias estimada foi de 60.000 bactérias por sementes. Além do inoculante foi adicionado 5 mL de água kg⁻¹ de sementes, como veículo. Foram tratados dois kg de sementes, necessárias a implantação das parcelas com inoculação, adicionando a mistura de inoculante e água, agitando as sementes para uniformizar a inoculação.

A semeadura do trigo foi realizada sobre resteva de soja em ambas as safras, com semeadora, em parcelas de 1 x 5 m, em seis

linhas com espaçamento entre linhas de 0,17 m e densidade de 330.000 plantas por hectare. As parcelas foram dispostas a um metro de distância entre elas, e os blocos a quatro metros. A adubação de semeadura foi com a fórmula 2-20-20 (N-P-K), 200 kg ha⁻¹ (safras 2010 e 2011), para expectativa de rendimento de 3.500 kg,ha⁻¹ conforme interpretação da análise de solo (Apêndice 13), de acordo com o Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFS-RS/SC, 2004).

Durante o desenvolvimento das plantas foi efetuado o controle das plantas daninhas, doenças e pragas, sempre que necessário (REUNIÃO..., 2011).

Foi avaliada leitura correspondente ao teor de clorofila na folha com um clorofilômetro da marca Konica Minolta, modelo SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development). A leitura foi feita no terço médio da folha bandeira no início da floração (cód. 61 da escala de ZADOKS et al., 1974), em dias ensolarados.

A estatura de plantas foi medida na fase de maturação dos grãos (cód. 91 da escala de ZADOKS et al., 1974) tomando-se a medida do solo até a extremidade da espiga.

Foi colhido manualmente um metro linear de cada parcela, atentando-se para a uniformidade das plantas na parcela, para avaliação do número de perfilhos por planta e a massa de grãos por espiga através da trilhagem manual.

A área útil da parcela de 3,4 m² foi colhida com uma colhedora de parcelas e obtida a massa de grãos, corrigindo-se a umidade dos grãos para 13% e extrapolado a massa para um hectare.

Destes grãos, também foi determinada a massa de mil grãos através de contagem e pesagem, e o peso do hectolitro.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (F-teste) e as médias das doses submetidas à análise de regressão, sendo escolhido o modelo significativo de menor grau.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação da inoculação e doses de nitrogênio no teor de clorofila nas folhas (safra 2011) e peso do hectolitro (safras 2010 e 2011) (Figuras 1, 2 e 3). As demais, número de perfilhos por planta, estatura de planta, massa de grãos por espiga, massa de mil grãos e rendimento de grãos foram somente influenciadas pelo fator nitrogênio (Figura 4 e 5).

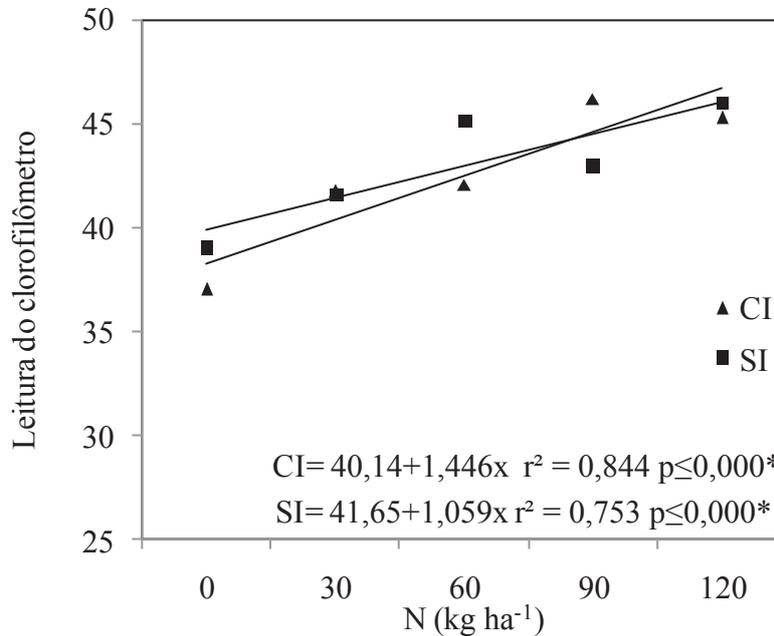


Figura 1 - Teor de clorofila nas folhas de trigo cultivar Marfim, com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense* e adubação com doses de N, na safra 2011, Passo Fundo, RS.

O teor de clorofila nas folhas, na safra 2010, teve diferença entre doses de nitrogênio, (Figura 4C), com ajuste linear, com aumento do teor de clorofila quando incrementado as doses de N. Na safra 2011, além da interação nitrogênio com inoculante, foi significativo o fator nitrogênio isoladamente. Em relação interação, tanto com ou sem inoculação houve aumento linear do teor de clorofila em função do incremento das doses de N, apenas na dose de 90 kg ha⁻¹ a média com inoculação foi superior a sem inoculação. O teor de clorofila na folha pode ser utilizado para prever o nível nutricional de nitrogênio em plantas, devido ao fato de a quantidade

desse pigmento correlacionar-se positivamente com teor de N na planta (BOOIJ et al., 2000). Essa relação é atribuída, principalmente, ao fato de que 50 a 70 % do N total das folhas compõe enzimas (CHAPMAN & BARRETO, 1997) que estão associadas aos cloroplastos (TOCKING & ONGUN, 1962). Além de que, o nitrogênio faz parte da estrutura da molécula de clorofila, sendo constituinte dos núcleos pirrólicos (TAIZ & ZEIGER et al., 2004). As bactérias do gênero *Azospirillum* fixam biologicamente nitrogênio quando associadas a plantas, inclusive com gramíneas, mas também quando em vida livre (HUNGRIA, 2011) Devido a este fato, a inoculação de sementes com esta bactéria poderia contribuir com o aporte de nitrogênio para as culturas e, como consequência, com o aumento do teor de clorofila das folhas. O efeito da inoculação sobre o teor de clorofila demonstrado em experimento com plantas de trigo, a inoculação de sementes com *A. brasilense* Cd, promoveu um aumento significativo em todos os pigmentos, incluindo clorofila *a* e *b* na parte aérea, em relação às plantas não inoculada (BASHAN et al., 2006).

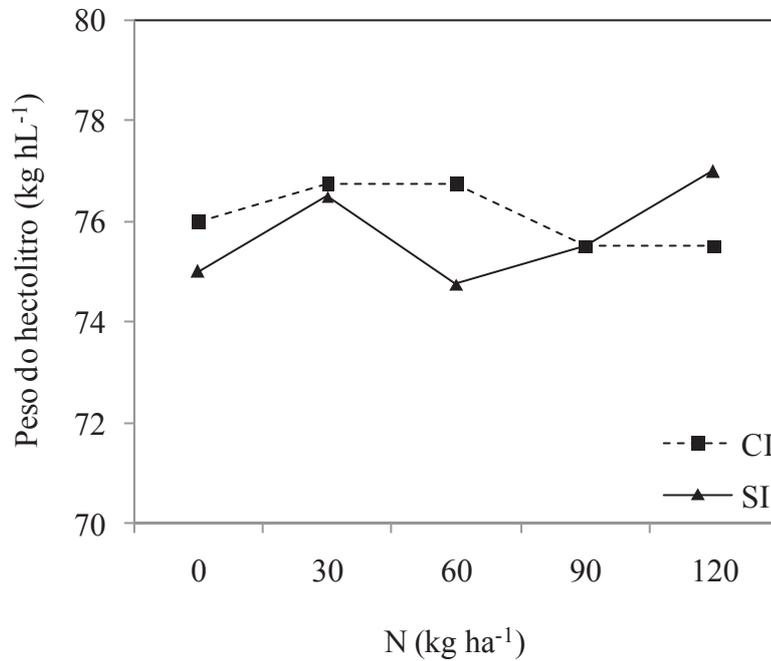


Figura 2 - Peso do hectolitro em trigo cultivar Marfim, com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense* e adubação com doses de N, na safra 2010, Passo Fundo, RS.

A única variável analisada que teve influência da interação dos fatores avaliados ($p < 0,05$), nas duas safras seguidas foi o peso hectolétrico (PH). Na safra 2010, não houve ajuste da equação de regressão. Na safra 2011, quando houve inoculação das sementes, não houve ajuste da equação da regressão, porém quando não houve inoculação houve resposta linear positiva com o incremento das doses de N. (Figuras 2 e 3, respectivamente).

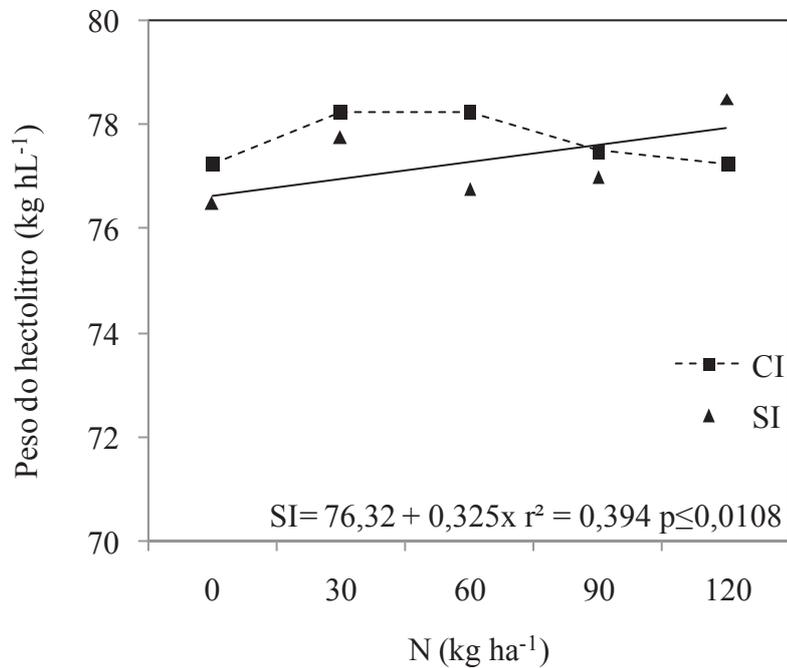


Figura 3 - Peso do hectolitro em trigo cultivar Marfim, com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense* e adubação com doses de N, na safra 2011, Passo Fundo, RS

Na safra de 2010 o PH máximo foi de 77 e na safra 2011 78. O PH dos grãos é um indicador que determina a qualidade dos mesmos, sendo assim, é um dos requisitos estabelecidos pela Instrução Normativa nº38 (30/11/2010) para classificar os grãos de trigo. Desta forma, considera-se que o PH de 78, no mínimo, é classificado como trigo Tipo 1 e de 75, no mínimo, é classificado como trigo Tipo 2 (REGULAMENTO, 2012). Sabe-se que quanto maior o valor do PH, maior a aceitação e valorização de mercado do produto (MAZZUCO et al., 2002).

A variável número de perfilhos por planta, na safra 2010 não foi influenciada pelas doses de N, os dados são apresentados na Figura 4 A. Ao contrário da safra 2011. Neste caso, o modelo quadrático explica quase que totalmente o fenômeno ($r^2=0,97$) (Figura 5 A), com tendência de aumento do número de perfilhos por planta à medida que aumentam as doses de N. Em relação a inoculação, não houve influência na variável em nenhuma das safras avaliadas. Nas espécies em que o perfilhamento é comum, como o trigo e o arroz, os perfilhos são benéficos, pois aumentam o número de inflorescências por área, incrementando o rendimento de grãos (SANGOI et al., 2011).

A presença de maior ou menor número de perfilhos esta sob efeito de alguns fatores. Para Ozturk et al. (2006) ocorre forte efeito da interação do genótipo e ambiente, relacionados à emissão e à sobrevivência de perfilhos. Sabe-se que o N é o macroelemento mais limitante do rendimento de grãos de trigo, visto que dentre outros fatores, determina o número de perfilhos (SALA et al., 2005). A qualidade da luz que incide sobre o dossel vegetativo em função, por exemplo, da densidade de plantas também suprime o desenvolvimento de perfilhos em trigo, estimulando a dominância apical (ALMEIDA et al., 2002). Da mesma forma, este fator pode explicar a diferença entre as safras 2010 e 2011, quando na primeira a densidade de plantas foi maior (330 plantas m^{-2}) em relação à segunda (265 plantas m^{-2}). Há casos, em que o aumento no rendimento de grãos de trigo foi atribuído ao aumento do número de perfilhos, fenômeno que esta de alguma forma sob controle hormonal (Reynders & Vlassak, 1982, apud DIDONET, 1993), como auxinas, giberelinas e citocininas (CAVALLET et al., 2000).

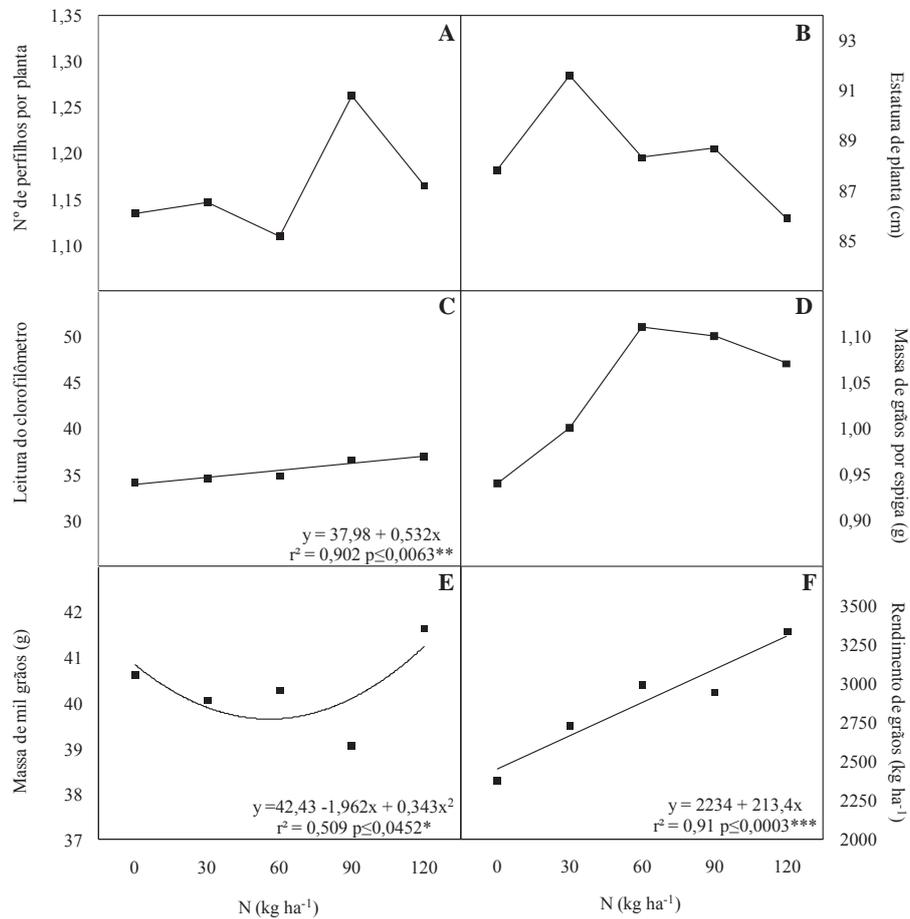


Figura 4 – Número de perfilhos (n°) por planta (A), estatura de planta (B), teor de clorofila nas folhas (C), massa de grãos por espiga (D), massa de mil grãos (E) e rendimento de grãos (F) de trigo cultivar Marfim em função de doses de N em cobertura na safra 2010, média com e sem inoculação, Passo Fundo, RS.

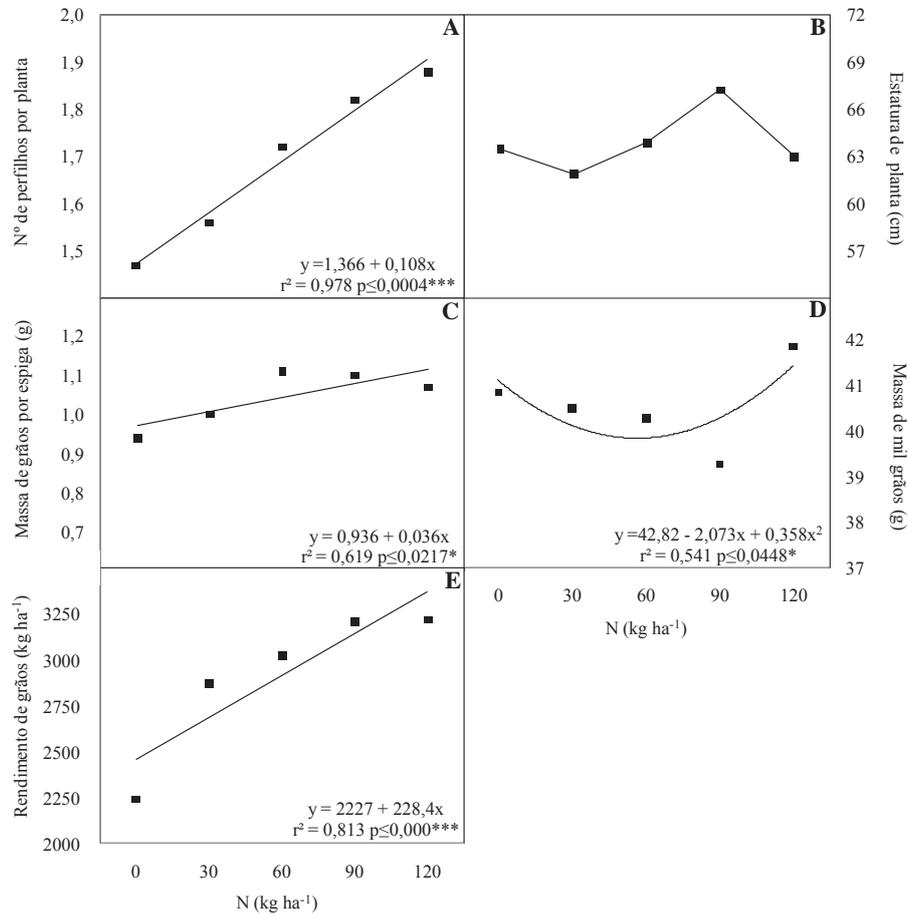


Figura 5 - Número de perfilhos (n°) por planta (A), estatura de planta (B), massa de grãos por espiga (C), massa de mil grãos (D) e rendimento de grãos (E) de trigo da cultivar Marfim em função de doses de N em cobertura na safra 2011, média com e sem inoculação, Passo Fundo, RS.

Para estatura de planta não foi observada interação dos fatores e não houve influência do fator inoculação, contudo, houve significância apenas para o fator doses de nitrogênio, em ambas as

safras (Figuras 4B e 5B, respectivamente), porém não houve ajuste das equações de regressão. Acredita-se que o hormônio auxina, sobretudo como ácido indolacético (AIA), produzido pelas bactérias do gênero *Azospirillum*, atue no crescimento da planta (Reynders & Vlassak, 1982, apud DIDONET, 1993). A auxina promove o crescimento por alongamento, principalmente, por aumentar a capacidade de extensão da parede celular. De acordo com a hipótese de crescimento ácido, uma das ações importantes da auxina é induzir as células a transportar prótons para a parede celular, que, em resumo, causam o seu afrouxamento e alongamento (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Na safra 2010, a variável massa de grãos por espiga, não sofreu influência da inoculação, nem da aplicação de nitrogênio (Figura 4 D). Na safra 2011 houve efeito das doses de nitrogênio nesta variável (Figura 5 C), com ajuste linear com aumento da massa de grãos por espiga em função do incremento das doses de N. A população de plantas indicada para a cultivar Marfim é de até 330 plantas por metro quadrado (BIOTRIGO, 2012). Se for considerado a produção média de perfilhos, na safra 2010, de 1,16 perfilhos por planta e que cada perfilho produz uma espiga (98,6% de colmos férteis) com a massa de grãos de 1,04 gramas a produção média seria de 3.828 kg ha⁻¹ (incremento de 24,9%). Na safra 2011, com produção média de 1,69 perfilhos por planta (97% de colmos férteis) com a massa de grãos de 1,08 gramas, a produção média seria de 5.577 kg ha⁻¹. Porém, o rendimento médio de grãos na safra 2010 foi de 2.875 kg ha⁻¹ e na safra 2011 foi de 2.913 kg ha⁻¹, em virtude principalmente, da população de plantas terem ficado abaixo da recomendada, principalmente, na safra 2011, por ocasião de chuvas

excessivas logo após a semeadura (Apêndices 11). Contudo, segundo Oliveira et al. (2004), estudando o efeito da umidade no solo na sobrevivência de bactérias diazotróficas, o teor de umidade tem pouca influência na sobrevivência de *A. brasilense*, considerada uma espécie cosmopolita.

A variável massa de mil grãos não interagiu com inoculação e doses de nitrogênio em nenhuma das safras, nem ocorreu influência da inoculação isoladamente. De acordo com Didonet et al. (2000), o uso mais eficiente do N disponível promovido pela inoculação reflete em maior índice de colheita, também proporcionando maior aproveitamento da biomassa, em benefício dos grãos, resultando em maior massa de mil grãos. No presente trabalho, somente o fator doses de nitrogênio foi significativo, em ambas as safras (Figura 4 E e 5 D, respectivamente). Nas safras 2010 e 2011, a massa de mil grãos teve comportamento semelhante, apesar do modelo quadrático ajustado não explicar totalmente o fenômeno ($r^2=0,50$ e $r^2=0,54$, 2010 e 2011, respectivamente).

Na safra 2010, o rendimento de grãos diferiu quanto as doses de N (Figura 4F) e a inoculação. O rendimento de grãos foi de 3.029 kg ha^{-1} com inoculação e de 2.720 kg ha^{-1} sem inoculação, uma diferença significativa de aproximadamente 10% a mais de rendimento de grãos quando usado a inoculação com *A. brasilense*. Na safra 2011, o resultado da safra 2010 não foi repetido, apenas o fator doses de N foi significativo (Figura 5E). Este comportamento reflete bem a inconsistência de resultados obtidos com a inoculação, como os citados por Bashan & Holguin (1997). Apesar dos avanços da pesquisa básica e aplicada, os resultados obtidos de ensaios de campo

quanto à eficácia agronômica de inoculantes a base de *Azospirillum* não são consistentes (HUNGRIA et al., 2010). Em experimentos realizados com a cultura do trigo, de 2002 a 2006, em 297 localidades na região dos Pampas argentinos (precipitação pluvial na faixa de 500-1.000 mm anuais), observou-se incremento no rendimento entre as médias dos locais estudados de 260 kg por hectare, com utilização de inoculante líquido à base de *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6). Os autores destacam que em 70% dos locais estudados houve resultados de incremento no rendimento de grãos (DÍAZ-ZORITA et al., 2009). Os autores também enfatizam que houve uma correlação positiva entre os maiores rendimentos e maiores acúmulos de matéria seca na parte aérea e raízes, assim como, no número e peso hectolitro dos grãos. Em outro trabalho, a inoculação de trigo, com várias estirpes de *Azospirillum*, causou um aumento significativo em relação ao controle no rendimento de grãos, variando de 23 a 63% (Caballero Mellado et al., 1992 apud BASHAN & HOLGUIN, 1997).

Em um conjunto de nove ensaios realizados em Londrina e Ponta Grossa, sul do Brasil, nove estirpes de *Azospirillum brasilense* foram testadas. As cepas AbV1, AbV5, AbV6 e AbV8 foram as mais eficazes, com rendimentos crescentes de 312-423 kg ha⁻¹, ou 13-18% (HUNGRIA et al., 2010).

O fato da falta de resposta positiva, em relação à inoculação, na maioria das variáveis analisadas pode ser creditada a vários fatores. Para Didonet et al. (2000), a inoculação de bactérias diazotróficas em sementes deve levar em consideração que estas estão amplamente distribuídas nos solos, portanto, a inoculação à base de bactérias do gênero *Azospirillum* deve competir satisfatoriamente com

as bactérias diazotróficas nativas e com microflora do solo. A capacidade competitiva das bactérias diazotróficas com outras é alta somente quando as condições são de baixa disponibilidade de N no ambiente (SILVA et al., 2007). Um dos fatores ambientais que pode influenciar na interação entre a bactéria diazotrófica e as plantas é a presença de N mineral no ambiente. A nitrogenase é inibida na presença de formas combinadas de N, como na forma de nitrato e amônia. É de se considerar, portanto, que a inoculação em solos com estas condições não tenham respostas positivas do uso destas bactérias (Dobbelaere et al., 2003 apud BERGAMASCHI, 2006).

Foi demonstrado também por Antonyuk & Evseeva (2006), que as lecitinas produzidas por plantas de trigo excretadas pelas raízes atuam como sinais moleculares para associação com bactérias do gênero *Azospirillum* e são fundamentais para determinar a especificidade genotípica da interação planta-bactéria. A utilização de bactérias adaptadas ou isoladas de uma mesma área, e da mesma espécie de planta, parece ser importante para se obter uma melhor resposta a inoculação das sementes de trigo com bactérias promotoras de crescimento, como as do gênero *Azospirillum* (Baldani e Dobereiner, 1980; Baldani et al., 1981; Millet et al. 1985; Brabieri et al. 1988, apud DIDONET, 1993). Neste sentido, pode-se discutir uma problemática que é a universalização da tecnologia de inoculação com produtos comerciais à base de bactérias do gênero *Azospirillum*, utilizando mesmos níveis de doses para diferentes culturas, tipos de solo e clima. Se de fato existe especificidade das estirpes em relação até mesmo a cultivares, seriam necessários estudos mais

regionalizados, para que esta tecnologia apresente resultados mais consistentes e se torne benéfico ao rendimento de grãos.

CONCLUSÃO

Com base nos dois anos de estudo em áreas diferentes conclui-se que a inoculação das estirpes de *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6 em sementes não influenciam o rendimento de grãos e os componentes do rendimento de trigo da cultivar Marfim.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. L.; SANGOI, L.; TRENTIN, P. S.; GALIO, J. Cultivares de trigo respondem diferentemente à qualidade da luz quanto à emissão de afillhos e acumulação de massa seca. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 377-383, 2002.

AMARAL FILHO, J. P. R.; FORNASIERI FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J. C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 29, p. 467-473, 2005.

ANTONYUK, L. P. & EVSEEVA, N. V. Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. *Microbiology*, Moskva, v. 75, p. 470-475, 2006.

ASHRAF, M.; HASNAIN, S.; BERGE, O.; MAHMOOD, T. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils*, New York, v. 40, p. 157-162, 2004.

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

BASHAN, Y. & DE-BASHAN, L. E. Plant growth-promoting. In: HILLEL, D. *Encyclopedia of soil in the environment*. Oxford, Elsevier, p. 103-115, 2005.

BASHAN, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review . *Biol Fertil Soils*, v. 29, p. 246 -256, 1999.

BASHAN, Y.; BUSTLLOS, J. J.; LEYVA, L. A.; HERNANDEZ, J. P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in weath seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biol Fertil Soils*, v. 42, p. 279-285, 2006.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, v. 50, p. 521–577, 2004.

BASHAND, Y. & HOGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationship: Environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.

BENETT, C. G. S.; BUZETTI, S.; SILVA, K. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; ANDREOTTI, M.; ARF, O. Aplicação foliar e em cobertura de nitrogênio na cultura do trigo no cerrado. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. 3, p. 829-838, 2011

BERGAMASCHI, C. *Inoculação em solos com estas condições não tenham respostas positivas do uso destas bactérias*. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BIOTRIGO. Cultivares. Disponível em: http://www.biotrigo.com.br/cultivares_orbiotrigo. Acesso em: 15 fev. 2012.

BOOIJ, R.; VALENZUELA, J.L.; AGUILERA, C. Determination of crop nitrogen status using non-invasive methods. In: HAVERKORT, A.J.; MACKERRON, D.K.L. (Eds.). *Management of nitrogen and water in potato production*. The Netherlands, Wageningen Pers, p. 72-82, 2000.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in culture of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 89, p. 1-3, 1989.

BRASIL, M. S.; FERNANDES F. A.; BALDANI, V. L. D. *Ocorrência de bactérias do gênero Azospirillum associadas a gramíneas forrageiras no pantanal da Nhecolândia*. Embrapa, Seropédia, n. 46, 2000. 7 p. (Comunicado Técnico 46)

BURDMAN, S.; VEDDER, D.; GERMAN, M.; ITZIGSOHN, R.; KIGEL, J.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. In *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century* (C. ELMERICH, C.; KONDOROSI, A. NEWTON, N.E. eds.), p. 609-612. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1998.

BURDMAN, S.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 26, p. 91-110, 2000.

CAMPOS, B.C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante “Graminante” na cultura de milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 713-715, 2000.

CASSÁN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, L.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology*, v. 45, n. 1, p. 12-19, 2009.

CAVALLET, L.E.; PESSOA, A.C. S.; HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R.; OST, C.F. produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* sp. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.

CHAPMAN, S.C.; BARRETO, H.J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. *Agronomy Journal*, Madison, v. 89 n. 4, p. 557-562, 1997.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. *Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina*. 10. ed. Porto Alegre, 2004. 400 p.

CONAB. *Séries históricas*. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2>. Acesso em : 15 fev. 2012.

CREUS, C.M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations in *Azospirillum* inoculated wheat seedlings under osmotic stress. *Canadian Journal of Botany*, v. 76, p. 238–244, 1998.

DE WEERT, S.; VERMEIREN, H.; MULDER, I. H.; KUIPER I.; HENDRICKX, N.; BLOEMBERG, G. V.; VANDERLEYDEN, J.; DE MOT R.; LUGTENBERG, B. J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 15, p. 1173-1180, 2002.

DEKHILL, S.B., CAHILL, M., STACKBRANDT, E. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 20, p. 72-77, 1997.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNÁNDEZ-CANIGIA, M.V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European Journal of Soil Biology*, v. 45, n. 1, p. 3-11, 2009.

DIDONET, A. D. *Aspectos do mecanismo de ação fisiológica associada à promoção do crescimento radicular de trigo (Triticum aestivum L.) por bactérias do gênero Azospirillum*. 1993. Tese (Doutorado Pós-Graduação Instituto de Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993. 80 p.

DIDONET, A. D.; LIMA, A. S.; CANDATEN, A. A.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos em trigo submetidos à inoculação de *Azospirillum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v. 35, n. 2, p. 401-411, fev. 2000.

DOBBELAERE, S. & OKON, Y. The plant growth-promoting effect and plant responses. In: *Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations* (Elmerich, C.; Newton, W.E. eds.), p. 145-170. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2007.

DOBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação de nitrogênio no Brasil. In: CONFERÊNCIA, mar.1989, Universidade Rural do Rio de Janeiro, *Artigos Assinados Estudos Avançados*, v. 4, n. 8, São Paulo, p. 144-152, 1990.

DOBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, Rehovot, v. 13, n. 1, p. 1-13, 1992.

DONZELI, V.P. *Atividade de alguns componentes da comunidade microbiana do solo e microrganismos diazotróficos endofíticos sob influência do nitrogênio na cultura do milho*. 2002. Dissertação (Mestrado Pós-Graduação Instituto de Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002. 84 p.

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

EMBRAPA TRIGO. *Informações meteorológicas*. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/agromet/app/principal/index.php> p. Acessado em: 22 de fev de 2012.

FERREIRA, A. C. B. *Efeitos da adubação com N, Mo, Zn sobre a produção, qualidade dos grãos e concentração de nutrientes no milho*. 1997. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997. 72 p.

FERREIRA, A. C. B.; ARAÚJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G. P.; CARDOSO, A. A. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. *Scientia Agricola*, v. 58, n. 1, p. 131-138, 2001.

GARCÍA-OLIVARES, J. G.; MORENO-MEDINA, V. R.; RODRÍGUEZ-LUNA, I. C.; MENDOZA-HERRERA, A.; MAYEK-PÉREZ, N. Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo, en el norte de México. *Agricultura técnica en México*, v. 32, n. 2, p. 135-141, 2006.

GARGANTINI, H.; BLANCO, G. H.; HAGG, H. P.; MALAVOLTA, E. Absorção de nutrientes pelo trigo. *Bragantia*, Campinas – SP, v. 32, n. 16, p. 285-307, 1973.

HOLGUIN, G.; PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. *Biol Fertil Soils*, v. 29, p. 10-23, 1999.

HUERGO, L. F. *Regulação do metabolismo do nitrogênio em Azospirillum brasilense*. 2006. Tese (Doutorado Pós-Graduação em Ciências Bioquímica) - Ciências Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. 170 p.

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

HUNGRIA, M. *Inoculação com Azospirillum brasiliense: inovação em rendimento a baixo custo*. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. (Documentos, n. 325)

JORDÃO, L. T.; LIMA, F. F.; LIMA, R. S.; MORETTI, P. A. E. M.; PEREIRA, H. V.; MUNIZ, A. S.; OLIVEIRA, M. C. N.. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum brasiliense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 29.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 13.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 11.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 8., 2010, Guarapari. Fontes de nutrientes e produção agrícola: modelando o futuro: anais. Viçosa: SBCS, 2010. 4 p.

KAVADIA, A.; VAYENAS, D. V.; PAVLOU, S.; AGGELIS, G. Dynamics of free-living nitrogen-fixing bacterial populations and nitrogen fixation in a two-prey-one-predator system. *Ecological Modelling*, v. 218, p. 323-338, 2008.

KEFALOGIANNI, I.; AGGELIS, G. Modeling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 58, p. 352–357, 2002.

KHAMMAS, K. M., AGERON, E., GRIMONT, P. A., KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov. a nitrogenfixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology*, v. 140, p. 679-693, 1989.

LAVRINENKO K., CHERNOUSOVA, E., GRIDNEVA, E., DUBININA, G. AKIMOV, V., KUEVER, J., LYSENKO, A., GRABOVICH, M. *Azospirillum thiophilum* sp. a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, p. 2832-2837, 2010.

LIN, S. Y., YOUNG, C. C., HUPFER, H., SIERING, C., ARUN, A. B., CHEN, W. M., LAI, W. A., SHEN, F. T., REKHA, P. D., YASSIN, A. F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 761-765, 2009.

LOPES, J. S.; DAL'COL, A.; STORCK, L. L.; DAMO, H. P. BRUM, B.; SANTOS, V. J. Relações de causa e efeito em espigas de milho relacionadas aos tipos de híbridos *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.6, p.1536-1542, 2007.

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

MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. 2. ed Institute of Plant Nutrition University of Hohenheim, Academic Press: Germany, 1995. 889 p.

MARTÍNEZ-MORALES, L. J et al. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 228, p. 167-173, 2003.

MAZZUCO, H.; PORTELLA, J. A.; BARIONI JUNIOR, W.; ZANOTTO, D. L.; MIRANDA, M. Z.; AVILA, V. S. Influência do

estágio de maturação na colheita e temperatura de secagem de grãos de trigo sobre os valores de energia metabolizável aparente corrigida (EMAc) em frangos de corte. *Revista Brasileira Zootecnia*, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2221-2226, 2002.

MEHNAZ, S. WESELOWSKI, B., LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogenfixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, p. 620–624, 2007a.

MEHNAZ, S. WESELOWSKI, B., LAZAROVITS, G. *Azospirillum zea* sp. a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, p. 2805–2809, 2007b.

MELGAR, R. J.; SIMITH, T. J.; CRAVO, M. S.; SÁNCHEZ, P. A. Rates and dates of nitrogen fertilizer application for maize on a latossol in the central Amazonia region. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.15, n.3, p.289-296, 1991.

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.

MORAES SÁ, J. C.; FERREIRA, A. O.; BRIEDIS, C.; VIEIRA, A.; FIGUEIREDO, A. G. Crescimento radicular, extração de nutrientes e produção de grãos de genótipos de milho em diferentes quantidades de palha de aveia-preta em plantio direto. *Revista Brasileira Ciência Solo*, Viçosa, v. 34, p. 207-216, 2010.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. *Química Nova*. São Paulo, v. 26, n. 6, p. 872-879, 2003.

OHLAND, R. A. A. et al. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 29, n. 3, p. 538-544, 2005.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; SILVA, E. E.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 295-299, 2004.

OZTURK, A.; CAGLAR, O.; BULUT, S. Growth and yield response of facultative wheat to winter sowing, freezing sowing and spring sowing at different seeding rates. *Journal of Agronomy and Crop Science*, v. 192, p. 10-16, 2006.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, v. 11, p. 1633–1644, 2007.

PENG, G., WANG, H., ZHANG, G., HOU, W., LIU, Y., WANG, E. T., TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses Grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 1263–1267, 2006.

PITTNER, E.; DALLA SANTA, O. R.; MOURA, M. O.; MONTEIRO, M. C.; DALLA SANTA, H. S. Flutuação populacional de bactérias do gênero *Azospirillum* em solo cultivado com milho e em campo nativo. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 3, n. 2, 2007.

PÖTTKER, D.; ROMAN, E.S. Efeito do nitrogênio em trigo cultivado após diferentes sucessões de culturas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 33, p. 501- 507, 1998.

REGULAMENTO técnico do trigo - *Instrução Normativa nº 38*.
Disponível em:
www.apassul.com.br/index.php?menu=noticias&acao=mostrar...

REINHOLD, B., HUREK, T., FENDRIK, I., POT, B., GILLIS, M., KERSTERS, K., THIELEMANS, S., DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. a nitrogenfixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 37, p. 43-51, 1987.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES I. C.; REIS, V. M.; HUNGRIA, M. *Fixação Biológica de Nitrogênio: uma revolução na agricultura*. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/cursobiotec/capitulo8.pdf>. Acesso em: 22 de julho de 2010.

REIS JUNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associado a *Brachiaria* sp. 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.

REJESUS, R. M.; HORNBAKER, R. H. Economic and environmental evaluation of alternative pollution-reducing nitrogen management practices in central Illinois. *Agriculture Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v. 75, p. 41-53, 1999.

REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE. *Informações técnicas para trigo e triticales – safra 2012 / V. Dourados, MS, 25 a 28 de julho de 2011, MS: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011.*

REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE MILHO E SORGO. *Indicações técnicas para o cultivo de milho e de sorgo no Rio Grande do Sul – Safras 2009/2010 e 2010/2011*. Veranópolis: FEPAGRO-Serra, 2009. 179 p.

RITCHIE, S. M., HANWAY, J. J. *How a corn plant develops*. Ames: Iowa State University Extension Department, 1993. 26 p. (Special Report, 48).

RODELAS, B.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V.; POZO, C.; SALMERÓN, V. Influence of *Rhizobium/Azotobacter* and *Rhizobium/Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils*, New York, v. 29, p. 165-169, 1999

SAIKIA, S. P.; JAIN, V.; KHETARPAL, S.; ARAVIND, S. Dinitrogen fixation activity of *Azospirillum brasilense* in maize (*Zea mays*). *Current Science*, v. 93, n. 9, 2007.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 29, n.3, Viçosa, p. 345-352 2005.

SANGOI, L.; VARGAS, V. P.; SCHIMITT, A.; PLETSCH, A. J.; VIEIRA, J.; SALDANHA, A.; SIEGA, E.; CARNIEL, G.; MENGARDA, R. T.; PICOLI JUNIOR, G. J. Disponibilidade de nitrogênio, sobrevivência e contribuição dos perfilhos ao rendimento de grãos do milho. *Revista Brasileira Ciência Solo*, v. 35, p. 183-191, 2011.

SILVA, A. A. O.; FELIPE, T. A.; BACH, E. E. Ação do *Azopsirillum brasiliense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). *Conscientiae Saúde*, Universidade Nove de Julho, São Paulo, v. 3, p. 29-35, 2004.

SILVA, D. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; SEMINOTI, R. J. J.; VOSS, M. Bactérias diazotróficas nas folhas e colmos de plantas de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 13, n. 2, p. 181-187, 2007

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

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y.; LOON, L. C. Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. In L. C. VAN LOON editor: *Advances in Botanical Research*, v.51, Burlington: Academic Press, p. 283-320, 2009.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719 p.

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

TOCKING, C. R. e ONGUN, A. The intracellular distribution of some metallic elements in leaves. *American Journal of Botany*, 49:284-289, 1962.

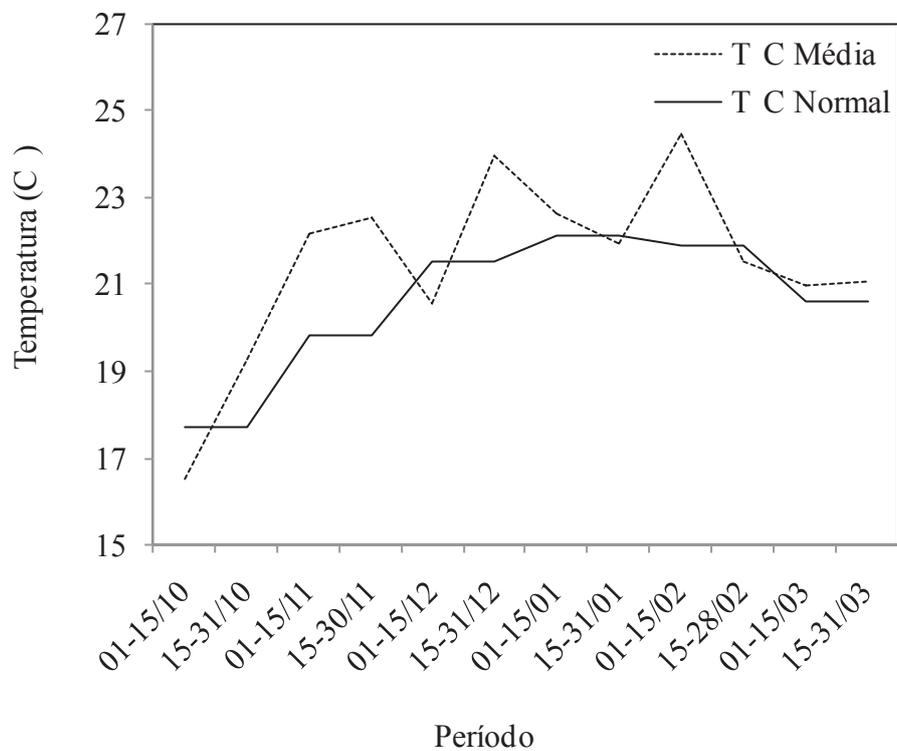
XIE, C., YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 1435-1438, 2005.

YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W. A.; REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, M. H.; CHEN, W. M.; YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 959-963, 2008.

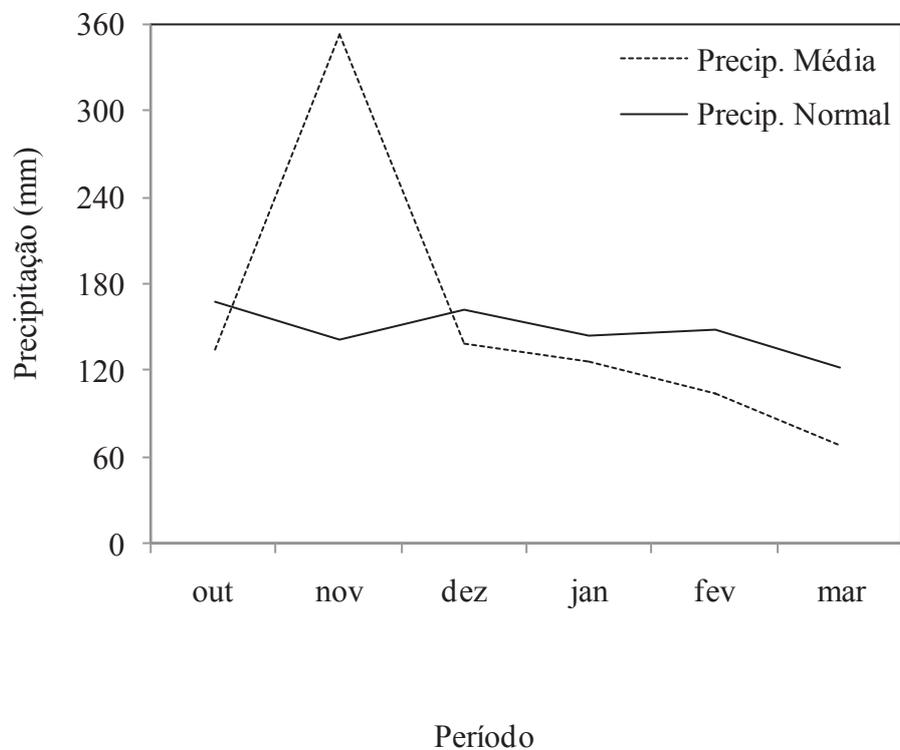
ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, Oxford, v. 14, p. 415-421, 1974.

ZORARELLI, L.; CARDOSO, E. G.; PICCININ, J. L.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; TORRES, E.; ALVES, B. J. Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1117-1122, 2003.

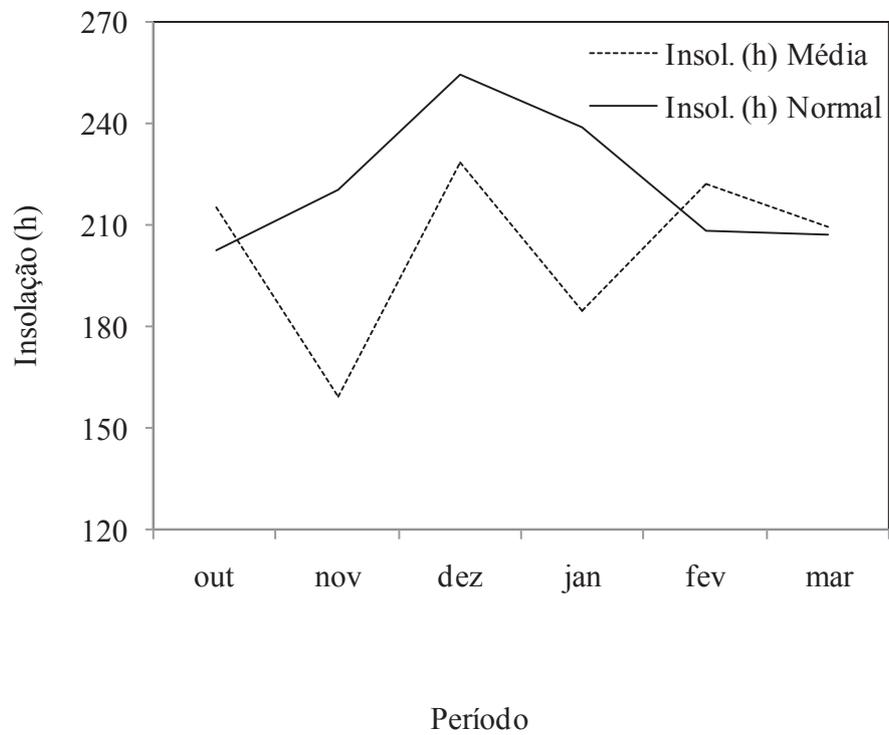
APÊNDICES



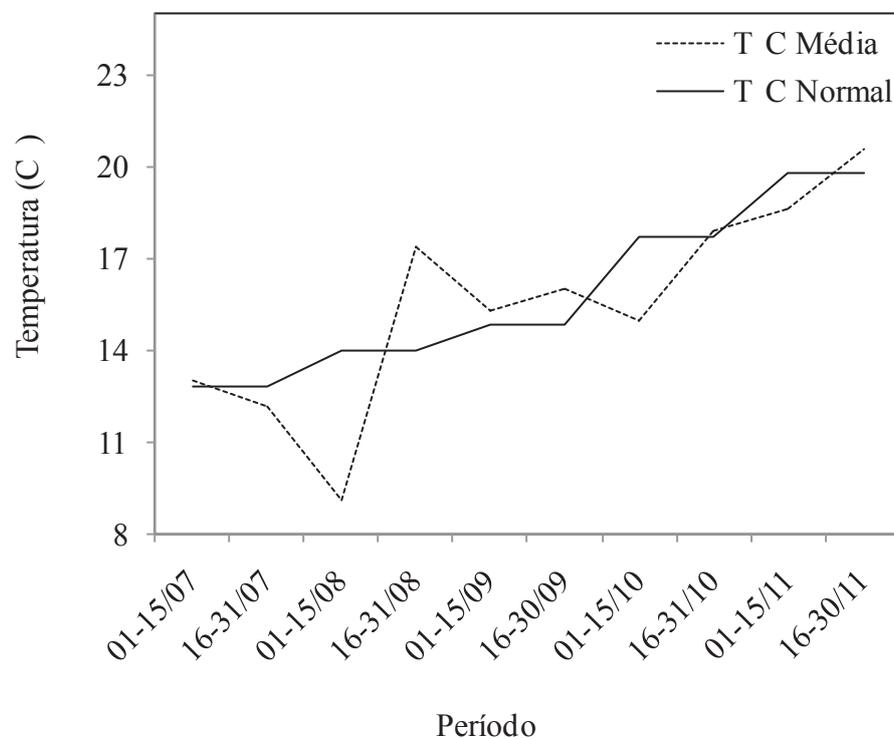
APÊNDICE 1. Temperatura média e temperatura normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do milho, safra 2009/2010, Passo Fundo, RS. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.



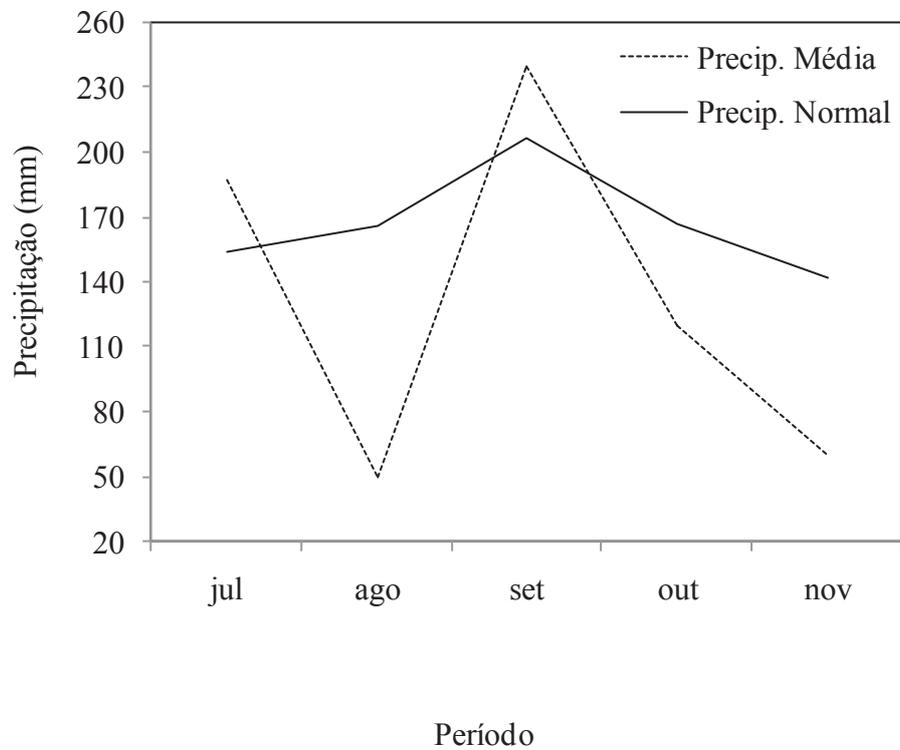
APÊNDICE 2. Precipitação média e precipitação normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do milho, safra 2009/2010, Passo Fundo, RS. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.



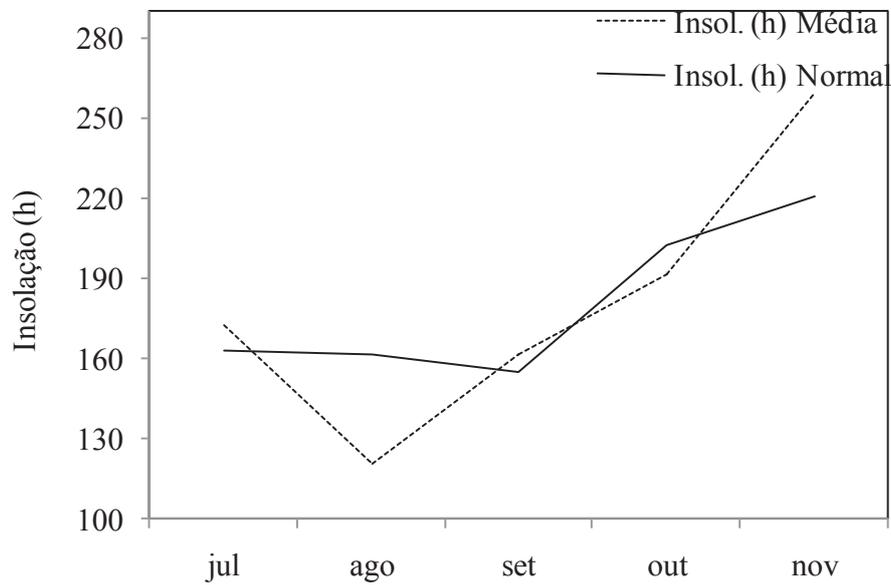
APÊNDICE 3. Insolação média e Insolação normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do milho, safra 2009/2010, Passo Fundo, RS. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.



APÊNDICE 4. Temperatura média e temperatura normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do trigo, safra 2010, Passo Fundo, RS. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.

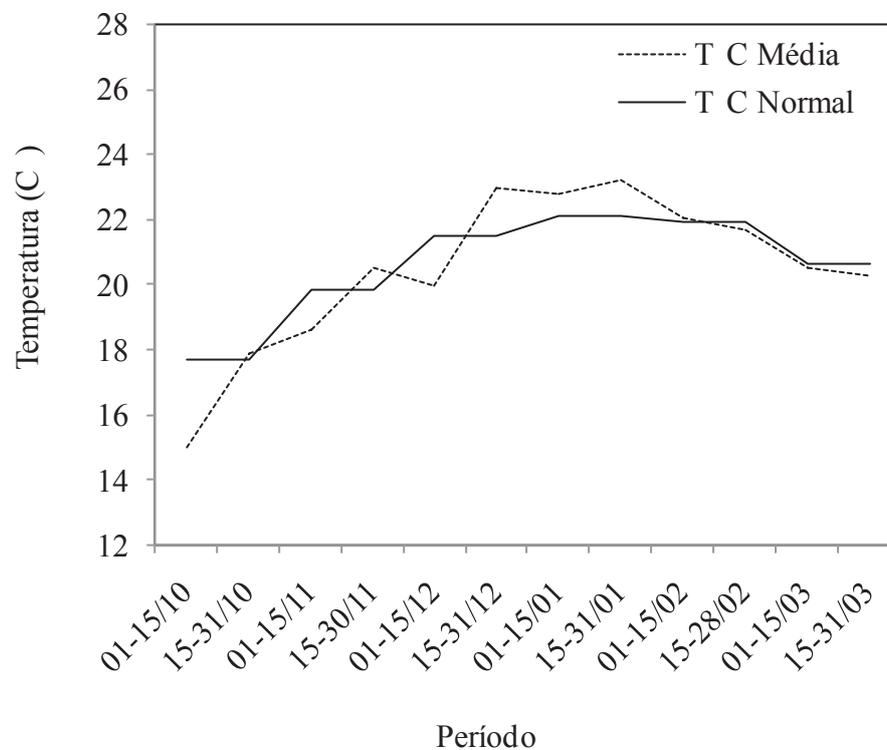


APÊNDICE 5. Precipitação média e precipitação normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do trigo, safra 2010, Passo Fundo, RS. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.

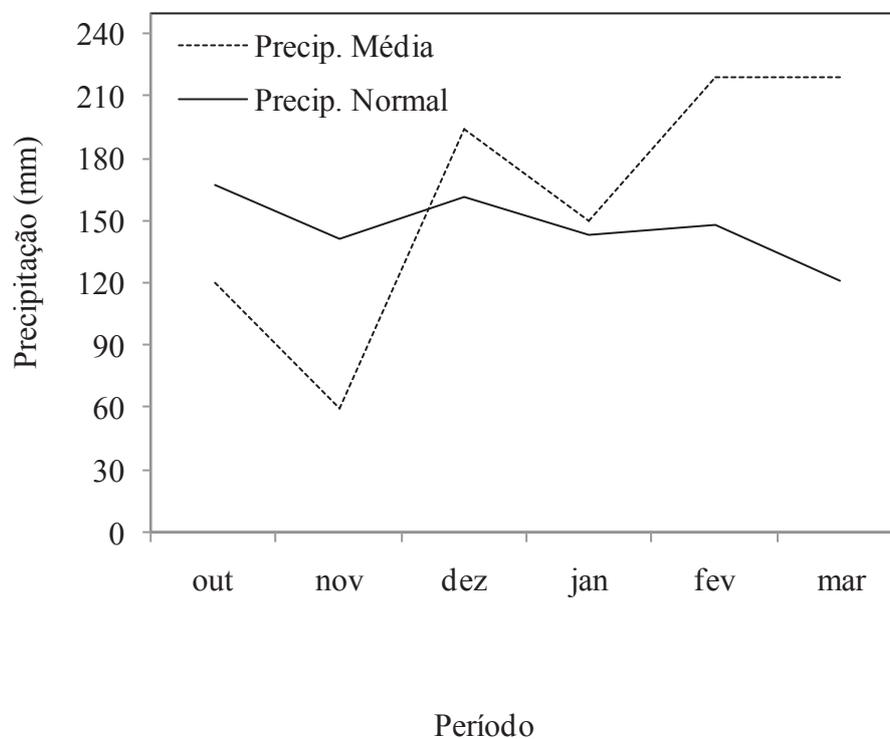


Período

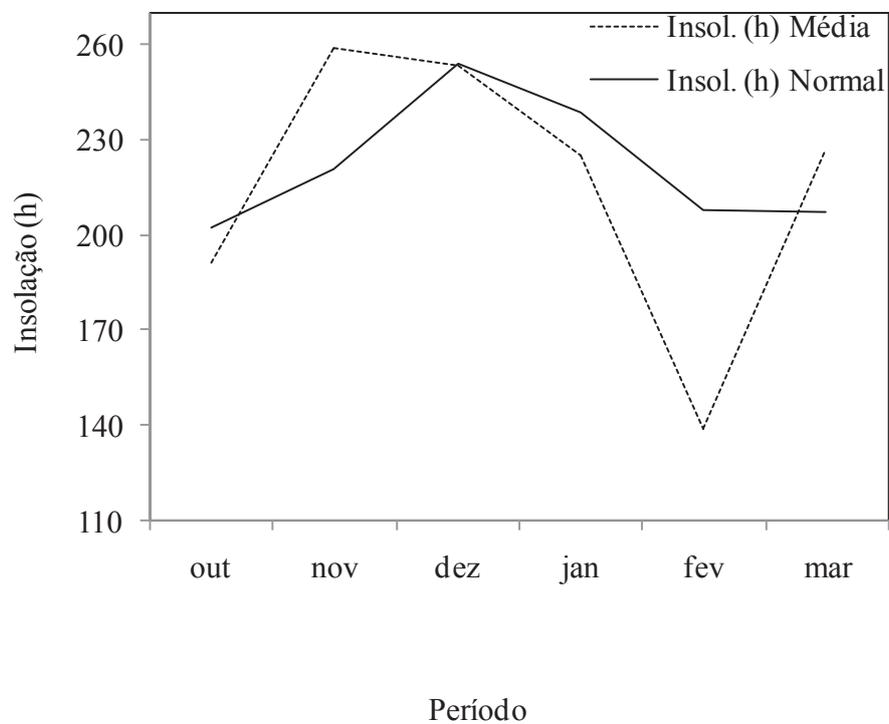
APÊNDICE 6. Insolação média e Insolação normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do trigo, safra 2010, Passo Fundo, RS. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.



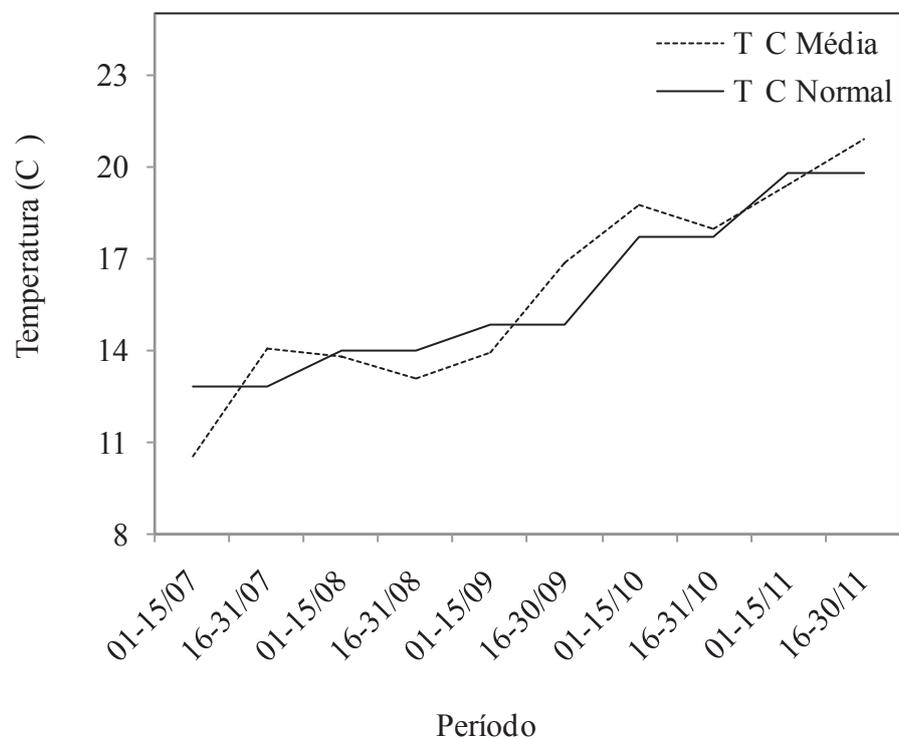
APÊNDICE 7. Temperatura média e temperatura normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do milho, safra 2010/2011, Passo Fundo, RS. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.



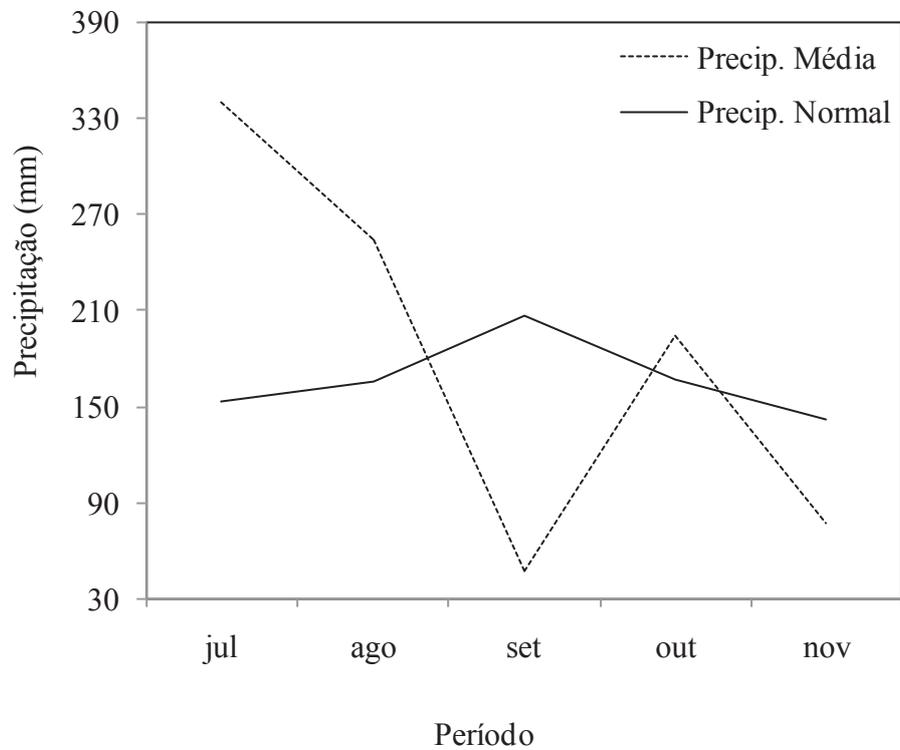
APÊNDICE 8. Precipitação média e precipitação normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do milho, safra 2010/2011, Passo Fundo, RS. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.



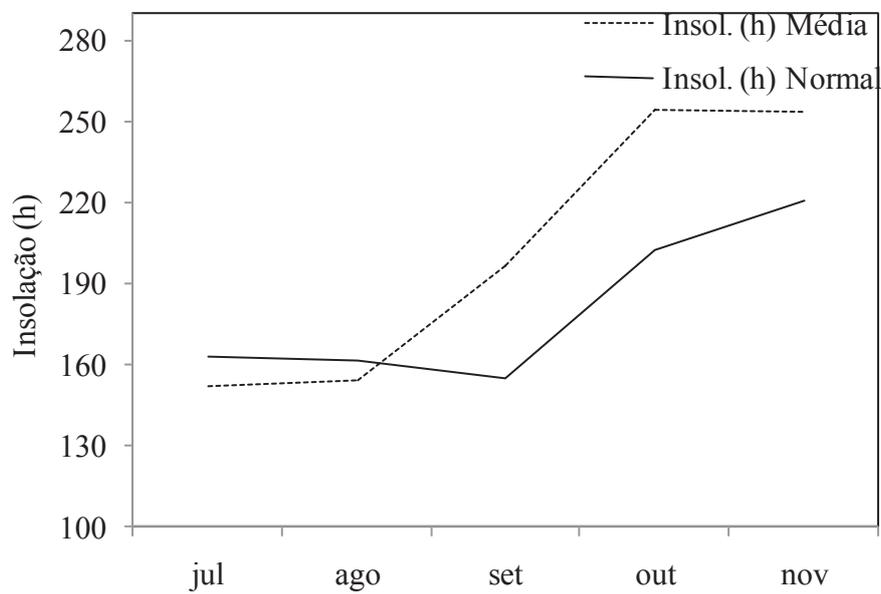
APÊNDICE 9. Insolação média e Insolação normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do milho, safra 2010/2011, Passo Fundo, RS, 2012. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.



APÊNDICE 10. Temperatura média e temperatura normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do trigo, safra 2011, Passo Fundo, RS. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.



APÊNDICE 11. Precipitação média e precipitação normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do trigo, safra 2011, Passo Fundo, RS. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.



Período

APÊNDICE 12. Insolação média e Insolação normal ocorrida no período entre semeadura e colheita da cultura do trigo, safra 2011, Passo Fundo, RS, 2012. Fonte: Embrapa Trigo, 2012.

APÊNDICE 13. Resultados de análises de solo realizadas nas áreas de instalação dos experimentos de campo, profundidade de amostragem 0-10 cm

Variável	Cultura/Safra			
	Milho- 2009/2010	Milho- 2010/2011	Trigo- 2010	Trigo- 2011
Argila (%)	41	42	63,2	45,8
pH (H ₂ O)	5,2	4,7	5,4	4,9
Ind. SMP	5,6	5,2	5,8	5,2
P (mg/dm ³)	31	19,7	18,2	18,9
K (mg/dm ³)	246	97	249	234
M.O. (%)	2,1	3,8	4,7	4,2
Al (cmol _c /dm ³)	0,3	2,1	0,1	1,5
Ca (cmol _c /dm ³)	4,1	1,8	3,4	3,7
Mg (cmol _c /dm ³)	1,8	0,6	2,5	1,7
H+AL (cmol _c /dm ³)	6,9	10,9	5,5	10,9
CTC (cmol _c /dm ³)	13,4	13,6	12	16,9
Sat. Bases (%)	49	20	54	35
Sat. Al (%)	4	44	2	20
Sat. K (%)	4,7	1,8	5,3	3,5

Fonte: Laboratório de Solos, Plantas, Adubos e Defensivos, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo.