



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSIANE FUKAMI

**ESTRATÉGIAS DE INOCULAÇÃO COM *AZOSPIRILLUM*
BRASILENSE NAS CULTURAS DE MILHO (*ZEA MAYS* L.) E
TRIGO (*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

Londrina
2014

JOSIANE FUKAMI

**ESTRATÉGIAS DE INOCULAÇÃO COM *AZOSPIRILLUM*
BRASILENSE NAS CULTURAS DE MILHO (*ZEA MAYS L.*) E
TRIGO (*TRITICUM AESTIVUM L.*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dr^a Mariangela Hungria
Co-orientador: Dr. Marco Antonio Nogueira

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F961e Fukami, Josiane.

Estratégias de inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho (*Zea mays* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.) / Josiane Fukami. – Londrina, 2014.
64 f.:il.

Orientador: Mariangela Hungria.

Coorientador: Marco Antonio Nogueira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola – Teses. 2. Fertilizantes nitrogenados – Teses. 3. Trigo – Teses. 4. Milho – Teses. 5. *Azospirillum brasilense* – Inoculação – Teses. I. Hungria, Mariangela. II. Nogueira, Marco Antonio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 663.1

JOSIANE FUKAMI

**ESTRATÉGIAS DE INOCULAÇÃO COM *AZOSPIRILLUM*
BRASILENSE NAS CULTURAS DE MILHO (*ZEA MAYS* L.) E TRIGO
(*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dr^a. Mariangela Hungria
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
Embrapa Soja

Dr. Ricardo Silva Araujo
Total Biotecnologia

Dr. Fabio Martins Mercante
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
Embrapa Agropecuária Oeste

Londrina, 08 de dezembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Tento buscar palavras belas e doces para descrever o que é gratidão, mas na maioria das vezes é difícil de decifrá-las. Não porque não sei o seu real significado, mas porque temos dificuldades de fazê-lo. Nessas poucas palavras, deixo o meu eterno agradecimento a todos que fizeram parte da minha caminhada.

Primeiramente a Deus, pelo alicerce da minha fé e esperança.

Aos meus queridos orientadores Mariangela Hungria e Marco Antonio Nogueira, pelo aprendizado e paciência quanto à minha grande ansiedade por tudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nivel Superior (CAPES), pela bolsa concedida, tornando possível a realização desta etapa.

Aos meus amados pais, que muitas vezes longe, sei que estão torcendo por mim.

Aos meus amigos do laboratório, que fizeram os meus dias mais felizes nessa jornada e me auxiliaram na condução do experimento, em especial a Paula, Sheila, Dona Rosa, Rinaldo e Cristiane.

Às minhas irmãs, que sempre estiveram comigo e me ajudaram nos momentos mais difíceis.

À minha avozinha e tias, que na ausência dos meus pais, nos ajudaram como se fossem eles.

Às minhas amigas de infância, Daiane, Viviane e Rosa Maria, que mesmo longe, estão sempre comigo.

Ao meu amor Gustavo, por fazer parte da minha vida, pelo seu companheirismo, dedicação e amizade.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

(Augusto Cury)

FUKAMI, Josiane. **Estratégias de inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho (*Zea mays* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.)**. 2014. 64f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O uso de inoculante à base de *Azospirillum brasilense* vem crescendo nas culturas do milho (*Zea mays* L.) e do trigo (*Triticum aestivum* L.). Contudo, existem preocupações com essa nova tecnologia, principalmente pela incompatibilidade com os agrotóxicos utilizados no tratamento químico de sementes. Com o intuito de verificar opções à aplicação tradicional de inoculantes via sementes, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de métodos alternativos para a inoculação de *A. brasilense* via sementes. Em casa de vegetação, foram estudadas diferentes doses de inoculante (milho: 100 e 250 mL 50 kg⁻¹ sementes; trigo: 200 e 500 mL 50 kg⁻¹ sementes), doses de N-fertilizante (milho: 120 e 90 kg N ha⁻¹; trigo: 80 e 60 kg N ha⁻¹) e métodos de inoculação (via semente, sulco, pulverização foliar e na superfície do solo). Foram avaliados os parâmetros: contagem de bactérias (folhas, raízes e rizosfera), após desinfestação superficial, pelo método de número mais provável (NMP); massa da parte aérea seca (MPAS); massa de raízes seca (MRS); teor de N (TN); e N-total da parte aérea (NTPA); e teor de clorofila. Também foram avaliados o diâmetro do colmo e a altura de plantas de milho e o número de perfilhos no trigo. No campo, foram realizados três ensaios com o milho em Cachoeira Dourada (GO), Luis Eduardo Magalhães (BA) e Ponta Grossa (PR). Foram aplicados 91,5 kg N ha⁻¹ com diferentes doses de inoculante (200 e 400 mL 50 kg⁻¹ sementes) em diferentes métodos inoculação (via semente, sulco, pulverização foliar e na superfície do solo), além de três testemunhas sem inoculação (com 24; 91,5 e 114 kg N ha⁻¹). Foram avaliados a MPAS, o teor de N e produtividade de grãos. No ensaio em casa de vegetação, a inoculação por pulverização foliar e na superfície do solo, de maneira geral, proporcionou efeitos positivos nos parâmetros avaliados em ambas as culturas. No milho, o tratamento inoculado com 100 mL 50 kg⁻¹ sementes e 120 kg N ha⁻¹ não resultou em incremento nos parâmetros avaliados, indicando efeitos negativos do tratamento com fertilizante químico em *A. brasilense*. Na contagem de bactérias das raízes e da rizosfera, a inoculação no sulco resultou em incremento estatisticamente significativo em relação às plantas de milho e de trigo não inoculadas. O método de inoculação por pulverização foliar no milho e no trigo apresentou diferenças significativas na contagem de bactérias das folhas quando comparado ao tratamento não inoculado. Em Cachoeira Dourada, a inoculação com a maior dose de inoculante e pulverização foliar foi superior estatisticamente às testemunhas não inoculadas para o parâmetro de rendimento de grãos. Consequentemente, a inoculação por pulverização foliar pode representar uma alternativa à inoculação tradicional nas sementes, podendo ser utilizada em casos em que haja incompatibilidade com produtos químicos usados no tratamento de sementes.

Palavras-chave: Pulverização. Sulco. Estratégias de inoculação. Fertilizantes Nitrogenados. Doses de Inoculantes.

FUKAMI, Josiane. **Strategies of inoculation with *Azospirillum brasilense* for maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) crops.** 2014. 64p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The use of *Azospirillum brasilense* inoculants for maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) is increasing crops in Brazil. However, there are concerns about this new technology, especially in relation to the incompatibility of inoculants with pesticides used for seed treatment. With the aim of verifying options to the traditional application of inoculants on seeds, the objective of this study was to evaluate the effects of alternative methods for inoculation of *A. brasilense*. Under greenhouse conditions, different doses of inoculants (maize: 100 and 250 mL 50 kg⁻¹ of seeds; wheat: 200 and 500 mL 50 kg⁻¹ of seeds), of N-fertilizer (maize: 120 e 90 kg N ha⁻¹; wheat: 80 e 60 kg N ha⁻¹) and methods of inoculation (via seed, in-furrow, spray on leaves and on soil surface). The parameters evaluated were: bacterial counts (leaves, roots and rhizosphere) after surface disinfection, by the most probable number (MPN) method; shoot dry weight (SDW); root dry weight (RDW); N content (NC) and total N in shoots (TNS); and content of chlorophyll. Other parameters evaluated were the stem diameter and plant height on maize and the number of tillers on wheat. Three field experiments were performed with maize, in Cachoeira Dourada (GO), Luis Eduardo Magalhães (BA) and Ponta Grossa (PR). Maize plants received 91.5 kg N ha⁻¹ with different doses of inoculant (200 and 400 mL 50 kg⁻¹ of seeds) applied with different inoculation methods (via seed, in-furrow and spray on leaves and on soil surface), in addition to three non-inoculated controls (24; 91.5 and 114 kg N ha⁻¹). The parameters evaluated were SDW, N content and yield. In the greenhouse experiments, the inoculation via spray (leaves and soil surface) in general resulted in positive effects on the parameters evaluated in both cultures. In maize, the treatment inoculated with 100 mL 50 kg⁻¹ of seeds and receiving 120 kg N ha⁻¹ did not result in increases in the evaluated parameters, indicating negative effects of chemical fertilizer on *A. brasilense*. Bacterial counts on roots and in the rhizosphere increased significantly by the inoculation in-furrow, in comparison to the non-inoculated control in both crops. Inoculation by foliar spraying in maize and wheat significantly increased bacterial counts on leaves when compared to the non-inoculated control. In Cachoeira Dourada, inoculation with the higher dose of inoculant and spraying on leaves resulted in higher yield in comparison with the non-inoculated control. Therefore, the inoculation by foliar spraying can represent an alternative to the traditional method of seed inoculation, and can be used in cases where there are incompatibilities with pesticides.

Keywords: Spraying. In-furrow. Strategies inoculation. Nitrogen Fertilizers. Doses of Inoculants.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tratamentos do ensaio conduzido em casa de vegetação, sob distintas doses de inoculantes, de N fertilizante e métodos de aplicação de inoculantes nas culturas de milho e trigo.....	33
Tabela 2 –	Características químicas do solo utilizado nos experimentos com milho e trigo, antes da realização da calagem	35
Tabela 3 –	Tratamentos do ensaio conduzido a campo com milho, com diferentes doses de inoculantes, de N fertilizante e métodos de inoculação.....	35
Tabela 4 –	Características químicas e textura dos solos (0-20 cm) nos quais os ensaios foram conduzidos, na safra 2012/2013. Análises realizadas antes da semeadura	38
Tabela 5 –	Informações agronômicas dos experimentos a campo	38
Tabela 6 –	Massa da parte aérea seca (MPAS), massa de raízes secas (MRS), teor de N (TN), N total acumulado na parte aérea (NTPA) e teor de clorofila em ensaio conduzido em casa de vegetação, com milho híbrido BRS 3010, em função de diferentes doses de inoculantes, de N fertilizante e métodos de inoculação. Coleta realizada aos 52 dias após a emergência das plântulas.....	43
Tabela 7 –	Parâmetros biométricos (volume de raiz, diâmetro do colmo, altura de plantas) e parâmetros microbiológicos (nº células g ⁻¹ avaliada pelo método do número mais provável (NMP) nas folhas, raízes e solo rizosférico), em ensaio conduzido em casa de vegetação, com milho híbrido BRS 3010, em função de diferentes doses de inoculante, de N fertilizante e métodos de inoculação. Coleta realizada aos 52 dias após a emergência das plântulas.....	44
Tabela 8 –	Massa da parte aérea seca (MPAS), massa de raízes secas (MRS), teor de N (TN), N total acumulado na parte aérea (NTPA) e teor de clorofila em ensaio conduzido em casa de vegetação, com trigo cultivar BRS Gaivota, em função de diferentes doses de inoculantes, de N fertilizante e métodos de inoculação. Coleta realizada aos 54 dias após a emergência das plântulas	45

Tabela 9 – Parâmetros biométricos (volume de raízes e número de perfilhos) e parâmetros microbiológicos (nº células g ⁻¹ da parte aérea; da raiz e do solo rizosférico), em ensaio conduzido em casa de vegetação com trigo cultivar BRS Gaivota, em função de diferentes doses de inoculante, de N fertilizante e métodos de inoculação. Coleta realizada aos 54 dias após a emergência das plântulas.....	45
Tabela 10 – Massa da parte aérea seca (MPAS) e teor N (TN) na cultura do milho. Experimento realizado em três regiões no Brasil, em função de diferentes doses de N fertilizante, métodos de inoculação e doses de inoculante.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	AS GRAMÍNEAS	13
2.1.1	A Cultura do Milho.....	13
2.1.2	A Cultura do Trigo.....	14
2.2	FERTILIZANTES NITROGENADOS	14
2.3	BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	16
2.4	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)	17
2.5	<i>AZOSPIRILLUM</i> COMO INOCULANTE PARA CEREAIS	19
2.6	INOCULAÇÃO EM SEMENTES TRATADAS COM PRODUTOS QUÍMICOS.....	21
	REFERÊNCIAS	23
3	ARTIGO: Estratégias de inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> nas culturas de milho e do trigo	30
3.1	INTRODUÇÃO	30
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.2.1	Condução dos Ensaios em Casa de Vegetação.....	31
3.2.2	Condução dos Ensaios a Campo.....	35
3.2.3	Análises Laboratoriais	36
3.2.4	Análises Estatísticas.....	40
3.3	RESULTADOS	40
3.3.1	Ensaios conduzidos em casa de vegetação	40
3.3.2	Ensaios conduzidos a campo	46
3.4	DISCUSSÃO	49
3.5	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A expressão fenotípica de uma espécie vegetal, agronomicamente relacionada à quantidade e à qualidade dos produtos colhidos, depende do genótipo (cultivar) e do ambiente (condições edafoclimáticas) em que é cultivada. Devido a gama de fatores que atuam concomitantemente no ambiente de produção, pouco se conhece sobre suas interrelações. É notório, porém, o conhecimento de que o equilíbrio nutricional é um dos principais fatores condicionantes das produtividades agrícolas.

Dentre os nutrientes essenciais às plantas está o nitrogênio (N), requerido em maior quantidade. Embora a obtenção de altas produtividades dos cultivos esteja atrelada ao equilíbrio de todos os nutrientes (MOURÃO FILHO; AZEVEDO; NICK, 2002; MARTINS et al., 2005), o N é um dos nutrientes ao qual há maiores respostas das culturas em incremento de produtividade (ROS et al., 2003; SOUZA; SORATTO, 2006). O ganho de produtividade pode ser atribuído, dentre outros fatores, ao aumento no teor de clorofila no tecido foliar, pois o N é constituinte dessa molécula, responsável pela fotossíntese – fonte para obtenção de carbono e de energia (SEPEHRI; SANAVY, 2003).

O uso de fertilizantes nitrogenados de origem estritamente industrial apresenta alguns pontos negativos. O primeiro é de cunho econômico, em que os custos de produção e comercialização são elevados, devido ao alto gasto energético na produção e transporte destes fertilizantes. O outro ponto refere-se à eficiência agrônômica, especialmente com relação à ureia – um dos fertilizantes nitrogenados mais comercializados – uma vez que está sujeita a perdas elevadas, devido à volatilização de amônia logo após a aplicação ou, ainda, por desnitrificação ou lixiviação de nitrato, resultante da sua oxidação no solo.

Além da adubação nitrogenada, as plantas podem obter nitrogênio de solos com alto teor de matéria orgânica (GONÇALVES; CERETTA; BASSO, 2000) e a partir da fixação biológica (simbiótica ou não) (SAIKIA et al., 2012) e fixação por descargas elétricas (RICE, 1964). Na fixação biológica, destaca-se a associação simbiótica entre leguminosas e bactérias conhecidas, coletivamente, como rizóbios. Um exemplo clássico é o de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* que formam nódulos nas raízes da soja (*Glycine max* (L.) Merr.), estabelecendo simbioses altamente eficientes em fixar nitrogênio (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). Esta associação de organismos tornou economicamente viável a produção de soja no Brasil, devido ao aumento na produtividade e à eliminação dos custos com fertilizantes nitrogenados.

O gênero *Azospirillum* inclui bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico (N_2) (BASHAN et al., 2008), tornando-o disponível para as plantas, através da conversão enzimática do N_2 em íons amônio (NH_4^+). No entanto, essas bactérias apresentam características distintas dos simbioses conhecidos coletivamente como rizóbios, uma vez que não formam estruturas típicas, os nódulos, mas colonizam a rizosfera e raízes (BASHAN; HOLGUIN, 1997). A associação de *Azospirillum* spp. tem sido estudada principalmente em gramíneas como o milho (*Zea mays* L.), o trigo (*Triticum aestivum* L.) e a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (SWEDRZYŃSKA; SAWICKA, 2001; HUNGRIA et al., 2010; MOUTIA et al., 2010; PICCININ et al., 2011) – culturas essas de grande importância para o agronegócio brasileiro.

Bactérias do gênero *Azospirillum* também são comumente denominadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), por exercerem outros efeitos benéficos aos vegetais hospedeiros, não decorrentes da FBN. A promoção do crescimento pode se dar por diversos mecanismos, incluindo a solubilização de fosfato (RODRIGUEZ et al., 2004) e a produção de reguladores vegetais, como auxinas, citocininas (TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979; MONTAÑEZ; SICARDI, 2013), etileno (STRZELCZYK; KAMPER; LI, 1994) e giberilinas (BOTTINI et al. 1989; SAIKIA et al., 2012).

Existem relatos na literatura de que tais bactérias tem a capacidade de atuar contra fitopatógenos, ou seja, no controle biológico de doenças de plantas, como o fungo *Colletotrichum acutatum* no morangueiro (*Fragaria* spp.) (TORTORA; DIAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011), a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* no tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (ROMERO et al., 2003) e nematoides como *Meloidogyne incognita* (KHAN; KOUNSAR; HAMID, 2002).

O uso de BPCP em substituição parcial ou total a fertilizantes e agrotóxicos pode, além de reduzir os custos de produção, auxiliar na mitigação do impacto ambiental relacionado à agricultura. Para o desenvolvimento de práticas agronomicamente viáveis como o uso de BPCP são imprescindíveis estudos mais aprofundados com essas bactérias associativas, a fim de verificar a viabilidade de novas estratégias de inoculação, que possam ser aplicadas em larga escala na agricultura.

Hungria et al. (2010), estudando diferentes estirpes e espécies de *Azospirillum* (*A. brasilense* e *A. lipoferum*) inoculadas em sementes de milho e trigo, encontraram resultados promissores. Foram constatados incrementos de produtividade pela inoculação de *A. brasilense* nas culturas de milho e trigo de até 30% e 18%, respectivamente. Esses autores evidenciaram diferenças entre as estirpes e atribuíram os resultados encontrados

não só ao maior conteúdo de N, mas também a outros macro e micronutrientes absorvidos em maior quantidade pelo sistema radicular mais desenvolvido. Piccinin et al. (2011), avaliando a produtividade de trigo inoculado com *A. brasilense* e associado a diferentes doses de fertilizante nitrogenado (0, 50 e 100 kg N ha⁻¹), evidenciaram melhores resultados com a dose intermediária de adubação.

É corrente e muitas vezes necessário o tratamento químico das sementes com agrotóxicos nas culturas de milho e de trigo. Entretanto, estes podem influenciar diretamente na infecção das bactérias no hospedeiro reduzindo, assim, a eficiência de inoculação via semente – método mais empregado – e, por consequência, o desenvolvimento das plantas (SWEDRZYŃSKA; SAWICKA, 2011). Neste sentido, outras estratégias de inoculação podem ser eficazes, visto que as bactérias não entrariam em contato diretamente com os produtos químicos utilizados nos tratamentos de sementes. Entre as estratégias, têm-se diferentes métodos de inoculação, como a aplicação do inoculante no sulco de semeadura e a pulverização após a emergência das plântulas, ou durante o seu desenvolvimento. Contudo, particularmente no caso das estirpes brasileiras de *A. brasilense* em associação com cultivares brasileiras de milho e trigo, há carência de informações sobre métodos alternativos de inoculação.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o desenvolvimento de milho e trigo com diferentes estratégias de inoculação com *Azospirillum brasilense* (estirpes comerciais Ab-V5 e Ab-V6), associadas a diferentes doses de inoculante e de fertilizante nitrogenado, visando estabelecer estratégias de inoculação que permitam maximizar o estabelecimento do microrganismo e seu efeito na promoção do crescimento das plantas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AS GRAMÍNEAS

A família Poaceae, também conhecida como gramínea, compreende mais de 10.000 espécies, incluindo as culturas de maior importância agrícola e econômica mundial, tais como o milho, o trigo, o arroz (*Oryza sativa* L.) e a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).

2.1.1 A Cultura do Milho

O milho é uma das culturas de maior importância no mundo, não só pela extensão da área cultivada, como também por sua versatilidade de utilização, destacando-se a alimentação animal e humana e, ainda, por seus reflexos sócio-econômicos e culturais.

No cenário nacional, o milho é a segunda cultura de maior importância para a agricultura brasileira. Somente na safra 2011/2012 – primeira e segunda safras – a produção no país correspondeu a 72,98 milhões de toneladas (CONAB, 2012a) e, na safra de 2012/2013, a produção foi de 81,34 milhões de toneladas (CONAB, 2013a).

Já na evolução mundial de produção, o milho é a cultura de maior expressão – 840 milhões de toneladas em 2012/2013 (USDA, 2012a). O Brasil destaca-se como o terceiro maior produtor, superado apenas pelos Estados Unidos, com 272,4 milhões de toneladas e China, com 200 milhões de toneladas (USDA, 2012a). Apesar de estar entre os três maiores produtores, o Brasil não tem se destacado entre os países com maior produtividade. Isso porque a média do maior produtor – Estados Unidos – foi de 9,24 t ha⁻¹ na safra de 2011/2012 (USDA, 2012a), enquanto a média brasileira foi de apenas 4,8 t ha⁻¹ (USDA, 2012b).

Diversos fatores contribuem para que a produtividade nacional de milho não alcance patamares mais elevados, como a baixa e/ou ausência de adoção de tecnologias, devido ao baixo nível de capitalização dos pequenos produtores, que correspondem, aproximadamente a 60% da produção nacional (FOLONI et al., 2008). Constatou-se, assim, que os diferentes sistemas de produção deverão ser aperfeiçoados a fim de aumentar a produtividade e a rentabilidade da cultura (RODRIGUES et al., 2012).

2.1.2 A Cultura do Trigo

O trigo está entre as plantas mais cultivadas no mundo. Sendo uma gramínea de ciclo anual, com cultivo no inverno, por irrigação ou sequeiro, é utilizado como alimento básico, consumido em diferentes formas, como pães, massas alimentícias, bolos e biscoitos.

Apesar da grande importância da cultura, a produção brasileira na safra de 2012/2013 foi de 4,46 milhões de toneladas, apresentando uma redução de 1,32 milhões de toneladas comparada à safra de 2011/2012, consequência do clima desfavorável desse ano, com a ocorrência de estiagem no período de semeadura, geada na época crítica para a cultura, chuvas de granizo no final do ciclo, vendavais ocasionando acamamento no cultivo, e excesso de chuva no período da colheita (CONAB, 2012a). Contudo, nos últimos anos, houve um incremento na produção do trigo, relacionado ao melhoramento genético, com genótipos de porte mais baixo, ciclo precoce e com maior potencial de rendimento de grãos, além da resistência ou tolerância às principais doenças, e a melhorias no manejo dos solos (SCHEEREN et al., 2007).

O Brasil concentra sua produção no Paraná e no Rio Grande do Sul, responsáveis por, aproximadamente, 90% da produção nacional. Este montante representa menos de 50% do consumo interno do cereal (CONAB, 2012a), fazendo com que o país seja um dos principais importadores mundiais de trigo (USDA, 2012a).

Quanto ao panorama mundial, o trigo representa o segundo cereal mais produzido, com considerável aumento nos últimos anos, com cerca de 651 milhões de toneladas na safra de 2012/2013, com liderança da União Europeia – 132 milhões de toneladas (USDA, 2012a).

2.2 FERTILIZANTES NITROGENADOS

O nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas. Ainda que a obtenção de altas produtividades das culturas esteja relacionada ao equilíbrio de todos os nutrientes (MOURÃO FILHO; AZEVEDO; NICK, 2002; MARTINS et al., 2005), o N é um dos elementos ao qual há maiores respostas de produtividade nas culturas de milho e trigo (ROS et al., 2003; SOUZA; SORATTO, 2006).

De acordo com Gross, Von Pinho e Brito (2006), o N possui grande relevância como constituinte de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos e citocromos, além de sua importante função como integrante da molécula de clorofila.

A maneira mais comum de disponibilizar N para as plantas é pelo uso de fertilizantes químicos nitrogenados. No Brasil, cerca de 70% desses fertilizantes são importados, elevando ainda mais os custos da aplicação de N-mineral, não apenas no país, mas em diversas localidades (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). A comercialização de fertilizantes nitrogenados no primeiro semestre de 2012 no Brasil foi de 2.654 mil toneladas, apresentando um aumento de 0,5% em relação ao ano de 2011. Essa evolução deve-se à demanda pelas culturas de milho segunda safra, arroz, entre outras (ANDA, 2012).

Entretanto, o uso dos fertilizantes nitrogenados resulta em várias implicações econômicas e ambientais, devido a fatores relacionados ao custo de produção, principalmente pela alta quantidade de energia fóssil utilizada para sua produção industrial, além da baixa eficiência de uso, que, nas melhores condições, chega a 50% do total aplicado (VITTI; MALAVOLTA; COLTINHO, 1984; QUEIROZ et al., 2011), enquanto o restante é perdido no sistema solo-atmosfera por lixiviação, volatilização, desnitrificação, escoamento superficial e erosão (QUEIROZ et al., 2011).

O custo de fertilizante reflete no final da cadeia produtiva de grãos, ou seja, eleva os custos de produção para os agricultores. Estudos econômicos realizados por Souza et al. (2012) constataram que os fertilizantes nitrogenados, como a ureia, o sulfato de amônio e o Entec[®] (sulfonitrato de amônio) corresponderam a, aproximadamente, 32%, 47% e 49%, respectivamente, do custo de produção do milho. Esses custos podem ser ainda mais elevados, quando se visam maiores produtividades. Entretanto, alguns cuidados devem ser tomados, uma vez que doses muito baixas limitam a produtividade e, quando muito elevadas, podem causar acamamento de plantas, dificultando a colheita e reduzindo a produtividade das culturas, por exemplo, do trigo (ZAGONEL et al., 2002; PRANDO et al., 2012).

Esses índices podem ser reduzidos por práticas de manejo da cultura, pela fonte do nutriente e pela forma de aplicação utilizada. Além desses fatores, as plantas podem aumentar a eficiência de absorção do nutriente disponível no solo, mas também obter N biologicamente a partir da ação de bactérias diazotróficas. A utilização dessas bactérias com as culturas do milho e do trigo apresenta potencial para diminuir a dependência dos fertilizantes nitrogenados químicos e, como consequência, reduzir os custos de produção das lavouras e o impacto ambiental.

2.3 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

As bactérias diazotróficas são microrganismos capazes de fixar nitrogênio atmosférico (N_2), tornando-o disponível para as plantas pela conversão enzimática do N_2 em íons amônio (NH_4^+). Essas bactérias podem ser classificadas em três grupos: *i*) bactérias de vida livre, que são capazes de fixar N_2 para o seu próprio uso; *ii*) bactérias associativas, que contribuem para o crescimento dos vegetais, porém, sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo assim uma simbiose; *iii*) bactérias simbióticas, que estabelecem interação estreita entre planta e hospedeiro, com a formação de estruturas típicas, os nódulos (EVANS; BURRIS, 1992; MARIN et al., 1999).

No caso das simbióticas, um dos exemplos clássicos é o de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* que formam nódulos nas raízes da soja, conseguindo suprir a planta com N suficiente para sustentar altas produtividades (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001).

Segundo Baldani et. al (1997), as bactérias diazotróficas associativas podem ainda ser subdivididas em três subgrupos: *i*) bactérias rizosféricas, que colonizam a superfície de raízes; *ii*) bactérias endofíticas facultativas, que podem colonizar tanto a superfície quanto o interior de raízes; *iii*) bactérias endofíticas obrigatórias, que são capazes de colonizar o interior de raízes e a parte aérea das plantas. Deve-se observar, porém, que vários autores consideram não existir uma diferenciação clara entre bactérias associativas endofíticas e as rizosféricas, pois algumas bactérias podem ter períodos em que crescem na rizosfera, seguidos de períodos em que se localizam internamente na planta (BASHAN; HOLGUIN, 1997).

O gênero *Azospirillum* está compreendido no segundo subgrupo das associativas, sendo uma bactéria endofítica facultativa (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). De fato, essas bactérias podem também colonizar as folhas das plantas, como foi constatado por Mendonça, Urquiaga e Reis (2006), pelo método do “Número Mais Provável” (NMP). Esses autores observaram que as bactérias se localizam mais frequentemente no interior das raízes, seguidas pelos colmos e folhas de milho. Em outros estudos, foram isolados *Azospirillum* do interior de plantas (ROTHBALLER, M.; SCHIMID, M.; HARTMANN, A., 2003; FENG et al., 2004). A capacidade das bactérias associativas endofíticas de colonizar o interior da planta representa uma vantagem em relação às bactérias de vida livre, quanto à utilização de substratos e à localização intimamente relacionada ao hospedeiro. Essas bactérias possuem maior acesso às fontes de carbono

prontamente disponíveis, reduzindo a competição com demais microrganismos na rizosfera. Além dessas vantagens, os endofíticos colonizam nichos protegidos de elevadas concentrações de oxigênio, garantindo a funcionalidade da enzima nitrogenase (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; COMPANT et al., 2005), enzima essa responsável pela FBN.

2.4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)

Além da FBN, diversas bactérias, incluindo ou não espécies diazotróficas, são denominadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), por proporcionarem outros efeitos benéficos aos hospedeiros.

A promoção do crescimento pode se dar por duas diferentes vias:

i) Bactérias que afetam diretamente o metabolismo das plantas, fornecendo substâncias que geralmente estão disponíveis em menor quantidade (BASHAN; BASHAN, 2005), incluindo a solubilização de fosfato (RODRIGUEZ et al., 2004), a produção de fitormônios, como auxinas, citocininas, (TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979; MONTAÑEZ; SICARDI, 2013), etileno (STRZELCZYK; KAMPER; LI, 1994; HUNGRIA et al., 2010) e giberelinas (BOTTINI et al., 1989; SAIKIA et al., 2012). Além disso, essas bactérias melhoram a tolerância contra estresses, como seca, alta salinidade, toxicidade a metais e agrotóxicos (BASHAN et al., 2008).

ii) Bactérias que, indiretamente, promovem o crescimento das plantas em consequência de seus efeitos antagônicos a fitopatógenos, ou seja, como forma de controle biológico das doenças de plantas, tanto contra fungos, por exemplo, *Colletotrichum acutatum* no morangueiro (TORTORA; DIAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011), como contra bactérias, por exemplo *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* no tomate (ROMERO et al., 2003) e a nematoides, como *Meloidogyne incognita* (KHAN; KOUNSAR; HAMID, 2002). Tais bactérias produzem substâncias que prejudicam ou inibem outros microrganismos e parasitas, mas não as plantas. Como exemplos de mecanismos de inibição, têm-se a limitação da disponibilidade de ferro para os fitopatógenos, ou através de alterações no metabolismo da planta hospedeira, aumentando a sua resistência contra a infecção de patógenos, num processo chamado de resistência sistêmica (BASHAN et al., 2008) ou, ainda, pela produção de substâncias antimicrobianas (STROBEL, 2002). Outras aplicações dessas bactérias não relacionadas à agricultura têm surgido, como a produção de poli- β -hidroxibutirato (PHB) para a utilização na área médica, a degradação de poluentes, a produção de vitaminas, a purificação

de água residual (BASHAN; HOUGUIN, 1997) e a produção de substâncias anticancerígenas, como o taxol (STROBEL, 2002).

Dentre as bactérias promotoras de crescimentos de plantas, diversos são os gêneros, incluindo *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Anabaena*, *Arthrobacter*, *Azoarcos*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Hydrogenophaga*, *Kluyvera*, *Microcoleus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* e *Vibrio* (BASHAN et al., 2008).

Apesar dos diversos gêneros descobertos até o presente, as bactérias do gênero *Azospirillum* são as mais estudadas e utilizadas como BPCP. Atualmente, existem 17 espécies descritas (STRAININFO, 2013). No entanto, o *A. brasilense* e *A. lipoferum* são as espécies com maior número de estudos (BALDANI et al., 2005; FIBACH-PALDI; BURDMAN; OKON, 2012). 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 1,0 micrômetro (μm) e comprimento de 2,1 a 3,8 μm (SILVA, 2004), com alta mobilidade (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

A temperatura ótima de crescimento desses microrganismos varia entre 28 e 41°C, dependendo da espécie (ECKERT et al., 2001). São aeróbicos típicos quando supridos com fonte de N combinado, como amônio, nitrato, nitrito, aminoácidos, sendo essas as fontes de N preferenciais (HARTMANN; ZIMMER, 1994; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000) e microaerofílicos (WEBER; BALDANI; DÖBEREINER, 2000), quando crescem dependentes da fixação de N_2 .

Em uma revisão recente de trabalhos relacionados a respostas fisiológicas induzidas por *Azospirillum*, são relatadas melhorias na taxa fotossintética, com maior teor de clorofila e condutância estomática, no potencial hídrico, maior altura de plantas e incremento na produção de biomassa (BARASSI et al., 2008; HUNGRIA, 2011).

A associação com *Azospirillum* spp. é observada principalmente em gramíneas, como o milho, o trigo e a cana-de-açúcar (SWEDRZYŃSKA; SAWICKA, 2001; MOUTIA et al., 2010; PICCININ et al., 2011), culturas estas de grande importância para o agronegócio brasileiro. Alguns grupos de pesquisa, porém, vêm estudando o *Azospirillum* em culturas menos expressivas comercialmente, como no cultivo do pimentão (*Capsicum annuum* L.) (DEL AMOR; CUADRA-CRESPO, 2012). Esses autores, utilizando inoculante de *A. brasilense* e *Pantoea dispersa* sob estresse salino, observaram que o pimentão é capaz de melhorar, em parte, os efeitos causados pelo NaCl sobre o crescimento de plantas. Da mesma forma, o trabalho de Fasciglione et al. (2012) investigou a ação do *A. brasilense* em

alface (*Lactuca sativa* L.), sob condições salinas, a inoculação resultou em melhor crescimento das plantas, além de acelerar a taxa de germinação na ausência de salinidade.

Alamri e Mostafa (2009), estudando a inoculação de *A. brasilense* no trigo, em casa de vegetação, sob condições de irrigação com diferentes teores de água salina, evidenciaram que os tratamentos inoculados apresentaram aumento na altura de plantas, massa de raízes seca e massa da parte aérea seca e número de perfilhos quando comparados aos tratamentos não inoculados.

Nia et al. (2012) também constataram, nas plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum* em condições de salinidade, efeitos positivos quanto aos parâmetros avaliados: massa total das plantas seca, número de perfilhos, número de espigas e grãos por espigas, peso de grãos e índice de colheita quando comparados tanto às testemunhas em condições de alto estresse salino quanto às testemunhas sem estresse salino .

Foram conduzidos ensaios com as culturas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L), amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e soja para verificar o efeito da coinoculação de *Azospirillum* e estirpes de rizóbios. Os autores relataram o efeito sinérgico na nodulação, crescimento de plantas, rendimento e fixação de N₂ (SINGH, SUBBA RAO, 1979; RAVERKER, KONDE, 1988; HUNGRIA, NOGUEIRA, ARAUJO, 2013). Aparentemente, o *Azospirillum* libera substâncias na rizosfera que atuam como sinalizadoras de genes indutores de nódulos, garantindo o favorecimento da simbiose, promovendo um incremento na fixação de N₂, maior número de nódulos e, conseqüentemente incrementos no rendimento (GALAL, 1997; BURDMAN et al., 1998; PARRA; CUEVAS, 2001).

Embora extensos estudos genéticos, bioquímicos e ecológicos tenham classificado o gênero *Azospirillum* como um dos mais promissores para BPCP (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000), os mecanismos relacionados à promoção do crescimento ainda não estão bem elucidados, havendo necessidade de novos estudos que, inclusive, poderão trazer mais benefícios aos sistemas produtivos e à sustentabilidade da agricultura.

2.5 AZOSPIRILLUM COMO INOCULANTE PARA CEREAIS

Desde as primeiras descobertas que levaram à descrição do gênero *Spirillum* por Johanna Döbereiner e colaboradores na década de 70 (posteriormente reclassificados como *Azospirillum*), este é o gênero mais estudado entre as BPCP. Apesar da vasta gama de trabalhos realizados, tanto em casa de vegetação quanto a campo, a aplicação em escala

comercial não evoluiu na mesma proporção (BASHAN; HOLGUIN, 1997). Mesmo assim, em alguns países esses inoculantes começaram a ser comercializados. Com exemplo, nos Estados Unidos um produto denominado Azo-Green[®] foi produzido e recomendado para aumentar o vigor da semente, aumentar o sistema radicular, a resistência à geada e promover uma melhoria geral da saúde da planta (FALLIK; OKON, 1996).

Já na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido um produto com nome comercial de Zea-Nit[®], contendo uma mistura de *A. brasilense* (estirpe Cd) e *A. lipoferum* (Br17) comercializado na forma líquida ou em mistura com vermiculita. Segundo os fabricantes, este produto reduziria a aplicação de 30 a 40% do N necessário à cultura (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

No México, foi desenvolvido um inoculante comercializado como “Fertilizante para milho” e aplicado em 5000 ha no ano de 1993 (PAREDES-CARDONA et al., 1988; CABALLERO-MELLADO; CARCANO-MONTIEL; MASCARUA-ESPARZA, 1992; OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

A Argentina lançou um produto denominado Graminante[®], à base de pó de carbonato de cálcio contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum*. Os fabricantes informam que o produto pode aumentar a produção de grãos em cerca de 20 % (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Valores próximos aos informados pelo fabricante foram constatados por Cavallet et al. (2000), obtendo cerca de 17% de incremento no rendimento de grãos no milho. Contudo, Campos, Theisen e Gnatta (2000) não evidenciaram aumento no potencial produtivo no milho em condições de campo, além de não se conhecer a estirpe presente no inóculo, uma vez que não foi especificada pelo fabricante. E com o intenso estudo realizado no país, novas estirpes foram selecionadas e recomendadas para produção de inoculantes comerciais (Diaz-Zorita; Fernández-Canigia, 2008).

No Brasil, Piccinin et al. (2011), avaliando a produtividade de trigo inoculado com *A. brasilense* e associado com diferentes doses de fertilizante nitrogenado (0, 50 e 100 kg ha⁻¹ de N), evidenciaram melhores resultados com a dose intermediária de adubação. Hungria et al. (2010), estudando diferentes estirpes e espécies de *Azospirillum* (*A. brasilense* e *A. lipoferum*) inoculadas em sementes de milho e trigo, em vários locais, encontraram resultados promissores. Foram constatados incrementos nos níveis de produtividade com a inoculação de *A. brasilense*, nas culturas de milho e trigo de até 30% e 18%, respectivamente. Esses autores evidenciaram diferenças entre as estirpes utilizadas, e atribuíram os resultados encontrados não só ao nitrogênio, mas também a outros macro e micronutrientes absorvidos em maior quantidade pelas plantas inoculadas. Diante desses

últimos resultados promissores, o grupo de pesquisa da Embrapa Soja e da Universidade Federal do Paraná (UFPR) lançou as primeiras estirpes de *Azospirillum* recomendadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil (HUNGRIA, 2011). Das estirpes selecionadas, as duas escolhidas para a formulação de inoculantes comerciais foram a Ab-V5 e Ab-V6, uma vez que são eficientes tanto para a cultura do milho, como do trigo.

De maneira geral, aproximadamente 70% dos experimentos conduzidos a campo com inoculação de *Azospirillum*, em várias culturas e em diferentes condições edafoclimáticas, resultaram em incremento na produtividade, que pode chegar a 30% (OKON; LABANDERA-GONZÁLEZ, 1994).

2.6 INOCULAÇÃO EM SEMENTES TRATADAS COM PRODUTOS QUÍMICOS

Na atualidade, a incompatibilidade com fungicidas e outros produtos utilizados no tratamento de sementes representa o maior desafio à simbiose de *Bradyrhizobium*–soja (HUNGRIA, CAMPO, MENDES, 2007). De fato, ensaios de sobrevivência de *Bradyrhizobium* em sementes pré-inoculadas de soja realizados por Ferreira et al. (2011) evidenciaram que a sobrevivência dessas estirpes não foi superior a 10 dias após a inoculação e, ainda, nos ensaios onde houve o tratamento de sementes com fungicidas e micronutrientes, a mortalidade de células foi mais acentuada.

Limitações semelhantes podem ser observadas com diazotróficos associativos ou endofíticos e, portanto, precisam ser avaliadas. Gallori et al. (1991) estudando os efeitos tóxicos de dez fungicidas (Benomil; Captafol; Captam; Carboxim; Dicloran; Folpet; Tiabendazol; Thiram; Zineb e Ziran), seis herbicidas (2,4-D; Alachlor; Atrazina; Butilato; EPTC e Glifosato) e quatro inseticidas (Dieldrin; Carbaril; Malathion e Piretrina) no crescimento de *A. brasilense*, observaram que dentre os fungicidas, o thiram, ziran, captan, folpet e captafol, foram os compostos mais tóxicos. E ainda, o thiram e ziran inibiu o crescimento do microrganismo em baixas concentrações. Já para os herbicidas e inseticidas, nenhum agrotóxico apresentou efeito significativo no crescimento do *A. brasilense*. Omar e Abd-Alla (1992) encontraram efeitos tóxicos do Brominal (herbicida), Fenvalerato (inseticida piretróide) e Cuprosan (fungicida) no *A. brasilense*, com a consequente redução na taxa respiratória e conteúdo de proteínas.

Mesmo assim, várias pesquisas ainda precisam ser conduzidas para verificar a compatibilidade do *Azospirillum* com os principais agrotóxicos recomendados para as culturas do milho, do trigo e de outras gramíneas. É necessário, ainda, dar uma atenção

especial aos estudos de compatibilidade com inseticidas, que são largamente empregados no tratamento de semente de milho.

Além dos estudos mais aprofundados à respeito da compatibilidade de agroquímicos, se fazem necessários novos estudos buscando diferentes estratégias de inoculação, alternativas à inoculação via semente, em que as estirpes entram diretamente em contato com os agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

- ALAMRI, S.; MOSTAFA, Y. S. Effect of nitrogen supply and *Azospirillum brasilense* Sp-248 on the response of wheat to seawater irrigation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.16, p. 101-107, 2009.
- ANDA. ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. **Mercado de Fertilizantes – Janeiro/outubro 2012**. Disponível em: <<http://www.anda.org.br/estatistica/comentarios.pdf>> Acesso em: 3 nov. 2012.
- BALDANI, J. I.; KRIEG, N. R.; BALDANI, V. L. D.; HARTMANN, A.; DÖBEREINER, J. Genus II. *Azospirillum*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T., 2. ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer-Verlag, 2005. p. 7-26.
- BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J.; CREUS, C. M.; CARROZZI, L. E.; CASANOVAS, W. M.; PEREYRA, M. A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ed. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 49-59.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. Plant growth-promoting. In: HILLEL, D., ed. **Encyclopedia of soils in the environment**. Oxford: Elsevier, 2005. p. 103-115.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; PUENTE, M. E.; DE-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J. P. Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. In: AIT BARKA, E.; CLÉMENT, C. **Plant-microbe interactions**. Kerala, India: Research Signpost, 2008. p. 69-93.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, p. 45-47, 1989.
- BURDMAN, S.; VEDDER, D.; GERMAN, M.; ITZIGSOHN, R.; KIGEL, J., JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**, v. 31, p. 609-612, 1998.
- CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA- ESPARZA, M. A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, v. 13, p. 243-253, 1992.
- CAMPOS, B. C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante “graminante” na cultura de milho. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 713-715, 2000.
- 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 spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, segundo levantamento, novembro 2012, Brasília, 2012 a. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_11_08_09_10_48_boletim_portugues_novembro_2012.pdf>. Acesso em: 15 nov.2013.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, Décimo segundo levantamento, setembro 2013, Brasília, 2013 a. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_09_10_16_05_53_boletim_portugues_setembro_2013.pdf>. Acesso em: 15 set. 2013.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS. **Preços da Agropecuária: preços mínimos da safra verão (safras 2011/2012 e 2012/2013)**, 2013 b. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_03_26_16_59_42_0501_precos_minimos_safra_de_verao.pdf>. Acesso em: 15 set. 2013.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS. **Preços dos Insumos Agropecuários**. 2012b. Disponível em:
<<http://www.conab.gov.br/detalhe.php?a=1303&t=2>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

CROES, C.L.; MOENS, S.; VAN BASTELAERE, E.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, K.W. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 2261-2269, 1993.

DEL AMOR, F. M.; CUADRA-CRESPO, P. Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. **Functional Plant Biology**, v. 39, p. 82-90, 2012.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNÁNDEZ-CANIGIA, M. V. Análisis de la producción de cereales inoculados com *Azospirillum brasilense* em La República Argentina. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ed. ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 155-166.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107-149, 2003.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* 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.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.1-42.

FALLIK, J.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 511-515, 1996.

FASCIGLIONE, G.; CASANOVAS, E. M.; YOMMI, A.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. *Azospirillum* improves lettuce growth and transplant under saline conditions. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 92, n. 12, p. 2518-2523, 2012.

FENG, C.; SHI-HUA, S.; SAN-FENG, C.; YU-XIANG, J. Migration of *Azospirillum brasilense* Yu62 from root to stem and leaves inside rice and tobacco plants. **Acta Botanica Sinica**, v. 46, n. 9, p. 1065-1070, 2004.

FERREIRA, E.; NOGUEIRA, M. A.; FUKAMI, J.; CONCEIÇÃO, R. B.; HUNGRIA, M. Nova legislação, recomendação de doses de inoculantes e pré-inoculação: riscos ao sucesso da contribuição da fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja. In: XXXII REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 2011, São Pedro, SP. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2011. p. 325-327.

FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 326, p. 99-108, 2012.

FOLONI, J. S. S.; SANTOS, D. H.; CRESTE, J. E.; CÂMARA, M.; TIRITAN, C. S. Produção de matéria seca do milho e fertilidade do solo em função da gessagem em excesso. **Colloquium Agrariae**, v. 4, n. 2, p. 42-51, 2008.

GALAL, Y. G.M. Dual inoculation with strains of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* to improve growth and biological nitrogen fixation of soybean (*Glycine max* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 317-322, 1997.

GALLORI, E.; CASALONE, E.; COLELLA, C. M.; DALY, S.; POLSINELLI, M. 1,8-Naphthalic anhydride antidote enhances the toxic effects of captan and thiram fungicides on *Azospirillum brasilense* cells. **Research in Microbiology**, v. 142, p. 1005-1012, 1991.

GONÇALVES, C. N.; CERETTA, C. A.; BASSO, C. J. Sucessões de culturas com plantas de cobertura e milho em plantio direto e sua influência sobre o nitrogênio no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 153-159, 2000.

GROSS, M. R.; VON PINHO, R. G.; BRITO, A. H. Adubação nitrogenada, densidade de semeadura e espaçamento entre fileiras na cultura do milho em sistema plantio direto. **Ciência Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 387-393, 2006.

HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: OKON, Y., ed. ***Azospirillum/plant associations***. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 15-39.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 38 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).

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

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

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.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013.

KHAN, M. R.; KOUNSAR, K.; HAMID, A. Effect of certain rhizobacteria and antagonistic fungi on root-nodulation and root-knot nematode disease of green gram. **Nematologia Mediterranea**, v. 30, p. 85-89, 2002.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. **Fixação Biológica de Nitrogênio**: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 1999. 34 p. (Série Documentos).

MARTINS, L. A.; FIORETTO, R. A.; FONSECA, I. C. B.; CARNEIRO, C. E. A. Monitoramento nutricional do trigo através do índice de balanço nutricional – DRIS. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 455-462, 2005.

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**, v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.

MONTAÑEZ, A.; SICARDI, M. Effects of inoculation on growth promotion and biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) under greenhouse and field conditions. **Basic Research Journal of Agricultural Science and Review**, v. 2, p. 102-110, 2013.

MOURÃO FILHO, F. A. A.; AZEVEDO, J. C.; NICK, J. A. Funções e ordem da razão dos nutrientes no estabelecimento de normas DRIS em laranjeira Valência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 185-192, 2002.

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

NIA, S. H.; ZAREA, M. J.; REJALI, F.; VARMA, A. Yield and yield components of wheat as affected by salinity and inoculation with *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 11, n. 2, p. 113- 121, 2012.

- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, 1994.
- OMAR, S. A.; ABD-ALLA, M. H.. Effect of pesticides on growth, respiration and nitrogenase activity of *Azotobacter* and *Azospirillum*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 326-328, 1992.
- PAREDES-CARDONA, E.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M. A.; CABALLERO-MELLADO, J. Respuesta del maiz a la inoculation con *Azospirillum brasilense*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 30, n. 35, p. 351-355, 1988.
- PARRA, Y.; CUEVAS, F. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la Agricultura. **Cultivos Tropicales**, v. 23, n. 3, p. 31-41, 2001.
- PICCININ, G. G.; DAN, L. G. M.; BRACCINI, A. L.; MARIANO, D. C.; OKUMURA, R. S.; BAZO, G. L.; RICCI, T. T. E. Agronomic efficiency of *Azospirillum brasilense* in physiological parameters and yield components in wheat crop. **Journal of Agronomy**, v. 10, n. 4, p. 132-135, 2011.
- PRANDO, A. M.; ZUCARELI, C.; FRONZA, V; BASSOI, M. C.; OLIVEIRA, F. A. Formas de ureia e doses de nitrogênio em cobertura no desempenho agrônômico de genótipos de trigo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 621-632, 2012.
- QUEIROZ, A. M. Q.; SOUZA, C. H. E.; MACHADO, V. J.; LANA, R. M. Q.; KORNDORFER, G. H; SILVA, A. A. Avaliação de diferentes fontes e doses de nitrogênio na adubação da cultura do milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 3, p. 257-266, 2011.
- RAVERKER, K. P.; KONDE, B. K. Effect of *Rhizobium* and *Azospirillum lipoferum* inoculation on nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. **Plant and Soil**, v. 106, p. 249-252, 1988.
- RICE, E. L. Inhibition of Nitrogen-Fixing and Nitrifying Bacteria by Seed Plants (I .) **Ecological Society of America**, v. 45, n. 4, p. 824-837, 1964.
- RODRIGUES, T. R. D; BROETTO, L.; OLIVEIRA, P. S. R.; RUBIO, F. Desenvolvimento da cultura do milho submetida a fertilizantes orgânicos e minerais. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 4, p. 509-514, 2012.
- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552-555, 2004.
- ROMERO, A. M.; CORREA, O. S.; MOCCIA, S.; RIVAS, J. G. Effect of *Azospirillum* mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 832-838, 2003.

- ROS, C. O.; SALET, R. L.; PORN, R. L.; MACHADO, J. N. C. Disponibilidade de nitrogênio e produtividade de milho e trigo com diferentes métodos de adubação nitrogenada no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 799-804, 2003.
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. In situ localization and PGPR effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. **Symbiosis**, v. 34, p. 261-279, 2003.
- SAIKIA, S. P.; BORA, D.; GOSWAMI, A.; MUDOI, K. D.. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 6, p. 1085-1102, 2012.
- SCHEEREN, P. L.; CAIERÃO, E.; SILVA, M. S.; DEL DUCA, L. J. A.; NASCIMENTO JUNIOR, A.; LINHARES, A.; EICHELBERGER, L. Novas cultivares - BRS Guamirim: cultivar de trigo da classe pão, precoce e de baixa estatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 293-296, 2007.
- SEPEHRI, A.; SANAVY, M. Water and nitrogen stress on maize photosynthesis. **Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 6, p. 578-584, 2003.
- SILVA, A. A. O. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Conscientiae Saúde**, v. 3, p. 29-35, 2004.
- SINGH, C. S.; SUBBA RAO, N. S. Associative effect of *Azospirillum brasilense* with *Rhizobium japonicum* on nodulation and yield of soybean. **Plant and Soil**, v. 53, p. 387-392, 1979.
- SOUZA, E. F. C.; SORATTO, R. P. Efeito de fontes e doses de nitrogênio em cobertura, no milho safrinha, em plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 5, n. 3, p. 395-405, 2006.
- SOUZA, J. A.; BUZETTI, S.; TARSITANO, M. A. A.; VALDERRAMA, M. Lucratividade do milho em razão das fontes, doses e épocas de aplicação de nitrogênio. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 321-329, 2012.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 487-506, 2000.
- STRAININFO 2013. Disponível em: <<http://www.straininfo.net>>. Acesso em 26 nov 2013.
- STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.
- STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytokinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiology Research**, v. 149, p. 55-60, 1994.

SWEDRZYŃSKA, D.; SAWICKA, A. Effect of Inoculation on population numbers of *Azospirillum* bacteria under winter wheat, oat and maize. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 10, n. 1, p. 21-25, 2001.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1016-1024, 1979.

TORTORA, M. DIAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 275-286, 2011.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2012. Grain: **World markets and trade**. Disponível em: <<http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/grain-market/grain-market-11-09-2012.pdf>>. Acesso em: 3 nov. 2012a.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2012. **World agricultural production**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 3 nov. 2012b.

VITTI, G. C.; MALAVOLTA, E.; COLTINHO, E. L. M. Uso eficiente de fertilizantes nitrogenados e portadores de enxofre. In. SIMPÓSIO SOBRE FERTILIZANTES NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 1984, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: EMBRAPA-DEP, 1984. p. 205-253.

WEBER, O. B.; BALDANI, J. I. DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 11, p. 2277-2285, 2000.

ZAGONEL, J.; VENÂNCIO, W. S.; KUNZ, R. P.; TANAMATI, H. Doses de nitrogênio e densidade de plantas com e sem um regulador de crescimento afetando o trigo, cultivar OR-1. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 25-29, 2002.

3 ARTIGO: Estratégias de inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho e do trigo

3.1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) e o trigo (*Triticum aestivum* L.) estão entre as culturas que possuem maior expressão econômica no cenário mundial, não só pela extensão da área cultivada, como também por sua versatilidade de utilização, com destaque para a alimentação animal e humana e, ainda, por seus reflexos sócio-econômicos e culturais.

Dentre os nutrientes essenciais para as plantas, o nitrogênio (N) é o requerido em maior quantidade, sendo um dos elementos ao qual há maiores respostas das culturas de milho e trigo (ROS et al., 2003; SOUZA; SORATTO, 2006). A maneira mais comum de disponibilizar o N para as plantas é pelo uso de fertilizantes químicos nitrogenados. Entretanto, a sua produção é onerosa, refletindo no custo final da cadeia produtiva de grãos. Outra forma das plantas obterem o N é a partir da infecção com bactérias diazotróficas capazes de fixar nitrogênio atmosférico (N₂), pela conversão enzimática do N₂ em íons amônio (NH₄⁺). Dentre elas, está o *Azospirillum brasilense*, que está entre as bactérias também denominadas como promotoras de crescimento de plantas (BPCP), por proporcionarem outros efeitos benéficos aos vegetais hospedeiros, como a produção de reguladores vegetais, tais como auxinas, citocininas (TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979; MONTAÑEZ; SICARDI, 2013), etileno (STRZELCZYK; KAMPER; LI, 1994; HUNGRIA et al., 2010) e giberilinas (BOTTINI et al. 1989; SAIKIA et al., 2012). O incremento também pode ocorrer pela maior disponibilidade de outros nutrientes (BASHAN; BASHAN, 2005) como o fósforo pela solubilização de fosfato (RODRIGUEZ et al., 2004). Além disso, elas melhoram a tolerância das plantas a estresses, como deficiência hídrica, salinidade, toxicidade de metais e agrotóxicos (BASHAN et al., 2008).

A associação de *Azospirillum* spp. com gramíneas tem sido estudada principalmente com algumas gramíneas, como o milho, o trigo e a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (SWEDRZYŃSKA; SAWICKA, 2001; MOUTIA et al., 2010; PICCININ et al., 2011), de grande importância para o agronegócio brasileiro.

Em uma revisão de trabalhos realizados por 20 anos, foi constatado que, em aproximadamente 70% dos experimentos conduzidos a campo com inoculação de *Azospirillum*, em várias culturas e em diferentes condições edafoclimáticas, houve incremento de produtividade de até 30% (OKON; LABANDERA-GONZÁLEZ, 1994). No Brasil, Hungria et al. (2010) também constataram incrementos no rendimento de grãos com a

inoculação com *A. brasilense*, nas culturas de milho e trigo, de até 30% e 18%, respectivamente.

Embora o uso de inoculantes com *Azospirillum* possa propiciar ganhos nas produtividades das culturas, podem ocorrer limitações relacionadas à compatibilidade das bactérias com os tratamentos químicos de sementes, particularmente agrotóxicos, conforme observado com outros fixadores de nitrogênio, como *Bradyrhizobium* (CAMPO; ARAUJO; HUNGRIA, 2009; FERREIRA et al., 2011) ou mesmo *A. brasilense* (PUENTE; GARCÍA; PERTICARI, 2008).

O objetivo desse trabalho foi, portanto o de verificar alternativas à inoculação com *Azospirillum* via sementes em trigo e milho, mitigando os efeitos deletérios dos produtos químicos, utilizados cada vez em maior número e quantidade, no tratamento de sementes.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Condução dos Ensaios em Casa de Vegetação

Os experimentos em casa de vegetação foram conduzidos na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja), em Londrina, PR. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 18 tratamentos, e cinco repetições, totalizando 90 unidades experimentais para cada cultura. Os tratamentos compreenderam as doses de nitrogênio e de inoculante, bem como distintos modos de aplicação de inoculantes nas culturas do milho e do trigo (Tabela 1).

Experimento com milho – utilizou-se o híbrido de milho BRS 3010, semeando-se três sementes por vaso, com capacidade de 3 kg. Após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste, mantendo-se apenas duas plântulas por vaso. As sementes não foram desinfestadas superficialmente para a semeadura. As sementes foram tratadas industrialmente com fungicida Maxim[®]XL (ingrediente ativo (i.a.): 2,5% fludioxonil; 1,0% metalaxyl-M) e inseticidas Actellic[®]500 CE (i.a.: 50% pirimifós-metilico) e K-Obiol[®]25 CE (i.a.: 2,5% deltametrina).

Foram incluídos dois controles não inoculados com *Azospirillum brasilense* um com 100% da dose recomendada de fertilizante nitrogenado para a cultura, equivalente a 120 kg ha⁻¹ e outro com uma redução de 25% de N, representando 90 kg de N ha⁻¹, tendo como fonte de N o nitrato de amônio (NH₄NO₃). Para os tratamentos inoculados foram

utilizados inoculantes contendo $1,3 \times 10^8$ cél mL⁻¹ de *A. brasilense* estirpes AbV5 e AbV6, sendo a dose do produto comercial recomendada de 100 mL 50 kg⁻¹ semente. A inoculação no sulco também foi realizada no momento da semeadura, com a diluição do inoculante em água (diluição 1:500). A inoculação por pulverização foliar e pulverização na superfície do solo foi realizada aos 15 dias após a semeadura e se deu quando as plantas estavam no estágio vegetativo de desenvolvimento V3, de acordo com a escala de Fancelli e Dourado Neto, ou seja, quando a planta apresentava três folhas desenvolvidas (FANCELLI; DOURADO NETO, 1997). O número de células planta⁻¹ em cada tratamento pode ser visualizado na Tabela 1. Aos 52 dias após a emergência (DAE), procedeu-se à coleta das plantas.

Experimento com trigo – utilizou-se a cultivar de trigo BRS Gaivota, com a semeadura de quatro sementes por vaso; após a emergência, foi realizado o desbaste, deixando duas plântulas por vaso. As sementes não foram desinfestadas superficialmente para a semeadura.

Foi utilizado o mesmo inoculante do experimento com milho, mas a dose simples foi de 200 mL 50 kg⁻¹ sementes, uma vez que as sementes de trigo são menores portanto, a superfície total por kg de semente é maior. Já as doses de fertilizante nitrogenado foram equivalentes a 80 e 60 kg de N ha⁻¹, correspondentes a 100% e 75% do N recomendado, respectivamente. A inoculação no sulco também foi realizada no momento da semeadura, por pulverização de uma suspensão de células do inoculante em água (diluição 1:3000). Os tratamentos de pulverização foliar e superfície do solo foram realizados aos 22 dias após a semeadura, quando as plantas estavam em estágio de afilamento 3, de acordo com a escala de Feeks e Large (LARGE, 1954). Decorridos 54 dias da emergência das plântulas, as plantas foram coletadas para análises.

Em ambos os experimentos, o substrato utilizado foi obtido da camada superficial (0-20 cm) de um Latossolo Bruno da região de Ponta Grossa – PR, cujas características químicas são apresentadas na Tabela 2. Para correção da acidez e elevação da saturação por bases, o solo foi corrigido com 6,0 g de calcário calcítico vaso⁻¹

Tabela 1 – Tratamentos do ensaio conduzido em casa de vegetação, sob distintas doses de inoculantes, de N fertilizante e métodos de aplicação de inoculantes nas culturas de milho e trigo.

Tratamento	Dose N (%)	Dose Inoculante (n°)	Métodos de Inoculação	Dose aplicada - milho (n°cél pl ⁻¹)	Dose aplicada - trigo (n° cél pl ⁻¹)
1	75	Ausência	Sem inoculação	Ausência	Ausência
2	100	Ausência	Sem inoculação	Ausência	Ausência
3	75	1	Semente	1,0 x10 ⁵	1,7 x10 ⁴
4	100	1	Semente	1,0 x10 ⁵	1,7 x10 ⁴
5	75	2,5	Semente	2,7 x10 ⁵	4,4 x10 ⁴
6	100	2,5	Semente	2,7 x10 ⁵	4,4 x10 ⁴
7	75	1	Sulco ¹	1,0 x10 ⁵	1,7 x10 ⁴
8	100	1	Sulco ¹	1,0 x10 ⁵	1,7 x10 ⁴
9	75	2,5	Sulco ¹	2,7 x10 ⁵	4,4 x10 ⁴
10	100	2,5	Sulco ¹	2,7 x10 ⁵	4,4 x10 ⁴
11	75	1	Pulverização foliar ²	1,0 x10 ⁵	1,7 x10 ⁴
12	100	1	Pulverização foliar ²	1,0 x10 ⁵	1,7 x10 ⁴
13	75	2,5	Pulverização foliar ²	2,7 x10 ⁵	4,4 x10 ⁴
14	100	2,5	Pulverização foliar ²	2,7 x10 ⁵	4,4 x10 ⁴
15	75	1	Pulverização na superfície do solo ²	1,0 x10 ⁵	1,7 x10 ⁴
16	100	1	Pulverização na superfície do solo ²	1,0 x10 ⁵	1,7 x10 ⁴
17	75	2,5	Pulverização na superfície do solo ²	2,7 x10 ⁵	4,4 x10 ⁴
18	100	2,5	Pulverização na superfície do solo ²	2,7 x10 ⁵	4,4 x10 ⁴

Fonte: a própria autora.

¹ aplicação na semeadura.

² aplicação no estágio V3 do milho e afilhamento 3 do trigo.

(equivalentes a $4,0 \text{ ton ha}^{-1}$). Em seguida, adicionaram-se 500 mL de água, a fim de ativar a ação do calcário no solo, cujo pH passou de 4,82 para 7,12, após sete dias de reação.

Adicionaram-se 100 mL de uma solução de micronutrientes por vaso contendo B, Mo e Co, composta de 7,5 mg de ácido bórico (H_3BO_3), 0,3 mg de molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 0,00045 mg de sulfato de cobre ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), além de 200 mL de uma solução de fósforo com 0,55 g de fosfato monoácido de potássio (K_2HPO_4) por vaso. O fornecimento de N para as culturas foi fracionado em quatro vezes, sendo a primeira dose adicionada no momento da semeadura e as outras doses aplicadas em um intervalo de oito dias cada.

No tratamento de inoculação no sulco, o inoculante foi aplicado no solo, por meio de pipeta regulável, imediatamente antes da distribuição das sementes, simulando o papel de um sulcador com o mesmo volume de água para ambas as doses de inoculante. Já para os tratamentos com pulverização foliar e na superfície do solo, foi utilizado um atomizador aerógrafo para simulação de um equipamento de pulverização. Para a pulverização foliar, o solo foi protegido com papel alumínio para que o inoculante não atingisse a superfície do mesmo e, no caso da pulverização no solo, as partes aéreas das plantas foram cobertas com saco plástico, para que a inoculação fosse exclusivamente na superfície do solo. Foi realizado o cálculo da necessidade de inoculante por semente, através da estimativa do peso de 100 sementes. O volume aplicado tanto para a pulverização foliar quanto no solo foi o mesmo para ambas as culturas, ou seja, volume final de 1 mL (água + inoculante) em cada vaso, com diluição de 1: 1000 e 1: 7500, para o milho e trigo, respectivamente.

A temperatura média durante a condução do experimento com milho foi de $29/16 \text{ }^\circ\text{C}$ (dia/noite) e de $29/15 \text{ }^\circ\text{C}$ (dia/noite) para o experimento com trigo. Antes da coleta final, as plantas foram submetidas à determinação do índice SPAD (Soil Plant Analysis Development), e a leitura foi realizada no terço inferior das folhas. Para a cultura do milho, foi avaliada a folha +3 (TRANI, HIROCE e BATAGLIA, 1983; SOUZA et al., 1998) e, para a cultura do trigo, a última folha expandida. O equipamento estima o teor relativo de clorofila a partir da absorção de luz pelas clorofilas 'a' e 'b', sendo verificado com o aparelho SPAD 502 (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japan). Com base nessas verificações, a concentração da clorofila da folha foi estimada conforme calibração descrita por Kaschuk et al. (2009).

Tabela 2 – Características químicas do solo utilizado nos experimentos com milho e trigo, antes da realização da calagem.

P	pH¹	Al	H + Al	Ca	Mg	K	SB²	CTC²	V²	M²
mg dm⁻³	CaCl₂	cmol_c dm⁻³						%		
3,7	4,82	0,12	5,68	2,41	1,03	0,25	3,4	9,37	34,41	3,15

Fonte: a própria autora.

¹ Antes da adição de calcário.

² SB, soma de bases; CTC, capacidade de troca de cátions efetiva; V, saturação por bases; M, saturação por ácidos da CTC a pH 7,0.

3.2.2 Condução dos Ensaio a Campo

Na safra agrícola de 2012/2013, três ensaios com a cultura de milho foram levados a campo, em um delineamento experimental em blocos casualizados, com 11 tratamentos e seis repetições, totalizando 66 parcelas (Tabela 3).

Tabela 3 – Tratamentos do ensaio conduzido a campo com milho, com diferentes doses de inoculantes, de N fertilizante e métodos de inoculação.

Tratamento	Dose N (%)	Dose Inoculante (n°)	Métodos Inoculação	Dose aplicada (n° cél pl⁻¹)
1	Ausência	Ausência	Sem inoculação	Ausência
2	100% N	Ausência	Sem inoculação	Ausência
3	75% N	Ausência	Sem inoculação	Ausência
4	100% N	1 dose	Semente	1,5 x10 ⁶
5	75% N	1 dose	Semente	1,5 x10 ⁶
6	75% N	2 doses	Sulco	3,0 x10 ⁶
7	75% N	4 doses	Sulco	6,0 x10 ⁶
8	75% N	2 doses	Pulverização foliar	3,0 x10 ⁶
9	75% N	4 doses	Pulverização foliar	6,0 x10 ⁶
10	75% N	2 doses	Pulverização na superfície do solo	3,0 x10 ⁶
11	75% N	4 doses	Pulverização na superfície do solo	6,0 x10 ⁶

Fonte: a própria autora.

Os experimentos foram conduzidos em três regiões distintas do Brasil: Cachoeira Dourada (GO), Luis Eduardo Magalhães (BA) e Ponta Grossa (PR). As características químicas e a textura dos solos podem ser visualizadas na Tabela 4. Em Cachoeira Dourada (GO) (18°29'31'' S e 49°28'29'' O), a altitude aproximada é de 459 m, o clima da região é do tipo *Cwa* (quente e úmido, com estação chuvosa no verão e seca no inverno, com temperatura média anual entre 22°C e 24 °C e máxima podendo ultrapassar 35 °C, precipitação média anual 1.500 mm) segundo a classificação climática de Köppen. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distroférico (LV3) (EMBRAPA, 2006).

No Município de Luis Eduardo Magalhães (BA) (12°05'31'' S e 45°48'18'' O), a altitude aproximada é de 720 m. O clima é *Aw*, com a existência de dois períodos sazonais bem definidos, um verão chuvoso (outubro a março) e um inverno seco (abril a setembro), precipitação anual maior que 1.000 mm. O solo é classificado como Latossolo Amarelo Distrófico (LA1) (EMBRAPA, 2006).

Em Ponta Grossa (PR) (25°13' S e 50°1' O), a altitude é de 880 m, o clima é *Cbf* (temperado com verões amenos) e o solo classificado como Latossolo Vermelho-Escuro Distrófico textura argilosa (LE1) (EMBRAPA, 2006).

As sementes foram tratadas industrialmente com fungicida Maxim[®]XL (ingrediente ativo (i.a.): 2,5% fludioxonil; 1,0% metalaxyl-M) e inseticidas Actellic[®]500 CE (i.a.: 50% pirimifós-metílico) e K-Obiol[®]25 CE (i.a.: 2,5% deltametrina).

As informações principais referentes à condução do experimento a campo podem ser visualizadas na Tabela 5. Em todos os tratamentos foram adicionados 300 kg ha⁻¹ de N-P-K (08-20-20) no sulco, equivalentes a 24 kg N ha⁻¹, imediatamente antes da semeadura. Aos 35 DAE, as plantas receberam as doses complementares de N correspondendo a 75% e 100 % N da dose recomendada para a cultura, 67,5 e 90 kg ha⁻¹ de N na forma de ureia, respectivamente, em cobertura. Para os tratamentos com pulverização e inoculação no sulco, os inoculantes foram diluídos em água, considerando a respectiva dose em 150 L de calda ha⁻¹ (proporção de 1:1500), correspondendo a 100, 200 e 400 mL inoculante ha⁻¹, para os tratamentos com 1 dose, 2 doses e 4 doses, respectivamente, com concentração do inoculante de $1,27 \times 10^9$ cél mL⁻¹.

A pulverização no solo e a inoculação no sulco foram conduzidas no momento da semeadura. Já para a pulverização foliar, a inoculação foi realizada quando as plantas de milho estavam no estágio vegetativo V2 (escala de FANCELLI; DOURADO NETO, 1997), ou seja, com duas folhas desenvolvidas.

3.2.3 Análises Laboratoriais

As avaliações realizadas nos ensaios de casa de vegetação, quanto aos parâmetros biométricos imediatamente antes da coleta no experimento com milho foram: *i*) altura de plantas (cm); *ii*) diâmetro do colmo, com auxílio de um paquímetro digital; e *iii*) determinação do volume de raízes, o método consiste na introdução das raízes em proveta graduada, contendo um volume de água conhecido e medindo-se o volume deslocado, de

acordo com a metodologia descrita por Basso (1999). No experimento com trigo, os parâmetros avaliados foram: *i*) número de perfilhos imediatamente antes da coleta; e *ii*) volume de raízes.

Em ambos os experimentos, foi realizada a contagem de bactérias diazotróficas pelo método do “Número Mais Provável” (NMP), de acordo com Döbereiner, Baldani e Baldani (1995), regulamentada de acordo com a Instrução Normativa nº 30, de 12 de novembro de 2010 (MAPA, 2010).

Para a contagem, inicialmente as plantas foram separadas em raízes, solo rizosférico e parte aérea. Na avaliação do solo rizosférico, foram obtidos 10 g de amostra. Em seguida, as amostras foram transferidas para frascos contendo 90 mL de solução salina esterilizada sob agitação constante de 150 rpm por, aproximadamente, uma hora.

Nas análises da parte aérea e das raízes, 1,0 g de amostra de tecido foi lavado em água corrente, cortado e homogeneizado. As amostras foram desinfestadas superficialmente em solução de álcool etílico a 70% por um minuto, seguida de hipoclorito de sódio a 6,0% por, aproximadamente, três minutos e lavadas com água destilada e esterilizada três vezes. Após o procedimento, cada 1,0 g amostra foi triturado com auxílio de dispersor de partículas em 9 mL de solução salina, em seguida as amostras foram diluídas seriadamente, adicionando 1 mL da diluição original em tubos contendo 9 mL da solução salina esterilizada.

A partir das diluições de 10^5 a 10^9 , uma alíquota de 100 μ L foi inoculada em frascos contendo 5 mL do meio de cultura semisólido NFb (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI; 1995), em triplicata, obtendo-se um total de 15 frascos por amostra. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30°C por sete dias.

A estimativa da população bacteriana foi realizada pelo método de NMP, com a tabela de McCrady, conforme descrito por Pochon e Tardieux (1962). O desenvolvimento da película característica dos microrganismos confere resultado positivo, ao passo que a ausência apresenta resultado negativo para o teste. Para eficácia do teste a última diluição apresentou todas as repetições negativas, evitando a subestimação do resultado.

$$n^{\circ} \text{ cél/g} = n \times d \times f$$

Tabela 4 – Características químicas e textura dos solos (0-20 cm) nos quais os ensaios foram conduzidos, na safra 2012/2013. Análises realizadas antes da semeadura.

Local	Química								Textura dos solos				
	P	pH	Al	H + Al	Ca + Mg	K	SB ¹	CTC ²	V	C	Argila	Silte	Areia
	mg dm ⁻³	CaCl ₂			cmol _c dm ⁻³				%	g dm ⁻³		%	
Cachoeira Dourada (GO)	4,50	5,25	0	4,05	4,97	0,35	5,32	9,37	57,00	28,4	58,65	18,55	22,80
Luis E. Magalhães (BA)	21,34	5,53	0	0,83	1,20	0,04	1,24	2,07	60,00	6,35	10,95	1,05	88,00
Ponta Grossa (PR)	2,80	4,90	0,17	4,75	4,85	0,23	5,08	9,83	52,00	30,50	23,80	3,00	73,20

Fonte: a própria autora.

¹ SB, soma de bases; CTC², capacidade de troca de cátion efetiva; V, saturação por bases.

Tabela 5 – Informações agronômicas dos experimentos a campo.

Local	Híbrido	Semeadura	Espaçamento	n ^o sementes m ⁻¹ linear	Densidade plantas ha ⁻¹	Colheita	Área Útil
Cachoeira Dourada	2B707 HX	14/11/2012	0,8 m	6	75.000	15/05/2013	7,2 m ²
Luis E. Magalhães	2B707 HX	24/11/2012	0,8 m	6	75.000	20/04/2013	7,2 m ²
Ponta Grossa	P4285 H	05/12/2012	0,5 m	4,1	82.000	17/04/2013	8,0 m ²

Fonte: a própria autora.

Onde:

n = número característico obtido da tabela de McCrady;

d = menor diluição da séria empregada;

f = fator de diluição (10).

Após a coleta e a amostragem de tecido vegetal para as análises microbiológicas, a parte aérea das plantas e suas respectivas raízes foram acondicionadas em sacos de papel, e levadas à estufa a 60°C até que as amostras atingissem massa constante para a obtenção da massa da parte aérea seca (MPAS) e massa de raízes secas (MRS).

Realizado o procedimento de pesagem, as amostras foram moídas em equipamento específico para material vegetal, com peneira de 18 mesh e homogeneizadas para a quantificação do teor de N (TN) pelo método do verde de salicilato, de acordo Searle (1984), em extrato obtido por digestão sulfúrica. Pesou-se 0,1 g de cada amostra e, juntamente às amostras, um padrão com teor de N conhecido foi analisado.

Para a digestão sulfúrica adicionaram-se 2,0 g de catalisador $K_2SO_4-CuSO_4$ (10:1), 3 mL de ácido sulfúrico 98% P.A. (H_2SO_4) e 5 mL de peróxido de hidrogênio 30% P.A. (H_2O_2) em cada tubo, bem como uma prova em branco, contendo apenas os reagentes analíticos. As amostras foram conduzidas ao bloco digestor, elevando-se a temperatura gradativamente até atingir 350°C e mantidas por, aproximadamente, 45 minutos.

Depois de realizada a digestão total da matéria orgânica, realizaram-se diluições seriadas em água (1:300). Em seguida, uma alíquota de 1,0 mL da diluição foi transferida para tubo de ensaio contendo 6 mL de água destilada e homogeneizada. Foi acrescentado 1,0 mL de cada solução, consistindo de uma solução do catalisador de nitropussiato, outra de verde de salicilato e hipoclorito, à temperatura ambiente. Após a reação das amostras por, aproximadamente, uma hora, realizou-se a leitura em espectrofotômetro em luz visível a 697 nm.

As análises realizadas no experimento a campo foram: *i*) MPAS (g); *ii*) produtividade de grãos ($kg\ ha^{-1}$) e *iii*) teor foliar de N ($mg\ g^{-1}$). Para a determinação da MPAS foram coletadas cinco plantas por tratamento com 56, 61 e 30 DAE, além das coletas de 15 folhas por parcela (terço médio de folhas, sem a nervura principal) para análise do TN, com 92, 96 e 84 DAE, realizadas nos municípios de Cachoeira Dourada (GO), Luis E. Magalhães (BA) e Ponta Grossa (PR), respectivamente.

Os dias de colheita, densidade de população e área útil da parcela podem ser visualizados na Tabela 5. A determinação da produtividade de grãos de milho foi realizada em base de 13% de umidade.

3.2.4 Análises Estatísticas

Para os experimentos em casa de vegetação, as análises estatísticas foram realizadas considerando o delineamento experimental inteiramente casualizado e os dados submetidos à análise de variância (ANAVA), com aplicação do teste de Duncan a 5% de probabilidade. Todas as variáveis foram submetidas à comparação de médias com o tratamento 2 (não inoculado e 100%N) utilizando o teste de Dunnet a 5% de probabilidade. Para o experimento a campo, o delineamento experimental foi em blocos casualizados, com teste de Duncan a 5%, ou a 10% de probabilidade.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Ensaios conduzidos em casa de vegetação

De acordo com os resultados apresentados para a cultura do milho observa-se que, na MPAS (Tabela 6), o tratamento 17 (pulverização no solo com 2,5 doses de inoculante e 75 % N) apresentou diferenças estatísticas quando comparado à testemunha agrônômica com 75% N (T1), proporcionando um incremento de 27,4%. É importante ressaltar que nos tratamentos 5 e 9 (inoculação na semente e no sulco com 2,5 doses de inoculante e 75%N) os resultados foram similares ao da testemunha agrônômica com 100% (T2).

Quanto a variável MRS (Tabela 6), evidencia-se que as plantas do T14 (pulverização foliar com 2,5 doses de inoculante e 100 % N) tiveram aumento na massa de 26,26% em relação ao T2 (sem inoculação e 100%N).

Os tratamentos T8 e T16 (sulco ou pulverização no solo com uma dose de inoculante e 100%N) apresentaram TN superiores quando comparados a todos os tratamentos com pulverização foliar. Resultados semelhantes foram verificados em relação ao NTPA (Tabela 6). Além disso, o tratamento com inoculação na semente, 2,5 doses de inoculante e 75% N (T5) apresentou um acréscimo de 17,9% em comparação ao T1 (sem inoculação e

75% N). O tratamento 9, com maior dose de inoculante no sulco de semeadura e 75%N, apresentou efeito inibitório nas duas variáveis. Quanto ao teor de clorofila (Tabela 6), não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

Em relação aos parâmetros biométricos (Tabela7), o volume de raiz, correspondente ao tratamento T6 (Inoculação na semente com 2,5 doses de inoculante e 100%N) foi superior aos tratamentos inoculados no sulco de semadura. Quanto à altura de plantas, foi possível constatar diferenças significativas no tratamento na dose de 100% N, inoculação por pulverização no solo com uma dose de inoculante (T16), apresentando um acréscimo de 18,8% e 13,7% em comparação com as médias da inoculação de sementes (T3, T4 e T5) e com T1 (sem inoculação e 75%N), respectivamente. Já no parâmetro de diâmetro do colmo não houve efeito significativo entre os tratamentos.

No tocante às análises microbiológicas (Tabela 7), a estimativa de *Azospirillum* por NMP nas folhas de milho visou verificar a presença de colonização entre os diferentes métodos de inoculação. Assim, as plantas dos tratamentos T6, T7, T10, T11 e T12 apresentaram colonizações superiores estatisticamente quando comparados aos tratamentos não inoculados. Destacaram-se os tratamentos T11 e T12, inoculados por pulverização foliar, sugerindo que as bactérias são capazes de colonizar as plantas a partir das folhas, por meio de estômatos. Já para a colonização das raízes, incrementos significativos foram obtidos no tratamento T9 de inoculação no sulco com 2,5 doses, em relação aos tratamentos sem inoculação. Na análise do solo rizosférico, o T8 (com inoculação no sulco, uma dose e 100%N) apresentou maior concentração de células, em comparação aos tratamentos não inoculados (T1 e T2).

No ensaio conduzido com a cultura do trigo em casa de vegetação, não houve diferença na MPAS, mas a variável MRS apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 8). O tratamento com inoculação por pulverização foliar com uma dose e 100% N (T12) apresentou o maior ganho em relação à testemunha com a dose total de N (T2), com 0,95 g planta⁻¹ ou 57,2%. É importante salientar, ainda, que o tratamento com pulverização foliar, uma dose de inoculante e 75%N (T11) resultou em um incremento de 40,4% na MRS em relação ao controle com 100% da dose de N.

Quanto ao TN (Tabela 8), os tratamentos inoculados via semente e pulverização no solo com 2,5 doses de inoculante e 75%N (T5 e T17) foram superiores à testemunha agrônômica com 75%N (T1). O maior valor de NTPA (Tabela 8) foi constatado no tratamento com pulverização no solo, maior dose de inoculante e maior dose de fertilizante

(T14). O tratamento convencional (T3), inoculado via semente com uma dose e 75%N, apresentou diferenças estatísticas quando comparado ao T1 (não inoculado e com 75%N).

Em relação ao teor relativo de clorofila (Tabela 8), a redução de fertilizante nitrogenado e sob diferentes formas de inoculação (T7, T13 e T15), com exceção do tratamento convencional (inoculação na semente), foram estatisticamente superiores em relação ao tratamento com a dose 100% de N e sem inoculação (T2). Para o teor de clorofila, as plantas do tratamento com inoculação no sulco, combinado com maiores doses de inoculante e fertilizantes (T10) foram estatisticamente superiores em relação às testemunhas não inoculada (T1 e T2). Em ambos os experimentos (milho e trigo) não foi possível observar correlação entre a variável de TN e o teor de clorofila.

Quanto ao volume de raízes (Tabela 9), não houve diferença significativa entre os tratamentos. Para o número de perfilhos, as plantas do tratamento 12, com inoculação por pulverização foliar e 100%N, apresentaram diferenças estatísticas quando comparada a testemunhas com 100%N (T2). É importante salientar que o T7, com uma dose de inoculante no sulco e 75% N, foi superior ao T1 (75% N e sem inoculação).

Em relação aos parâmetros microbiológicos (Tabela 9), a estimativa da população bacteriana diazotrófica pelo método NMP no interior da parte aérea das plantas evidenciou que, nos tratamentos com uma dose de inoculante, 75%N e os métodos de inoculação no sulco, pulverização foliar e no solo (T7, T11 e T15), além do tratamento 14 (pulverização foliar com 2,5 doses inoculante e 100%N) resultaram em valores superiores aos das plantas dos tratamentos não inoculados (T1 e T2). Já para a raiz, o tratamento com pulverização no solo, uma dose de inoculante e 100%N (T16) apresentaram diferenças estatísticas em relação às testemunhas não inoculadas (T1 e T2). Quanto ao solo rizosférico, destacam-se as plantas do tratamento com inoculação no sulco e com a dose maior de inoculante (T10), com valores superiores aos encontrados nas testemunhas agrônômicas não inoculadas (T1 e T2).

Tabela 6 – Massa da parte aérea seca (MPAS), massa de raízes secas (MRS), teor de N (TN), N total acumulado na parte aérea (NTPA) e teor de clorofila em ensaio conduzido em casa de vegetação, com milho híbrido BRS 3010, em função de diferentes doses de inoculantes, de N fertilizante e métodos de inoculação. Coleta realizada aos 52 dias após a emergência das plântulas.

Tratamento	MPAS (g pl⁻¹)	MRS (g pl⁻¹)	TN (mg g⁻¹)	NTPA (mg pl⁻¹)	Teor Clorofila (µg cm⁻²)
T1: Não inoculado + 75% N (90 kg/ha)	6,67 c*	3,77 bc	14,74 abc	98,33 ghi	12,99 ^{n.s.}
T2: Não inoculado + 100% N (120 kg/ha);	8,01 ab	3,96 bc	14,41 abc	115,60 abcd	13,71
T3: Semente + 1 dose inoculante +75% N;	7,43 bc	3,92 bc	11,81 de	87,03 i*	12,93
T4: Semente + 1 dose inoculante +100% N;	7,56 bc	3,66 c	15,17 abc	113,99 abcdef	14,76
T5: Semente + 2,5 doses inoculante +75% N;	7,71 ab	3,95 bc	14,96 abc	115,93 abcd	12,33
T6: Semente + 2,5 doses inoculante +100% N;	8,02 ab	4,47 ab	14,74 abc	117,91 abc	12,99
T7: Sulco + 1 dose inoculante + 75% N;	7,29 bc	4,11 bc	15,72 ab	114,39 abcde	12,29
T8: Sulco + 1 dose inoculante + 100% N;	7,59 abc	3,93 bc	15,96 a	123,21 ab	13,72
T9: Sulco + 2,5 doses inoculante + 75% N;	8,16 ab	4,07 bc	11,33 e*	91,93 hi*	12,18
T10: Sulco + 2,5 doses inoculante + 100% N;	7,57 bc	3,88 bc	14,66 abc	109,79 bcdefg	13,30
T11: Pulverização foliar + 1 dose inoculante + 75% N;	7,30 bc	3,92 bc	13,62 bcd	99,49 efghi	12,28
T12: Pulverização foliar + 1 dose inoculante + 100%N;	7,39 bc	4,17 bc	13,48 cde	98,64 fghi	13,38
T13: Pulverização foliar + 2,5 doses inoculante + 75% N;	7,22 bc	4,41 abc	13,47 cd	96,92 ghi	12,38
T14: Pulverização foliar + 2,5 doses inoculante + 100% N;	8,13 ab	5,00 a*	13,07 cde	106,06 cdefgh	12,63
T15: Pulverização no solo + 1 dose inoculante + 75%N;	7,52 bc	3,60 c	13,14 cde	98,30 fghi	13,29
T16: Pulverização no solo + 1 dose inoculante + 100% N;	7,92 ab	4,38 abc	16,05 a	126,731 a	13,97
T17: Pulverização no solo + 2,5 doses inoculante + 75% N;	8,50 a	4,47 ab	11,95 de	101,15 defghi	11,80
T18: Pulverização no solo + 2,5 doses inoculante + 100% N	7,72 ab	3,88 bc	15,71 ab	121,13 abc	13,91
Valor de p	0,0058	0,0150	<0,0001	<0,0001	0,5525
C.V (%)	8,08	12,81	10,57	10,06	13,92

Fonte: a própria autora.

Médias (cinco repetições) seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) e médias seguidas de * diferem do tratamento 2 pelo teste de Dunnet ($p \leq 0,05$).

Tabela 7 – Parâmetros biométricos (volume de raiz, diâmetro do colmo, altura de plantas) e parâmetros microbiológicos (n° células g⁻¹ avaliada pelo método do número mais provável (NMP) nas folhas, raízes e solo rizosférico), em ensaio conduzido em casa de vegetação, com milho híbrido BRS 3010, em função de diferentes doses de inoculante, de N fertilizante e métodos de inoculação. Coleta realizada aos 52 dias após a emergência das plântulas.

Tratamento	Parâmetros Biométricos			Parâmetros Microbiológicos		
	Volume raiz (mL pl ⁻¹)	Ø Colmo (mm)	Altura (cm)	Folha (n° cél g ⁻¹)	Raiz (n° cél g ⁻¹)	Rizosfera (n° cél g ⁻¹)
T1: Não inoculado + 75% N (90 kg/ha);	19,90 abc	9,47 ^{n.s.}	66,60 bcd	4,57E+06 efg	1,73E+08 e	1,55E+06 bcd
T2: Não inoculado + 100% N (120 kg/ha);	20,30 abc	10,12	73,12 ab	2,92E+06 efg	4,75E+08 bcde	5,52E+05 cd
T3: Semente + 1 dose inoculante +75% N;	18,90 bc	9,97	64,40 bcd	2,47E+06 efg	6,24E+08 abcde	6,12E+05 cd
T4: Semente + 1 dose inoculante +100% N;	19,40 bc	9,93	62,10 d	1,14E+07 cdef	6,24E+08 abcde	2,12E+06 bcd
T5: Semente + 2,5 doses inoculante +75% N;	20,40 abc	10,08	64,60 bcd	4,31E+06 efg	6,86E+08 abcde	5,10E+05 d
T6: Semente + 2,5 doses inoculante +100% N;	23,30 a	10,22	66,50 bcd	1,16E+08 bc*	2,83E+08 cde	5,10E+05 d
T7: Sulco + 1 dose inoculante + 75% N;	18,70 bc	10,08	65,50 bcd	1,22E+08 b*	5,03E+08 abcde	3,02E+06 bc
T8: Sulco + 1 dose inoculante + 100% N;	19,10 bc	10,58	70,75 abcd	2,70E+07 bcde	4,58E+08 abcde	2,52E+07 a*
T9: Sulco + 2,5 doses inoculante + 75% N;	19,60 bc	10,22	65,70 bcd	2,18E+07 bcde	1,25E+09 a	1,52E+06 bcd
T10: Sulco + 2,5 doses inoculante + 100% N;	18,40 bc	10,07	69,80 abcd	2,40E+09 a*	3,28E+08 bcde	8,48E+05 bcd
T11: Pulverização foliar + 1 dose inoculante + 75% N;	20,30 abc	10,25	68,80 abcd	2,05E+09 a*	2,37E+08 de	1,03E+06 bcd
T12: Pulverização foliar + 1 dose inoculante + 100%N;	20,20 abc	10,58	62,87 cd	7,38E+07 bcd*	1,02E+09 abc	4,65E+06 b
T13: Pulverização foliar + 2,5 doses inoculante + 75% N;	21,30 ab	10,07	70,20 abcd	7,50E+06 def	9,18E+08 abcd	1,54E+06 bcd
T14: Pulverização foliar + 2,5 doses inoculante + 100% N;	21,00 abc	10,30	72,80cd	1,12E+06 fg	7,33E+08 abcde	3,04E+06 bc
T15: Pulverização no solo + 1 dose inoculante + 75%N;	18,10 bc	9,84	68,70abcd	4,07E+06 efg	4,84E+08 cde	1,34E+06 bcd
T16: Pulverização no solo + 1 dose inoculante + 100% N;	20,50 abc	10,07	75,70a	1,10E+06 fg	9,94E+08 abc	1,40E+06 bcd
T17: Pulverização no solo + 2,5 doses inoculante + 75% N;	21,30 ab	10,43	73,10 ab	1,11E+06 fg	3,66E+08 cde	1,50E+06 bcd
T18: Pulverização no solo + 2,5 doses inoculante + 100% N	17,70 c	10,21	71,40 abc	6,25E+05 g	1,14E+09 ab	1,65E+06 bcd
Valor de p	0,00492	0,6696	0,0127	<0,0001	0,0192	0,0002
C.V (%)	12,02	6,38	10,6	11,2	6,65	9,24

Fonte: a própria autora.

Médias (cinco repetições) seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) e médias seguidas de * diferem do tratamento 2 pelo teste de Dunnet ($p \leq 0,05$).

Tabela 8 – Massa da parte aérea seca (MPAS), massa de raízes secas (MRS), teor de N (TN), N total acumulado na parte aérea (NTPA) e teor de clorofila em ensaio conduzido em casa de vegetação, com trigo cultivar BRS Gaivota, em função de diferentes doses de inoculantes, de N fertilizante e métodos de inoculação. Coleta realizada aos 54 dias após a emergência das plântulas.

Tratamento	MPAS (g pl⁻¹)	MRS (g pl⁻¹)	TN (mg g⁻¹)	NTPA (mg pl⁻¹)	Teor Clorofila (µg cm⁻²)
T1: Não inoculado + 75% N (60 kg/ha)	1,64 ^{n.s}	1,71 bc	22,40 d	36,72 d*	17,90 d
T2: Não inoculado + 100% N (80 kg/ha)	1,76	1,66 bc	27,42 abc	48,16 ab	17,89 d
T3: Semente + 1 dose inoculante +75% N	1,78	1,98 abc	26,79 abcd	47,98 ab	19,08 cd
T4: Semente + 1 dose inoculante +100% N	1,80	2,23 abc	24,41 abcd	46,42 abc	19,67 bcd
T5: Semente + 2,5 doses inoculante +75% N	1,62	1,96 abc	27,25 abc	44,06 abcd	19,34 cd
T6: Semente + 2,5 doses inoculante +100% N	1,83	2,35 ab	25,65 abcd	47,07 abc	19,15 cd
T7: Sulco + 1 dose inoculante + 75% N	1,79	2,22 abc	24,54 abcd	44,06 abcd	21,34 abc*
T8: Sulco + 1 dose inoculante + 100% N	1,68	1,98 abc	24,91 abcd	41,90 bcd	21,07 abc*
T9: Sulco + 2,5 doses inoculante + 75% N	1,56	1,81 bc	25,70 abcd	40,15 bcd	19,58 bcd
T10: Sulco + 2,5 doses inoculante + 100% N	1,64	1,93 abc	27,05 abc	44,42 abcd	22,36 a*
T11: Pulverização foliar + 1 dose inoculante + 75% N	1,65	2,33 ab	23,60 bcd	38,60 cd	19,63 bcd
T12: Pulverização foliar + 1 dose inoculante + 100%N	1,66	2,61 a*	24,42 abcd	40,38 bcd	20,49 abc
T13: Pulverização foliar + 2,5 doses inoculante + 75% N	1,50	1,57 c	26,23 abcd	38,46 cd	21,99 ab*
T14: Pulverização foliar + 2,5 doses inoculante + 100% N	1,84	2,15 abc	28,48 a	51,64 a	20,35 abcd
T15: Pulverização no solo + 1 dose inoculante + 75%N	1,62	1,76 bc	23,17 cd	37,29 d	21,26 abc*
T16: Pulverização no solo + 1 dose inoculante + 100% N	1,72	1,55 c	27,87 ab	47,11 abc	16,65 bcd
T17: Pulverização no solo + 2,5 doses inoculante + 75% N	1,54	1,94 abc	27,25 abc	41,46 bcd	19,56 bcd
T18: Pulverização no solo + 2,5 doses inoculante + 100% N	1,75	2,09 abc	28,88 a	43,82 abcd	20,01 abcd
Valor de p	0,5401	0,0497	0,0217	0,0043	0,0015
C.V (%)	21,31	24,74	11,44	21,06	13,04

Fonte: a própria autora.

Médias (cinco repetições) seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) e médias seguidas de * diferem do tratamento 2 pelo teste de Dunnet ($p \leq 0,05$). n.s.: não significativo.

Tabela 9 – Parâmetros biométricos (volume de raízes e número de perfilhos) e parâmetros microbiológicos (n° células g⁻¹ da parte aérea; da raiz e do solo rizosférico), em ensaio conduzido em casa de vegetação com trigo cultivar BRS Gaivota, em função de diferentes doses de inoculante, de N fertilizante e métodos de inoculação. Coleta realizada aos 54 dias após a emergência das plântulas.

Tratamento	Parâmetros Biométricos		Parâmetros Microbiológicos		
	Volume Raiz (mL pl ⁻¹)	# Perfilhos	Parte Aérea (n° cél g ⁻¹)	Raiz (n° cél g ⁻¹)	Rizosfera (n° cél g ⁻¹)
T1: Não inoculado + 75% N (60 kg/ha)	9,00 ^{n.s}	4,60 c	1,26E+05 def	2,64E+08 bcdef	3,30E+06 bcd
T2: Não inoculado + 100% N(80 kg/ha)	9,1	4,90 bc	4,07E+04 f	7,92E+08 abc	5,33E+06 d
T3: Semente + 1 dose inoculante +75% N	8,1	5,00 bc	8,94E+05 def	5,28E+08 abcd	2,24E+06 bcd
T4: Semente + 1 dose inoculante +100% N	11,1	6,20 ab	6,95E+05 cdef	9,00E+07 cdef	2,19E+06 cd
T5: Semente + 2,5 doses inoculante +75% N	7,4	5,00 bc	3,98E+05 ef	4,97E+08 bcdef	1,00E+07 abcd
T6: Semente + 2,5 doses inoculante +100% N	9,6	5,50 abc	3,69E+06 abcd*	6,26E+07 ef	4,14E+06 abcd
T7: Sulco + 1 dose inoculante + 75% N	9,2	6,20 ab	5,04E+06 abc*	5,42E+08 bcde	1,38E+07 abcd
T8: Sulco + 1 dose inoculante + 100% N	9,3	5,20 abc	1,07E+06 bcde	1,60E+08 f*	4,46E+06 abcd
T9: Sulco + 2,5 doses inoculante + 75% N	7,8	4,40 c	2,09E+06 abcde	1,03E+09 ab	3,32E+07 abc
T10: Sulco + 2,5 doses inoculante + 100% N	9,2	5,00 bc	1,14E+06 abcde	4,84E+08 abcde	3,29E+08 a*
T11: Pulverização foliar + 1 dose inoculante + 75% N	9,8	5,90 abc	2,40E+07 ab*	4,17E+08 bcdef	1,12E+08 ab
T12: Pulverização foliar + 1 dose inoculante + 100%N	12,1	6,60 a	2,74E+06 abcd*	8,94E+07 cdef	2,98E+06 cd
T13: Pulverização foliar + 2,5 doses inoculante + 75% N	9,6	4,60 c	7,06E+05 abcde	5,17E+08 bcdef	3,95E+06 bcd
T14: Pulverização foliar + 2,5 doses inoculante + 100% N	8	5,70 abc	3,82E+07 a*	6,82E+07 def	6,20E+06 abcd
T15: Pulverização no solo + 1 dose inoculante + 75%N	8,4	5,00 bc	9,72E+06 ab*	9,92E+08 ab	5,36E+06 bcd
T16: Pulverização no solo + 1 dose inoculante + 100% N	6,4	5,90 abc	1,04E+06 abcd*	2,40E+09 a	2,42E+06 cd
T17: Pulverização no solo + 2,5 doses inoculante + 75% N	8,4	5,00 bc	1,45E+06 abcd*	8,23E+08 abcd	2,13E+06 cd
T18: Pulverização no solo + 2,5 doses inoculante + 100%	10,3	6,30 ab	1,90E+06 abcd*	1,21E+09 abc	1,77E+06 d
Valor de p	0,2877	0,0125	<0,0001	0,0002	0,0134
C.V (%)	30,25	18,74	14,32	7,5	8,09

Fonte: a própria autora.

Médias (5 repetições) seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) e médias seguida de * diferem do tratamento 2 pelo teste de Dunnet ($p \leq 0,05$). n.s.: não significativo.

3.3.2 Ensaio conduzidos a campo

No experimento a campo realizado com a cultura do milho em Cachoeira Dourada (GO), o tratamento T5 (inoculação na semente com uma dose de inoculante e 75% N) resultou em maior MPAS (Tabela 10) quando comparado à inoculação no sulco e 4 doses de inoculante (T11), em 27,81%. Os tratamentos T9 e T8 (Figura 1.A) em que as plantas foram inoculadas por pulverização foliar com quatro e duas doses de inoculantes (T9 e T8), proporcionaram incrementos no rendimento de 773 e 439 kg ha⁻¹ em relação às plantas do tratamento T2 (100% N e sem inoculação), respectivamente. Em Luis E. Magalhães, ao contrário de Cachoeira Dourada, as plantas que receberam duas doses de inoculante no sulco (T10) apresentaram maior rendimento, da ordem de 555 kg ha⁻¹, em relação ao T3 (75% N), embora sem diferença significativa (Figura 1.B). E ainda, o T10 foi superior estatisticamente, com acréscimo na produtividade da ordem de 643 kg ha⁻¹ quando comparada ao T9. Embora a MPAS não tenha apresentado diferenças estatísticas entre os tratamentos, a variável TN no tratamento 8 apresentou maiores teores em relação ao T2 (Tabela 10). Em Ponta Grossa (Figura 1.C), apesar de não ter havido efeito dos tratamentos no rendimento, a pulverização foliar com duas doses de inoculantes (T8), resultou em acréscimo no rendimento de 850 kg ha⁻¹, comparado ao obtido na testemunha com 100%N. A MPAS não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, enquanto para o TN, o T5 com uma dose inoculada na semente e 75%N foi semelhante ao T2 (Tabela 10).

Nos experimentos em Cachoeira Dourada e Ponta Grossa, foi possível constatar que o tratamento com inoculação de duas doses no sulco (T10) resultou em efeito inibitório quanto aos TN, enquanto que para Cachoeira Dourada esse efeito foi também observado para produtividade de grãos. Todavia, em Luis E. Magalhães esses resultados não apresentaram repetibilidade, uma vez que o tratamento com duas doses no sulco (T10) foi o que resultou no maior rendimento de grãos.

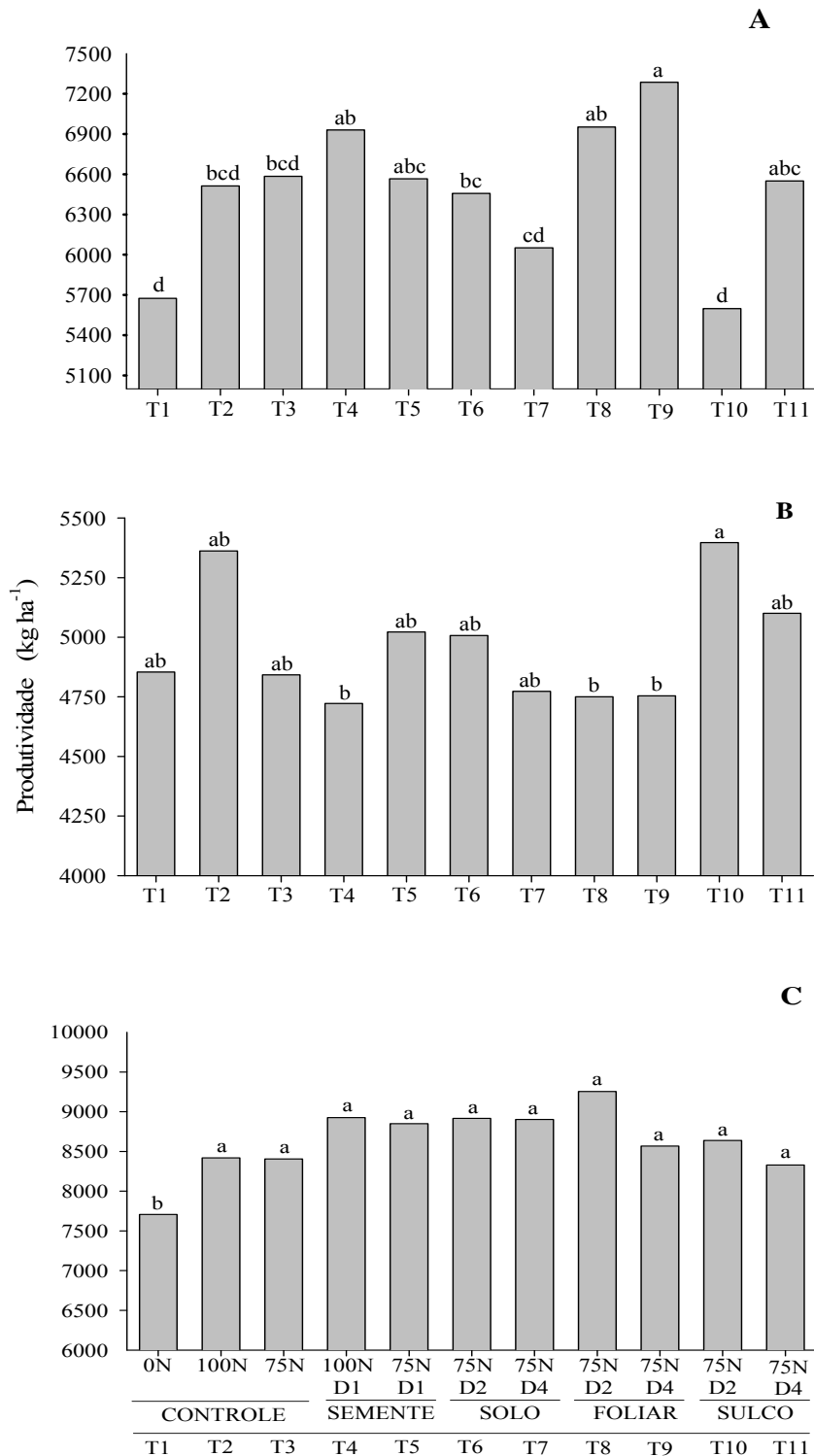
Tabela 10 – Massa da parte aérea seca (MPAS) e teor N (TN) na cultura do milho. Experimento realizado em três regiões no Brasil, em função de diferentes doses de N fertilizante, métodos de inoculação e doses de inoculante.

Tratamento	Cachoeira Dourada		Luis E. Magalhães		Ponta Grossa	
	MPAS (g pl ⁻¹)	TN (mg g ⁻¹)	MPAS (g pl ⁻¹)	TN (mg g ⁻¹)	MPAS (g pl ⁻¹)	TN (mg g ⁻¹)
T1: 0%N	29,45 c	23,08 a	68,82 ^{n.s.}	30,08 b	49,08 ^{n.s.}	18,91 d*
T2: 100%N	36,01 abc	22,19 a	66,3	30,05 b	53,5	23,69 ab
T3: 75%N	33,01 ab	21,16 ab	65,78	30,97 ab	56,09	23,74 ab
T4: Semente + 1dose inoculante + 100%N	36,68 abc	20,93 ab	71,34	31,60 ab	54,12	24,67 a
T5: Semente + 1dose inoculante + 75%N	41,13 a	21,60 ab	71,26	33,43 ab	58,33	23,86 ab
T6: Pulverização no solo + 2doses inoculante + 75%N	34,41 abc	20,31 abc	70,5	32,79 ab	53,95	21,11 c*
T7: Pulverização no solo + 4doses inoculante + 75%N	34,23 abc	19,18 bc	65,45	34,10 ab	54,14	22,15 bc
T8: Pulverização foliar + 2doses inoculante + 75%N	34,26 abc	19,07 bc	69,75	35,31 a	49,48	22,71 bc
T9: Pulverização foliar + 4doses inoculante + 75%N	36,34 abc	18,68 bc	77,63	33,88 ab	54,97	20,94 c*
T10: Sulco + 2doses inoculante + 75%N	39,47 ab	17,69 c	71,94	30,58 b	50,6	20,82 c*
T11: Sulco + 4doses inoculante + 75%N	32,18 bc	20,76 ab	75,41	31,36 ab	47,73	20,96 c*
Valor de p	0,0438	0,0028	0,5303	0,0764	0,4597	<0,0001
C.V. (%)	34,64	10,82	13,97	10,07	15,15	6,77

Fonte: a própria autora.

Médias (6 repetições) seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan. (Para valor de $p \leq 0,05$, Duncan a $p \leq 0,05$; para valor de $p > 0,05$ e $\leq 0,10$, Duncan $p \leq 0,10$). n.s.: não significativo.

Figura 1 – Produtividade de grãos de milho (kg ha^{-1}) em Cachoeira Dourada (A), Luis Eduardo Magalhães (B) e Ponta Grossa (C). Tratamentos: Doses de nitrogênio: 0N (sem fertilizante nitrogenado); 100N (100% N); 75N (redução de 25% N). Doses de inoculante: D1 (1 dose de inoculante); D2 (2 doses de inoculante); D4 (4 doses de inoculante). Formas de Inoculação: CONTROLE (sem inoculação); SEMENTE (inoculação na semente); SOLO (inoculação por pulverização no solo); FOLIAR (inoculação por pulverização foliar); SULCO (inoculação no sulco de semeadura). Teste de Duncan $p \leq 0,05$.



3.4 DISCUSSÃO

O uso de inoculantes contendo estirpes de *A. brasilense* para as gramíneas não visa a substituição total de fertilizantes nitrogenados. Entretanto, o processo de FBN realizado pelas BPCP e o benefício que estas trazem às plantas, como o estímulo ao sistema radicular e, com isso, maior eficiência na exploração dos nutrientes do solo ou dos fertilizantes, podem suprir parcialmente as necessidades das plantas (HUNGRIA, 2011). A inoculação de plantas com *Azospirillum* pode resultar em significativas mudanças em vários parâmetros de crescimento, como a produção de biomassa, altura das plantas, tamanho de folhas e comprimento de raízes (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004; CAKMAK; AYDYN; SAHIN, 2006; KOUCHEBAGH; MIRSHEKARI; FARAHVASH, 2012).

Cerca de 25 milhões de doses de inoculantes com rizóbios para a cultura da soja e 2 milhões de doses de *A. brasilense* para as culturas de milho e trigo são comercializadas anualmente no Brasil (MARKS et al., 2013). Apesar do avanço no conhecimento sobre inoculantes para gramíneas, o seu uso como insumo agrícola ainda é modesto. Por isso, é imprescindível a continuidade e a intensificação de estudos nessa área para alcançar a consolidação dessa nova tecnologia no mercado brasileiro.

Em razão do intenso uso de produtos químicos, notadamente fungicidas e inseticidas, provenientes dos tratamentos industriais das sementes comercializadas, pode haver redução da eficiência dos microrganismos aplicados via sementes, caso esses produtos sejam incompatíveis com as bactérias inoculadas também via sementes. Assim, o estudo visou avaliar alternativas à inoculação, que não via semente, visando aumentar a eficiência do processo de inoculação com *Azospirillum* nas culturas do milho e do trigo, chegando-se a alguns resultados promissores que podem auxiliar no direcionamento do refinamento de técnicas alternativas de inoculação.

Em nosso estudo, para a cultura do milho, a inoculação por pulverização, tanto foliar quanto no solo, representaram os tratamentos com os maiores ganhos de MPAS e MRS. Resultados semelhantes também foram observados por Stancheva et al. (1992), porém pelo método convencional (inoculação na semente). Esses autores evidenciaram que a inoculação com *A. brasilense*, associada a 100 kg N ha⁻¹ proporcionou aumento na massa seca das plantas em relação ao controle, e ainda a testemunha que recebeu 200 kg N ha⁻¹ apresentou resultados semelhantes ao tratamento com 100 kg N ha⁻¹ e inoculado. No entanto, a eficiência da FBN pelo *Azospirillum* spp. é rapidamente reduzida ou até mesmo inibida na presença de altas doses de fertilizantes nitrogenados, especialmente na forma amoniacal,

provocando, assim, a rápida inibição da atividade da nitrogenase nas bactérias (HARTMANN, 1989, LANA et al., 2012).

Em uma revisão de experimentos conduzidos a campo e casa de vegetação na Bélgica, Uruguai, México e Israel, também foi constatado o efeito da inoculação de *Azospirillum* sp. sobre o crescimento de milho e trigo. Esses efeitos representaram um aumento significativo na massa seca, tanto de raízes quanto da parte aérea das plantas inoculadas, resultando em melhor desenvolvimento e florescimento (DOBBELAERE et al, 2001). Em nossa pesquisa, embora, não tenha apresentado um aumento da MPAS no trigo, o sistema radicular e NTPA apresentaram maiores acúmulos pela inoculação por pulverização foliar. Cohen et al. (1980) também evidenciaram aumento no NTPA e produção de matéria seca, indicando a contribuição de N nas plantas pelo *A. brasilense*. Isso aumenta as evidências dos efeitos positivos da inoculação com *Azospirillum* na promoção do crescimento de raízes, que são principalmente derivados de alterações morfológicas e fisiológicas, proporcionando aumento na captação de água e nutrientes (OKON; KAPULNIK 1986; FALLIK; SARIG; OKON, 1994; DOBBELAERE et al., 2002).

Tais alterações no sistema radicular, provavelmente, estão relacionadas com a produção dos reguladores vegetais (fitormônios), principalmente o ácido indolacético (AIA), que são produzidos pelo *Azospirillum* spp., desempenhando um papel importante na promoção do crescimento de plantas em geral (BASHAN; HOLGUIN, 1997). Além do AIA, o envolvimento das citocininas também tem sido observado no início da formação das raízes, divisão celular, crescimento celular e aumento da superfície radicular, por meio da formação das raízes laterais e adventícias (WERNER et al., 2003; BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Além disso, o *Azospirillum* pode proporcionar respostas fisiológicas como a melhoria no parâmetro fotossintético, compreendendo o maior teor de clorofila e condutância estomática, melhoria no potencial hídrico, maior altura de plantas e incremento na produção de biomassa (BARASSI et al., 2008; HUNGRIA, 2011).

Neste estudo, embora resultados satisfatórios tenham sido observados na pulverização, a inoculação no sulco com altas doses de *Azospirillum* não apresentou efeito ou até mesmo inibiu o desenvolvimento das plantas. Esses efeitos sobre o crescimento das raízes assemelham-se a respostas típicas de produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas, que são estimulantes em baixas concentrações, mas são inibitórias em concentrações elevadas (DOBBELAERE et al., 2002), como constatado por Fallik, Okon e Fischer (1988) no milho, inoculando com dose de 10^9 células planta⁻¹.

Resultados semelhantes também foram obtidos na coinoculação da soja e do feijoeiro, em que os maiores incrementos no rendimento foram observados na menor dose de *Azospirillum*, com inibição do crescimento em doses mais elevadas (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Efeitos inibitórios da aplicação de doses elevadas de *A. brasilense* também foram observados nos experimentos realizados a campo quanto aos TN, nos Municípios de Cachoeira Dourada e Ponta Grossa. Entretanto, em Luis E. Magalhães, a aplicação de doses mais elevadas foi positiva. As causas responsáveis por essas irregularidades são desconhecidas, mas geralmente têm sido atribuídos a vários fatores ecológicos e ambientais, às condições químicas e físicas do solo, aos genomas bacterianos e dos hospedeiros (OKON, 1985; BASHAN; LEVANONY; ZIV-VECHT, 1987; SUMNER 1990; FAGES 1994; OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994; DOBBELAERE et al., 2002).

Como evidenciado por Ferreira et al. (2013), estudando a inoculação associada aos micronutrientes e macronutrientes em diferentes tipos de solos (argiloso e arenoso) no milho, houve a influência do *A. brasilense* em solos argilosos nas variáveis MPAS, MRS e volume de raízes, e a ausência de efeito nos solos arenosos, o que pode estar associado com a baixa fertilidade e às propriedades físico-químicas desses solos. Também foi possível avaliar esses efeitos positivos no presente estudo quanto ao volume de raízes na inoculação via sementes para o milho, além do aumento na altura de plantas, com o método de pulverização no solo, e o método de pulverização foliar resultou em maior número de perfilhos no trigo.

Estudos têm demonstrado que a concentração de células (*A. brasilense*) inoculadas nas sementes constitui o primeiro passo da associação *Azospirillum*-raiz, dado que a bactéria primeiramente deve ser atraída quimicamente para a rizosfera por meio dos exsudatos de raízes e, então, crescer e aderir à superfície das raízes de plantas (CREUS et al., 1996; FERREIRA et al., 2013).

Embora tenha sido relatado que a concentração ótima das BPCP inoculadas em milho deva ser de 1×10^7 células semente⁻¹ (FALLIK; OKON; FISCHER, 1988), seria necessária aplicação de altos volumes do inoculante líquido, podendo comprometer a qualidade das sementes, uma vez que a dose atual recomendada equivale a aproximadamente a 1×10^5 células semente⁻¹. Para solucionar essa desvantagem, uma opção seria aumentar o número de células viáveis mL⁻¹ de inoculante (PUENTE; GARCIA; PERTICARI, 2009). Todavia, de acordo com a legislação vigente para a produção de inoculantes, a concentração mínima para os formulados contendo microrganismos associativos ou BPCP não está

especificada na instrução normativa (MAPA, 2011). Assim, devido à ausência de legislação para concentrações de inoculantes líquidos à base de *A. brasilense* e o comprometimento da qualidade das sementes, outra maneira de solucionar essa desvantagem são as diferentes formas de inoculação associadas às maiores doses de inoculantes, como no estudo proposto.

O gênero *Azospirillum* está compreendido entre as bactérias endofíticas facultativas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000), que podem colonizar tanto a superfície quanto o interior de raízes (BALDANI et al, 1997). Assim, a colonização radicular é o fator-chave para o sucesso das interações de plantas-*Azospirillum*, levando a respostas positivas no crescimento da planta (BASHAN 1986; OKON, 1985; MOSTAJERAN; AMOOAGHAIE; EMTIAZI, 2007).

A penetração dos endofíticos nas plantas hospedeiras é realizada pela extremidade das raízes, através de fissuras ocasionadas pela emergência de raízes laterais, injúrias na epiderme do sistema radicular, aberturas de estômatos e tricomas danificados (JAMES et al., 2002; CANELLAS et al., 2013). A capacidade de colonização dessas bactérias é consequência da utilização de substratos e a localização intimamente relacionada ao hospedeiro. Provavelmente, esses microrganismos possuem maior acesso às fontes de carbono prontamente disponíveis, reduzindo, assim, a competição com demais microrganismos na rizosfera.

Outro ponto a ser considerado é que o *Azospirillum*, na planta, coloniza nichos protegidos do oxigênio, garantindo a funcionalidade da enzima nitrogenase (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; COMPANT et al., 2005), responsável pela FBN. A colonização é, frequentemente, observada nos espaços intercelulares entre a epiderme e o córtex, e nas camadas externas do córtex de raízes inoculadas (PATRIQUIN, DÖBEREINER, JAIN, 1983; REINHOLD; HURECK, 1988; LEVANONY et al., 1989; REINHOLD-HUREK et al., 1993.; MOSTAJERAN; AMOOAGHAIE; EMTIAZI, 2007). Nabti et al. (2010) observaram a presença de *A. brasilense* no trigo, predominantemente localizado entre o espaço do apoplasto e as células epidérmicas das raízes. No entanto, essas bactérias podem também colonizar as folhas, como foi constatado por Mendonça, Urquiaga e Reis (2006). Mesmo após a desinfestação superficial do milho, esses autores observaram que as bactérias se localizam com mais frequência nas raízes, seguidas pelos colmos e folhas de milho.

Palus et al. (1996) relataram a presença de microrganismos endofíticos no fluido apoplástico das plantas de milho. Em razão disso, Montañez et al. (2009) concluíram que, devido à preferência desses microrganismos pelo apoplasto de tecidos da parte aérea,

isso poderia explicar a maior percentagem dos isolados nos tecido do caule (47%) do que no tecido das raízes (30%), bem como a mobilidade de propagação dos endofíticos nas partes aéreas de plantas, como a folha via espaços apoplástico.

James e Olivares (1998) também consideram que tanto os espaços intercelulares e o lúmen do xilema, denominados de compartimento do apoplasto, representam um local estável para os endofíticos, devido ao fornecimento constante de nutrientes e pelo sistema de circulação para os produtos benéficos associados às bactérias. A localização nesses sítios favorece a disseminação dos endofíticos por toda a planta, incluindo um maior estabelecimento na parte aérea da planta hospedeira, nos espaços intercelulares, através dos feixes vasculares (CANELLAS et al., 2013).

No presente estudo, na cultura do milho e do trigo, foi possível observar alta colonização na rizosfera e nas raízes nos tratamentos com inoculação no sulco de semeadura. No entanto, alta estimativa de *A. brasilense* foi observada na parte aérea do trigo nos tratamentos com inoculação via pulverização no solo, indicando alta mobilidade do microrganismo pela planta. Como relatado por James et al. (1994), a presença das bactérias nos vasos do xilema sugere ser essa a principal via de transporte da bactéria para outras partes das plantas, principalmente para a parte aérea. Outros autores têm relatado também a colonização do xilema pelas bactérias diazotróficas endofíticas (BALDANI et al., 1992; OLIVARES et al., 1995; SOUZA et al., 2004).

A estimativa da colonização das folhas em ambas as culturas foi maior quando foi realizada a inoculação por pulverização foliar, o que permite inferir que a colonização foi realizada via estômato de forma passiva, já que no momento da aplicação foliar o solo foi coberto para que não ocorresse a colonização via raízes. Os resultados obtidos corroboram os de Baldotto, Olivares e Bressan-Smith (2011). Esses pesquisadores, estudando a colonização do *Herbaspirillum seropedicae* em folhas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com sete e 14 dias da inoculação, observaram agregados bacterianos não só sobre os tricomas e junções da parede celular da epiderme, mas também sobre a parede periclinal externa e nas proximidades dos complexos estomáticos, sugerindo que a penetração ocorresse de forma passiva pelos estômatos. A colonização endofítica, no entanto, iniciou na câmara subestomática e se espalhou pelos espaços intercelulares do clorênquima esponjoso do mesófilo das folhas. De semelhante modo, Souza et al. (2004), utilizando o método de MEV em folhas de milho, também evidenciaram que a distribuição das células das bactérias se dá, preferencialmente,

pela colonização das células epidérmicas da face adaxial, onde os grupos foram formados ou próximos aos estômatos, confirmando a infecção dos endofíticos nas plantas de milho.

Saubidet, Fatta e Barneix (2002), realizando estudos em casa de vegetação com trigo, observaram que os tratamentos controles com solo desinfestado não resultaram em colonização por *A. brasilense*, enquanto no solo não desinfestado houve algum crescimento, provavelmente, a partir de uma estirpe nativa do solo. Pereyra et al. (2010) também detectaram crescimento populacional de *A. brasilense* da ordem de 3×10^3 UFC g⁻¹ raízes de pepino (*Cucumis sativus*) no tratamento não inoculado, enquanto nas plantas inoculadas foi de 8×10^6 UFC g⁻¹ raízes. Assim como observado no presente estudo, foi constatado crescimento populacional nos tratamentos não inoculados, porém menor que nas plantas inoculadas.

O ganho de produtividade de grãos pode ser atribuído, dentre outros fatores, ao aumento no teor de clorofila do tecido foliar, pois o nitrogênio é parte constituinte desta molécula, responsável pela fotossíntese (SEPEHRI; SANAVY, 2003). Dentre as técnicas existentes, a determinação do teor de clorofila pode ser realizada com o auxílio do clorofilômetro (SPAD), com leitura instantânea, sem que ocorra a destruição dos tecidos de plantas (DEL AMOR; CUADRA-CRESPO, 2012). Ainda que existam vantagens referentes à maior rapidez, menor custo e boa precisão, Argenta et al. (2001) constataram que o SPAD não é muito preciso para avaliação do TN na planta nos estádios iniciais de desenvolvimento de milho (seis a sete folhas), além da falta de relação entre as variáveis teor N determinado pelo método Kjeldahl e o teor relativo de clorofila na folha. Esses pesquisadores observaram que no estágio inicial da cultura, boa parte do N absorvido é, provavelmente, utilizada para a produção de outras estruturas e não para formação de clorofila. Desse modo, a ausência de correlação entre as variáveis no presente estudo corrobora com esses pesquisadores.

Vários estudos têm mostrado que o *A. brasilense* pode ser facilmente adaptado à rizosfera e/ou interior de raízes de trigo, afetando positivamente a produtividade da cultura (ROTHBALLER; SCHMID; HARTMANN, 2003; VENIERAKI et al., 2011). Tal como observado por Piccinin et al. (2013), a produtividade de grãos de trigo com a aplicação de 50 kg ha⁻¹ de N (metade da dose) em associação com a inoculação de sementes com *A. brasilense* foi semelhante ao tratamento não inoculado que recebeu 100 kg ha⁻¹ de N (dose completa).

No trigo, aumentos no rendimento de grãos são devidos, principalmente, ao aumento do número de perfilhos férteis (OZTURK; CAGLAR; SAHIN, 2003; SALANTUR; OZTURK; AKTEN, 2006; ALAMRI e MOSTAFA, 2009). Saubidet, Fatta e Barneix (2002) observaram a influência do *A. brasilense* no aumento do número de perfilhos de trigo

cultivado em solo desinfestado. Assim como nesse estudo, apesar da condução do experimento ter sido realizada em casa de vegetação, foi possível constatar resultados satisfatórios quanto ao número de perfilhos na inoculação por pulverização foliar e no solo, o que indica que resultados promissores também podem ser obtidos a campo.

De acordo com Dobbelaere, Vanderleyden e Okon (2003) para o milho, o aumento de rendimento de grãos pela inoculação está diretamente ligado à contribuição da FBN pela associação das bactérias do gênero *Azospirillum* spp., mas essa resposta é dependente da dose de N mineral empregada (PICCININ et al., 2013). Hungria et al. (2010), estudando diferentes estirpes e espécies de *Azospirillum* (*A. brasilense* e *A. lipoferum*) inoculadas em sementes de milho e trigo, no Estado do Paraná, encontraram resultados promissores. Foram constatados incrementos nos níveis de produtividade de grãos, com a inoculação de *A. brasilense*, nas culturas de milho e trigo de até 30% e 18%, ou 823 e 423 kg ha⁻¹, respectivamente. Esses autores evidenciaram diferenças entre as estirpes utilizadas e atribuíram os resultados não só ao nitrogênio, mas também a outros macro e micronutrientes absorvidos em maior quantidade pelas plantas inoculadas. Outros pesquisadores, em experimentos na região de cerrado no Brasil, encontraram aumentos na produtividade de milho na ordem de 29% (FERREIRA et al., 2013).

A produtividade média do milho na safra agrícola de 2012/2013 no Brasil foi de 4.904 kg ha⁻¹, sendo as médias de rendimento por Estado: GO, BA e PR de 7.925, 4.050 e 7.700 kg ha⁻¹, respectivamente (CONAB, 2012a). Os resultados obtidos com duas doses de inoculante por pulverização foliar no experimento em Ponta Grossa (PR) corresponderam a um ganho de 1.556 kg ha⁻¹ quando comparados à média produtiva do Estado. Para o Município de Luis E. Magalhães (BA) a inoculação com duas doses no sulco de semeadura apresentou um aumento de 1.394 kg ha⁻¹ em relação à média estadual. Todavia, em Cachoeira Dourada (GO), as maiores médias de produtividade de grãos com inoculação no tratamento por pulverização foliar (7.286 kg.ha⁻¹), ainda que superiores ao tratamento com a dose completa de N (100%N), não alcançaram a média daquele Estado.

Considerando as maiores produtividades de grãos nos tratamentos inoculados, comparados aos tratamentos com aplicação de apenas fertilizantes nitrogenados (100% N). Na localidade de Cachoeira Dourada, ainda que o tratamento com maior produtividade (pulverização foliar) esteja atrelada a quatro doses de inoculante, o custo da inoculação comercial situa-se na faixa de R\$ 11,00 por hectare, o que resulta em um custo de R\$ 44,00 por hectare com quatro doses de inoculante. Desse modo, a redução de 25% da dose de ureia e o preço médio desse fertilizante nos três Estados em estudo, corresponde a um

custo de R\$ 82,65 (CONAB, 2012b). O investimento no inoculante e a economia do fertilizante nitrogenado resultam em redução no custo de produção de R\$ 38,65 por hectare. Considerando ainda o ganho de 773 kg ha⁻¹ de grãos em Cachoeira Dourada, corresponde a uma receita de R\$ 224,94 por hectare, com preço médio de R\$ 17,46 por saca de 60 kg (CONAB, 2013). Para Ponta Grossa (PR), o ganho seria de R\$ 247,35 ha⁻¹ e uma economia em fertilizantes químicos de R\$ 60,65 ha⁻¹.

3.5 CONCLUSÃO

Tendo em vista a atual necessidade de busca por sistemas de produção mais conservacionistas, a inoculação com *Azospirillum brasilense* oferece perspectivas de contribuição para o aumento da sustentabilidade. Em um cenário em que uma grande variedade de produtos químicos são utilizados no tratamento de sementes, podendo resultar em incompatibilidade com *Azospirillum*, a inoculação por pulverização foliar com altas concentrações de células pode ser considerada como um método alternativo à inoculação na semente.

REFERÊNCIAS

- ALAMRI, S.; MOSTAFA, Y. S. Effect of nitrogen supply and *Azospirillum brasilense* Sp-248 on the response of wheat to seawater irrigation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 16, p. 101-107, 2009.
- ARGENTA, G.; SILVA, P. R.F.; BORTOLINI, C. G.; FORSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 158-167, 2001.
- BALDANI, V. L. D. BALDINI, J. I.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n. 56, p. 911-922, 1997.
- BALDOTTO, L. E. B.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R. Structural interaction between gfp-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* ram10 and pineapple plantlets 'Vitória'. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 114-125, 2011.
- BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L. E.; CASANOVAS, W. M.; PEREYRA, M. A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, 1. ed. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.49-59.
- BASHAN, Y. Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd following temporary depression of the rhizosphere microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 1067-1071, 1986.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. Plant growth-promoting. In: HILLEL, D., 1.ed. **Encyclopedia of soils in the environment**. Oxford: Elsevier, 2005. p. 103-115.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521-577, 2004.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H.; ZIV-VECHT, O. The fate of field inoculated *Azospirillum brasilense* Cd in wheat rhizosphere during the growing season. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 1074-1079, 1987.

BASHAN, Y.; PUENTE, M. E.; DE-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J. P. Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. In: AIT BARKA, E.; CLÉMENT, C. 1.ed. **Plant-microbe interactions**. Kerala, India: Research Signpost, 2008. p. 69-93.

BASSO, S.M.S. **Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de Adesmia DC. e Lótus L.** 1999. 268 fls. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, p.45-47, 1989.

CAKMAKC, R. I.; AYDÝN, D. F.; SAHIN, A. F.. Growth promotion of plants by plant growth- promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1482-1487, 2006.

CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Molybdenum-enriched soybean seeds enhance N accumulation, seed yield, and seed protein content in Brazil. **Field Crops Research**, v. 110, p. 219-224, 2009.

CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F. L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, p. 119-132, 2013.

COHEN, E.; OKON, Y.; KIGEL, J.; NUR, I.; HENIS, Y. Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. **Plant Physiology**, v. 66, p. 746-749, 1980.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS. **Acompanhamento de safra brasileira:grãos**, Segundo levantamento, novembro 2012, Brasília, 2012a. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_11_08_09_10_48_boletim_portugues_novembro_2012.pdf>. Acesso em: 15 nov.2013.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS. **Preços dos Insumos Agropecuários**, 2012b. Disponível em:

<<http://www.conab.gov.br/detalhe.php?a=1303&t=2>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTOS. **Preços da Agropecuária: preços mínimos da safra verão (safra 2011/2012 e 2012/2013)**, 2013. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_03_26_16_59_42_0501_precos_minimos_safra_de_verao.pdf>. Acesso em: 15 set. 2013.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action,

and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARAS, C. A. *Azospirillum* inoculation in pregerminating wheat seeds. **Canadian Journal Microbiololy**, v. 42, p. 83-86, 1996.

DEL AMOR, F. M.; CUADRA-CRESPO, P. Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. **Functional Plant Biology**, v. 39, p. 82-90, 2012.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J. F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 871-879, 2001.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, p. 36, n. 4, p. 284-297, 2002.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107-149, 2003.

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

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF: Embrapa Solos, 2006. 367 p.

FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: OKON, Y., 1. ed. ***Azospirillum/plant associations***. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 87-110.

FALLIK, E.; SARIG, S.; OKON, Y. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: OKON, Y. 1. ed. ***Azospirillum/plant associations***. Boca Raton: CRC Press. 1994. p. 57-75.

FALLIK, E.; OKON, Y.; FISCHER, M. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 20, p. 45-49, 1988.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Fenologia do milho. In: **Tecnologia da produção de milho**, Publique: Piracicaba, 1997. p. 131-134.

FERREIRA, E.; NOGUEIRA, M. A.; FUKAMI, J.; CONCEIÇÃO, R. B.; HUNGRIA, M. Nova legislação, recomendação de doses de inoculantes e pré-inoculação: riscos ao sucesso da contribuição da fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja. In: XXXII REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 2011, São Pedro, SP. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2011. p. 325-327.

FERREIRA, A. S.; PIRES, R. R.; RABELO, P. G.; OLIVEIRA, R. C.; LUZ, J. M. Q.; BRITO, C. H. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 103-108, 2013.

HARTMANN, A. Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. **Plant and Soil**, v.110, p. 225-238, 1989.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 38 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).

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.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 275, p. 757-766, 1994.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic bacteria. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.17, p. 77-119, 1998.

JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W. L.; REDDY, P. M.; IANNETTA, P. P. M.; OLIVARES, F. L.; LADHA, J. K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 894-906, 2002.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P. A.; GILLER, K. E.; KUYPER, T. W. Differences in photosynthetic behavior and leaf senescence of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) dependent on N₂ fixation or nitrate supply. **Plant Biology**, v. 12, p. 60-69, 2009.

KOUCHEBAGH, S. B.; MIRSHEKARI, B.; FARAHVASH, F. Improvement of corn yield by seed biofertilization and urea application. **World Applied Sciences Journal**, v. 16, n. 9, p. 1239-1242, 2012.

LANA, M. C.; DARTORA, J. ; MARINI, D.; HANN, J. E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, n.3, p. 399-40, 2012.

LARGE, E. C. Growth stages in cereals illustration of the Feeks scales. **Plant Pathology**, v. 4, n. 1, p. 22-24, 1954.

LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; ROMONO, B.; KLEIN, E. Ultrastructural localization and identification of *A. brasilense* Cd on and within wheat root by immunogold labelling. **Plant and Soil**, v. 117, p. 207-218, 1989.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Instrução normativa Nº 30**, de 12 de novembro de 2010. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 10 set. 2012.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Instrução normativa Nº 13**, de 24 de março de 2011. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 10 set. 2013.

MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Biotechnological potencial of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *A. brasilense* inoculants with soybean and maize. **ABM Express**, v. 3, n. 21, p. 1-10, 2013.

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**, v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.

MOSTAJERAN, A.; AMOOAGHAIE, R.; EMTIAZI, G. The participation of the cell wall hydrolytic enzymes in the initial colonization of *Azospirillum brasilense* on wheat roots. **Plant and Soil**, v. 291, p. 239-248, 2007.

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

MONTAÑEZ, A.; SICARDI, M. Effects of inoculation on growth promotion and biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) under greenhouse and field conditions. **Basic Research Journal of Agricultural Science and Review**, v. 2, p. 102-110, 2013.

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

NABTI, E.; SAHNOUNE, M.; GHOUL, M.; FISCHER, D.; HOFMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Restoration of growth of durum wheat (*Triticum durum* var. waha) under saline conditions due to inoculation with the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* NH and extracts of the marine alga *Ulva lactuca*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 6-22, 2010.

OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 223-228, 1985.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. **Plant and Soil**, v. 90, p. 3-16, 1986.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, 1994.

OLIVARES, F. L., BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, 1995.

OZTURK, A.; CAGLAR, O.; SAHIN, F. Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 166, p. 262-266, 2003.

PALUS, J. A.; BORNEMAN, J.; LUDDEN, P. W.; TRIPLETT, E. W. Isolation and characterization of endophytic diazotrophs from *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. **Plant and Soil**, v. 186, p. 135-142, 1996.

PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D. X. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 900-915, 1983.

PEREYRA, C. M.; RAMELLA, N. A.; PEREYRA, M. A.; BARASSI, C. A.; CREUS, C. M. Changes in cucumber hypocotyl cell wall dynamics caused by *Azospirillum brasilense* inoculation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 62-69, 2010.

PICCININ, G. G.; DAN, L. G. M.; BRACCINI, A. L.; MARIANO, D. C.; OKUMURA, R. S.; BAZO, G. L.; RICCI, T. T. E. Agronomic efficiency of *Azospirillum brasilense* in physiological parameters and yield components in wheat crop. **Journal of Agronomy**, v. 10, n. 4, p. 132-135, 2011.

PICCININ, G. G.; BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; SCAPIM, C. A.; RICCI, T. T.; BAZO, G. L. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 393-397, 2013.

POCHON, J.; TARDIEUX, P. Techniques d'analyse en microbiologie du sol, **Ed. de la Tourelle**, Saint-Mandé, 1962.

PUENTE, M. L.; GARCIA, J. E.; PERTICARI, A. Investigación aplicada de *Azospirillum* para su uso como promotor del crecimiento en cultivos de interés agronómico. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ed. ***Azospirillum* sp.:** cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 167-178.

PUENTE, M. L.; GARCIA, J. E.; PERTICARI, A. Effect of bacterial of *Azospirillum brasilense* in the inoculum and its plant growth regulator compounds on crop yield of corn (*Zea mays* L.) in the field. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 5, p. 604-608, 2009.

REINHOLD, B.; HURECK, T. Location of diazotrophs in the root interior with special attention to the kallar grass association. **Plant and Soil**, v. 110, p. 259-268, 1988.
REINHOLD-HUREK, B.; HURECK, T.; CLAEYSSSENS, M.; VAN-MONTASU, M. Cloning expression in *Escherichia Coli* and Characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 7056-7065, 1993.

- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552-555, 2004.
- ROS, C. O.; SALET, R. L.; PORN, R. L.; MACHADO, J. N. C. Disponibilidade de nitrogênio e produtividade de milho e trigo com diferentes métodos de adubação nitrogenada no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 799-804, 2003.
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. In situ localization and PGPR effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. **Symbiosis**, v. 34, p. 261-279, 2003.
- SALANTUR, A.; OZTURK, R.; AKTEN, S. Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. **Plant Soil Environment**, v. 52, p. 111-118, 2006.
- SAIKIA, S. P.; BORA, D.; GOSWAMI, A.; MUDOI, K. D.. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 6, p. 1085-1102, 2012.
- SAUBIDET, M. I.; FATTA, N.; BARNEIX, A. J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 215-222, 2002.
- SEARLE, P. L. The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. **Analyst**, v. 109, p. 549-568, 1984.
- SEPEHRI, A.; SANAVY, M. Water and nitrogen stress on maize photosynthesis. **Journal of Biological Sciences**, v.3, n. 6, p. 578-584, 2003.
- SOUZA, A. O. de; PAMPHILE, J. A.; ROCHA, C. L. M. S. C. AZEVEDO, J. L. Plant-microbe interactions between maize (*Zea mays* L.) and endophytic microorganisms observed by scanning electron microscopy. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 3, p. 357-359, 2004.
- SOUZA, E. C. A.; COUTINHO, E. L. M.; NATALE, W.; BARBOSA, J. C. Respostas do milho à adubação com fósforo e zinco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 1013-1036, 1998.
- SOUZA, E. F. C.; SORATTO, R. P. Efeito de fontes e doses de nitrogênio em cobertura, no milho safrinha, em plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 5, n. 3, p. 395-405, 2006.
- STANCHEVA, I.; DIMITROV, I.; KALOYANOVA, N.; DIMITROVA, A.; ANGELOV, M. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on photosynthetic enzyme activities and grain yield in maize. **Agronomie**, v. 12, p. 319-324, 1992.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 487-506, 2000.

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytokinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiology Research**, v. 149, p. 55-60, 1994.

SUMNER, M. E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. In: STEWART, B.A. (ed) **Advances in soil sciences**. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 53-123. 1990.

SWEDRZYŃSKA, D.; SAWICKA, A. Effect of Inoculation on population numbers of *Azospirillum* bacteria under winter wheat, oat and maize. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 10, n. 1, p. 21-25, 2001.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1016-1024, 1979.

TRANI, P.E.; HIROCE, II; BATAGLIA, O.C. **Análise foliar: amostragem e interpretação**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 18 p.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; PERGALIS, P.; KEFALOGIANNI, I.; CHATZIPAVLIDIS, I.; KATINAKIS, P. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 2, p. 277-285, 2011.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; ONCKELEN, H. V.; SCHMULLING, T. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. **Plant Cell**, v. 15, p. 2532-2550, 2003.