

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Estudo da Interação da Bactéria BR11417 de
Herbaspirillum seropedicae com Plantas de Milho**

Gabriela Cavalcanti Alves

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DA BACTÉRIA BR11417 DE
Herbaspirillum seropedicae COM PLANTAS DE MILHO**

GABRIELA CAVALCANTI ALVES

Sob a Orientação da Professora
Veronica Massena Reis

e Co-orientação do Pesquisador
Jean Luiz Simões de Araújo

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutora em Ciências, no Curso de
Pós-Graduação em Agronomia, Área
de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011

633.15

A474e

T

Alves, Gabriela Cavalcanti, 1975-

Estudo da interação da bactéria BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae* com plantas de milho/Gabriela Cavalcanti Alves - 2011.

52 f.: il.

Orientador: Verônica Massena Reis.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 38-46.

1. Milho - Inoculação - Teses. 2. Milho - Cultivo - Teses. 3. Nitrogênio - Fixação - Teses. 4. Bactérias nitrificantes - Teses. I. Reis, Veronica Massena, 1961- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO

GABRIELA CAVALCANTI ALVES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 24/02/2011.

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Robert Michael Boddey. Ph.D. Embrapa Agrobiologia

Márcia Soares Vidal. Dra. Embrapa Agrobiologia

Luiz Fernando Wurdig Roesch. Dr. UniPampa

Marcos Gervasio Pereira. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico àqueles que buscam no conhecimento a diminuição da degradação ambiental.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo para realização dos meus estudos de doutorado.

Ao CPGA-CS, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, pela oportunidade da formação concedida.

À Embrapa-Agrobiologia, pelo apoio estrutural, financeiro e de pessoal para realização de todas as etapas deste trabalho.

À Dra. Veronica Massena Reis, pelo acompanhamento e orientação na execução deste trabalho.

Ao Dr. Jean Luiz Simões de Araújo pela colaboração nesta tese e pela oportunidade de aprender.

Aos bolsistas e amigos: Joilson, Péricles, Paulo Boa Sorte, Hélder, Danielle, Sandy, Marcela, German, Luiza, Cecília, Túlio, Danilo, Fabrício, Flávia, Valfredo, Leona, Patrícia, Cleiton, Carlos, Elisamara e pelas sugestões, auxílios, amizade, incentivo, companhia e cumplicidade.

Aos funcionários do campo experimental da Embrapa Agrobiologia: Ernani, Paulo, Eugênio, Enivaldo, Arlei, Manoel, Ed, Fred, Silvio, Samuel, Ozéias, Silão (*in memoriam*), Edilson, Ébio, Serginho, Josias e José Pedro pela presteza e esforço em todos os experimentos que conduzimos juntos.

Ao Geraldo pelo apoio e pela amizade.

Aos pesquisadores: Dr. José Ivo Baldani, Dra. Márcia Vidal, Dra. Rosa Pitard, Dr. Luc, Dr. Stephan, Dra. Janaína Ribeiro, Dr. Segundo Urquiaga, Dr. Bruno Alves, Dr. Robert Boddey e ao Dr. Gustavo Xavier pelas orientações e estímulo para o prosseguimento do trabalho.

Aos funcionários da Embrapa Agrobiologia: Luiz Carlos, Marildo, Jorge, Carlinhos, Mazinho, Claudinho, Naldo, Fernando, Jaime, Roberto Grégio, Valéria, Altiberto, Roberto Andrade, Cíntia, Itamar, Aline, Patrícia, Monalisa, Gisele, João, Adilson, Wallace, Jhony, que sempre me ajudaram em tudo que precisei e pelas constantes palavras de incentivo.

Aos meus amigos laboratoristas Wilson e Lúcio pela parceria e por tornarem o laboratório um lugar melhor.

À Professora Lúcia dos Anjos e ao Professor Marcos Gervasio pela amizade, compreensão e confiança.

Aos funcionários da Pós-Graduação: Marquinhos e Roberto por todos os esclarecimentos e auxílios.

Aos professores: Luiz Beja, Maurício Balesteiro, Márcio Alves-Ferreira, Manlio Silvestre e Sônia Regina pela disponibilidade e auxílio frequentes.

Aos meus sogros, tia Ivanete e S. Gonzaga e minha cunhada e seu esposo, Lusicleide, Zé e Betina por serem para mim um modelo de harmonia em família e pela torcida mesmo que de tão distante.

À minha avó, Djanyra, à minha madrinha Rita, aos meus tios-pais, Zezinho e Márcio, à tia Vera e aos meus primos: Matheus, Rafaela, Andréa, Zito, Gustavo, Cristiane, Duda e Manu por não permitirem que a distância deixasse de ser física.

Ao meu irmão Eduardo e minha cunhada Fernanda pelo incentivo e carinho.

À minha irmã Carolina, meu sobrinho Arthur e meu cunhado Pedro por sempre estarem do meu lado.

Ao meu pai pelas inúmeras citações em tudo que faço.

À minha mãe pelo amor incondicional e por ser a luz do meu caminho.

Ao meu marido Lusimar pela longa parceria de amor e cumplicidade.

Aos meus filhos Victor e Pedro que são a razão da minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

BIOGRAFIA

A autora nasceu aos 10 dias de agosto de 1975, no município do Rio de Janeiro, RJ. Filha de Luiz Eduardo Gouvêa Alves e Myrian Cavalcanti Silva Gouvêa Alves, concluiu o ensino médio em 1992. Ingressou no curso superior em Agronomia da UFRRJ em 1993 e fez estágio no Departamento de Solos da mesma Universidade, no laboratório de Gênese e Classificação do Solo de 1997 a 1998, e no laboratório de Fauna de Solo de 1998 a 1999, na Embrapa-Agrobiologia. Após concluir a graduação em 2000, participou do projeto Pronex, na Embrapa Agrobiologia, entre 2002 e 2005. Em 2005 iniciou o Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo pela UFRRJ e concluiu em 2007. No mesmo ano ingressou no doutorado no mesmo programa, concluindo em fevereiro de 2011.

RESUMO

ALVES, Gabriela Cavalcanti. **Estudo da interação da bactéria BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae* com plantas de milho.** 2011. 52f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O aproveitamento eficiente do nitrogênio atmosférico é um fator essencial para a agricultura sustentável e para o agronegócio mundial. A utilização de fertilizantes minerais nitrogenados em plantas não-leguminosas constitui um dos maiores custos na agricultura. Além disso, estudos comprovam que o emprego excessivo desses produtos causa danos ao meio ambiente. O objetivo deste estudo foi avaliar as interações entre genótipos de milho x inoculação da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* estirpe BR11417. Foram implantados ensaios em quatro áreas experimentais em diferentes classes de solo e estados do Brasil, nas safras e safrinhas de 3 anos consecutivos. Foi inoculada a estirpe BR11417 nos genótipos de milho híbrido BRS1030 e BRS1010, e variedades BRS4157 e BR106, em experimento fatorial com blocos casualizados. As variáveis analisadas foram produtividade média de grãos, e teor e acúmulo de N. Também foi quantificada a contribuição da FBN pela técnica da abundância natural de ^{15}N em um dos locais. Os resultados dos experimentos foram avaliados de forma conjunta. Para a variável produtividade, os locais de cultivo diferiram, assim como as épocas. Os híbridos foram superiores as variedades e o modelo linear foi o que melhor explicou as médias de produtividade para o fator adubação nitrogenada. A inoculação contribuiu para o aumento do rendimento de grãos na safrinha para o genótipo BRS1030, principalmente quando receberam adubação nitrogenada. Os híbridos também acumularam mais N do que as variedades, mas foi na safrinha onde se observou os maiores teores de N. Foram verificadas diferenças significativas nos $\delta^{15}\text{N}$ para o fator inoculação sendo verificada a contribuição de 26% do N absorvido.

Palavras-chave: Inoculante. ^{15}N . Fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

ALVES, Gabriela Cavalcanti. **Study of interaction of bacterium *Herbaspirillum seropedicae* BR 11417 with plants of maize.** 2011. 52p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The efficient usage of atmospheric nitrogen is an essential factor for sustainable agriculture and the world-wide agribusiness. The mineral nitrogen fertilizers applied in non-leguminous plants constitutes one of the biggest costs of agriculture. Moreover, studies prove that the excessive usage of these products may cause environmental damages. The objective of this study was to evaluate interactions between genotypes of maize vs. inoculation of the diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* strain BR11417. The experiments were set in four areas with different soils and states of Brazil, in crops planted in the wet and dry seasons, for three consecutive years. The strain BR11417 was inoculated in genotypes of hybrid maize BRS1030 and BRS1010, and the varieties BRS4157 and BR106, in an experiment with factorial design and randomized blocks. The variables analyzed were grain average productivity, and nitrogen content and accumulation. Also, it was quantified the FBN contribution using the technique of natural abundance of ^{15}N in one of the sites. The results of the experiments were combined to be evaluated. For the variable grain productivity, the production sites differed, as well as the harvest time. The hybrids showed superior results to the varieties, and the linear model better explained the averages of grain productivity for the factor nitrogen fertilization. The inoculation contributed for increasing of grain yield, in the dry season crop, for the genotype BRS1030, mainly when it received nitrogen fertilization. The hybrids also accumulated more N than the varieties, but it was at the dry season when it was observed the highest content of nitrogen. There were detected significant differences in $\delta^{15}\text{N}$ for the factor inoculation, with a contribution of 26% of the absorbed N.

Key words: Inoculant. ^{15}N . Biological nitrogen fixation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	Inoculantes para Milho.....	2
2.2	Importância Econômica do Milho e Impactos de um Inoculante Comercial.....	4
2.3	Quantificação da Contribuição da FBN pela Técnica da Abundância Natural de ¹⁵ N	5
2.4	Análise Conjunta de Experimentos	6
3	MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1	Análise da Qualidade do Inoculante.....	8
3.1.1	Organismo e preparo do inoculante.....	8
3.1.2	Contagem em turfa	8
3.2	Testes de Eficiência Agrônômica	9
3.2.1	Condições experimentais.....	9
3.2.3	Tratamentos e delineamento experimental.....	14
3.3	Quantificação da Contribuição da FBN	15
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1	Produtividade de Grãos de Milho em Planossolo Háplico e nos Latossolos Vermelhos ...	16
4.2	Produtividade de Grãos de Milho Cultivados no Latossolo Amarelo Álico Distrófico.....	26
4.3	Teor e Acúmulo de Nitrogênio em Grãos de Milho Cultivado no Planossolo Háplico Distrófico Arênico e no Latossolo Amarelo Álico Distrófico.....	28
4.4	Quantificação da Contribuição da FBN nas Plantas de Milho Cultivadas no Planossolo Háplico Distrófico arênico.....	32
5	CONCLUSÕES	35
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
8	ANEXOS	47

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a quarta posição no *ranking* mundial em produção de grãos de milho, sendo superado apenas pelos Estados Unidos, pela China e pela União Europeia. A estimativa da produção deverá passar de 54 milhões (2011) de toneladas de grãos de milho em 13 milhões de hectares. Além desta considerável área cultivada no território brasileiro, a cultura gera empregos no setor agrícola, tem grande importância pela utilização direta na alimentação humana e de animais, bem como na indústria para a produção de cola, amido, óleo, álcool, flocos alimentícios, bebidas e de muitos outros produtos. Por ser um dos cereais de maior importância econômica no mundo, o milho é uma das espécies vegetais mais estudadas.

O aproveitamento eficiente do N atmosférico é fator essencial para a agricultura sustentável e para o agronegócio mundial. A utilização de fertilizantes químicos nitrogenados em plantas não-leguminosas constitui um dos maiores custos na agricultura. Além disso, estudos comprovam que o uso desses produtos causa danos ao meio-ambiente, tais como: a emissão de óxidos nitrosos tóxicos, acidificação do solo e eutrofização de lagos e rios.

As bactérias diazotróficas ou fixadoras de nitrogênio são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e transferi-lo diretamente para os tecidos vegetais através da associação destas bactérias com as plantas. Tais bactérias colonizam e vivem no interior das plantas de milho, podendo contribuir substancialmente para sua nutrição de nitrogênio. Esta estreita relação tem sido observada em muitos trabalhos, mas o entendimento desta interação é essencial para sua utilização no aumento da eficiência da produção agrícola pela utilização de inoculantes. Em função disso, diferentes estratégias podem ser utilizadas para estudar a interação entre bactérias associativas e plantas, desde a implantação de experimentos com diferentes genótipos até a identificação de genes envolvidos em tais associações.

Inoculantes são biofertilizantes microbianos que trazem os seguintes benefícios as plantas: fixação biológica de nitrogênio, disponibilizar nutrientes, substâncias promotoras de crescimento, aumento da eficiência de fertilizantes, aumento da qualidade e quantidade de produção, aumento da tolerância a estresses bióticos ou abióticos, aumento da germinação, efeito residual, sustentabilidade dos sistemas, aumento da área radicular; entre outros.

O uso do inoculante não só reduziria os custos de produção para o agronegócio, como da energia não renovável gasta na produção dos fertilizantes nitrogenados. Além disso, promoveria maior segurança da água subterrânea, com menores riscos de vazamento de fertilizantes e menores emissões de óxido nitroso, diminuindo o impacto ambiental da cultura.

Para que uma estirpe de bactéria fixadora de nitrogênio seja considerada inoculante comercial ela tem que ser testada por órgãos de pesquisa oficiais, seguindo protocolos descritos pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola), com resultados já discutidos e aprovados em reunião da mesma Instituição e por esta recomendada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Muitos fatores bióticos e abióticos estão associados na observação da contribuição de um inoculante para a planta, modificando sua resposta a inoculação. Entre eles: tipo de solo, genótipo da planta e manejo. Identificar os fatores que podem contribuir para a maximização dos processos que as bactérias diazotróficas realizam é desafio da pesquisa atual.

O objetivo desta tese foi estudar a interação entre a bactéria diazotrófica BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae* com plantas de milho com base em experimentos conduzidos em diferentes locais e genótipos sob manejo e inoculação padronizados em anos consecutivos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inoculantes para Milho

A necessidade crescente de produtos agrícolas contribui para altos custos de produção e impactos ambientais. Entre as tecnologias que podem contribuir para o aumento da produtividade e/ou mitigação dos impactos das plantações encontra-se a inoculação das plantas com bactérias diazotróficas previamente selecionadas, capazes de promover um melhor estabelecimento e crescimento, principalmente em solos pobres ou degradados. Resultados obtidos por diversos pesquisadores demonstram que, a inoculação com diazotróficos é capaz de promover o crescimento da planta hospedeira por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, mas provavelmente associados ao aumento de massa radicular, nutrição nitrogenada ou aumento na eficiência de absorção de nutrientes do solo, entre outros (BASHAN et al., 2004).

Os inoculantes são reais estratégias biotecnológicas, alternativas ao uso de fertilizantes químicos. No Brasil, os estudos sobre a fixação biológica de nitrogênio (FBN) iniciaram-se nos anos 1950, sendo que a utilização de inoculantes na cultura da soja proporcionou uma grande economia em fertilizantes nitrogenados, os quais são necessários para manter a atual produtividade da cultura. De fato, a soja brasileira tornou-se altamente competitiva no mercado mundial por não depender da aplicação de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA e CAMPO, 2005). Os efeitos positivos da inoculação observados em vários estudos revelam o potencial dessa prática como ferramenta biotecnológica também para os sistemas de produção de cereais, com grande potencial de proporcionar vantagens para produtores e indústrias do setor. As plantas de milho podem estabelecer associações rizosféricas e/ou endofíticas com diversos gêneros de bactérias fixadoras de N tais com *Azospirillum*, *Klebsiela*, *Pantoea*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Rhizobium etli* e *Burkholderia* os quais podem suprir N fixado para as plantas (MONTANEZ et al, 2009).

O grande interesse na FBN em poáceas (gramíneas) é devido à maior facilidade de aproveitamento de água das mesmas em relação às leguminosas, pela maior efetividade fotossintética. As poáceas apresentam um sistema radicular fasciculado, tendo vantagens sobre o sistema pivotante das leguminosas para extrair água e nutrientes do solo. Além disso, são largamente cultivadas em todo o mundo e utilizadas como alimento pelo homem. Por isso, mesmo que, se apenas uma parte do nitrogênio pudesse ser fornecida pela associação com bactérias fixadoras, a economia em adubos nitrogenados seria igual ou superior àquela verificada com as leguminosas que podem ser auto-suficientes em nitrogênio (DÖBEREINER, 1992), assim como para a manutenção da qualidade do solo e da água, aumentando a sustentabilidade da produção (CHELIUS E TRIPLETT, 2000).

Existem inoculantes comerciais para gramíneas em todo o mundo. No entanto todos estes produtos têm em sua composição bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp., provavelmente por influência das pesquisas realizadas por Johanna Döbereiner, que iniciou os trabalhos com bactérias diazotróficas há mais de 40 anos (MOREIRA et al., 2010).

O maior obstáculo para a utilização desta tecnologia é a inconsistência das respostas à inoculação que está ligada a fatores como condições edafoclimáticas, interação com a biota do solo, seleção de estirpe e qualidade dos inoculantes (REIS, 2006).

A disponibilidade de nitrogênio no solo para a planta é outro fator que influencia a FBN. Segundo Dobbelaere e colaboradores (2003) a contribuição das bactérias diazotróficas pode ser 50 a 95% maior quando a planta recebe doses de fertilizante nitrogenado. Provavelmente por isto, Riggs e colaboradores (2001) verificaram que a inoculação de *H. seropedicae* promoveu acréscimos de produção de matéria seca de 49 a 82% quando aplicada

juntamente com fertilizante nitrogenado, em comparação com 16% de aumento quando as plantas foram apenas inoculadas e não adubadas. Montanez e colaboradores (2009), sob condições de casa de vegetação, verificaram pelo método da diluição isotópica de ^{15}N para 19 genótipos de milho, que a porcentagem de nitrogênio derivada do ar variou entre 12 e 33%, não sendo, em geral, a FBN afetada pela adubação nitrogenada e sim pelo genótipo. No entanto, altas aplicações de fertilizantes nitrogenados já foram sugeridas como responsáveis pela diminuição do número populacional de bactérias diazotróficas em variedades de cana-de-açúcar (FUENTES e RAMÍREZ et al., 1999) e de nodulação em soja (MENDES et al., 2008).

Outros trabalhos correlacionam a associação com bactérias diazotróficas aos aspectos fisiológicos do metabolismo de nitrogênio nas plantas. Didonet e colaboradores (1996) mencionam que são muitas as evidências de que a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasilense* seja responsável pelo aumento da taxa de acúmulo de matéria seca, principalmente na presença de elevadas doses de nitrogênio, o que parece estar relacionado com o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação de nitrogênio. Ribaud e colaboradores (2006) observaram que em plântulas de milho a inoculação com a estirpe Z172 de *H. seropedicae* afetou o desenvolvimento da planta, o conteúdo de nitrogênio, bem como a atividade das enzimas de assimilação de amônio, GS e GOGAT, indicando que a inoculação desta bactéria tem efeito significativo no metabolismo de N de plântulas de milho.

Experimentos com o inoculantes a base de *Azospirillum* spp., mostraram que os tratamentos com inoculação e aplicação de adubação nitrogenada, aumentaram a produção em 30% (CAVALLET et al. 2000; HUNGRIA et al., 2010; CAMPOS et al., 2000). No entanto, nas associações com este gênero há baixa especificidade e colonização de regiões superficiais da planta, pois tem ampla distribuição nos solos (DÖBEREINER & DE POLLI, 1980) e colonização predominantemente rizosférica (MAGALHÃES et al., 1979).

Segundo Antoun e colaboradores (1998) a variabilidade dos resultados dos experimentos de inoculação é devida, provavelmente, a complexidade das interações na rizosfera entre a planta, a bactéria introduzida e o resto da microbiota rizosférica, neutra ou deletéria. Esta poderia ser a justificativa para as respostas positivas, porém variáveis observadas em inúmeros trabalhos. Contudo, é razoável que tais resultados sejam bastante influenciados pelas já mencionadas, condições de solo, ambiente e genótipos de planta.

As bactérias do gênero *Herbaspirillum seropedicae* trouxeram nova dimensão aos estudos das associações dos microrganismos com as plantas de milho já que têm maior especificidade de interação com as plantas, uma vez que são endófitos obrigatórios com baixa sobrevivência no solo (BALDANI et al., 1987). Primeiro elas invadem os espaços intercelulares das raízes, penetram na endoderme e colonizam os vasos condutores podendo atingir a parte aérea das plantas (JAMES et al., 1997; RONCATO-MACCARI et al., 2003).

Diversos autores sugeriram que, dadas as dificuldades de estabelecimento na rizosfera pelos microrganismos inoculados, seria melhor trabalhar com promotores de crescimento que sejam endofíticos, o que lhes garantiria um habitat menos competitivo (CHANWAY et al., 2000; STURZ & NOWAK, 2000; BARKA et al., 2000). Especula-se que os diazotróficos endofíticos não sofrem limitação de substâncias ricas em carbono, estão livres de competição com outros microrganismos e podem transferir muito mais eficientemente os compostos nitrogenados produzidos para a planta (NEVES et al., 1985; DÖBEREINER, 1997).

Aliado as possíveis vantagens da colonização interna, os altos números nos tecidos das plantas de milho indicam que estas bactérias são promissoras para utilização como inoculante para a cultura do milho podendo resultar em rendimentos menos variáveis com maior reprodutibilidade, além de ser mais um produto a ser utilizado na busca por interações mais eficientes.

2.2 Importância Econômica do Milho e Impactos de um Inoculante Comercial

No Brasil a cultura do milho tem-se caracterizado pela divisão da produção em duas épocas de plantio. O plantio de verão ou safra, ou ainda primeira safra é realizado na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre fins de agosto, na região Sul, até os meses de outubro/novembro no Sudeste e Centro-Oeste, no Nordeste, esse período ocorre no início do ano. A safrinha, ou segunda safra, compreende-se aos meses de janeiro e fevereiro alcançando o final do verão e início do inverno nas regiões Sul-Sudeste e Centro-Oeste (CRUZ, 2011).

A importância econômica do milho não está apenas na produção anual da cultura, mas em todo o relacionamento que essa cultura tem na produção agropecuária brasileira, tanto no que diz respeito a fatores econômicos quanto a fatores sociais (DUARTE, 2009) e ambientais. Os fatores econômicos estão relacionados ao uso do milho como alimentação animal, humana e outras aplicações industriais, como a produção de etanol. A alimentação animal é o que representa a maior parte do consumo deste cereal, e o crescimento das criações acompanha a demanda por milho e vice-versa. A alimentação humana, com derivados de milho, mesmo não tendo uma participação muito grande no uso de milho em grão, constitui outro importante uso desse cereal em regiões com baixa renda.

A adoção da tecnologia de inoculação com *Azospirillum*, para a cultura do milho, pode resultar em uma economia estimada em US\$ 1 bilhão por safra de milho em todo o país, considerando uma área cultivada de 13 milhões de hectares, com um rendimento médio de 3,2 mil quilos/hectare, e visto que pode-se reduzir de 20 a 50% do uso de fertilizantes (<http://www.embrapa.gov.br/embrapa/imprensa/noticias/2009/agosto/1asemana/embrapa-e-ufpr-desenvolvem-primeiroinoculante-para-milho-e-trigo>).

A produção mundial ficou em torno de 835 milhões de toneladas na última safra (USDA, 2010) com 54 milhões de toneladas produzidas no Brasil em aproximadamente 13 milhões de hectares. A produção poderia ser maior não fosse o baixo nível de produtividade, devido ao grande número de pequenos produtores que cultivam esse cereal com baixa ou nenhuma aplicação de insumos.

A importância do milho ainda está relacionada ao aspecto social, pois grande parte dos produtores depende dessa produção para viver. Inclusive no que diz respeito ao emprego de mão-de-obra, já que muitos trabalhadores rurais estão ligados à produção de milho. Esta agricultura de pouca tecnologia se reflete nas baixas produtividades médias. Portanto, pode-se, afirmar que há uma clara dualidade na produção de milho no Brasil: uma grande parcela de produtores que não estão envolvidos com a produção comercial e que atingem apenas baixos índices de produtividade, e uma pequena parcela de produtores, com elevado índice de produtividade, com aplicação intensiva de tecnologia e elevado investimento de capital na produção de milho (DUARTE, 2009). A geração de tecnologias pelos órgãos de fomento deve levar em consideração não apenas a otimização do processo produtivo em sistemas com elevada aplicação de tecnologia, mas também favorecer o modelo praticado pela agricultura de subsistência aumentando a disponibilidade de alternativas que visem o melhor desempenho em condições de baixa aplicação de insumos.

A cultura do milho também está associada aos fatores ambientais devido a responder por cerca de 28% da área agrícola do país (IBGE, 2011) onde são aplicados 3,792 milhões de toneladas de adubos (COSTA et al., 2011) que provocam a poluição dos mananciais e resultam na destruição da vegetação nativa do país. Portanto, a importância do milho não está só na produção de uma cultura anual, mas em todo o relacionamento que essa cultura tem na produção agropecuária, tanto no que diz respeito a fatores econômicos quanto a fatores sociais e ambientais. Pela sua versatilidade de uso, pelos desdobramentos de produção animal e pelo aspecto social, o milho é um dos mais importantes produtos do setor agrícola no Brasil.

2.3 Quantificação da Contribuição da FBN pela Técnica da Abundância Natural de ^{15}N

Quantificar a contribuição da FBN é uma necessidade para quem recomenda estirpes como inoculante, não só para justificar tal recomendação garantindo a efetividade da estirpe bacteriana, bem como para motivar pesquisas mais detalhadas no aumento de sua eficiência. A quantificação da FBN de plantas de milho já foi comprovada pelo método do gás N_2 marcado com ^{15}N (ALEXANDER & ZUBERER, 1989), pelo método da diluição isotópica de ^{15}N (RENNIE, 1980; GARCÍA DE SALAMONE et al., 1996; MONTANEZ et al., 2009) ou pelo método da abundância natural de ^{15}N (ALVES, 2007).

A abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) é um método com o objetivo de quantificar a total contribuição da fixação biológica de nitrogênio na nutrição nitrogenada das plantas. Esta técnica baseia-se no fato de que o N do solo é, geralmente, levemente enriquecido com o isótopo ^{15}N em comparação ao N_2 do ar (SHEARER & KOHL, 1986). O nitrogênio do ar apresenta cerca de 0,3663% de ^{15}N e o restante (99,6337%) de ^{14}N (JUNK & SVEC, 1958). Contudo, devido a discriminação isotópica que ocorre durante as transformações do nitrogênio no sistema solo-planta, ambos podem apresentar valores de ^{15}N um pouco maiores que os encontrados na atmosfera (SHEARER & KOHL, 1986). Espécies capazes de obter do ar a maior parte do nitrogênio necessário para sua nutrição, apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ bem próximos a zero, uma vez que a maior parte vem do N do ar que, é o padrão da técnica, e possui 0,3663% de ^{15}N , ou seja, zero unidades de delta ^{15}N em excesso. Por outro lado, as espécies não fixadoras crescendo no mesmo solo, têm valores de $\delta^{15}\text{N}$ mais elevados e próximos aos do solo, uma vez que todo ou a maior parte do nitrogênio necessário para o seu desenvolvimento é derivado do solo (RESENDE et al., 2003).

Esta técnica, como todas as outras técnicas isotópicas, apresentam a vantagem de permitir a discriminação e quantificação das fontes de N que contribuem para a nutrição nitrogenada das plantas de forma direta, ou seja, através da aplicação desta técnica pode-se saber qual a fração do N acumulado pela planta é proveniente do solo e/ou do processo de FBN quando associado às plantas. Além disso, as técnicas isotópicas são as únicas que se aplicam para a estimativa da contribuição deste processo para a nutrição das plantas ao nível do campo em culturas de plantas não leguminosas (BODDEY et al., 2001).

Assim como as outras técnicas isotópicas, ela depende que as plantas fixadoras e não-fixadoras, crescendo no mesmo solo, absorvam nitrogênio com a mesma marcação com ^{15}N (SHEARER & KOHL, 1986). Esta limitação pode ser contornada selecionando-se espécies-referência, com desenvolvimento radicular e demanda de N semelhantes à planta avaliada. Outra limitação do método consiste no alto custo das análises e a necessidade de um maior cuidado com a manipulação das amostras (BODDEY, 1987). Além disso, outras entradas de N no sistema solo-planta como água de irrigação, chuvas, fertilizantes nitrogenados devem ser desprezíveis, ou iguais tanto para a planta fixadora de N_2 como para a planta referência.

É importante considerar também os valores de fracionamento isotópico (valor B) das plantas fixadoras crescendo em meios livres de N. Estas variações se dão em nível de espécie da planta, das estirpes das bactérias diazotróficas envolvidas, do estágio e condições de crescimento. Sendo assim, é necessário que se utilize um fator de correção, (valor B), que possa expressar a discriminação isotópica de ^{15}N feita por cada espécie (PEOPLES et al., 1989). Por outro lado, as diferenças que possam existir na exploração do volume do solo pelas raízes das plantas teste e controle, e as diferenças na curva de absorção de nutrientes entre elas, são fatores que permitem sugerir o uso de mais de uma planta como referência (SHEARER & KOHL, 1986).

A abundância natural de ^{15}N em profundidade pode refletir diferenças, devido a difusão do ar atmosférico no solo e isto pode acarretar, de fato, mudanças na contribuição do processo. Segundo Ledgard et. al (1984) no horizonte superficial os valores de $\delta^{15}\text{N}$ são

relativamente mais baixos, o que pode acarretar em erros nas estimativas da FBN, especialmente se as plantas testemunhas apresentam seu maior desenvolvimento na camada superficial do solo. Para corrigir esta situação, realiza-se um estudo adicional em casa de vegetação para verificar o grau de uniformidade dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ no perfil do solo cultivado com a planta alvo (XAVIER, 2006).

A técnica da abundância natural de ^{15}N apresenta maior potencial de estimar a contribuição da FBN associada a plantas com adequadas exatidão e precisão (BODDEY et al., 2001). Contudo tem baixa acurácia na quantificação de baixos níveis de fixação de nitrogênio (REICHARDT et al., 1988). A principal característica que atribui esta vantagem sobre outras, é a possibilidade da estimativa da contribuição da FBN *in situ*, sem perturbação do sistema solo/planta, com os resultados expressando o acúmulo de N no tempo, e podendo ser utilizado para detectar a FBN em qualquer sistema biológico (SHEARER et al., 1978).

Neste estudo são apresentados alguns resultados de quantificação da contribuição da FBN em milho que justificam a recomendação do inoculante proposto.

2.4 Análise Conjunta de Experimentos

Em muitos ramos da experimentação há influência decisiva do local ou da ocasião sobre os efeitos dos tratamentos. Isto ocorre, nos experimentos com plantas, nas quais o solo e as condições climáticas têm uma interferência muito grande (GOMES, 1990). O solo é apenas um dos componentes de um conjunto complexo de fatores de produção, destacando-se pelo seu importante papel de fornecer às plantas suporte físico, água e nutriente. Portanto, o conhecimento das características inerentes a cada solo, os chamados fatores edáficos, é importante para julgar o potencial de produção agrícola (LEPSCH, 1987).

A disponibilidade de água no solo governa a produção vegetal, assim sua falta ou excesso afetam de maneira decisiva o desenvolvimento das plantas (REICHARDT, 1996), pois alteram a absorção dos nutrientes e da própria água (HUMBRET, 1968). Exceto locais que utilizam irrigação para fornecimento de água às culturas, a disponibilidade de água é regida pela distribuição da chuva e pelo potencial de armazenamento de água no solo, que é condicionado pela sua capacidade de retenção e drenagem do solo. A capacidade de retenção de água de um solo é bastante variada dependendo do tipo e quantidade de porosidade do mesmo (MAULE et al., 2001).

Várias respostas do milho aos fatores do ambiente decorrem de seu mecanismo fotossintético C4, resultando em elevada produtividade de grãos, quando comparado a outras espécies cultivadas sem o mesmo mecanismo (BERGONCI & BERGAMASCHI, 2002).

A análise conjunta de experimentos é de grande interesse para os melhoristas de plantas, pois, as estimativas de parâmetros genéticos baseadas em experimentos conduzidos em um único ambiente são superestimadas. Isto ocorre devido ao fato de que, além do componente genético, há o componente da interação genótipo x ambiente envolvido nestas estimativas. As estimativas obtidas com base em experimentos conduzidos em dois ou mais ambientes são mais realistas (REGAZZI et al., 1999) e recomendados (CRUZ et al., 2004). Para se estimar a interação e, mais ainda procurar alternativas para atenuar o seu efeito, é necessária a realização da análise conjunta desses experimentos (RAMALHO et al., 2000). Nesta análise, pode ser avaliada a magnitude das interações genótipo x ambiente pela variância dos efeitos de genótipos x locais, genótipos x anos, genótipos x anos x locais entre outros.

Este tipo de análise se adéqua perfeitamente ao milho, que vem sendo cultivado em todos os estados brasileiros, com centenas de genótipos lançados todos os anos (EMBRAPA, 2007). Além disso, o plantio ocorre praticamente durante o ano todo. A cultura é denominada de acordo com a época de plantio: milho safra ou primeira safra, plantado de agosto a dezembro; e milho safrinha ou segunda safra, plantado de janeiro a maio. O período mais expressivo para o plantio ocorre na safra, mas o milho safrinha vem ganhando espaço, desde a

década de 80, como alternativa viável de atividade econômica e de produto para consumo próprio no período de outono-inverno (DUARTE, 2004).

Nas safrinhas a disponibilidade de nutrientes é menor, sobretudo em decorrência das baixas precipitações pluviárias ocorridas durante o desenvolvimento da cultura. Na safra, período das águas com melhor distribuição de chuvas, as médias de produtividade foram sempre superiores as do período de safrinha. Tais diferenças entre a produtividade nas safras e safrinhas estão em conformidade com Tsunehiro e Miele (1999) e Farinelli e colaboradores (2003) e reforçam a necessidade da análise dos grupos de experimentos por época.

Para que os experimentos possam ser reunidos é preciso que os quadrados médios residuais não difiram muito entre si, isto é, que sejam relativamente homogêneos. Gomes (1990) relata que grupos de experimentos similares, em que todos os tratamentos tenham o mesmo número de repetições, podem ser analisados de forma conjunta, se o quociente entre o maior e o menor quadrado médio residual for menor do que 7. Quando esse quociente for além de 7, convirá considerar separadamente os experimentos.

Em termos experimentais, em que se dispõe de uma rede de ambientes para avaliação dos cultivares, é fundamental identificar se há, entre os ambientes disponíveis, padrões de similaridades de respostas de cultivares, de tal maneira que seja possível avaliar a representatividade dos ensaios (CRUZ et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise da Qualidade do Inoculante

3.1.1 Organismo e preparo do inoculante

A estirpe BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae*, também conhecida como ZAE94, foi isolada de raízes desinfestadas de arroz, pertence ao gênero *Herbaspirillum* e foi incluída na espécie *H. seropedicae* por Baldani e colaboradores (1986). Vários estudos mostraram que esta espécie apresenta baixa sobrevivência quando inoculada em solos naturais ou até mesmo esterilizados (OLIVARES et al., 1996).

O isolado BR11417 foi inicialmente crescido em placa com meio de cultura sólido JNFB (DÖBEREINER et al., 1995), com o objetivo de verificar sua pureza. O meio JNFB é semi-seletivo para *Herbaspirillum* spp., o que permite o crescimento do inóculo em uso e inibe o crescimento de contaminantes, tornando a avaliação mais confiável.

Para obtenção do inoculante, colônias puras do isolado foram inoculadas no meio de cultura Dyg's (RODRIGUES NETO, 1986) e multiplicadas por 24 horas a 30 °C a 175 rpm. Após esta etapa, 100 µL da suspensão celular foi inoculada em frascos contendo 75 mL do mesmo meio Dyg's, e multiplicadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o crescimento, a densidade ótica da suspensão de células foi ajustada para 1, a 436 nm (SCHLOTTER et al., 1992) para a obtenção de 10^8 - 10^9 células mL⁻¹.

Posteriormente ao ajuste celular, foi feita a inoculação de 75 mL da suspensão bacteriana em sacos de polipropileno contendo 175 g de turfa previamente seca, moída, esterilizada e pH ajustado (STRALIOTTO, 2000), sendo homogeneizados em seguida. Logo após a inoculação, a turfa maturou a 30 °C por 24 h. Após este período, as sementes foram cobertas com uma solução de polvilho a 10%, visando melhor aderência, depois peletizadas com a turfa inoculada na proporção de 250 g de inoculante turfoso para cada 10 kg de sementes de milho.

3.1.2 Contagem em turfa

Após o preparo de cada dose de inoculante utilizada nos experimentos, foram separadas três amostras para contagem da população de bactérias diazotróficas e adicionada mais uma amostra de turfa inoculada com água estéril como controle. As amostras foram separadas, homogeneizadas e pesadas. Foi colocado 1 g de cada amostra em tubo contendo 9 mL de solução salina (anexo) e homogeneizado em vortex por 30 segundos.

Em seguida, as amostras foram diluídas seriadamente de 10^{-1} (primeiro tubo) até 10^{-10} , acrescentando-se 1 mL da diluição original aos tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. A partir da diluição 10^{-5} , amostras de 0,1 mL foram inoculadas em 3 repetições de frascos contendo 5 mL do meio de cultura semi-sólido JNFB (anexo) sem adição de nitrogênio.

Os frascos inoculados foram incubados a 30 °C por um período de 7 dias, para o desenvolvimento de película na região superficial do meio. A contagem da população bacteriana foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP) utilizando a tabela de McCrady para três repetições de cada diluição (DÖBEREINER et al., 1995). Este método é um processo indireto de contagem muito utilizado em laboratórios para monitoramento da população microbiana.

A presença de bactérias diazotróficas nas amostras foi verificada pela formação de película no meio de cultura semi-sólido, semi-seletivo JNFB (Tabela 1) em cada dose utilizada nos experimentos. Como resultado padrão nas três amostras correspondentes ao

inoculante, em torno de três dias após a inoculação já se observava a película na superfície do meio de cultura. Já na amostra de turfa inoculada com água estéril, não era observado crescimento de película.

Tabela 1. Número de células ($\times 10^9$) por grama de inoculante contado em JNFB em resultado padrão de contagem em turfa.

Inóculo	Amostra	Contagem
Água estéril	-	ND
BR11417	1	14,3
BR11417	2	5,0
BR11417	3	11,0

ND: não detectado pelo método.

A concentração encontrada foi em média de 10^{10} g^{-1} de inoculante. Considerando que em 10 kg há 30 mil sementes e a indicação foi de $250 \text{ g } 10 \text{ kg}^{-1}$ de sementes, isto significa que são em torno de 10^7 células por semente. O número de células viáveis no inoculantes está de acordo com a legislação Nacional, n.º 86955 de 18 de fevereiro de 1982, que determina para inoculantes comerciais um mínimo de 10^8 células g^{-1} de inoculante.

3.2 Testes de Eficiência Agronômica

3.2.1 Condições experimentais

a) Caracterização dos locais dos experimentos

Os experimentos foram implantados em quatro locais: Seropédica-RJ, Sete Lagoas-MG, Planaltina-DF e Boa Vista-RR (Tabela 2). Estas áreas englobam biomas e classes de solo distintas: Planossolo, Latossolo Vermelho e Latossolo Amarelo.

O Planossolo é uma classe de solo com sérias limitações físicas, em geral, associadas à baixa condutividade hidráulica no horizonte B plânico. A transmissão de doenças de plantas que se propagam com maior facilidade em ambiente relativamente mal drenado é também um fator limitante desses solos (OLIVEIRA, 2005). Esta classe foi encontrada nos experimentos conduzidos em Seropédica onde ocorrem altas precipitações no verão e temperaturas médias, característico, em parte, ao bioma Mata Atlântica, já muito devastado na região.

As temperaturas médias e as precipitações variaram muito no decorrer dos anos de estudo (Figura 1). Em 2007 houve verão atípico com altas precipitações, contrastante com os anos anteriores. No verão deste ano foram registrados extremos de chuvas em MG, SP e RJ, com perda de vidas (aproximadamente 120 até finais de janeiro de 2007), e com graves prejuízos na infraestrutura, população e estradas nestes estados (MARENGO et al., 2007).

O Latossolo é um solo com avançado estágio de intemperismo, baixa capacidade de troca de cátions e baixos teores ou quase ausência de minerais primários facilmente alteráveis. Sua reserva em nutrientes é muito reduzida, fato que não o impede de ser bastante produtivo quando bem manejado (OLIVEIRA, 2005).

Esta classe foi encontrada em três das áreas experimentais, sendo dois Latossolos Vermelhos e um Latossolo Amarelo. Os Latossolos Vermelhos estão localizados no bioma Cerrado, em Sete Lagoas-MG e Planaltina-DF onde o clima é quente, semi-úmido, tem verão chuvoso e inverno seco (Figura 2 e 3).

Os Latossolos são muito presentes no cerrado, devido à alta lixiviação e ao tempo de formação dos solos da região. Em geral, apresentam baixa fertilidade natural, alta acidez, aliada à presença de Al, alta fixação de P e baixos teores de matéria orgânica (RAIJ, 1991; AMADO et al., 2002). Parte destas limitações não foi observada devido as áreas de plantio se localizarem em campos experimentais, regularmente corrigidos (Tabela 2).

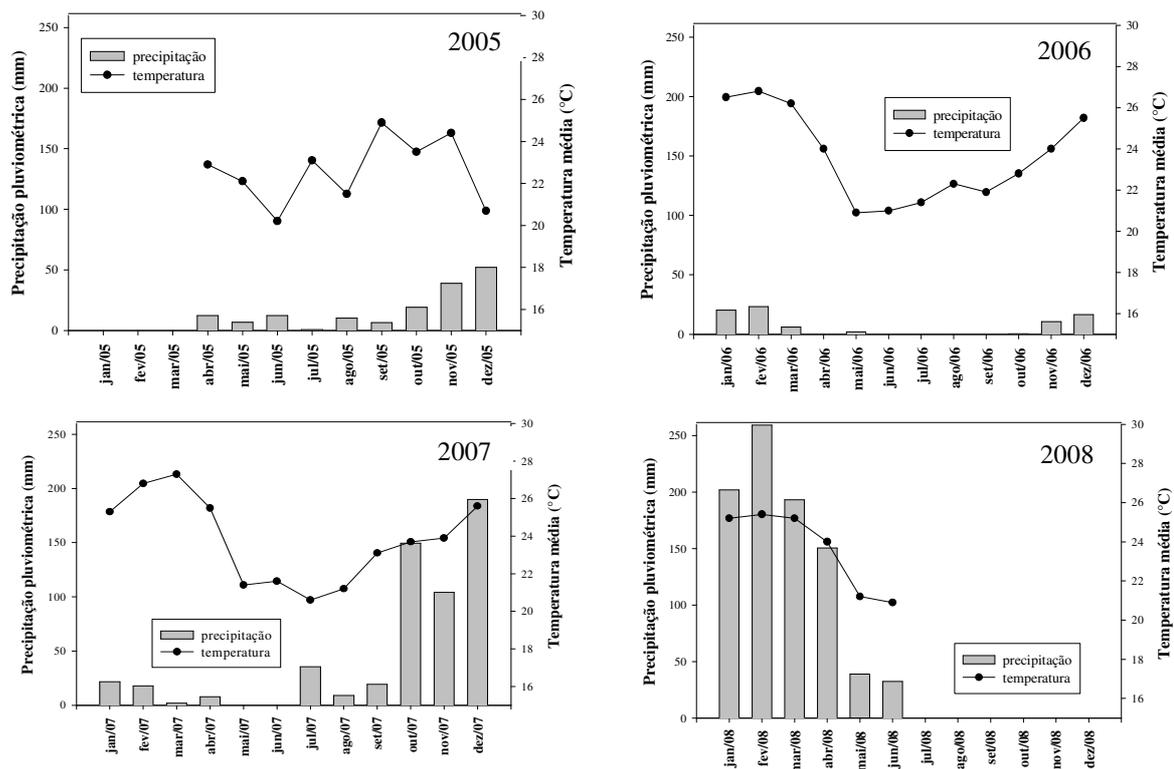


Figura 1. Médias mensais de temperatura e precipitação pluviométrica da área em Seropédica –RJ, de abril de 2005 até junho de 2008. Dados fornecidos pelo INMET.

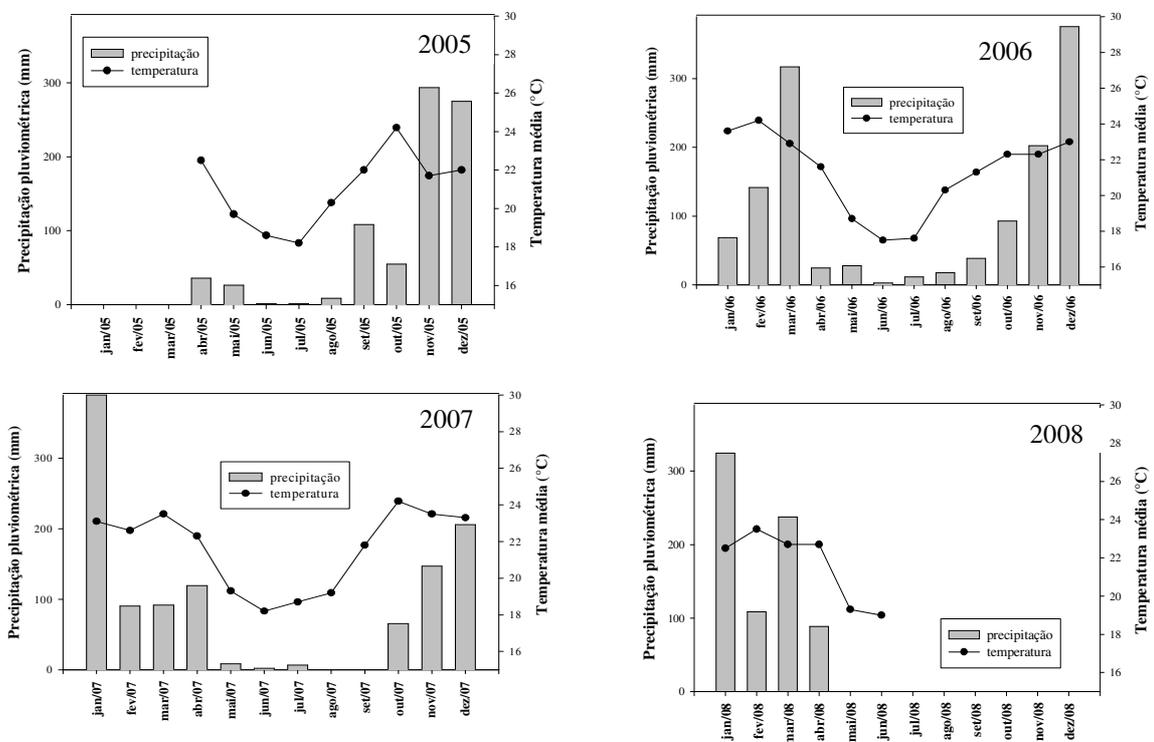


Figura 2. Médias mensais de temperatura e precipitação pluviométrica da área em Sete Lagoas-MG, de abril de 2005 a junho de 2008. Dados fornecidos pelo INMET.

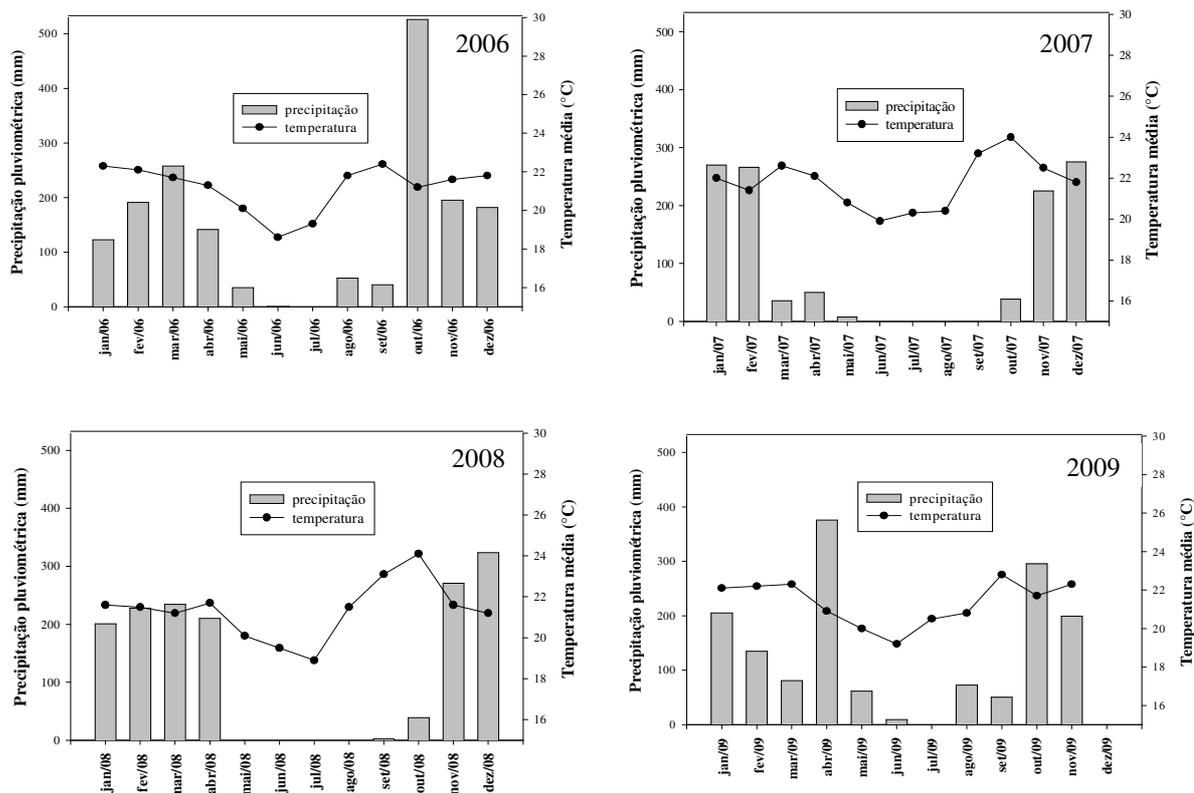


Figura 3. Médias mensais de temperatura e precipitação pluviométrica da área em Planaltina-DF, de janeiro de 2006 até novembro de 2009. Dados fornecidos pelo INMET.

O Latossolo Amarelo localiza-se em Roraima, no bioma Amazônia com precipitações pluviométricas que chegam a 1.800 mm/ano e temperatura estável no decorrer do ano, com média entre 25 e 28 °C (Figura 4). Diferente das outras áreas, as chuvas vão de abril a setembro e devido às chuvas concentradas, só há uma safra de milho nesta região.

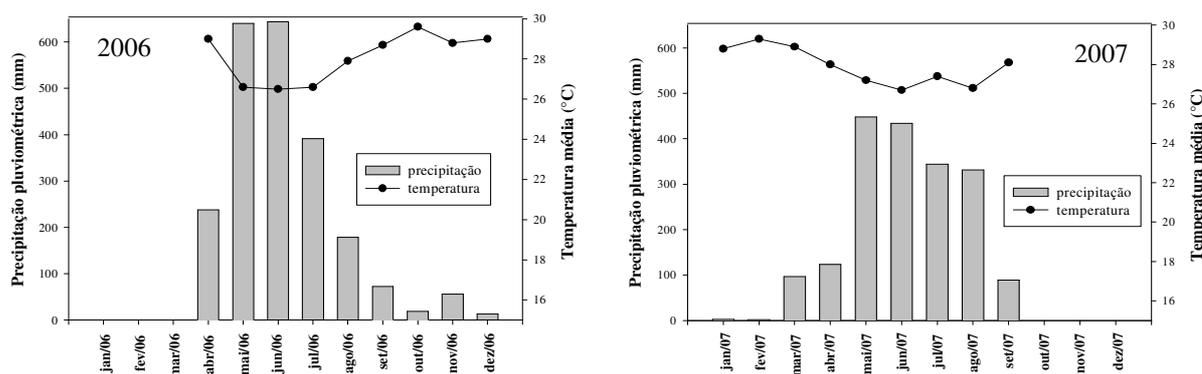


Figura 4. Médias mensais de temperatura e precipitação pluviométrica da área de estudo em Boa Vista-RR, de abril de 2006 até setembro de 2007. Dados fornecidos pelo INMET.

Tabela 2. Caracterização dos locais dos experimentos.

Local	Classe de Solo	Clima	Análise do Solo	Correção	Parcelas	Densidade de Plantio
Seropédica-RJ	Planossolo Háplico Distrófico arênico (PHda)	Aw	pH em água de 5,6, Al: 0, Ca+Mg: 3,1 e MO: 0,73 cmol _c dm ⁻³ , Corg: 1,25 g dm ⁻³ , P: 4,8 e K: 48,4 mg dm ⁻³	80 kg ha ⁻¹ de P ₂ O ₅ (200 g de Superfosfato Simples por linha de 4 m) e 20 kg ha ⁻¹ de K ₂ O (17 g de KCl por linha de 4 m)	6 m x 6 m, espaçadas por 1 m e área útil de 12 m ²	5 plantas.m linear
Sete Lagoas-MG	Latossolo Vermelho Distrófico (LVd1)	Aw	pH em água de 5,3, Al: 0, Ca+Mg: 3,2 cmol _c dm ⁻³ , P: 6,0 e K: 2,7 mg dm ⁻³	0-28-16 de N, P ₂ O ₅ , K ₂ O + Zn na dose 350 kg ha ⁻¹	5 m x 5 m, espaçadas por 0,90 m e área útil de 13,5 m ²	5 plantas.m linear
Planaltina-DF	Latossolo Vermelho Distrófico (LVd2)	Cwa	pH em água de 5,6, Al: 0,1, Ca+Mg: 2,3 cmol _c dm ⁻³ , P: 18,6 e K: 121,5 mg dm ⁻³	3 Mg ha ⁻¹ de calcário dolomítico e adubação básica	4 m x 6 m, espaçadas por 0,9 m e área útil de 12 m ²	5 plantas.m linear
Boa Vista-RR	Latossolo Amarelo Distrófico (LAAd)	Aw	pH em água de 5,4, Al: 0,1, Ca+ Mg: 3,1 e MO: 0,6 cmol _c dm ⁻³ , Corg: 5,8 g dm ⁻³ , P: 31,9 e K: 0,2 mg dm ⁻³	90 kg ha ⁻¹ de P ₂ O ₅ no plantio e 90 kg ha ⁻¹ de K ₂ O parcelados	4 m x 5 m, espaçadas por 0,9 m e área útil de 8,1 m ²	5 plantas.m linear

A correção da fertilidade do PHda foi feita com base nos resultados obtidos em análise química segundo Manual do Rio de Janeiro (ALMEIDA et al, 1988) e a correção da fertilidade dos Latossolos foi feita segundo Sousa e Lobato (2004).

b) Cultivares de milho

Os genótipos de milho utilizados nos experimentos foram: BR106, BRS4157, BRS1010 e BRS1030 (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos genótipos utilizados nos experimentos

Genótipos	Material Genético	Ciclo	Características especiais	Porte	Região
BR106	Variedade	Semiprecoce	Boa estabilidade de produção, ampla adaptabilidade e alta prolificidade	Médio	NO-NE-SE CO-SC-PR
BRS4157	Variedade	Precoce	Excelente adaptação a solos de baixa fertilidade, eficiente no uso de nitrogênio	Médio	NO-NE-SE CO-SUL
BRS1010	Híbrido Simples	Precoce	Ampla adaptação, alto potencial produtivo, muito boa estabilidade de produção, alta eficiência na utilização de fósforo.	Baixo	SE-CO Norte do PR Sudoeste BA Sul MA e PI
BRS1030	Híbrido Simples	Precoce	Alto potencial produtivo, estabilidade de produção e resistência às doenças mais comuns do milho	Baixo	SE-CO Norte do PR Sudoeste BA

Tabela adaptada do Guia de Cultivares de Milho da Embrapa Milho e Sorgo e a Santa Helena Sementes (SHS 5050).

A escolha dos genótipos foi devido a diferirem quanto o tipo de material genético, a ampla adaptação a diversos locais e a disponibilidade de sementes nas áreas experimentais. Os genótipos BR106 e BRS4157 são mais adaptados a solos de baixa fertilidade e os genótipos BRS1010 e BRS1030 para solos de fertilidade boa à moderada.

No LAAd - Boa Vista não foi utilizado o genótipo BRS1030 em razão da sua baixa adaptação às condições locais.

c) Época de plantio dos experimentos

Os experimentos foram implantados nas safras, época das águas, e safrinhas, época seca, de diferentes anos (Tabela 4) dependendo do local de plantio.

Tabela 4. Anos agrícolas dos experimentos conduzidos em quatro locais.

Locais	Anos Agrícolas								
	safrinha	Safra	safrinha	Safra	Safrinha	Safra	safrinha	Safra	safrinha
	2005	2005-2006	2006	2006-2007	2007	2007-2008	2008	2008-2009	2009
PHda	+	+	+	+	+	+			
LVd1	+	+	+		+	+			
LVd2				+	+	+	+	+	+
LAAd				+		+			

+ ocorrência de experimento

No Planossolo Háplico foram implantados seis experimentos, em três safras e três safrinhas de 2005 a 2008. No Latossolo Vermelho 1, seis experimentos, três safras e três safrinhas, de 2005 a 2009. No Latossolo Vermelho 2 foram plantados cinco experimentos, dois nas safras e três nas safrinhas de 2005 a 2008. Em Boa Vista/RR, como só se planta milho em uma época do ano, foram plantados dois em 2006 e 2007. Estes últimos experimentos foram considerados safrinha devido a terem sido plantados em abril. Totaliza-se, 19 experimentos, sendo 8 em safras e 11 em safrinhas.

3.2.3 Tratamentos e delineamento experimental

Os dados foram analisados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983) quanto à normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet). Foram atendidas as pressuposições necessárias para avaliação dos dados por testes paramétricos e verificados os quadrados médios residuais para avaliação dos experimentos em grupo. O delineamento utilizado foi blocos casualizados em arranjo fatorial. Foram feitas análises de variância dos experimentos em conjunto, com aplicação do teste F, para testar significância com 10% de probabilidade. De acordo com o protocolo para inoculantes em plantas não leguminosas, descrito na RELARE (BALDANI, 2007).

Para a análise conjunta com vários locais foram considerados cinco fatores: tipo de solo (S), época (E), genótipo (G), inoculação (I) e adubação nitrogenada (N) (Tabela 5).

Nesta avaliação os arranjos fatoriais foram 3x2x2x2x2 (SxExGxIxN), sendo que os genótipos utilizados no PHda, LVd1 e LVd2 foram BRS1030 e BR106, adubação nitrogenada ou não com 40 kg de N/ha e inoculação ou não com a bactéria BR11417.

Para análise conjunta em um local foram considerados quatro fatores: época (E) ou ano (A), genótipo (G), inoculação (I) e adubação nitrogenada (N), sendo o arranjo fatorial 2x2x2x2 (E ou AxIxGxN).

A análise conjunta no LAAd utilizou os genótipos BRS1010 e BRS4157. O LAAd não foi comparado com os demais tipos de solos devido aos genótipos serem distintos, o que impossibilita tal avaliação.

Tabela 5. Detalhamento dos fatores utilizados nas análises dos experimentos, do número de repetições e das variáveis avaliadas.

Fatores para as análises					Nº de repetições	Variáveis Analisadas
Locais	Genótipos Utilizados	Adubação nitrogenada (kg.ha ⁻¹)	Inoculação	Época		
PHda	BRS1030, SHS5050, BR106, BRS4157	0, 40 e 80	Com ou Sem BR11417	Safra e safrinha	6	Produtividade, % de N, N acumulado e $\delta^{15}\text{N}$ e % de FBN
LVd 1	BRS1030, BR106	0 e 40	Com ou Sem BR11417	Safra e safrinha	4	Produtividade
LVd 2	BRS1030, BR106	0, 40	Com ou Sem BR11417	Safra e Safrinha	4	Produtividade
LAAd	BRS1010, BRS4157	0, 40 e 80	Com ou Sem BR11417	Safrinha	6	Produtividade, % de N e N acumulado

PHda – Planossolo Háptico distrófico arênico, localizado em Seropédica-RJ; LVd1 – Latossolo Vermelho distrófico 1, localizado em Planaltina-DF; LVd2 – Latossolo Vermelho distrófico 2, localizado em Sete Lagoas-MG; LAAd – Latossolo Amarelo Álico distrófico, localizado em Boa Vista-RR.

Para os valores médios dos caracteres estudados nos fatores: tipo de solo, época, inoculação e genótipo foi utilizado o teste de Scott-Knott (SCOTT & KNOTT, 1974) e para o

fator nível de adubação, fator quantitativo, foi utilizado o teste de regressão, ambos com auxílio do programa SISVAR 4.6 (FERREIRA, 2003).

A análise conjunta entre locais foi feita visando observar o efeito da inoculação na produtividade, ao longo do tempo, em diferentes locais. Devido a diferença no número de repetições, nos locais com Latossolos Vermelhos (LVd1 e LVd2) foram adicionadas 2 médias das repetições do mesmo tratamento para permitir a análise dos grupos de experimentos com o Planossolo Háptico.

3.3 Quantificação da Contribuição da FBN

Foram realizadas amostragens em 4 experimentos plantados no PHda, visando quantificar a contribuição de FBN na cultura do milho. A quantificação foi realizada através da técnica de diluição isotópica de ^{15}N a partir da abundância natural de ^{15}N das plantas (SHEARER & KOHL, 1986). Para a estimativa da FBN através da abundância natural de ^{15}N utiliza-se a seguinte expressão:

$$P = 100 \frac{(\delta^{15}\text{N planta não fixadora}) - (\delta^{15}\text{N planta fixadora})}{(\delta^{15}\text{N não fixadora} - B)}$$

Onde, P é a% de fixação biológica de N, $\delta^{15}\text{N}$ não fixadora é o valor de $\delta^{15}\text{N}$ encontrado na planta testemunha coletadas em cada parcela experimental e B é o fator de correção do fracionamento isotópico ocorrido pelas plantas de milho crescendo exclusivamente dependente da FBN (Neste estudo, foi considerado igual a zero, como proposto por BODDEY et al., 2001).

Nas parcelas dos tratamentos testemunha absoluta e testemunha inoculada (sem N) foram coletadas três plantas de milho da linha central para a quantificação da contribuição de FBN. Foi feita a coleta da parte aérea das plantas de milho dos genótipos BRS1030 e BR106 em todos os experimentos, composta por folha e colmo, na metade da fase de enchimento dos grãos. Também foram coletadas três ou quatro testemunhas presentes, em cada repetição dos tratamentos testados, as quais foram utilizadas para as estimativas de FBN. Foram elas: *Portulaca oleracea* (“beldroega”), *Eleusine indica* (“capim pé-de-galinha”) e *Richardia brasiliensis* (“ricardia”).

As amostras foram secas, moídas, tiveram o teor de N quantificado, foram pesadas e analisadas em espectrômetro de massa Delta Plus da Embrapa Agrobiologia.

Delineamento experimental

Os dados foram analisados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983) quanto à normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet). Atendidas as pressuposições necessárias para avaliação dos dados por testes paramétricos e verificados os quadrados médios residuais para avaliação dos experimentos em grupo, foram feitas análises de variância dos experimentos em grupo por época, com auxílio do programa SISVAR 4.6 (FERREIRA, 2003). O delineamento experimental foi em blocos casualizados em arranjo fatorial.

Para a análise conjunta dos experimentos foram considerados os fatores: época (E), tipo de planta (P- milho e invasoras), e inoculação (I). O arranjo foi 2x4x2 (ExPxI), sendo as épocas safra e safrinha, plantas de milho dos genótipos BRS1030 e BR106, inoculadas e não inoculadas, comparadas a 3 plantas invasoras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, estão dispostos os resultados encontrados para as variáveis analisadas pela avaliação conjunta de experimentos.

4.1 Produtividade de Grãos de Milho em Planossolo Háplico e nos Latossolos Vermelhos

Na tabela 6 podem ser observadas as médias de produtividades de grãos de dois genótipos de milho (BRS1030 e BR106) em três tipos de solos (PHda, LVd1 e LVd2), nas safras e safrinhas, com e sem adubação nitrogenada, inoculados e não inoculados com a estirpe BR11417.

Tabela 6. Médias de produtividades ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) de grãos de milho BRS1030 e BR106, cultivado no Planossolo (PHda) e Latossolos Vermelhos (LVd1 e LVd2), na época safrinha ou safra, adubados ou não com 40 kg de N/ha e inoculados ou não com a estirpe BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae*.

Local	N	Época	BRS1030			BR106			Média geral
			NI	I	Incremento	NI	I	Incremento	
PHda	0	Safrinha	3.872	3.689	-	3.092	2.845	-	3.375
		Safra	3.570	3.775	205	3.340	3.790	450	3.618
	40	Safrinha	4.455	4.977	522	3.472	3.586	115	4.123
		Safra	4.273	4.611	337	3.840	3.733	-	4.114
média PHda			4.043	4.263		3.436	3.488	52	3.808 B
LVd1	0	Safrinha	4.415	5.057	642	4.555	4.454	-	4.620
		Safra	8.289	7.639	-	6.595	6.547	-	7.268
	40	Safrinha	5.261	5.673	412	5.379	5.405	27	5.430
		Safra	8.580	8.541	-	7.611	7.442	-	8.044
média LVd1			6.636	6.728		6.035	5.962	-	6.340 A
LVd2	0	Safrinha	5.767	5.983	216	6.334	6.031	-	6.029
		Safra	7.049	6.933	-	5.536	5.089	-	6.151
	40	Safrinha	6.212	6.688	475	6.790	6.534	-	6.556
		Safra	7.542	8.041	500	5.711	5.710	-	6.751
média LVd2			6.512	6.796		6.187	5.929	-	6.356 A
média geral			5.684 b	5.878 a		5.162 a	5.079 a	-	5.451

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si nas colunas e médias seguidas de letras minúsculas nas linhas pelo teste Scott-Knot a 10% de probabilidade. PHda: Planossolo háplico em Seropédica-RJ distrófico arênico; LVd1: Latossolo Vermelho distrófico em Planaltina-DF; LVd2: Latossolo Vermelho distrófico em Sete Lagoas-MG. N: adubação nitrogenada; 0: sem adubação nitrogenada; 40: 40 kg de N/ha. BRS1030 e BR106: genótipos de milho. NI: Não inoculados e I: Inoculados; Incrementos: Produtividade do tratamento inoculado – a produtividade do tratamento não inoculado.

Foram observadas diferenças significativas entre os locais onde foram implantados os experimentos. No Planossolo Háplico (PHda) a produtividade média de grãos foi equivalente a $3.808 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, enquanto que nos Latossolos Vermelhos a média foi de, aproximadamente, $6.350 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Esta diferença de mais de $2.500 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ demonstra a distinção entre os ambientes estudados.

Nos Planossolos há dificuldade no crescimento e desenvolvimento das plantas devido suas condições físicas naturalmente desfavoráveis (PAULETTO et al., 2004). Além disso, seu

caráter arênico dificulta a proteção física da matéria orgânica, estando sujeito à rápida decomposição dos resíduos culturais e menor formação de macroagregados (STRECK et al., 2008). Isso confere também alta suscetibilidade à desagregação, favorecendo o selamento superficial e dificultando o desenvolvimento radicular.

Já os Latossolos possuem excelentes condições físicas, as quais, aliadas ao relevo plano ou suavemente ondulado onde ocorrem, favorecem sua utilização com a cultura do milho, climaticamente adaptado às regiões. Esses solos, por serem ácidos e distróficos requerem correção de acidez e adubação pelo seu alto grau de intemperismo. Os Latossolos dos ambientes estudados são argilosos e têm melhor aptidão agrícola quando comparados aos arenosos, tendo em vista que esses últimos são mais pobres e podem ser degradados mais facilmente por compactação e erosão (SANTOS et al., 2006).

Na Figura 5 estão apresentadas as produtividades médias de grãos de milho nos experimentos de safras e safrinhas no Planossolo e Latossolos Vermelhos.

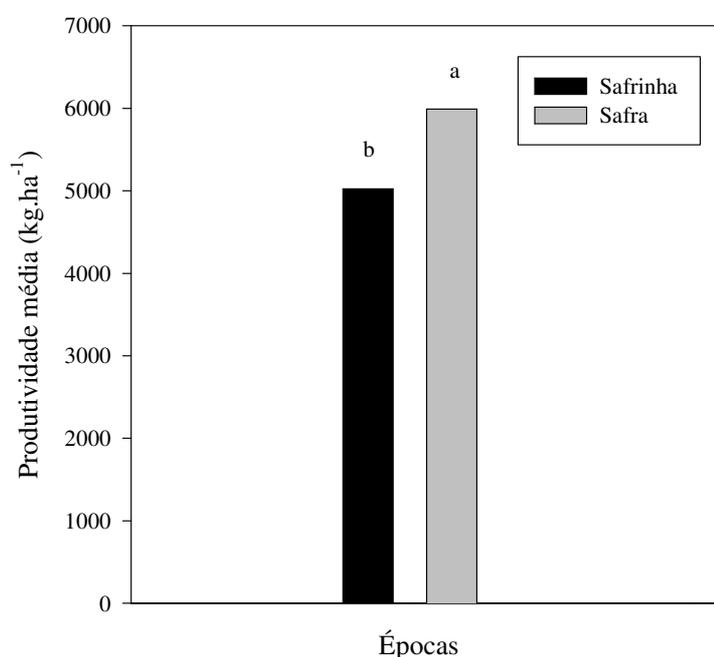


Figura 5. Valores de produtividade média de grãos de milho (kg.ha⁻¹) nas épocas safrinha e safra. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade, pelo teste Scott-knott.

No período de safrinha, os genótipos apresentaram valores médios de produtividade estatisticamente inferiores ao período de safra. Isto ocorreu em vista da influência das condições ambientais, sobretudo em decorrência das baixas precipitações pluviais ocorridas durante o desenvolvimento da cultura (FARINELLI et al., 2003). Durães e colaboradores (1995) ressaltam que as condições de cultivo de milho safrinha são desfavoráveis para o desenvolvimento da cultura, comparando-se com o período de primavera-verão, quando ocorre o plantio da safra.

Segundo Brunini (1997), as semeaduras realizadas no período da safrinha, após o mês de fevereiro, fazem com que a planta de milho desenvolva a maior parte de seu ciclo em meses cuja taxa de acúmulo térmico de desenvolvimento diário é muito baixa, resultando em alongamento do ciclo.

Na figura 6 verifica-se a diferença significativa entre os genótipos de milho.

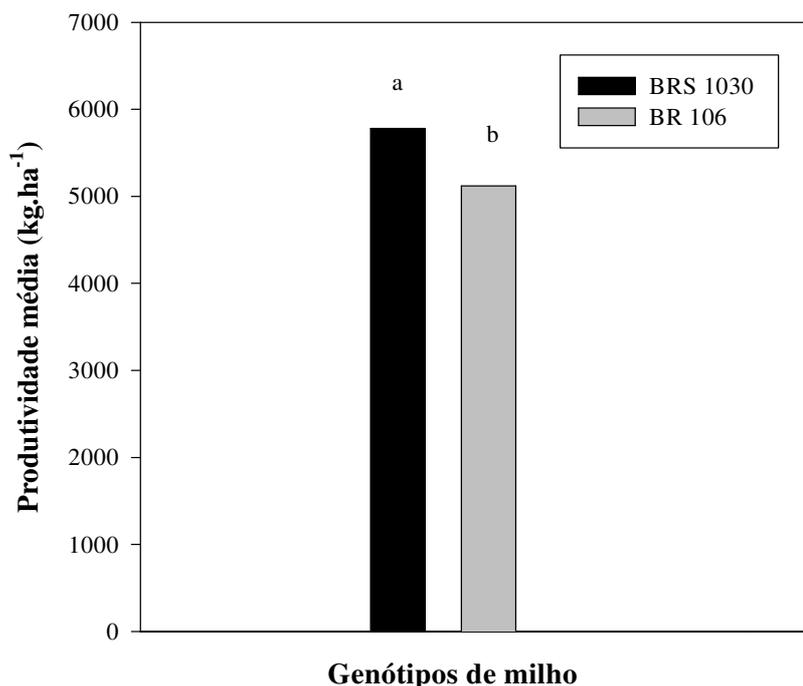


Figura 6. Valores de produtividade média de grãos de milho (kg.ha⁻¹) dos genótipos BRS1030 e BR106. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade, pelo teste Scott-knott.

O híbrido BRS1030 apresentou melhor rendimento (5.830 kg.ha⁻¹) em comparação com a variedade BR106 (5.173 kg.ha⁻¹) nos três tipos de solo estudados. Geralmente, os híbridos comerciais apresentam melhor desempenho que as variedades, com grande uniformidade de plantas e espigas.

Uma variedade de milho é um conjunto de plantas com algumas características comuns, em geral com potencial de produtividade relativamente baixo. É um material geneticamente estável e que, por essa razão, com os devidos cuidados em sua multiplicação, a produção pode ser utilizada como semente sem nenhuma perda de seu potencial produtivo (COSTA & CAMPOS, 1997). Além disso, as variedades são materiais pouco melhorados, necessitando de trabalhos adicionais de melhoramento para que atinjam um nível desejado de produtividade. Entretanto, essas populações são importantes por constituírem fonte de variabilidade genética que podem ser exploradas na busca por genes desejáveis ao melhoramento (ARAÚJO & NASS, 2002). Uma menor produtividade das variedades em relação aos híbridos é esperada, haja vista que a variedade é composta por um infinito número de híbridos simples, ao passo que os híbridos, sejam simples, triplos ou duplos, são teoricamente as melhores combinações híbridas específicas que podem ser obtidas dentro de uma ou mais variedades (RIBEIRO et al., 2000).

Na Figura 7 são observadas as produtividades médias de grãos de milho com adubação nitrogenada ou não, no Planossolo Háplico e nos Latossolos Vermelhos.

Para o fator adubação nitrogenada o modelo linear foi o que melhor se ajustou, com coeficientes de determinação (R^2) entre 96,6 e 100%, o que indica que, nos três tipos de solo, na maior dose de fertilizante nitrogenado, houve a maior produtividade. No LVd1 o efeito da adubação nitrogenada foi maior em relação aos demais tipos de solos, com ganhos de até 793 kg.ha⁻¹ quando os genótipos de milho receberam fertilizante nitrogenado. Este resultado não surpreende, uma vez que o melhoramento de milho é, quase sempre, conduzido com a

aplicação de quantidades elevadas de fertilizantes nitrogenados (KAMPRATH et al., 1982), tornando os cultivares extremamente responsivos.

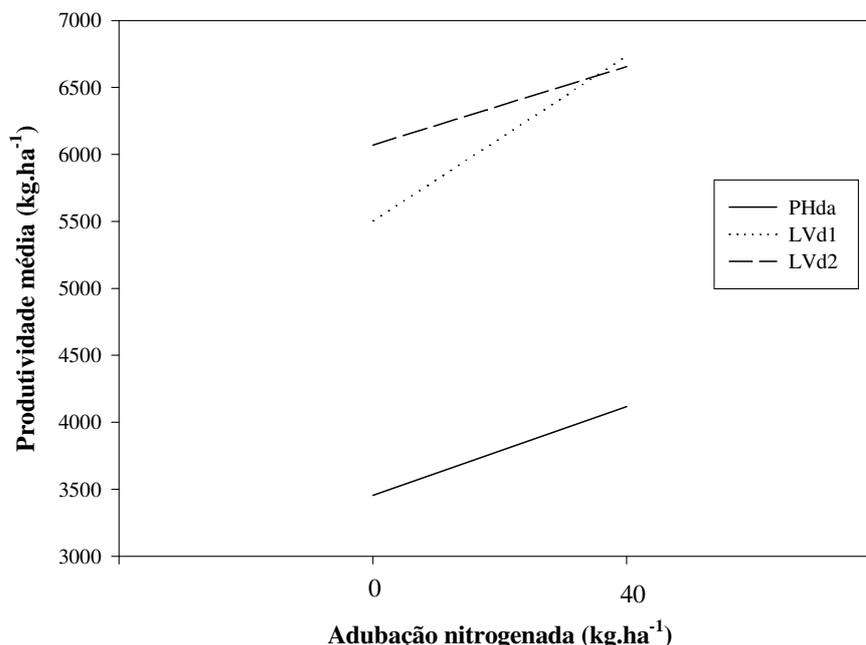


Figura 7. Valores de produtividade média de grãos de milho cultivado no PHda, LVd1 e LVd2 adubados ou não com 40 kg de N/ha.

O nitrogênio (N) é o nutriente mineral quantitativamente mais importante para a fisiologia vegetal. Dessa forma, seu ciclo na natureza é um dos que mais afeta as variadas formas de vida no planeta (VAN LOON & DUFFY, 2010). O uso de elevados níveis deste nutriente durante o desenvolvimento dos cultivares pode levar à seleção de genótipos que apresentem consumo de luxo de N ou requeiram elevadas doses deste nutriente para expressarem seu potencial produtivo (CARLONE & RUSSEL, 1987). Por outro lado, os baixos níveis de N podem contribuir naturalmente para a seleção de genótipos eficientes na fixação biológica do nitrogênio (BODDEY et al., 1995) a qual pode representar diminuição na necessidade de fertilização nitrogenada.

Com intuito de não mascarar uma possível eficiência da FBN os níveis de adubação nitrogenada utilizados nos experimentos foram no máximo de 80 kg de N/ha, sendo que a recomendação média para adubação é de 100 a 200 kg de N/ha, dependendo do tipo de solo e do potencial genético do genótipo (COELHO E FRANÇA, 1995).

Na Figura 8 observam-se os rendimentos de milho no Planossolo Háplico e Latossolos Vermelhos na safrinha e safra.

A figura 8 mostra um comportamento diferenciado dos genótipos de milho, em função dos tipos de solo e das épocas de plantio. As letras apontam para a diferença entre os locais.

Houve interação entre os tipos de solo e as épocas de cultivo, mas a ordem dos locais se manteve, ou seja, em todos os solos, os genótipos de milho tiveram melhor performance na safra e pior na safrinha. No entanto, a magnitude da diferença não se manteve. Isto pode ser observado na inclinação da linha que explica tal interação. No Planossolo Háplico e no Latossolo Vermelho Distrófico 2 observa-se maiores produtividades na safra, mas isto se dá de forma menos acentuada do que no LVd1.

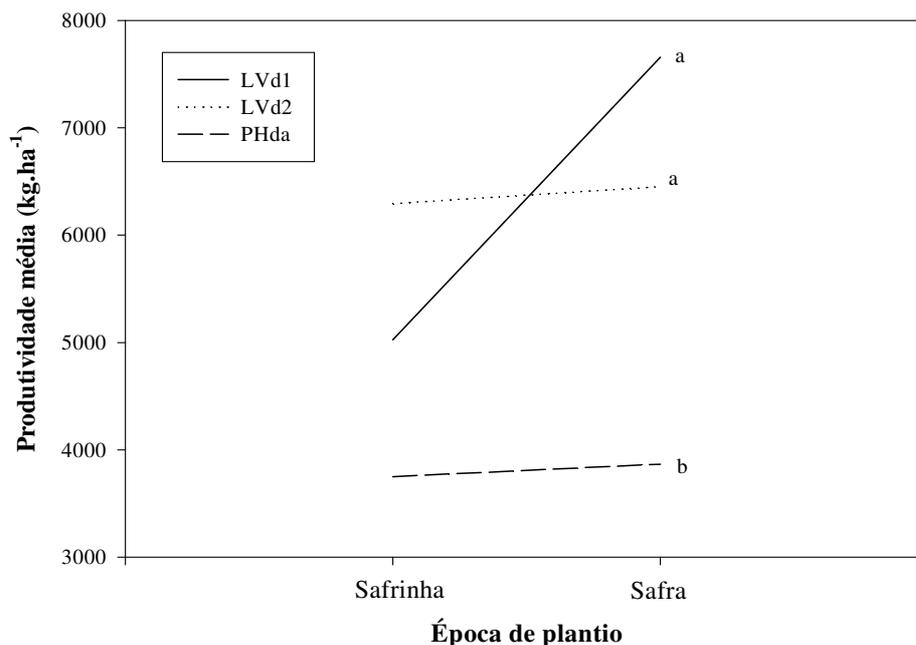


Figura 8. Valores de produtividade média de grãos ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) de milho cultivado no PHda, LVd1 e Figura 8. LVd2, nas épocas de plantio safrinha e safra. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste Scott-knott.

O Planossolo foi menos produtivo quando comparado aos demais solos em ambas as épocas avaliadas, assim como na safra houve sempre as maiores médias de produtividade. No Planossolo e Latossolos Vermelhos, o comportamento do milho na safra foi estatisticamente superior a safrinha.

Cultivares de cana-de-açúcar apresentaram comportamentos de produtividade agrícola e maturação variados nos dois ambientes de desenvolvimento estudados, em consequência das diferentes condições hídricas entre os solos, o que enfatiza o papel do ambiente na produtividade de colmos e maturação de cultivares (MAULE et al., 2001).

Na figura 9 pode-se observar o desempenho dos genótipos de milho BRS1030 e BR106 frente às épocas safra e safrinha.

A figura 9 mostra a interação entre os genótipos e as épocas de cultivo, sendo que o híbrido BRS1030 foi o genótipo mais produtivo, com produtividade média de grãos 6% maior na safrinha e 21% maior na safra. Esta baixa produtividade do genótipo BR106 é consequência da menor adaptação à época de plantio, aliada ao potencial do material genético da variedade.

A produtividade de grãos obtida na safra foi mais alta, provavelmente consequência das condições climáticas favoráveis, com volume maior de precipitações pluviais, maior radiação solar e temperaturas adequadas ocorridas durante o desenvolvimento das cultivares (Figuras 1, 2 e 3). Na safra, com plantios em outubro, novembro e dezembro, o atendimento hídrico é mais provável, fazendo com que as fases fenológicas críticas da cultura do milho (florescimento e enchimento de grãos) coincidam com uma distribuição regular de chuvas (ALFONSI et al., 1997).

Bergamaschi e colaboradores (2004) verificaram em dois experimentos no Rio Grande do Sul que independentemente da condição climática regional, a produtividade de grãos de milho é decorrente das condições hídricas durante o período crítico, que vai do pendoamento ao início do enchimento de grãos.

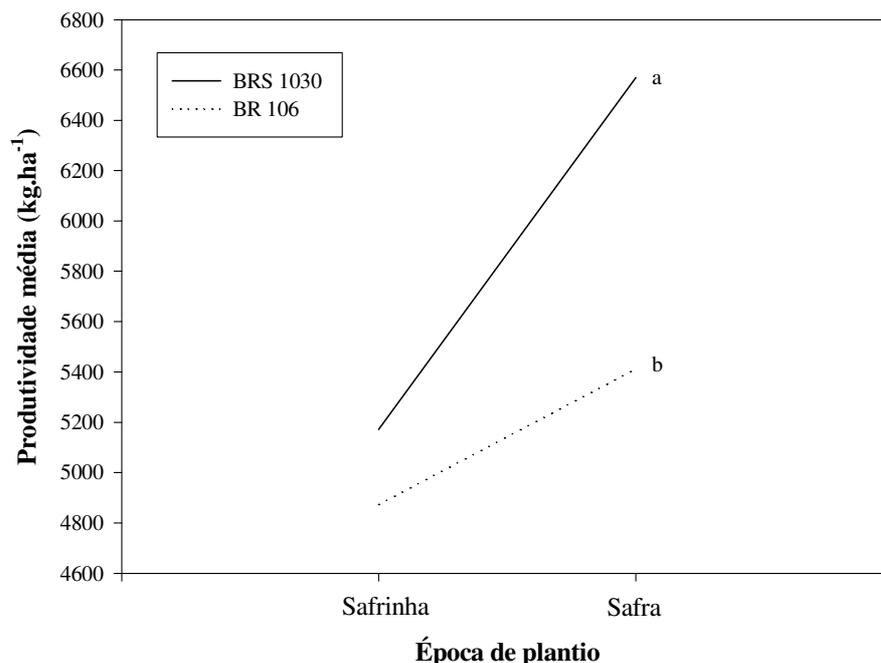


Figura 9. Valores de produtividade média de grãos (kg.ha^{-1}) dos genótipos de milho BRS1030 e BR106 nas épocas safrinha e safra. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

A Figura 10 apresenta as produtividades médias de grãos de milho sem a inoculação e com a inoculação da estirpe BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae*.

Houve interação entre os fatores genótipo e inoculação (Figura 10), sendo o comportamento da variedade diferente estatisticamente do híbrido por ocasião da inoculação. Enquanto no BR106 a inoculação reduziu as produtividades, no híbrido BRS1030 a inoculação incrementou em média 194 kg.ha^{-1} .

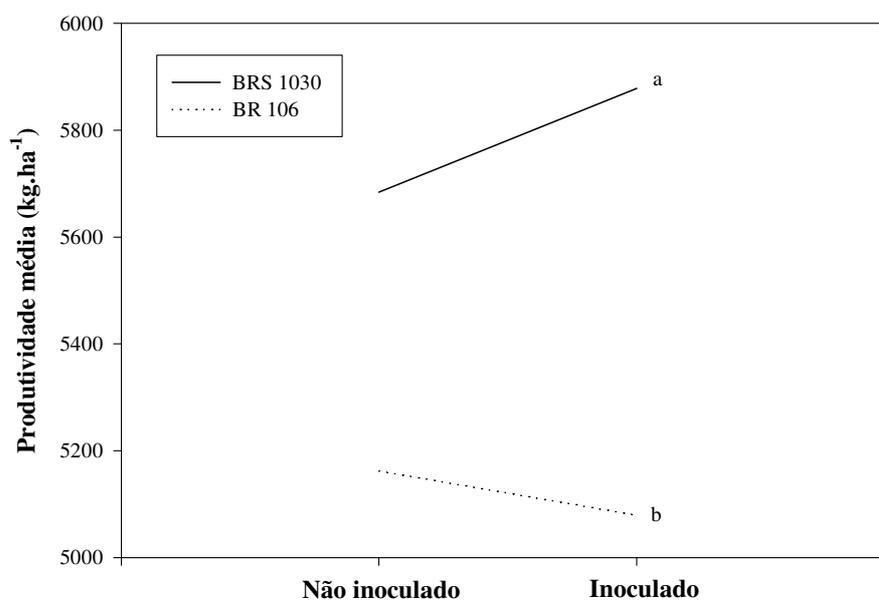


Figura 10. Valores de produtividade média de grãos de milho (kg.ha^{-1}) sob inoculação ou não da bactéria BR11417. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Esta interação indica que o híbrido testado responde melhor a inoculação do que a variedade. O genótipo da planta afeta a exsudação radicular, sustentando comunidades

microbianas diferentes dentro de espécies vegetais (GU & MAZZOLA, 2001). Portanto, o genótipo da planta é o fator chave para obtenção dos benefícios propiciados por bactérias diazotróficas endofíticas (REIS et al., 2000).

Em vários trabalhos são discutidas as diferenças entre os efeitos da inoculação em genótipos de plantas na contribuição da FBN, ou na dinâmica populacional (GARCÍA DE SALAMONE & DOBEREINER, 1996; WEBER, et al., 2000). Elbeltagy e colaboradores (2001) em estudo realizado sobre a colonização endofítica de plantas de arroz pela bactéria diazotrófica *Herbaspirillum* spp., registraram populações significativamente maiores colonizando as espécies selvagens de arroz, em relação as variedades cultivadas. A manipulação de exsudatos, pela escolha adequada de cultivares favoreceriam o isolado introduzido (STURZ & NOWAK, 2000). Reis e colaboradores (2000) relataram que em muitos casos, a ausência de resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas tem sido atribuída ao uso de linhagens inadequadas.

Na figura 11 consta o comportamento dos genótipos de milho nas safras e safrinhas de três tipos de solos.

Houve interação entre os fatores tipo de solo, genótipo e época (Figura 11). No PHda ocorreram as menores produtividades de grãos, enquanto que no LVd1 as maiores produtividades da safra. No PHda os genótipos pesaram mais na estratificação dos resultados, uma vez que as linhas se agruparam em razão do genótipo. No LVd1 a época de plantio exerceu maior importância do que o genótipo, tendo em vista a distância entre as linhas referentes às safras e as referentes às safrinhas.

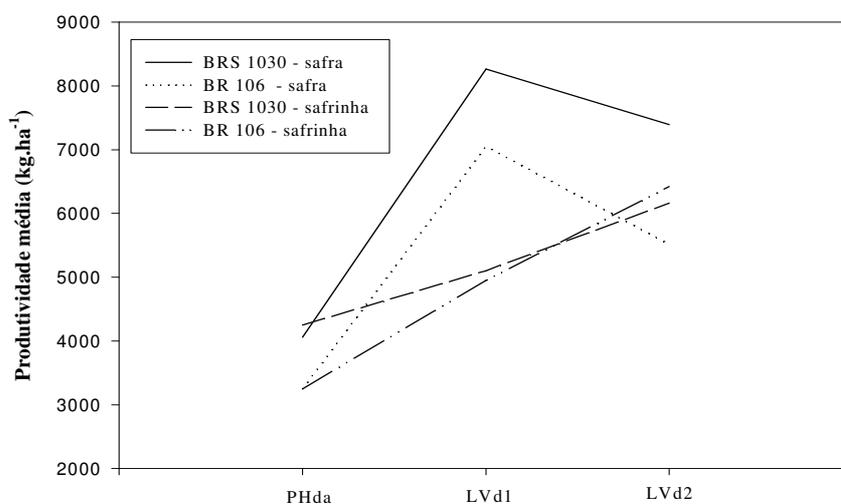


Figura 11. Valores de produtividades médias de grãos de milho (kg.ha⁻¹) cultivado no PHda, LVd1 e LVd2 nas épocas de safra e safrinha.

Em um determinado ambiente, a manifestação fenotípica é o resultado da ação do genótipo sob a influência do meio. Entretanto, quando se consideram uma série de ambientes, detecta-se, além dos efeitos genéticos e ambientais, um efeito adicional, proporcionado pela interação destes. A avaliação da interação genótipos x ambientes tem grande importância, pois, no caso de sua existência, há possibilidade de o melhor genótipo em um determinado ambiente não o ser em outro (CRUZ et al., 2004).

Os melhores rendimentos nas safrinhas foram observados no LVd2, indicando uma melhor adaptação dos genótipos às condições edafoclimáticas da região na safrinha. A

resposta da cultura na safrinha varia com o tipo de solo e com as condições climáticas (CANTARELLA e DUARTE, 1997 e CANTARELLA, 1999).

Na figura 12 podem ser observados os valores de produtividade média de milho nas safras e safrinhas em resposta a inoculação com a estirpe BR11417.

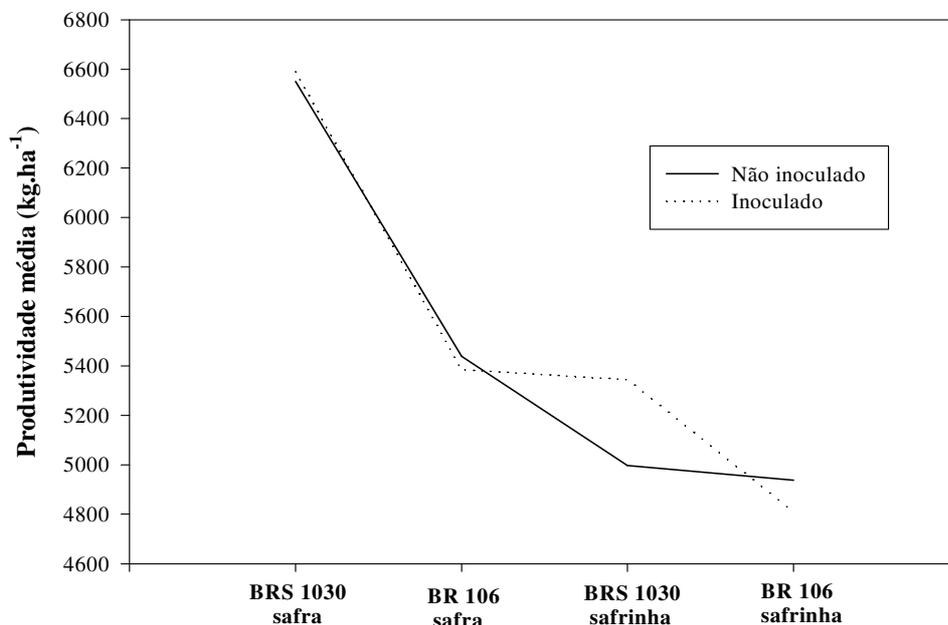


Figura 12. Valores de produtividades médias de grãos (kg.ha⁻¹) do milho BRS1030 e BR106, inoculados ou não com a estirpe BR11417, nas épocas safra e safrinha

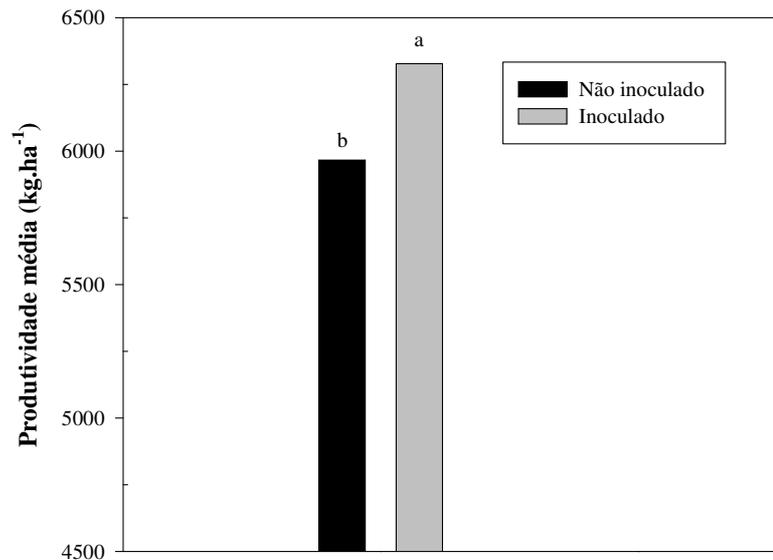
Avaliando os dois genótipos de milho em ambas as épocas de plantio ocorreu efeito da inoculação na produtividade somente para o híbrido na safrinha. Isto pode ser observado nas linhas coincidentes para todas as produtividades médias (Figura 12), exceto nos pontos que se referem ao BRS1030 na época seca.

Em leguminosas, a ocorrência de deficiências hídricas durante o ciclo de cultivo tem efeito negativo em diferentes etapas do processo de infecção, além de afetar a sobrevivência das bactérias no solo e também a atividade de FBN (KING & PURCELL, 2005; HUNGRIA & VARGAS, 2000).

No entanto, mudas de maracujazeiro amarelo associadas a fungos micorrízicos arbusculares e submetidas a estresse hídrico apresentaram maiores valores de temperatura foliar, menores taxas de transpiração que as não estressadas e de resistência difusiva, que mede o comportamento dos estômatos em resposta à perda de vapor d'água (CAVALCANTE et al., 2001).

Segundo trabalho realizado por Bashan (1991), a deficiência hídrica pode modificar, inclusive, a forma das bactérias. Em plantas de sorgo que não foram submetidas ao estresse hídrico, *Azospirillum* spp. ocorria na forma vário, enquanto nas plantas que foram submetidas ao estresse, eles ocorriam na forma cística, preferencialmente. Quando as condições de estresse foram removidas, as células bacterianas reverteram para formas vário com um concomitante crescimento da população. Aparentemente, a forma cística é a resposta da bactéria ao estresse hídrico na rizosfera.

Na figura 13 isolou-se o efeito da inoculação na safrinha para o híbrido BRS1030 já mencionado (Figura 12), para melhor visualização. Foi observado um incremento de 347 kg.ha⁻¹ do genótipo BRS1030 frente à inoculação (Figura 13) que diferiu estatisticamente, devido a interação entre os fatores inoculação, genótipo e época.



BRS 1030

Figura 13. Valores de produtividade média de grãos do milho BRS1030 (kg.ha⁻¹) inoculados ou não com a bactéria BR11417 na época safrinha. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Como já é conhecido, na safrinha ocorrem baixas precipitações e, qualquer condição desfavorável de clima afeta o peso específico do grão e, por conseguinte, o rendimento. A planta de milho caracteriza-se pelo acúmulo de reservas que, depois, serão carreadas para os grãos. Assim, fatores que concorram para a redução nos estádios vegetativos e reprodutivos e/ou, principalmente, a alteração da ótima relação período vegetativo/reprodutivo como menores precipitações, provocam a redução no peso de grãos, pois reduzem a oferta de fotoassimilados (VIEIRA JR., 1999).

As bactérias diazotróficas não beneficiam as plantas só com a fixação biológica de N₂ (DOBBELAERE et al., 2001). Outros estudos demonstraram que os efeitos positivos proporcionados por estes microrganismos são derivados de alterações morfológicas e fisiológicas nas raízes das plantas inoculadas, acarretando um incremento na absorção de água e nutrientes (OKON & VANDERLEYDEN, 1997).

A redução de fotoassimilados, comum no período da safrinha, foi minimizada nas plantas do genótipo BRS1030 quando houve a inoculação, evidenciando a maior afinidade entre a estirpe inoculada e o referido genótipo, resultando na maior adaptabilidade deste material a esta condição desfavorável.

No desdobramento dos fatores época, inoculação, genótipo e adubação nitrogenada (Figura 14), observa-se que com 40 kg de N/ha a resposta a inoculação foi ainda mais consistente.

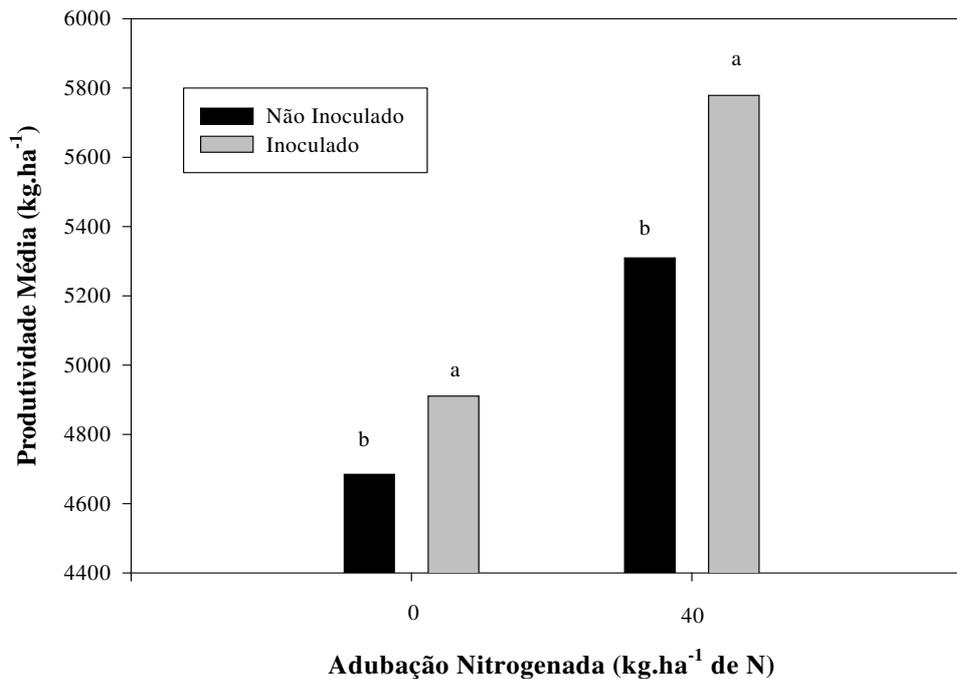


Figura 14. Valores de produtividade média (kg.ha⁻¹) de grãos do genótipo BRS1030 na época safrinha com ou sem adubação nitrogenada equivalente a 40 kg de N/ha. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Na figura 14 a inoculação do híbrido BRS1030, na safrinha, promoveu incremento na produtividade de grãos em até 470 kg.ha⁻¹ quando foi feita a adubação nitrogenada.

Esta interação da inoculação com a adubação nitrogenada indica que a associação bactéria-milho usa mais eficientemente o nitrogênio mineral aplicado ao solo, contudo, altas adubações nitrogenadas podem inibir a FBN e reduzir a população de bactérias diazotróficas (KAVADIA et al., 2008). Roesch e colaboradores (2005) observaram aumento no comprimento, na massa seca de raízes e no conteúdo de nitrogênio similar ao do controle nitrogenado quando a inoculação foi feita. Riggs e colaboradores (2001) verificaram que a inoculação de *H. seropedicae* promoveu acréscimos de produção de matéria seca de 49 a 82% quando aplicada juntamente com fertilizante nitrogenado, em comparação com 16% de aumento quando as plantas foram apenas inoculadas e não adubadas. De modo similar, Dobbelaere e colaboradores (2002) verificaram que o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* estirpe Sp 245 e *A. irakense* estirpe KBC1 foi maior quando associado às doses de N.

Em plantas de arroz, Baldani e colaboradores (1996) verificaram que a inoculação de *Herbaspirillum* na presença de pequenas doses de N mostrou maior eficiência para o sistema planta/bactéria quando comparada com o uso isolado da bactéria. Na produção de grãos de trigo inoculados com a estirpe JA04 de *A. brasilense* na presença de 15 kg ha⁻¹ de N foi estatisticamente igual ao tratamento controle que recebeu a adubação equivalente a 45 kg ha⁻¹ de N em cobertura (DIDONET et al., 1996), evidenciando a resposta a inoculação quando é feita a adubação nitrogenada. Bashan e Levanony (1990) observaram que os maiores aumentos de produção foram obtidos com a aplicação de N em níveis subótimos para a máxima produção.

Tem sido sugerido que a interação genótipo da planta e ambiente exerça papel decisivo sobre a eficiência do diazotrofo (GYANESHWAR et al., 2002), mas as razões para a variabilidade de resposta da FBN em milho ainda não foram elucidadas e estes resultados

confirmam o papel decisivo que a interação do ambiente e a planta exercem sobre a eficiência da bactéria diazotrófica.

4.2 Produtividade de Grãos de Milho Cultivados no Latossolo Amarelo Álico Distrófico

Na tabela 7 são observados os valores de produtividade de grãos de milho cultivado no LAAd em dois anos consecutivos com e sem adubação nitrogenada, inoculados e não inoculados com a estirpe BR11417.

Tabela 7. Produtividade média de grãos de milho ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) cultivados no LAAd nos anos de 2006 e 2007, sem adubação nitrogenada ou com 40 e 80 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de N, com ou sem inoculação da estirpe BR11417.

Ano	N	BRS4157		Incremento	BRS1010		Incremento	Média geral
		NI	I		NI	I		
2006	0	3114	3419	305	3646	4241	595	3605
	40	3171	3499	328	4212	3979	0	3715
	80	3215	3351	136	4748	4642	0	3989
Média 2006		3166	3423		4202	4287		3770 B
2007	0	3157	3202	45	4956	6459	1503	4444
	40	3975	3418	0	6135	6051	0	4895
	80	4056	4620	564	6775	7546	771	5750
Média 2007		3729	3747		5955	6685		5029 A
Média geral		3516 b			5282 a			4399

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si nas colunas e médias seguidas de letras minúsculas nas linhas pelo teste Scott-Knott a 10% de probabilidade. N: adubação nitrogenada; 0: sem adubação nitrogenada; 40: 40 kg de N/ha, 80: 80 kg de N/ha. BRS4157 e BRS1010: genótipos de milho. NI: Não inoculados e I: Inoculados; Incrementos: Produtividade do tratamento inoculado – a produtividade do tratamento não inoculado.

Foram observadas diferenças significativas entre os anos de cultivo. Em 2006 a produtividade média foi de $3770 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, enquanto que em 2007 a produtividade foi de mais de $5000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$.

A quantidade de água consumida por uma lavoura de milho durante o seu ciclo está em torno de 600 mm (MAGALHÃES E DURÃES, 2010). No ano de 2006, choveu em maio e junho o dobro desta quantidade. Enquanto que em 2007, as chuvas foram mais regulares (Figura 4). O plantio do milho no LAAd foi feito em abril, tanto em 2006 quanto em 2007. Isto significa que em maio e junho, quando ocorreu o excesso de chuva, a planta estava entre o estágio V6 (estádio vegetativo com 6 folhas) e o VT (estádio vegetativo de transição pro reprodutivo). Este período se caracteriza pelos estádios vegetativos da planta até o pendoamento, intervalo onde são definidos o número de fileiras de grãos e o tamanho da espiga (MAGALHÃES E DURÃES, 2010).

Durante os estádios vegetativos há maior tolerância ao excesso de chuvas. No entanto, encharcamento por períodos de tempo maior que cinco dias pode acarretar prejuízos consideráveis e irreversíveis (MAGALHÃES E DURÃES, 2006). Além disso, no pendoamento, a planta apresenta alta sensibilidade ao excesso de água o qual pode contribuir inclusive com a inviabilidade dos grãos de pólen (MAGALHÃES E DURÃES, 2010).

O híbrido BRS1010 foi o genótipo mais produtivo (Tabela 7), diferindo estatisticamente da variedade BRS4157. Isto ocorre devido ao BRS1010 ter maior heterose e menor variabilidade entre plantas e espigas e por apresentar boa sanidade (BORGES et al., 2006). Segundo Cardoso e colaboradores (2012), estudando 42 genótipos de milho, os híbridos apresentam melhor adaptação que as variedades em condições adversas.

Na figura 15 são observadas as médias de produtividade de grãos de milho inoculados ou não inoculados, cultivados no LAAd por dois anos consecutivos.

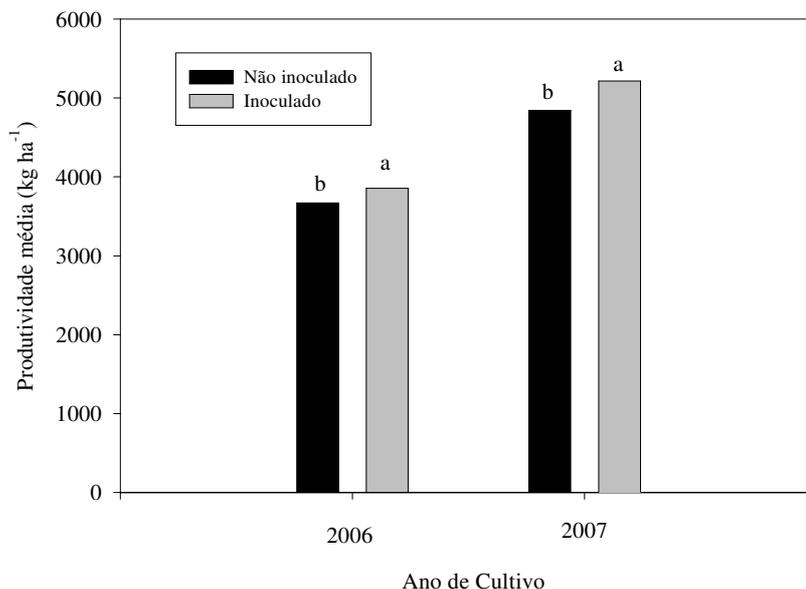


Figura 15. Valores de produtividade média (kg ha^{-1}) de grãos de milho cultivados no LAAd, com ou sem adubação nitrogenada, não inoculados e inoculados nos anos de 2006 e 2007. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Houve diferença significativa entre os tratamentos inoculados e os não inoculados (Figura 15) nos dois anos de cultivo. No entanto, no ano de 2007 ocorreram as maiores produtividades, assim como os maiores ganhos frente à inoculação (média de $374 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$). Em estudo realizado por Guimarães e colaboradores (2003) também se observou que a inoculação com esta estirpe promoveu aumento de 50% na produção de grãos de arroz, demonstrando assim o grande potencial desta bactéria.

Na figura 16 pode ser observado o comportamento dos genótipos de milho com e sem inoculação sob adubação nitrogenada.

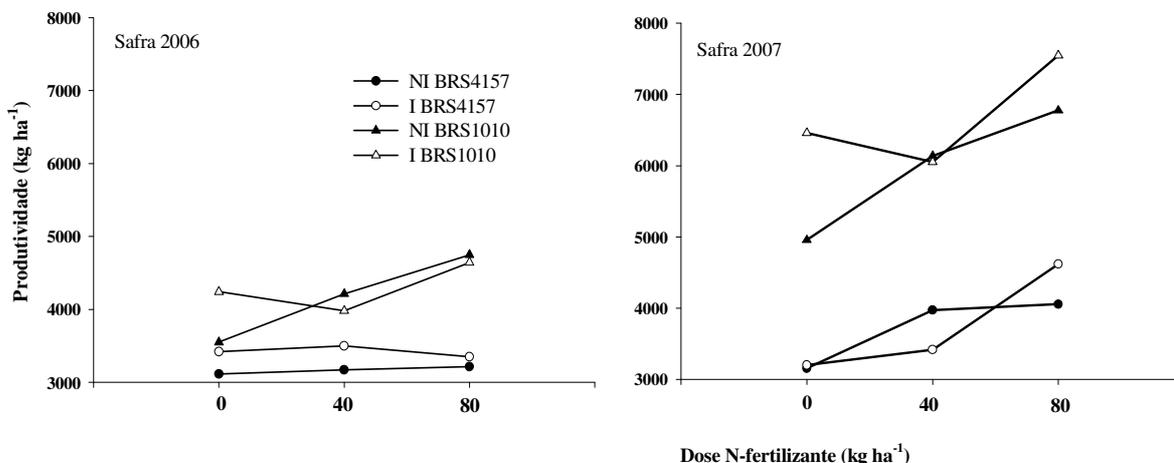


Figura 16. Médias de produtividades ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) dos genótipos BRS4157 e BRS1010 cultivados no LAAd com 0, 40 e $80 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N, não inoculados (NI) e inoculados (I) nas safras de 2006 e 2007

Para o genótipo BRS1010 a adubação teve resposta linear, ou seja, na maior dose foram observadas as maiores produtividades médias de grãos. Além disso, o híbrido respondeu a inoculação nos dois anos, sendo em 2007, o mais expressivo.

Observa-se (Figura 16) que a variedade BRS4157, em geral, não mostrou resposta à adubação nitrogenada nem à inoculação. Entretanto, com 80 kg.ha⁻¹ de N houve um ganho de produtividade do tratamento inoculado em relação ao controle. Borges e colaboradores (2006) verificaram que este genótipo tem maior adaptação à condição de restrição de N do que a do híbrido simples. Esta variedade foi formada a partir de 36 populações da América Central e Sul, adaptada a solos de baixa fertilidade natural e eficiente no uso de nitrogênio (MACHADO, 1997). Segundo Rosielle & Hamblin (1981) materiais mais eficientes na utilização de nitrogênio apresentam menor diferença de resposta produtiva em alto e baixo N.

A ausência de resposta deste genótipo a adubação nitrogenada restringiu a avaliação da contribuição da inoculação com a estirpe BR11417 para o rendimento de grãos deste genótipo, mostrando resposta da FBN pouco expressiva (ZILLI et al., 2007).

O híbrido BRS1010 mostrou resposta positiva frente à inoculação. A produtividade de grãos obtida no tratamento inoculado sem adubação nitrogenada foi significativamente igual ao tratamento com 80 kg.ha⁻¹ de N em 2006 e 2007 (Figura 16). Houve interação entre os fatores genótipo, adubação nitrogenada e ano de cultivo, sendo que o genótipo BRS1010 inoculado no ano 2007 foi, em média, 720 kg.ha⁻¹ mais produtivo do que quando não foi inoculado, principalmente quando não recebeu adubo nitrogenado. A repetição do comportamento em experimentos consecutivos confirma a eficiência da interação planta x bactéria nas condições descritas.

Okon e Vanderleyden (1997) e Campos e colaboradores (2000), na cultura do milho, obtiveram diferentes respostas quanto ao benefício da interação planta-*Azospirillum*, as quais variaram em diferentes condições de solo e de híbrido, demonstrando assim a necessidade de serem estudadas as interações.

A inoculação contribuiu para o aumento do rendimento de grãos no híbrido de milho BRS1010, mas na variedade BRS4157 este efeito não foi observado. A avaliação regionalizada de inoculantes e genótipos de milho permite indicar combinações mais adaptados àquele local.

4.3 Teor e Acúmulo de Nitrogênio em Grãos de Milho Cultivado no Planossolo Háptico Distrófico Arênico e no Latossolo Amarelo Álico Distrófico

A tabela 8 apresenta os teores de N nos grãos de milho dos genótipos BRS1030 e BR106 cultivado no PHda sob inoculação ou não, com e sem adubação nitrogenada.

Verifica-se a existência de variabilidade significativa nos teores de N entre as épocas de cultivo, sendo a safrinha com maior teor de N em relação a safra. Estes resultados divergem da maioria dos estudos onde com estresse hídrico ocorrem os menores teores de N e produtividade. Este comportamento singular pode ser explicado por um efeito de concentração associado ao estresse hídrico imposto a cultura por ocasião da não ocorrência de chuvas, já relatado em cana-de-açúcar (SHIGAKI et al., 2004) ou por alguma alteração na translocação deste nutriente na planta.

A adubação nitrogenada incrementou o percentual de N nos grãos, ajustando uma função linear crescente, como era esperado. Em 1968, Barber e Olson já haviam relatado que o N disponível nas plantas de milho é utilizado para processos de crescimento e produção. Sendo assim, geralmente, as maiores doses aumentam o conteúdo de N do grão.

Tabela 8. Teor de nitrogênio (%) nos grãos de milho dos genótipos BRS1030 e BR106 cultivado no PHda sob inoculação ou não, com ou sem adubação nitrogenada.

Época	N	BRS1030		Média	BR106		Média	Média
		NI	I	BRS1030	NI	I	BR106	Geral
Safrinha	0	1,49	1,39	1,44	1,51	1,42	1,47	1,45
	40	1,58	1,62	1,60	1,58	1,56	1,57	1,59
Média Safrinha		1,53	1,51	1,52 A	1,55	1,49	1,52 A	1,52 A
Saфра	0	1,35	1,33	1,34	1,42	1,39	1,40	1,37
	40	1,41	1,29	1,35	1,52	1,51	1,51	1,43
Média Saфра		1,38	1,31	1,34 Bb	1,47	1,45	1,46 Ba	1,40 B
Média geral		1,43 b			1,49 a			1,46

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si nas colunas e médias seguidas de letras minúsculas nas linhas pelo teste Scott-Knott a 10% de probabilidade. PHda: Planossolo Háplico Distrófico arênico em Seropédica-RJ; N: adubação nitrogenada; 0: sem adubação nitrogenada; 40: 40 kg de N/ha. BRS1030 e BR106: genótipos de milho. NI: Não inoculados e I: Inoculados.

A variedade BR106 apresentou maior teor de N do que o híbrido BRS1030. A BR106 é descrita como variedade de boa estabilidade de produção e adaptabilidade a todas as regiões brasileiras e boa performance em solos de baixa disponibilidade de nutrientes (NOCE, 2004) como Planossolo Háplico em questão. Em estudo de Silva e Oliveira e colaboradores (1999) a BR106 já havia sido apontada pela alta rusticidade.

Houve interação entre as épocas e os genótipos, sendo na safrinha verificados os maiores teores para ambos os genótipos. Segundo Sans e Santana (2011) a seca relaciona-se intimamente com a eficiência na utilização de nitrogênio, ou seja, variedades de milho tolerantes à seca podem também ser eficientes na absorção do nitrogênio. Em condições de seca, o nitrogênio disponível no solo está na forma predominante de amônia e a cultivar tolerante tem que ter mecanismo de eficiência na absorção de nitrogênio nessa forma. Provavelmente, os genótipos estudados apresentam tolerância à seca ou eficiência na utilização de nitrogênio.

Na tabela 9 são apresentados os valores de N acumulado ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) nos grãos de milho cultivado no PHda, com ou sem adubação nitrogenada, inoculados ou não com a estirpe BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae*.

Tabela 9. Valores de N acumulado ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) nos grãos de milho cultivado no PHda, com ou sem adubação nitrogenada, inoculados ou não com a estirpe BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae*.

Época	N	BRS1030		Média	BR106		Média	Média
		NI	I	BRS1030	NI	I	BR106	Geral
Safrinha	0	5.827	5.265	5.546	4.741	4.090	4.415	4.981
	40	6.983	8.150	7.567	5.505	5.506	5.505	6.536
Média Safrinha		6.405	6.708	6.556 A	5.123	4.798	4.960	5.758
Saфра	0	4.939	5.057	4.998	4.721	5.229	4.975	4.987
	40	6.094	5.777	5.935	5.745	5.732	5.738	5.837
Média Saфра		5.516	5.417	5.467 B	5.233	5.481	5.357	5.412
Média geral		6.012 a			5.159 b			5.585

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si nas colunas e médias seguidas de letras minúsculas nas linhas pelo teste Scott-Knott a 10% de probabilidade. PHda: Planossolo Háplico Distrófico arênico em Seropédica-RJ; N: adubação nitrogenada; 0: sem adubação nitrogenada; 40: 40 kg de N/ha. BRS1030 e BR106: genótipos de milho. NI: Não inoculados e I: Inoculados.

No que diz respeito ao nitrogênio total acumulado nos grãos de milho (Tabela 9), este acompanhou o rendimento de grãos, sendo o híbrido BRS1030 superior a variedade BR106 em acumular nitrogênio.

Assim como observado para produtividade média e teor de N, para a variável acúmulo de N, o modelo linear foi o que melhor se ajustou ao fator adubação nitrogenada, demonstrando a importância deste nutriente no melhor desempenho da cultura.

No entanto, diferente do que foi observado para teor de N, o híbrido BRS1030 acumulou mais N na safrinha do que na safra, havendo a interação entre a época e o genótipo. Este resultado reflete a melhor adaptação deste genótipo em acumular N sob condições desfavoráveis.

Foi observada ainda a interação tripla entre as fontes de variação época, nitrogênio e inoculação, sendo observado que os grãos de milho acumularam mais N na safrinha em comparação com a safra, quando as plantas foram adubadas com 40 kg de N/ha e inoculadas.

Na tabela 10 são apresentados os valores de teor de N (%) nos grãos de milho cultivado no LAAd, com ou sem adubação nitrogenada, inoculados ou não com a estirpe BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae*.

Tabela 10. Teor de nitrogênio (%) nos grãos de milho dos genótipos BRS4157 e BRS1010 cultivados no LAAd sob inoculação e não inoculação, com e sem adubação nitrogenada.

Ano	N	BRS4157		Média	BRS1010		Média	Média Geral
		NI	I		NI	I		
2006	0	1,71	1,94	1,83	1,50	1,59	1,55	1,69
	40	1,82	1,93	1,88	1,61	1,60	1,61	1,74
	80	1,90	1,84	1,87	1,68	1,55	1,62	1,74
Média 2006		1,81	1,90	1,86 Aa	1,60	1,58	1,59 Ab	1,72a
2007	0	1,58	1,62	1,60	1,53	1,47	1,50	1,55
	40	1,65	1,51	1,58	1,44	1,34	1,39	1,48
	80	1,59	1,59	1,59	1,41	1,36	1,38	1,49
Média 2007		1,60	1,58	1,59 Ba	1,46	1,39	1,42 Bb	1,51B
Média geral		1,72a			1,51b			1,62

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si nas colunas e médias seguidas de letras minúsculas nas linhas pelo teste Scott-Knott a 10% de probabilidade. LAAd: Latossolo Amarelo Álico distrófico em Boa Vista-RR; N: adubação nitrogenada; 0: sem adubação nitrogenada; 40: 40 kg de N/ha; 80: 80 kg de N/ha. BRS4157 e BRS1010: genótipos de milho. NI: Não inoculados e I: Inoculados.

Para o teor de N no Latossolo Amarelo foram observadas diferenças significativas entre anos de cultivo, genótipo e interações entre: ano e genótipo; ano e adubação nitrogenada; genótipo e inoculação; genótipo e inoculação e ano.

Diferente do que ocorreu para a variável produtividade, o teor de N foi maior no ano de 2006 do que em 2007. O reduzido teor de N nos grãos tem sido algumas vezes associado com maiores produtividades de grãos sob deficiência de N (MEDICE, 2003). Contudo, Latiffe e colaboradores (1994) e Machado (1997) indicaram que o elevado teor de N nos grãos foi importante para a produtividade do milho, em solos pobres em N.

Entre os anos estudados, foi observado, sobretudo, o excesso de chuvas no período vegetativo e início do pendoamento das plantas de milho. Isto pode ser caracterizado como uma situação de estresse. Segundo Singh e colaboradores (1998) sob estresse a maior capacidade produtiva do germoplasma é frequentemente atribuída a sua composição genética para absorção e utilização de N do solo ou de fertilizantes, sugerindo que os genótipos estudados apresentam eficiência na utilização de N.

A variedade BRS4157 apresentou maior percentual de N do que o BRS1010. Esta variedade foi selecionada em ambientes com baixa fertilidade natural e com baixo nível de nitrogênio (MACHADO e MAGALHÃES, 1995). Segundo Borges e colaboradores (2006) esta variedade mostrou adaptação à condição de restrição de nitrogênio por sua maior capacidade de acumular NO_3^- nas folhas no primeiro estágio de desenvolvimento vegetativo e remobilizá-lo no segundo estágio, apresentando um maior teor de N-amino nas folhas e bainhas do que o híbrido simples BRS1010, descrito como de alto potencial de produção, quando sob menor dose de nitrogênio. Em Oliveira e colaboradores (2011) a variedade BRS4157 apresentou maior teor de N no grão do que o híbrido BRS1010. No mesmo estudo verificou-se o maior acúmulo de N na parte reprodutiva para o híbrido em comparação com a variedade no tratamento com NO_3^- , demonstrando o comportamento da BRS1010, que tem melhor resposta à adubação química.

Na interação dos genótipos com os anos de cultivo, observa-se que para o teor de N nos grãos, 2006 foi superior ao ano 2007 para ambos os genótipos, assim como a variedade foi superior ao híbrido em ambos os anos.

Houve interação entre ano e adubação nitrogenada e entre ano e a inoculação, sendo que no ano de 2006 foi sempre observado maior teor de N nos grãos do que no ano de 2007.

Foi observada a interação entre genótipo e inoculação, sendo que a variedade apresentou maior teor de N que o híbrido quando inoculada ou não.

Verificou-se ainda a interação tripla entre os fatores genótipo, inoculação e adubação nitrogenada. Nas combinações ano 2006 com 80 kg de N/ha e ano 2007 com 40 kg de N/ha os tratamentos não inoculados apresentaram maiores teores de N do que os inoculados, contudo na combinação ano 2006, sem adubação nitrogenada, o teor de N dos grãos, cujas plantas foram inoculadas, foi superior aos grãos de plantas não inoculadas.

Na tabela 11 são apresentados os valores de N acumulado ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) nos grãos de milho cultivado no LAAd, com ou sem adubação nitrogenada, inoculados ou não com a estirpe BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae*.

Tabela 11. Valores de N acumulado ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) nos grãos de milho cultivado no LAAd, com e sem adubação nitrogenada, inoculados ou não com a estirpe BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae*.

Ano	N	BRS4157		Média	BRS1010		Média	Média Geral
		NI	I		NI	I		
2006	0	5.297 b	6.644 a	5.971	5.451	6.770	6.111	6.041
	40	5.793	6.754	6.273	6.786	6.338	6.562	6.418
	80	6.098	6.156	6.127	8.005	7.187	7.596	6.861
Média 2006		5.729	6.518	6.124	6.747	6.765	6.756	6.440 B
2007	0	5.004	5.200	5.102	7.621	9.572	8.597	6.849
	40	6.524	5.121	5.823	8.802	8.103	8.453	7.138
	80	6.482	7.348	6.915	9.535	10.312	9.924	8.419
Média 2007		6.003	5.890	5.946 b	8.653	9.329	8.991 a	7.469 A
Média geral		6.035 b			7.874 a			6.954

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si nas colunas e médias seguidas de letras minúsculas nas linhas pelo teste Scott-Knott a 10% de probabilidade. LAAd: Latossolo Amarelo Álico distrófico em Boa Vista-RR; N: adubação nitrogenada; 0: sem adubação nitrogenada; 40: 40 kg de N/ha; 80: 80 kg de N/ha. BRS4157 e BRS1010: genótipos de milho. NI: Não inoculados e I: Inoculados

Foram observadas diferenças significativas entre os anos de cultivo. No ano de 2007 foram acumulados 7.469 kg de N/ha nos grãos de milho, enquanto que no ano de 2006 foram

acumulados 6.440 kg de N/ha. O híbrido, mais uma vez, demonstrou ter melhor desempenho que a variedade, apresentando maior acúmulo de N.

Para o fator adubação nitrogenada, o modelo linear foi o que melhor se ajustou, o que indica mais uma vez que, na maior dose de fertilizante nitrogenado, houve o maior acúmulo de N nos grãos de milho.

Houve interação entre o ano de cultivo e o genótipo, sugerindo comportamento diferenciado entre os anos e os genótipos. Em 2007 pode ser observado maior acúmulo de N no híbrido BRS1010 do que em 2006.

4.4 Quantificação da Contribuição da FBN nas Plantas de Milho Cultivadas no Planossolo Háptico Distrófico arênico

A quantificação da FBN foi avaliada em 4 dos 6 experimentos conduzidos no PHda, onde foram verificadas diferenças significativas nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre as plantas de milho inoculadas e não inoculadas (Tabela 12) com plantas referência, e entre as épocas de plantio.

Tabela 12. Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas de milho cultivadas no PHda nas safras e safrinhas de 2 anos consecutivos.

$\delta^{15}\text{N}$		Não inoculado				Inoculado				Média Global
Época	Genótipo	PM	1	2	3	PM	1	2	3	
Saфра	BR106	7,2	8,1	8,9	8,2	6,1	7,7	7,7	7,8	7,9 B
	BRS1030	6,8	8,9	9,2	7,5	6,3	8,3	9,1	7,9	
	Média	7,0 Ba	8,5 b	9,0 b	7,9 a	6,2 Ba	8,0b	8,4 b	7,9 b	
Safrinha	BR106	5,8	7,0	7,5	7,2	4,6	6,0	7,2	6,4	6,5 A
	BRS1030	5,8	6,7	7,6	6,7	5,0	7,0	7,5	6,8	
	Média	5,8 Aa	6,8 b	7,5 b	6,9 b	4,8 Aa	6,5 b	7,4 b	6,6 b	
Média Global		6,4 b				5,2 a				

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si nas colunas e médias seguidas de letras minúsculas nas linhas dentro do fator inoculação. Scott-knott a 1% de probabilidade. $\delta^{15}\text{N}$ = valores médios de delta de ^{15}N ; E= épocas; G= genótipos de milho; PM= plantas de milho; PR= plantas referência (1 - *Portulaca oleracea* – beldroega, 2 - *Eleusine indica* - capim pé-de-galinha e 3 - *Richardia brasiliensis* – ricardia).

Na tabela 12 os genótipos BRS1030 e BR106 não diferiram estatisticamente na análise conjunta, contudo os valores da abundância natural de ^{15}N das plantas referência (PR) foram maiores do que os observados nas plantas de milho (PM), possibilitando a aplicação da técnica de $\delta^{15}\text{N}$ para a estimativa da contribuição da FBN para o milho (Tabela 13), como estipulado por Shearer e Kohl, (1986).

As diferenças entre os valores de delta ocorreram independentemente da inoculação, indicando a existência de outros diazotrofos presentes, hábeis em disponibilizar N para as plantas de milho. Entretanto foram observadas diferenças altamente significativas entre as plantas de milho inoculadas e as não inoculadas (média global comparada na última linha), demonstrando a capacidade de estabelecimento e competitividade da estirpe inoculada.

Esses resultados confirmam o potencial para FBN da cultura do milho concordando com trabalhos de outros autores que afirmam que a fixação biológica de nitrogênio é responsável por boa parte da necessidade nitrogenada da cultura (DOBBELAERE et al., 2002; RIGGS et al., 2001).

As plantas inoculadas tiveram valores de deltas menores na safrinha (Tabela 12), sugerindo que a menor disponibilidade de nutrientes/água no solo estimula o processo simbiótico, além do aumento da superfície de contato das raízes pela produção de

fitohormônios. Segundo Sylvia (1998) a capacidade competitiva das bactérias diazotróficas com outras é alta quando as condições são de baixa disponibilidade de nitrogênio no ambiente. Na safrinha já tinham sido observados os maiores teores de nitrogênio em milho, que podem ser em decorrência desta associação, juntamente a composição genética dos cultivares.

A estimativa da contribuição da FBN para as plantas de milho, neste estudo, foi realizada com o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ da espécie de planta testemunha (Tabela 13).

Tabela 13. Contribuição do percentual da fixação biológica de nitrogênio (%FBN) estimado pela técnica de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), em dois genótipos de milho cultivado no PHda, na safra e nas safrinhas de dois anos consecutivos.

Inoculação	Epoca	%FBN* dos genótipos de milho		Média geral
		BRS1030	BR106	
NI	Safra	14,52	19,80	17,16
	Safrinha	17,94	18,55	18,25
Média NI		16,23	19,17	17,70 b
I	Safra	24,22	22,43	23,32
	Safrinha	31,84	25,81	28,82
Média I		28,03	24,12	26,07 a
Média geral		22,13 A	21,65 A	21,89

Médias seguidas de letras minúsculas diferem entre si nas colunas e médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas a 10% de probabilidade pelo teste Scott-knott. NI: tratamentos não inoculados, I: tratamentos inoculados. * Para o cálculo da FBN na safra foi utilizada a média (8,1) dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrados em três espécies não fixadoras: *Portulaca oleracea* - beldroega (8,0‰); *Eleusine indica* - capim pé-de-galinha (8,4‰) e *Richardia brasiliensis* - ricardia (7,9‰). Para o cálculo da FBN na safrinha foi utilizado a média (6,8) dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrados em três espécies não fixadoras: *Portulaca oleracea* - beldroega (6,5‰); *Eleusine indica* - capim pé-de-galinha (7,4‰) e *Richardia brasiliensis* - ricardia (6,6‰).

Não houve diferença na contribuição da FBN entre os genótipos de milho, nem entre as épocas, embora tenham sido observadas diferenças entre genótipos de milho e épocas nas produtividades médias de grãos e N acumulado nos mesmos experimentos (item 4.1).

Mendonça e colaboradores (2006) também observaram em genótipos de milho variação quanto à produção de grãos, matéria seca total e acúmulo de N, mas não verificaram diferenças no enriquecimento de ^{15}N . Já García de Salamone e colaboradores (1996) verificaram contribuição da FBN em dois dos quatro genótipos de milho testados.

Provavelmente, não foi observada diferença entre os genótipos devido a produção e o acúmulo de N terem sido consequência, principalmente, da variabilidade genotípica das plantas de milho para extrair N do solo e não da inoculação de bactérias.

Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos inoculados e não inoculados na contribuição da FBN. Contudo, houve contribuição da FBN tanto para os tratamentos inoculados (26%), quanto para os não inoculados (17%), evidenciando a presença de outros organismos fixadores de nitrogênio, além dos inoculados nas plantas de milho. Não é possível estudar apenas o microrganismo isolado, sem levar em conta a complexidade do habitat em que deverá se estabelecer. Um dos aspectos mais importantes de uma rizosfera estabelecida é a presença de uma comunidade microbiana complexa e substratos orgânicos liberados das raízes (ATKINSON & WATSON, 2000).

Montañez e colaboradores (2009) observaram uma variação de 12 a 33% de FBN em uma série de cultivares comerciais de milho do Uruguai pelo método de diluição de isótopos- ^{15}N . Riggs e colaboradores (2001) observaram incrementos de até 82% no rendimento de milho em casa de vegetação, com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* na presença de N fertilizante, mas não mediram a contribuição da FBN.

Muitos estudos, em vasos e no campo, têm mostrado aumento no rendimento de grãos e acúmulo de matéria seca em milho, como resultado da inoculação de diferentes estirpes de *Azospirillum* spp. (BODDEY et al., 2000) mostrando aumentos de aproximadamente 25% (KENNEDY et al., 2004). Segundo Dobbelaere e colaboradores (2001) a contribuição das bactérias é maior quando a planta recebe dose de fertilizante nitrogenado. Entretanto para quantificação da FBN através de técnicas isotópicas (^{15}N) as entradas de nitrogênio no sistema solo-planta devem ser desprezíveis (RESENDE et al., 2003).

Tendo em vista os resultados da variável produtividade no híbrido BRS1030 (Figura 14), onde a inoculação teve resposta mais consistente com adubação nitrogenada é provável que a contribuição da FBN seria ainda maior do que os 28% observados.

A utilização do potencial microbiano para fixação biológica de N no milho no Brasil é incipiente, dada a abordagem simplificada desse tema. A maioria dos estudos brasileiros referentes a este assunto aborda apenas o isolamento de bactérias diazotróficas de plantas de milho e testes bioquímicos em vasos e laboratório (QUADROS et al. 2006; ROESCH et al. 2007), faltando a avaliação de isolados a campo para demonstrar a interação planta-microorganismo.

Os resultados obtidos nestes experimentos demonstram que a inoculação, com a estirpe BR11417 pode ser rentável ao agricultor, tendo em vista que contribuiu, em média, com 26% do N utilizado no desenvolvimento da cultura de milho, mesmo na presença de outras bactérias.

Por efeito da interação genótipo-ambiente, muitas vezes, uma variedade superior em determinadas condições ambientais pode não manter esta superioridade em outro ambiente. Assim, o estudo pormenorizado do comportamento de uma variedade, ante as variações ambientais, tem sido de grande importância, por permitir a recomendação e utilização mais eficiente do material genético disponível.

5 CONCLUSÕES

Foram observadas diferenças significativas entre os locais onde foram implantados os experimentos. No PHda a produtividade média de grãos foi equivalente a 3.808 kg.ha^{-1} , enquanto que nos LVd1e2 a média foi de, aproximadamente, 6.350 kg.ha^{-1} .

No período de safrinha, os genótipos apresentaram valores médios de produtividade estatisticamente inferiores ao período de safra.

O híbrido BRS1030 apresentou melhor rendimento (5.830 kg.ha^{-1}) em comparação com a variedade BR106 (5.173 kg.ha^{-1}) nos três solos estudados.

Para o fator adubação nitrogenada o modelo linear foi o que melhor se ajustou.

Houve interação entre os tipos de solo e as épocas de cultivo, mas a ordem dos locais se manteve, ou seja, em todos os solos, os genótipos de milho tiveram melhor performance na safra e pior na safrinha.

Houve interação entre os genótipos e as épocas de cultivo, sendo que o híbrido BRS1030 foi o genótipo mais produtivo, com produtividade média de grãos 6% maior na safrinha e 21% maior na safra.

Houve interação entre os fatores genótipo e inoculação, sendo o comportamento da variedade diferente estatisticamente do híbrido por ocasião da inoculação. Enquanto no BR106 a inoculação reduziu a produtividade, no híbrido BRS1030 a inoculação incrementou a produtividade de grãos.

Houve interação entre os fatores tipo de solo, genótipo e época. No PHda ocorreram as menores produtividades de grãos, enquanto que no LVd1 as maiores produtividades da safra.

A inoculação do híbrido BRS1030, na safrinha, promoveu incremento na produtividade de grãos em até 470 kg.ha^{-1} quando foi feita a adubação nitrogenada.

No LAAd foram observadas diferenças significativas entre os anos de cultivo. Em 2006 a produtividade média foi de 3770 kg.ha^{-1} , enquanto que em 2007 a produtividade foi de mais de 5000 kg.ha^{-1} .

Houve diferença significativa entre os tratamentos inoculados e os não inoculados nos dois anos de cultivo. No entanto, no ano de 2007 ocorreram as maiores produtividades, assim como os maiores ganhos frente à inoculação (média de 374 kg.ha^{-1}).

Para o genótipo BRS1010 a adubação teve resposta linear, ou seja, na maior dose foram observadas as maiores produtividades médias de grãos. Além disso, o híbrido respondeu a inoculação nos dois anos, sendo em 2007, o mais expressivo.

Verifica-se a existência de variabilidade significativa nos teores de N entre as épocas de cultivo, tendo a safrinha maior teor de N em relação a safra.

A adubação nitrogenada incrementou o percentual de N nos grãos, ajustando uma função linear crescente.

A variedade BR106 apresentou maior teor de N do que o híbrido BRS1030.

Houve interação entre as épocas e os genótipos, sendo na safrinha verificados os maiores teores para ambos os genótipos.

No que diz respeito ao nitrogênio total acumulado nos grãos de milho, este acompanhou o rendimento de grãos, sendo o híbrido BRS1030 superior a variedade BR106 em acumular nitrogênio.

Assim como observado para produtividade média e teor de N, para a variável acúmulo de N, o modelo linear foi o que melhor se ajustou ao fator adubação nitrogenada

No entanto, diferente do que foi observado para teor de N, o híbrido BRS1030 acumulou mais N na safrinha do que na safra, havendo a interação entre a época e o genótipo.

Foi observada ainda a interação tripla entre as fontes de variação época, nitrogênio e inoculação, sendo observado que os grãos de milho acumularam mais N na safrinha em comparação com a safra, quando as plantas foram adubadas com 40 kg de N/ha e inoculadas.

Diferente do que ocorreu para a variável produtividade, o teor de N foi maior no ano de 2006 do que em 2007.

A variedade BRS4157 apresentou maior percentual de N do que o BRS1010.

Na interação dos genótipos com os anos de cultivo, observa-se que para o teor de N nos grãos, 2006 foi superior ao ano 2007 para ambos os genótipos, assim como o genótipo BRS4157 foi superior ao BRS1010 em ambos os anos.

Houve interação entre ano e adubação nitrogenada e entre ano e a inoculação, sendo que no ano de 2006 foi sempre observado maior teor de N nos grãos do que no ano de 2007.

Foi observada a interação entre genótipo e inoculação, sendo que a variedade apresentou maior teor de N que o híbrido quando inoculada ou não.

Verificou-se interação tripla entre os fatores genótipo, inoculação e adubação nitrogenada. Nas combinações ano 2006 com 80 kg de N/ha e ano 2007 com 40 kg de N/ha os tratamentos não inoculados apresentaram maiores teores de N do que os inoculados, contudo na combinação ano 2006 sem adubação nitrogenada o teor de N dos grãos cujas plantas foram inoculadas foi superior aos grãos de plantas não inoculadas.

Foram observadas diferenças significativas entre os anos de cultivo. No ano de 2007 foram acumulados 7.469 kg de N/ha nos grãos de milho, enquanto que no ano de 2006 foram acumulados 6.440 kg de N/ha.

O híbrido, mais uma vez, demonstrou ter melhor desempenho que a variedade, apresentando maior acúmulo de N.

Para o fator adubação nitrogenada, o modelo linear foi o que melhor se ajustou.

Houve interação entre o ano de cultivo e o genótipo, sugerindo comportamento diferenciado entre os anos e os genótipos. Em 2007 pode ser observado maior acúmulo de N no híbrido BRS1010 do que em 2006.

Os genótipos BRS1030 e BR106 não diferiram estatisticamente na análise conjunta, contudo os valores da abundância natural de ^{15}N das plantas referência foram maiores do que os observados nas plantas de milho.

Foram observadas diferenças altamente significativas entre as plantas de milho inoculadas e as não inoculadas

As plantas inoculadas tiveram valores de deltas menores na safrinha

Não houve diferença na contribuição da FBN entre os genótipos de milho, nem entre as épocas.

Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos inoculados e não inoculados na contribuição da FBN

A inoculação, com a estirpe BR11417 contribuiu em média, com 26% do N necessário ao desenvolvimento da cultura de milho.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos devem ser realizados para avaliar a viabilidade de aplicação do inoculante recomendado em outros genótipos de milho. Deve-se destacar que as considerações mencionadas acima são derivadas da experiência nos solos Planossolo Háptico Distrófico arênico, Latossolo Vermelho Distrófico e Latossolo Amarelo Distrófico, sendo que qualquer extrapolação para outras condições edafoclimáticas deve ser previamente avaliada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, D.B.; ZUBERER, D.A. $^{15}\text{N}_2$ fixation by bacteria associated with maize roots at a low partial O_2 pressure. Applied and Environmental Microbiology n. 55, p. 1748–1753, 1989.
- ALFONSI, R.R.; VICTORIA FILHO, R.; SENTELHAS, P.C. Épocas de semeadura para a cultura do milho no Estado de SP, baseadas na probabilidade de atendimento hídrico. Revista Brasileira de Agrometeorologia, Santa Maria, n. 5, p. 43-40, 1997.
- ALMEIDA, D.L.; SANTOS, G.A.; DE-POLLI, H; CUNHA, L.H.; FREIRE, L.R.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; PEREIRA, N.N.C.; EIRA, P.A.; BLOISE, R.M.; SALEK, R.C. Manual de adubação para o Estado do Rio de Janeiro. Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1988. 179 p. (Coleção Universidade Rural. Ciências Agrárias, 2). Coordenador HELVÉCIO DE-POLLI.
- ALVES, G.C. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2007.
- AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J. & AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. Revista Brasileira Ciência do Solo, n. 26, p. 241-248, 2002.
- ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R. & LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). Plant and Soil, v. 204, p. 57-67, 1998.
- ARAÚJO, P.M.DE; NASS, L.L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. Scientia Agrícola, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.
- ATKINSON, D.C. & WATSON, A. The beneficial rhizosphere: a dynamic entity. Applied Soil Ecology, v. 15, p. 99-104, 2000.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of “*Pseudomonas*” *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. International Journal Systematic Bacteriology, v. 36, p. 86–93, 1986.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DOBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. In Brazil. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v. 4, p. 37-40, 1987.
- BALDANI, V. Protocolo para Análise da Qualidade e da Eficiência Agronômica de Inoculantes, Estirpes e outras Tecnologias Relacionadas ao Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio em Plantas não Leguminosas In: REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIANOS DE INTERESSE AGRÍCOLA (RELARE), 13, 2006,

- Londrina. Anais... Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 124-142. (Documentos/Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n. 290). Organizado por Rubens José Campo, Mariângela Hungria.
- BARBER, D.A.; OLSON, R.A. Fertilizer use on corn. In: NELSON, L.B., McVICKAR, M.H.; MUNSON, R.D.; SEATZ, L.F.; TISDALE, S.L.; WHITE, W.C. eds., Changing patterns in fertilizer. Madison, Wis.: Soil Science Society of America, p. 168-170, 1968.
- BARKA, E.A.; BELARBI, A.; HACHET, C.; NOWAK, J. & AUDRAN, J.C. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultures with plant growthpromoting rhizobacteria. FEMS Microbiology Letters, v. 186, p. 91-95, 2000.
- BASHAN, Y. Air-bone transmittion of the rhizosphere bacterium *Azospirillum*. FEMS Microbiology Ecology v. 22, p. 257-269, 1991.
- BASHAN, Y., HOLGUIN, G. AND DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and enviromental advances (1997 - 2003). Canadian Journal of Microbiology v. 50, p. 521 – 577, 2004.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Canadian Journal Microbiology, v. 36, n. 9, p. 591-608, 1990.
- BERGAMASCHI, H.; Dalmago, G.A.; BERGONCI, J.I.; BIANCHI, C.A.M.; MÜLLER, A.G.; COMIRAN, F.; HECKLER, B.M.M. Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 39, n. 9, p. 831-839, 2004.
- BERGONCI, J.I.; BERGAMASCHI, H. Ecofisiologia do milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24, 2002, Florianópolis. Anais. Florianópolis: Embrapa Milho e Sorgo; Epagri, 2002. CD-ROM.
- BODDEY R.M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key to energetically viable biofuel production. Critical Reviews in Plant Science, v. 14, n. 3, p. 263-279, 1995.
- BODDEY R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. CRC Critical Reviews in Plant Sciences, n. 6, p. 209-266, 1987.
- BODDEY, R.M.; SILVA, G.; REIS, V.M.; ALVES, B.J.R. AND URQUIAGA, S. Assessment of bacterial nitrogen fixation in grass species. In: TRIPLET E (Ed), Prokariotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process. Wymondham, UK: Horizon Scientific, p. 705-726, 2000.
- BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. Australian Journal of Plant Physiology, Melbourne, v. 28, p. 889-895, 2001.
- BORGES, E.A.; FERNADES, M.S.; LOSS, A.; SILVA, E.E. DA E SOUZA, S.R. DE. Acúmulo e remobilização de nitrogênio em variedades de milho. Revista Caatinga (Mossoró, Brasil), v. 19, n. 3, p. 278-286, 2006.
- BRUNINI, O. Probabilidade de cultivo do milho safrinha no Estado de São Paulo. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO SAFRINHA, 4, 1997, Assis. Resumos... Campinas: IAC/ Centro de Desenvolvimento Agropecuário do Médio Vale do Paranapanema, p. 37-53, 1997.
- CAMPOS, B.C.;THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante “Graminante” na cultura de milho. Ciência Rural, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 713-715, 2000.
- CANTARELLA, H. Adubação do milho “safrinha”. In: “SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO SAFRINHA”, 5., 1999, Barretos. Curso para agricultores. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 15-24, 1999.

- CANTARELLA, H., DUARTE, A.P. Tabela de recomendação de adubação NPK para milho safrinha no Estado de São Paulo. In: "SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO SAFRINHA", 4., 1997, Assis. *Anais...* Campinas: CATI/IAC/ IEA, p.65-70, 1997.
- CARDOSO, M.J.; CARVALHO, H.W.L.; ROCHA, L.M.P.; PACHECO, C.A.P.; GUIMARÃES, L.J.M.; GUIMARÃES, P.E.O.; PARENTONY, S.N.; OLIVEIRA, I.R. Identificação de cultivares de milho com base na análise de estabilidade fenotípica no Meio-Norte brasileiro *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 2, p. 346-353, 2012.
- CARLONE, M.R. AND RUSELL, W.A. Response to plant densities and nitrogen level for four maize cultivars. *Crop Science*, v. 27, n. 3, p. 165-470, 1987.
- CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; SANTOS, V.F. Respostas fisiológicas em mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims. F. *flavicarpa* Deg.) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e submetidas a estresse hídrico. *Acta Botanica Brasilica*, v. 15, n. 3, p. 379-390, 2001.
- CAVALLET, L.E.; PESSOA, A.C. DOS S.; JAIME JOSÉ HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R. & CHARLES FABIANO 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.
- CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G. & HOLL, F.G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Forest Ecology and Management*, v. 133, p. 81-88, 2000.
- CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. Diazotrophic endophytes associated with maize. In: Triplett EW (ed) *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process*. Horizon Scientific Press, p. 779-792, 2000.
- COELHO A.M; FRANÇA, G.E. DE Seja o doutor do seu milho: Nutrição e Adubação. 2 ed. aum. *Informações Agronômicas*, Piracicaba, n. 71, p. 1-9, set. 1995. *Arquivos do Agrônomo*, Piracicaba, n. 2, p. 1-9, 1995.
- COSTA, F. Fertilizantes no topo In: *Revista Dinheiro Rural*, Ed. nº 82. Agosto, 2011.
- COSTA, J.G.DA; CAMPOS, I.S. Recomendações básicas para a produção de sementes de milho no nível da pequena propriedade rural. *Instruções técnicas – Embrapa Acre*, n. 4, p. 1-3, ISSN 0104-9038, 1997.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. v. 1, 480 p.
- CRUZ, J.C. Cultivo do Milho, Embrapa Milho e Sorgo ISSN 1679-012 Versão Eletrônica - <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_7ed/index.htm> Acesso em 13 de novembro de 2011.
- DIDONET, A.D.; LIMA, O.S.; CANDATEN, A.A. and RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido à inoculação de *Azospirillum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35, n. 2, Feb. 2000.
- DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasiliense*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 16, n. 9, p. 645-651, 1996.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasiliense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*, v. 36, p. 284-297, 2002.

- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, 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. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal Plant and Physiology*, v. 28, n. 9, p. 871-879, 2001.
- 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. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. *Biociência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 1, n. 1, p. 2-3, 1997.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. *Microbiologia do solo*. Campinas: SBCS, 1992. p. 173-180.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: DF: EMBRAPA-SPI, 1995. 60 p.
- DÖBEREINER, J.; DE-POLLI, H. Diazotrophic rhizocoenoses. Stewart D.P.; Gallon, J.R., ed. *Nitrogen fixation*. London: Academic Press, p.301-334, 1980.
- DOEBLEY, J. Molecular evidence and the evolution of maize. *Economic Botany*, Bronx, v. 44, p. 6-27, 1990.
- DUARTE, A.P. Característica e sistemas de produção. In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V. (Ed.). *Tecnologias de produção do milho*. Viçosa: UFV, 2004. p. 109-139.
- DUARTE, J. DE O. Importância econômica. In: *Cultivo do Milho, Embrapa Milho e Sorgo* ISSN 1679-012 Versão Eletrônica - <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>> Acesso em 11 de fevereiro de 2009.
- DURÃES, F.O.M.; MAGALHÃES, P.C.; COSTA, J.D.; FANCELLI, A.L. Fatores ecofisiológicos que afetam o comportamento do milho em semeadura tardia (“safrinha”) no Brasil central. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 52, p. 491-591, 1995.
- ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, TORU; ISAWA, TSUYOSHI; MITSUI, HISAYUKI AND MINAMISAWA, KIWAMU. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n. 11, p. 5285-5293, 2001.
- EMBRAPA. Melhoramento genético de milho e sorgo da Embrapa completa 30 anos Importância econômica. <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2007/agosto/3a-semana/melhoramento-genetico-de-milho-e-sorgo-da-embrapa-completa-30-anos/>> Acesso em 21 de janeiro de 2011.
- EUCLYDES, R.F. Manual de utilização do programa Saeg (Sistema para análises estatísticas e genéticas). Viçosa: UFV, 1983. 59 p.
- FARINELLI, R.; PENARIOL, F.G.; BORDINI, L.; COICEV, L.; FORNASIERI FILHO, D. Desempenho Agrônomo de Cultivares de Milho nos períodos de safra e safrinha. *Bragantia*, Campinas, v. 62, n. 2, p. 235-241, 2003.
- FERREIRA, D.F. Sisvar, Versão 4.6. 2003 DEX/UFLA. 2003. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/danielff/sisvar>>. Acesso em: 15 Out. 2010.

- FUENTES-RAMÍRES, L.E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 29, p. 117-128, 1999.
- GARCÍA DE SALAMONE, I. G. & DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology Fertility of Soils*, v. 21, p. 193-196, 1996.
- GOMES, F.P. 1990. Curso de estatística experimental. 8. ed. Nobel, São Paulo. 450 p.
- GU, Y.H. & MAZZOLA, M. Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of *Pseudomonas putida* strain 2C8. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 33, p. 1155-1162, 2001.
- GUIMARÃES, S.L., BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. *Revista Agronomia*, v. 37, n. 2, p. 25-30, 2003.
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K. REDDY, P. M.; LADHA, J. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytologist*, v. 154, n. 1, p. 131-145, 2002.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G, N.; PARREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*. v. 45, p. 83-93, 2002.
- HUMBRET, R.P. The growing of sugar cane. New York: Elsevier, 1968. 779p.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 30, 2005, Pernambuco. Solos, sustentabilidade e qualidade ambiental. Pernambuco: SBCS, UFPE; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. p.1-30. CD-ROM.
- 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 Soil* (2010) 331:413–425.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in tropics, with an emphasis on Brazil, *Field Crops Research*, v. 65, p. 151–164, 2000.
- IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. GRUPO DE COORDENAÇÃO DE ESTATÍSTICAS AGROPECUÁRIAS (GCEA/IBGE, DPE, COAGRO). Levantamento sistemático da Produção Agrícola – outubro de 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15 dez. 2011.
- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal of Experimental Botany*, v. 48, p. 785–797, 1997.
- JUNK G. & SVEC H.J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 14, p. 234-243, 1958.
- KAMPRATH, E. J.; MOLL, R.H. AND RODRIGUEZ, N. Effects of nitrogen fertilization and recurrent selection on performance of hybrids populations of corn. *Agronomy Journal*, v. 74, n. 6, p. 955-958, 1982.
- KAVADIA, A.; VAYENAS, D.V.; PAVLOU, S.; AGGELIS, G. Dynamics of free-living nitrogen-fixing bacterial populations and nitrogen fixation in a two-prey–one-predator system. *Ecological Modelling*, v. 218, p. 323-338, 2008.
- KING, C.A.; PURCELL. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiology*, v.137, p.1389-1396, 2005.

- LAFITTE, H.R.; EDMEADES, G.O. Improvement for tolerance to low soil nitrogen in tropical maize. I. Selection criteria. *Field Crop Research*, v.39, p.1-14, 1994.
- LEDGARD, S.F.; FRENEY, J.R.; SIMPSON, J.R. Variations in natural enrichment of ^{15}N in the profiles of some Australian Pasture Soils. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Victoria, v. 22, p. 155-64, 1984.
- LEPSCH, I.F. Influência dos fatores edáficos na produção. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T. (Coord.) *Ecofisiologia da produção*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1987. p.83-98.
- MACHADO, A.T. 1997. Perspectiva do melhoramento genético em milho (*Zea mays* L.) visando eficiência na utilização do nitrogênio. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- MACHADO, A.T; MAGALHÃES, J.R. Melhoramento de milho para uso eficiente de nitrogênio sob condições de estresse. In: Simpósio Internacional sobre estresse ambiental: o milho em perspectiva. Belo Horizonte. Anais... Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, 1995, P. 321-342.
- MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D.; DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Revista Brasileira de Biologia*. Rio de Janeiro, v.39, p. 587-596, 1979.
- MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M. Ecofisiologia. In: *Cultivo do Milho*. Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-012 Versão Eletrônica - <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_2ed/ecofisiologia.htm> Acesso em 02 de dezembro de 2010.
- MARENGO, J.A.; ALVES, L.M.; VALVERDE, M.C.; LABORBE, R.; ROCHA, R.P. Eventos extremos em cenários regionalizados de clima no Brasil e América do Sul para o Século XXI: Projeções de clima futuro usando três modelos regionais. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE-MMA, SECRETARIA DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS – SBF, DIRETORIA DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE – DCBio. Mudanças Climáticas Globais e Efeitos sobre a Biodiversidade Sub-projeto: Caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do Século XXI. Brasília-Fevereiro, 2007.
- MAULE, R.F.; MAZZA, J.A.; MARTHA JR., G.B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheitas. *Scientia Agricola*, v. 58, n. 2, p. 295-301, 2001.
- MEDICI, L.O. Cruzamentos Dialélicos entre Linhas de Milho Contrastantes no Uso do Nitrogênio. 2003. 88 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MENDES, I.C.; REIS JR, F.B.; HUNGRIA, M.; SOUSA, D.M.G. E CAMPO, R.J. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja cultivada em latossolos do Cerrado. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1053-1060, 2008.
- MENDONÇA, M.M.; URQUIAGA, S.S.; REIS, V.M., Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.
- MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P.; HARDARSON, G AND SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ^{15}N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs *Biol Fertil Soils* v. 45, n. 3, p. 253-263, 2009.
- MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F.; DOBEREINER, J. Rhizobium strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 22, p. 1179-1192, 1985.
- NOCE, M.A. Milho Variedade BR 106 Técnicas de plantio. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2004, p. 1-5 (Comunicado Técnico, 109).
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, v. 63, n. 7, p. 366-370, 1997.
- 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*, New York, v. 21, p. 197-200, 1996.
- OLIVEIRA, J.B. Pedologia aplicada. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 2005. 574p.
- OLIVEIRA, S.A.S.; STARK, E.M.L.M.; EPIFÂNIO, J.A.; BERBARA, R.L.L.; SOUZA, S.R. Partição de Nitrogênio em Variedades de Milho (*Zea mays* L.) com a Aplicação Foliar de Microorganismos Eficazes e Nitrato. *Revista de Ciência e Vida. Seropédica* v. 31, n. 1, p. 57-69, 2011.
- PAULETTO, E.A.; GOMES, A.S. & PINTO, L.F.S. Física de solos de várzea cultivados com arroz irrigado. In: GOMES, A.S. & MAGALHÃES JR., A.M., eds. Arroz irrigado no sul do Brasil. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p. 119-142, 2004.
- PEOPLES M.B., FAIZAH A.W., RERKASEM B. & HERRIDGE D.F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. ACIAR, Monograph No. 11, Canberra, 1989. 76p.
- QUADROS, P.D.de, ROESCH, L.F.W., BERGAMASCHI, C., CAMARGO, F.A.O., SELBACH, P.A. Seleção de bactérias diazotróficas quanto à fixação de nitrogênio e produção de auxinas In: FERTBIO / Bonito - MS, 2006.
- RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C. Experimentação em Genética e Melhoramento de Plantas. Editora UFLA, 2000, 326 p.
- REGAZZI, A.J.; SILVA, H.D.; VIANA, J.M.S. e CRUZ, C.D. Análise de experimentos em látice quadrado com ênfase em componentes de variância. II Análise conjunta Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 34, n. 11, p. 1987-1997, nov. 1999.
- REICHARDT, K. "Capacidade de Campo" *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 12, n. 13, p. 211-216, 1988.
- REICHARDT, K. Dinâmica da matéria e da energia em ecossistemas. Piracicaba: USP/ESALQ, Depto. Física e Meteorologia, 1996. 513p.
- REIS, Jr.; SILVA, L.G. da; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de Bactérias Diazotróficas em diferentes Genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35, n. 5, p. 985-994, 2000.
- REIS, V.M. Inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio para aplicação em gramíneas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 27., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 11., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 9., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 6., 2006, Bonito, MS. A busca das raízes. Anais... Bonito: SBM. DOURADOS; Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 1 CD ROM. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 82).
- RENNIE, R.J. ¹⁵N isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. *Canadian Journal of Botany*, v. 58, p. 21-24, 1980.

- RESENDE, A.S. de; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Técnicas utilizadas na quantificação da fixação biológica de nitrogênio. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 26 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 165).
- RIBAUDO, C.M.; RONDANINI, D.P.; TRINCHERO, G.D.; CURÁ, J.A. Effect of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation on maize nitrogen metabolism. *Maydica*, Italy, v. 51, p. 481-485, 2006.
- RIBEIRO, P.H.E; RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de milho em diferentes condições ambientais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 11, p. 2213-2222, 2000.
- RIGGS, P.J.; CHELIUS, M.K.; INIGUEZ, A.L.; KAEPLER, S.M.; TRIPLETT, E.W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology*, Victoria, v. 28, p. 829-836, 2001.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J.R.V.A.; VICTOT, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. Citri Tipo B. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 12, p. 16, 1986.
- ROESCH, L.F.W.; CAMARGO, F.O; SELBACH, P.A; SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. *Ciência Rural*, v. 35, n. 5; p. 1201-1204, 2005.
- ROESCH, L.F.W.; PASSAGLIA, L.M.P.; BENTO, FÁTIMA M.; TRIPLETT, E.W. & CAMARGO, F.A.O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 31, p. 1367-1380, 2007.
- RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R. AND SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiology Ecology* v. 45, p. 39-47, 2003.
- ROSIELLE, A.A .; HAMBLIN, J. Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environments. *Crop Science*, v.21, n.1, p. 943-946, 1981.
- SANS, L.M.A.; SANTANA, D.P. Clima e solo. In: *Cultivo do Milho*, Embrapa Milho e Sorgo ISSN 1679-012 Versão Eletrônica - <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>> Acesso em 6 de janeiro de 2011.
- SANTOS, H.G. dos; FIDALGO, E.C.C.; COELHO, M.R.; ÁGLIO, M.L.D. Cultivo do arroz de terras altas no estado de Mato Grosso. Campinas: Embrapa Arroz e Feijão, *Sistemas de Produção*. n. 7, 2006.
- SCHLOTTER, M.; BODE, W.; HARTMANN, A. & BEESE, F. Sensitive chemoluminescence-based immunological quantification of bacteria in soil extracts with monoclonal antibodies. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 24, n. 5, p. 399-403, 1992.
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Oxford, v. 30, p. 507-512, 1974.
- SHEARER, G.; KOHL, D. H. AND CHIEN, S.H. The nitrogen ¹⁵N abundance in a wild variety of soils. *Soil Science Society of America Journal*. 50:105-110. 1978.
- SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Australian Journal of Plant Physiology*, Victoria, v. 13, p. 699-756, 1986.
- SHIGAKI, F.; FREITAS, N.; BERTO, A.; CEDDIA, M.B.; ZONTA,E.; LIMA,E. Influência do estresse hídrico nos parâmetros de crescimento, acúmulo de N e produtividade de

- diferentes variedades de cana-de-açúcar em Miracema – RJ. Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida. Seropédica, RJ, EDUR, v. 24, n. 1, jan.- jun., p. 63-71, 2004.
- SILVA E OLIVEIRA, J.; FERREIRA, R.P.; CRUZ, C.D.; PEREIRA, A.V.; LOPES, F.C.F. Adaptabilidade e Estabilidade de Cultivares de Milho para Silagem em Relação à Produção de Matéria Seca Degradável no Rúmen. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 28, n. 2, p. 230-234, 1999.
- SINGH, U.; LADHA, J.K.; CASTILLO, E.G.; PUNZALAN, G. TIROL-PADRE, A. DUQUEZA, M. Genotypic variation in nitrogen-use efficiency in medium and long duration rice. Field Crops Research, v. 58, p. 35-53, 1998.
- SOUSA, D.M.G. DE; LOBATO, E. Calagem e adubação para culturas anuais e semiperenes. In: SOUSA, D.M.G. de; LOBATO, G. Cerrado: correção do solo e adubação. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 283-315.
- STRALIOTTO, R. Protocolo operacional para o preparo da turfa para produção de inoculante rizobiano. Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ, 2000. 4p.
- STRECK, E.V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R.S.D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P.C.; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E. & PINTO, L.F.S. Solos do Rio Grande do Sul. 2.ed. Porto Alegre, Emater/RS, 222p., 2008.
- STURZ, A.V. & NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Applied Soil Ecology, v. 15, p. 183-190, 2000.
- SYLVIA, D.M.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. Principles and applications of soil microbiology. New Jersey: Printice Hall, 1998, 550p.
- TSUNECHIRO, A.; MIELE JR., C. Análise do risco da produção e do mercado de milho "safrinha". In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO "SAFRINHA", 5., Barretos, 1999. Anais. Campinas: Instituto Agrônomo, 1999. p. 127-132.
- USDA – Corn: Market Outlook - Economic Research Service 2010 www.ers.usda.gov/briefing/corn/2009baseline.htm acessado em 18 de outubro de 2010.
- VAN LOON, G.W.; DUFFY, S.J. Microbiological processes. In: VAN LOON, G.W.; DUFFY, S.J. Environmental Chemistry – The global perspective. New York: Oxford University, 2010, Cap. 15, p. 560.
- VIEIRA JR., P.A. Milho- *Zea mays* L. In: CASTRO, P.R.C. & KLUGE, R.A. Ecofisiologia de cultivos anuais: Trigo, Milho, Soja, Arroz e Mandioca. Nobel, 1999, p. 41-71.
- 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.
- XAVIER, R.P. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar. 2006. 71p. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.
- ZILLI, J.E.; MARSON, L.C.; REIS, V.M.; ALVES, G.C.; BALDANI, V.L.D. E CORDEIRO, A.C.C. Contribuição da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para o rendimento de grãos de arroz e milho em Roraima, Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Roraima; 6).

8 ANEXOS

Meios Utilizados – Composição por Litro

Solução salina para diluição de células

KH_2PO_4	3,4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
NaCl	0,1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
Solução de micronutrientes	2 mL
FeEDTA (solução 1,64%)	4 mL
KOH	4,5 g

Ajustar o pH para 6,5 com KOH e completar o volume para 1000 mL com água destilada.

Solução de micronutrientes

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,20g
H_3BO_3	1,40g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,75g

Completar o volume para 1000mL com água destilada.

JNFB

Ácido málico		5 g
K_2HPO_4	sol. 10%	6 mL
KH_2PO_4	sol. 10%	18 mL
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	sol. 10%	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	sol. 1%	2 mL
FeEDTA	sol. 1,4%	4 mL
Azul de bromotimol, solução 0,5% em 0,2 N de KOH		2 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
KOH		4,5 g
Extrato de levedura		20 mg

Completar para 1 L com água destilada.

Ajustar o pH para 5,8.

Adicionar 15 g de agar.

Tabela 14. Análise da Variância entre os locais PHda, LVd1 e LVd2

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco(Local)	15	38,88	2,59	1,69	0,048
Local-L	2	1.202,17	601,09	391,93	0,000
Época-E	1	168,92	168,92	110,14	0,000
Inoculação-I	1	0,62	0,62	0,41	0,524
Nitrogênio-N	1	89,63	89,63	58,44	0,000
Genótipo-G	1	88,91	88,91	57,97	0,000
L*E	2	331,83	165,91	108,18	0,000
L*I	2	0,73	0,37	0,24	0,788
L*N	2	2,02	1,01	0,66	0,518
L*G	2	0,35	0,18	0,12	0,891
E*I	1	0,68	0,68	0,44	0,506
E*N	1	0,24	0,24	0,15	0,695
E*G	1	30,17	30,17	19,68	0,000
I*N	1	1,66	1,66	1,08	0,299
I*G	1	3,90	3,90	2,54	0,091
N*G	1	0,95	0,95	0,62	0,433
L*E*I	2	3,87	1,93	1,26	0,284
L*E*N	2	1,01	0,50	0,33	0,721
L*E*G	2	62,87	31,43	20,50	0,000
L*I*N	2	0,36	0,18	0,12	0,889
L*I*G	2	1,50	0,75	0,49	0,614
L*N*G	2	4,80	2,40	1,57	0,210
E*I*N	1	0,06	0,06	0,04	0,847
E*I*G	1	2,27	2,27	1,48	0,225
I*N*G	1	1,20	1,20	0,78	0,378
L*E*I*N	2	3,36	1,68	1,10	0,335
L*E*I*G	2	0,86	0,43	0,28	0,755
L*E*N*G	2	0,60	0,30	0,20	0,823
L*I*N*G	2	0,31	0,15	0,10	0,904
E*I*N*G	1	0,83	0,83	0,54	0,063
L*E*I*N*G	2	0,65	0,32	0,21	0,810
Erro	755	1.157,93	1,53		
Total corrigido	815	3.203,28			
CV (%) =	22,72				
Média geral:	5,451				Número de observações: 816

Tabela 15. Análise da variância no LAAd

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco(Ano)	10	6,257	0,626	0,834	0,597
Ano-A	1	57,123	57,123	76,102	0,000
G	1	112,289	112,289	149,597	0,000
N	2	17,787	8,893	11,848	0,000
I	1	2,669	2,669	3,556	0,062
A*G	1	23,986	23,986	31,955	0,000
A*N	2	5,212	2,606	3,472	0,035
A*I	1	0,369	0,369	0,492	0,485
G*N	2	2,222	1,111	1,480	0,232
G*I	1	0,660	0,660	0,879	0,351
A*G*N	2	0,290	0,145	0,193	0,825
A*G*I	1	1,757	1,757	2,341	0,091
A*N*I	2	1,629	0,814	1,085	0,342
G*N*I	2	1,640	0,820	1,092	0,339
A*G*N*I	2	0,220	0,110	0,146	0,864
Erro	112	84,069	0,751		
Total corrigido	143	318,178			
CV (%)=	19,69				
Média geral	4399			Número de observações: 144	

Tabela 16. Análise da Variância do teor de N no PHda

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
B(E)	10	1,626	0,163	3,257	0,001
E	1	1,006	1,006	20,159	0,000
G	1	0,231	0,231	4,632	0,032
N	1	0,658	0,658	13,190	0,000
I	1	0,129	0,129	2,577	0,160
E*G	1	0,237	0,237	4,751	0,030
E*N	1	0,096	0,096	1,916	0,167
E*I	1	0,000	0,000	0,007	0,931
G*N	1	0,010	0,010	0,208	0,649
G*I	1	0,003	0,003	0,066	0,797
E*G*N	1	0,099	0,099	1,981	0,161
E*G*I	1	0,029	0,029	0,581	0,447
E*N*I	1	0,079	0,079	1,575	0,211
G*N*I	1	0,001	0,001	0,013	0,910
E*G*N*I	1	0,044	0,044	0,879	0,349
erro	263	13,130	0,049923		
Total corrigido	287	17,379			
CV (%)=	15,3				
Média geral:	1,46			Número de observações: 288	

Tabela 17. Análise da Variância do acúmulo de N no PHda

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
R(E)	10	108,363	10,836	2,541	0,006
E	1	8,648	8,648	2,028	0,156
G	1	52,386	52,386	12,285	0,001
N	1	104,158	104,158	24,427	0,000
I	1	0,072	0,072	0,017	0,897
E*G	1	39,752	39,752	9,322	0,003
E*N	1	8,949	8,949	2,099	0,149
E*I	1	0,133	0,133	0,031	0,860
G*N	1	5,490	5,490	1,287	0,258
G*I	1	0,356	0,356	0,083	0,773
E*G*N	1	2,572	2,572	0,603	0,438
E*G*I	1	4,271	4,271	1,002	0,318
E*N*I	1	12,509	12,509	2,934	0,088
G*N*I	1	1,520	1,520	0,356	0,551
E*G*N*I	1	1,104	1,104	0,259	0,611
Erro	263	1121,463	4,264		
Total corrigido	287	1471,744			
CV(%)=	36,97				
Média geral:	5,585			Número de observações: 288	

Tabela 18. Análise da Variância do Teor de N no LAAd

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
B(A)	10	0,199	0,020	1,234	0,277
A	1	1,684	1,684	104,314	0,000
G	1	1,701	1,701	105,389	0,000
N	2	0,001	0,000	0,027	0,973
I	1	0,002	0,002	0,112	0,739
A*G	1	0,092	0,092	5,670	0,019
A*N	2	0,116	0,058	3,607	0,030
A*I	1	0,069	0,069	4,270	0,041
G*N	2	0,014	0,007	0,418	0,659
G*I	1	0,051	0,051	3,160	0,078
A*G*N	2	0,028	0,014	0,873	0,421
A*G*I	1	0,009	0,009	0,549	0,460
A*N*I	2	0,116	0,058	3,606	0,030
G*N*I	2	0,013	0,006	0,395	0,674
A*G*N*I	2	0,009	0,004	0,277	0,759
Erro	112	1,808	0,016		
Total corrigido	143	5,910			
CV (%)=	7,9				
Média geral	1,61			Número de observações: 144	

Tabela 19. Análise da Variância do Acúmulo de N no LAAd

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
B(A)	10	29,064	2,906	1,302	0,238
A	1	38,120	38,120	17,076	0,000
G	1	121,716	121,716	54,522	0,000
N	2	36,547	18,274	8,186	0,001
I	1	4,247	4,247	1,902	0,171
A*G	1	52,381	52,381	23,464	0,000
A*N	2	5,069	2,534	1,135	0,325
A*I	1	0,130	0,130	0,058	0,810
G*N	2	3,676	1,838	0,823	0,442
G*I	1	0,001	0,001	0,000	0,984
A*G*N	2	4,972	2,486	1,114	0,332
A*G*I	1	5,487	5,487	2,458	0,120
A*N*I	2	9,537	4,768	2,136	0,123
G*N*I	2	3,306	1,653	0,740	0,479
A*G*N*I	2	0,719	0,360	0,161	0,851
Erro	112	250,032	2,232		
Total corrigido	143	565,006			
CV (%)=	21,49				
Média geral:	6,954			Número de observações: 144	

Tabela 20. Análise da variância da Quantificação da FBN

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco(E)	4	9,266	2,316	2,049	0,090
E	1	82,412	82,412	72,899	0,000
I	1	10,411	10,411	9,210	0,003
Planta-P	3	113,334	37,778	33,417	0,000
E*I	1	0,025	0,025	0,022	0,882
E*P	3	1,208	0,403	0,356	0,784
I*P	3	3,058	1,019	0,902	0,442
E*I*P	3	1,392	0,464	0,410	0,746
Erro	172	194,447	1,131		
Total corrigido	191	415,553			
CV (%) =	14,77				
Média geral:	7,20			Número de observações: 192	

Tabela 21. Análise da Variância da contribuição da FBN

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco(E)	4	196,419	49,105	0,382	0,820
E	1	130,153	130,153	1,013	0,321
G	1	2,803	2,803	0,022	0,883
I	1	840,850	840,850	6,544	0,015
E*G	1	59,408	59,408	0,462	0,501
E*I	1	58,477	58,477	0,455	0,504
G*I	1	140,836	140,836	1,096	0,302
E*G*I	1	0,134	0,134	0,001	0,974
erro	36	4.625,944	128,498		
Total corrigido	47	6.055,023			
CV (%) =	51,79				
Média geral:	21,89		Número de observações: 48		