

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

TESE

Crescimento e Metabolismo de Nitrogênio em Milho
Inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* e
Azospirillum brasilense

Farley Alexandre da Fonseca Breda

2018



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

**CRESCIMENTO E METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM
MILHO INOCULADO COM *Herbaspirillum seropedicae* e
*Azospirillum brasilense***

FARLEY ALEXANDRE DA FONSECA BREDA

Sob a Orientação do Professora
Verônica Massena Reis

e Co-orientação do Professor
Adelson Paulo de Araújo

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018

B831c Breda, Farley Alexandre da Fonseca, 10/09/1985-
Crescimento e Metabolismo de Nitrogênio em Milho
Inoculado com Herbaspirillum seropedicae e
Azospirillum brasilense / Farley Alexandre da Fonseca
Breda. - 2018.
80 f.

Orientadora: Veronica Massena Reis.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Agronomia - Ciência do Solo, 2018.

1. Metabolismo de plantas. 2. Análise de
crescimento. 3. Bactérias diazotróficas. I. Reis,
Veronica Massena, 1961-, orient. II Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Agronomia - Ciência
do Solo III. Título.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

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

FARLEY ALEXANDRE DA FONSECA BREDA

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

TESE APROVADA EM:26/02/2018

Verônica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

Everaldo Zonta. Dr. UFRRJ

Gabriela Cavalcanti Alves. Dra. Embrapa Agrobiologia

Márcio dos Reis Martins. Dr. Embrapa Agrobiologia

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida;

Aos meus pais, Daniel Clovis Breda e Luzia da Fonseca Breda, pela ajuda, paciência, companheirismo, pelo amor e pelo apoio nos momentos mais difíceis, durante a graduação, mestrado e doutorado.

A minha esposa, Erica Souto Abreu Lima por todo apoio, pelos momentos de alegria, e principalmente pela paciência e cobrança para não desanimar ao longo de tantos anos.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia - Ciência do Solo, pela oportunidade concedida para a realização do curso de doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento ao Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Comitê de Orientação Dra. Verônica Massena Reis e ao Dr. Adelson Paulo Araújo pelas orientações e ensinamentos recebidos para a realização e conclusão do trabalho.

A Embrapa Agrobiologia, pelo suporte laboratorial para à execução e desenvolvimento da pesquisa.

Aos funcionários da área experimental e técnicos de laboratório da Embrapa Agrobiologia, pelo apoio e paciência durante toda a condução dos experimentos, que direta ou indiretamente estiveram envolvidos no desenvolvimento da tese.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação da UFRRJ e colegas da Embrapa, pela troca de conhecimentos e experiências.

Aos estagiários do laboratório de Gramíneas pela ajuda na condução e análise que foram realizadas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos presentes e aos ausentes que contribuíram de certa forma, direta ou indiretamente.

E a todos aqueles que, no momento, possa ter esquecido.

"Muito Obrigado!"

BIOGRAFIA

Farley Alexandre da Fonseca Breda, filho de Daniel Clovis Breda e Luzia da Fonseca Breda, nasceu em 10 de setembro de 1985, na cidade de São Gabriel da Palha, estado do Espírito Santo. Em 2003 formou-se Técnico Agrícola com Habilitação em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Colatina-Es. Entrou para curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2005, e graduou-se 2010 em Engenharia Agrônoma. Durante sua graduação sempre esteve envolvido com estágios e projetos de pesquisa, sendo bolsista de Iniciação Científica pela Embrapa Solos na área de Física e Fertilidade do Solo. Participou da criação do Núcleo de Estudos Agrônomicos (NEAGRO). Ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da UFRRJ em março de 2012, concluindo sua dissertação de Mestrado em fevereiro de 2014, mesmo ano que ingressou no curso de Doutorado.

RESUMO GERAL

BREDA, Farley Alexandre da Fonseca. **Crescimento e metabolismo de nitrogênio em milho inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense***. 2018. 80f. Tese (Agronomia - Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Para que a cultura do milho alcance altas produtividades é necessário que o solo possua uma fertilidade elevada, pois essa gramínea é altamente exigente em nutrientes, principalmente nitrogênio. Visando diminuir essa demanda por fertilizantes nitrogenados, algumas linhas de pesquisa vêm sendo desenvolvidas. Uma das alternativas é a utilização de bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio. Deste modo, diferentes bactérias estão sendo utilizadas, dentre elas, destacam-se a *Herbaspirillum seropedicae* e a *Azospirillum brasilense*. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da inoculação de duas bactérias diazotróficas, a estirpe ZAE94, de *Herbaspirillum seropedicae*, e a estirpe Sp245, de *Azospirillum brasilense*, em plantas de milho, quanto à capacidade de alterar o crescimento e a absorção de nitrogênio ao longo do desenvolvimento da cultura, bem como, avaliar a sua produtividade e o rendimento no peso de mil grãos das plantas. Além disso, buscou-se avaliar o efeito dessas bactérias no metabolismo de N das plantas de milho quando cultivados em sistema hidropônico com solução nutritiva com alta e baixa concentração de deste elemento. Para isso, a tese foi dividida em dois capítulos, no primeiro foi realizado dois experimentos de campo, no ano agrícola de 2015/2016. Em ambos os experimentos, adotou-se o arranjo fatorial composto por quatro níveis de adubação (0, 50, 100 e 150 kg N ha⁻¹), com diferentes inoculações (NI - não inoculado, Hs - *Herbaspirillum seropedicae* e Ab - *Azospirillum brasilense*), em quatro repetições. Para o segundo capítulo, foi realizado um único experimento em casa de vegetação, utilizando cultivo hidropônico com aeração intermitente. Adotou-se um arranjo fatorial composto por dois níveis de adubação (3,0 mM e 0,3 mM de N), com diferentes inoculações (NI - não inoculado, Hs - *Herbaspirillum seropedicae* e Ab - *Azospirillum brasilense*), em oito repetições. Observou-se que as condições ambientais influenciaram diretamente a resposta da interação planta/bactéria, onde o período de maior temperatura e umidade (safra verão) promoveu respostas mais expressivas de ambas as bactérias. Diante da avaliação do crescimento vegetal e da produção de grãos das plantas de milho, foi possível evidenciar o potencial da utilização de bactérias diazotróficas como insumo biológico, principalmente da espécie *Herbaspirillum seropedicae*, uma vez que, a associação destas com as doses de 50 e 100 kg N ha⁻¹, promoveu incremento na produtividade de grãos de 15 e 35% respectivamente, quando comparados ao controle não inoculado. Com isso, a utilização desta bactéria possibilita a redução dos custos com adubação, conseqüentemente, causando menor impacto ambiental. A avaliação do crescimento vegetal mostrou, que as bactérias exercem efeito benéfico sobre o crescimento das plantas de milho, principalmente a *Herbaspirillum seropedicae*, fazendo com que sejam mais eficientes na produção de grãos e na absorção e assimilação de nitrogênio.

Palavras chaves: Metabolismo de plantas. Análise de crescimento. Bactérias diazotróficas.

GENERAL ABSTRACT

BREDA, Farley Alexandre da Fonseca. **Nitrogen growth and metabolism in corn inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense***. 80p. Thesis (Agronomy - Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

In order for the corn crop to reach high yields, it is necessary a high fertility of the soil, since this grass is highly demanding in nutrients, mainly nitrogen. In order to reduce this demand for nitrogen fertilizers, some lines of research have been developed. One of the alternatives is the use of diazotrophic nitrogen-fixing bacteria. Thus, different bacteria are being used, among them, stand out *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. The objective of the study was to evaluate the effect of the inoculation of two diazotrophic bacteria, strain ZAE94, of *Herbaspirillum seropedicae*, and strain Sp245, from *Azospirillum brasilense*, on maize plants, on the ability to alter nitrogen growth and absorption at during the development of the crop, as well as to evaluate its productivity and yield in the weight of a thousand grains of the plants. In addition, the objective was to evaluate the effect of these bacteria on N metabolism of maize plants when grown in a hydroponic system with nutrient solution with high and low concentration of this element. For this, the thesis was divided in two chapters, where in the first one was realized two field experiments, where the first one was cultivated in the summer crop of 2015/2016 and the second one in the harvest of winter 2016. In both experiments, (Hs - *Herbaspirillum seropedicae* and Ab - *Azospirillum brasilense*), with four different replications (0 - 50, 100 and 150 kg N ha⁻¹), with different inoculations. For the second chapter, a single greenhouse experiment was carried out using hydroponic cultivation with intermittent aeration. A factorial arrangement composed of two levels of fertilization (3.0 mM and 0.3 mM N), with different inoculations (NI - uninoculated, Hs - *Herbaspirillum seropedicae* and Ab - *Azospirillum brasilense*) was used in eight replications. It was observed that the environmental conditions influenced directly the response of the plant / bacteria interaction, where the period of higher temperature and humidity (summer harvest) promoted more expressive responses of both bacteria. Considering the plant growth and grain yield of maize plants, it was possible to show the potential of the use of diazotrophic bacteria as a biological input, mainly of the species *Herbaspirillum seropedicae*, since the association of these bacteria allows the reduction of costs with fertilization, consequently, causing less environmental impact, besides promoting higher productivity and better yield and quality of maize grains. The evaluation of plant growth showed that the bacteria exerted a beneficial effect on the growth of maize plants, especially *Herbaspirillum seropedicae*, making them more efficient in the production of grains and in the uptake and assimilation of nitrogen by plants.

Key words: Plant metabolism. Growth analysis. Diazotrophic bacteria.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Análise química de solo da área experimental.....	15
Tabela 2. Coeficientes dos modelos exponencial polinomial de 2° grau ajustados aos dados de massa seca (MS).....	19
Tabela 3. Coeficientes dos modelos exponencial polinomial de 2° grau ajustados aos dados de Índice de Área Foliar (IAF), para safra de verão e inverno.	24
Tabela 4. Coeficientes dos modelos exponencial polinomial de 2° grau ajustados aos dados de acúmulo de N, para safra de verão e inverno.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Dados climáticos do ano agrícola 2015/2016, onde pode ser observado as temperaturas máxima e mínima e a média de precipitação para cada mês ao longo do ano agrícola..... 14
- Figura 2.** Visão aérea da disposição do experimento, de realizado na safra de inverno, março a julho 2016. 15
- Figura 3.** Representação da forma de coleta das plantas para análise de crescimento e produtividade, na parcela. □ Representam as plantas que foram deixadas como bordadura, ■ representam as plantas coletadas para a análise de crescimento e ■ representam as plantas que foram coletadas para quantificar a produtividade e peso de mil grão. 17
- Figura 4.** Acúmulo de matéria seca (W) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2° grau. Ensaio conduzido na Estação Experimental Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ; entre o período de outubro 2015 a fevereiro 2016 – Safra de Verão..... 20
- Figura 5.** Acúmulo de matéria seca (W) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2° grau. Ensaio conduzido na Estação Experimental Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ; entre o período de março a julho 2016 - Safra Inverno..... 21
- Figura 6.** Taxa de crescimento da cultura (TCC) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de outubro 2015 a fevereiro 2016 - Safra de Verão. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2° grau..... 22
- Figura 7.** Taxa de Crescimento da cultura (TCC) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de março 2016 a julho 2016 – Safra de Inverno. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2° grau. 23
- Figura 8.** Índice de Área Foliar (IAF) de milho, em função do tipo de inoculação para cada dose de N, entre o período de outubro 2015 a fevereiro 2016 – Safra de Verão. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2° grau..... 25
- Figura 9.** Índice de Área Foliar (IAF) de milho, em função do tipo de inoculação para cada dose de N, entre o período de março a julho 2016 – Safra de Inverno. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2° grau. 26
- Figura 10.** Taxa de Assimilação Líquida (TAL) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de outubro 2015 a fevereiro 2016 - Safra de Verão. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2° grau..... 27
- Figura 11.** Taxa de Assimilação Líquida (TAL) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de março a julho 2016 - Safra de Inverno. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2° grau. 28
- Figura 12.** Acúmulo de N nas plantas de milho, da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de outubro 2015 a fevereiro 2016 - Safra de Verão. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2° grau..... 30
- Figura 13.** Acúmulo de N nas plantas de milho, da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de março a julho 2016 - Safra de Inverno. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2° grau. 31

- Figura 14.** Produtividade de grãos em função do tipo de inoculação nas diferentes doses de N. Valores médios de quatro repetições. Letras distintas comparam as médias, em cada dose de N a 5% de probabilidade pelo teste t. 33
- Figura 15.** Modelos de regressão para a produtividade de grãos de milho, em função das doses de N (0, 50, 100 e 150 kg N ha⁻¹), para os tratamentos não inoculado (NI), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) e *Azospirillum brasilense* (Ab). 34
- Figura 16.** Peso de 1000 grãos em função do tipo de inoculação nas diferentes doses de N. Valores médios de quatro repetições. Letras distintas comparam as médias, em cada dose de N a 5% de probabilidade pelo teste t. 35
- Figura 17.** Modelos de regressão para o peso de 1000 grãos de milho, em função das doses de N (0, 50, 100 e 150 kg N ha⁻¹), para os tratamentos não inoculado (NI), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) e *Azospirillum brasilense* (Ab). 36
- Figura 18.** Nitrogênio acumulado nos grãos de milho, em função do tipo de inoculação nas diferentes doses de N. Valores médios de quatro repetições. Letras distintas comparam as médias, em cada dose de N a 5% de probabilidade pelo teste t. 37
- Figura 19.** Modelos de regressão para o peso de 1000 grãos de milho, em função das doses de N (0, 50, 100 e 150 kg N ha⁻¹), para os tratamentos não inoculado (NI), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) e *Azospirillum brasilense* (Ab). 37
- Figura 20.** Representação do plantio das sementes em pós-germinação (a). Representação das plântulas transplantadas para cultivo hidropônico (b). 49
- Figura 21.** Massa seca de milho acumulada aos 40 dias sob condições hidropônicas e inoculada ou não com *Azospirillum brasilense* (Ab) e *Herbaspirillum seropedicae* (Hs). MSF - massa seca folha; MSR - massa seca da raiz; MST - massa seca total. Valor médio de 8 repetições. * diferem em P <0,05 (teste de Tukey). 52
- Figura 22.** Nitrogênio (N), potássio (K) e fósforo (P) acumulados em plantas de milho aos 40 dias após o transplante para o vaso. NI - controle não inoculado, Hs - *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 e Ab - *Azospirillum brasilense* Sp245. As letras indicam diferenças significativas em P < 0,05 (n = 8). A letra maiúscula comparar os níveis de nitrogênio e a minúsculas comparam os tratamentos inoculação em cada dose de N.. 54
- Figura 23.** Atividade de nitrato redutase (aNR) em Massa fresca de parte aérea (a) e raízes de milho (b) inoculados ou não (NI) com *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (Hs), *Azospirillum brasilense* Sp245 (Ab). Avaliados aos 20 dias (C1), depois de 72 horas (C2) e na colheita final aos 40 dias (C3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas em P <0,05 (n = 8). As letras maiúsculas comparam os níveis de nitrogênio e as minúsculas comparam os tratamentos inoculados nas coletas. 55
- Figura 24.** N-amino na massa fresca de parte aérea de milho (a) e raízes (b) inoculados ou não (NI) com *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (Hs), *Azospirillum brasilense* Sp245 (Ab). Avaliados aos 20 dias (C1), depois de 72 horas (C2) e na colheita final aos 40 dias (C3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas em P <0,05 (n = 8), letras maiúsculas, comparam os níveis de nitrogênio e as minúsculas entre os tratamentos inoculados nas coletas. 56
- Figura 25.** NO₃⁻ na Massa fresca de parte aérea (a) e raízes (b) de milho inoculados ou não (NI) com *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (Hs), *Azospirillum brasilense* Sp245 (Ab). Avaliados aos 20 dias (C1), depois de 72 horas (C2) e na colheita final aos 40 dias (C3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas em P <0,05 (n =

8). As letras maiúsculas comparam os níveis de nitrogênio e as minúsculas comparam os tratamentos inoculados nas coletas.57

Figura 26. Açúcares totais em Massa fresca de parte aérea (a) e raízes (b) de milho inoculados ou não (NI) com *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (Hs), *Azospirillum brasilense* Sp245 (Ab). Avaliados aos 20 dias (C1), depois de 72 horas (C2) e na colheita final aos 40 dias (C3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas em $P < 0,05$ ($n = 8$). As letras maiúsculas comparam os níveis de nitrogênio e as minúsculas comparam os tratamentos inoculados nas coletas.58

Figura 27. NH_4^+ na Massa fresca de parte aérea (a) e raízes (b) de milho inoculados ou não (NI) com *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (Hs), *Azospirillum brasilense* Sp245 (Ab). Avaliados aos 20 dias (C1), depois de 72 horas (C2) e na colheita final aos 40 dias (C3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas em $P < 0,05$ ($n = 8$). As letras maiúsculas comparam os níveis de nitrogênio e as minúsculas comparam os tratamentos inoculados nas coletas.59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Cultura do Milho	3
2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio por Bactérias Diazotróficas	4
2.3 Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP)	4
2.4 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	5
2.5 <i>Azospirillum brasilense</i>	6
2.6 Análise do Crescimento Vegetal	7
2.7 Metabolismo de Nitrogênio	9
3. CAPÍTULO I.....	10
CRESCIMENTO DE MILHO INOCULADO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA PRESENÇA DE DOSES CRESCENTES DE N FERTILIZANTE.....	10
3.1 RESUMO.....	11
3.2 ABSTRACT	12
3.3 INTRODUÇÃO	13
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.4.1 Área de Estudo.....	14
3.4.2 Preparo dos Inoculantes e Inoculação	15
3.4.3 Condições Experimentais	16
3.4.4 Análise do Crescimento Vegetal	16
3.4.5 Coletas	16
3.4.6 Avaliações Realizadas	17
3.4.7 Taxa de Crescimento	18
3.4.8 Análise Estatística.....	18
3.5 RESULTADOS	19
3.5.1 Acúmulo de Massa Seca (W)	19
3.5.2 Taxa de Crescimento da Cultura (TCC)	22
3.5.3 Índice de Área Foliar	24
3.5.4 Taxa de Assimilação Líquida (TAL).....	27
3.5.5 Acúmulo de Nitrogênio	29
3.5.6 Produtividade, Peso de 1000 Grãos e Acúmulo de Nitrogênio	32
3.6 DISCUSSÃO	39
3.6.1 Acúmulo de Massa Seca (W), Índice de Área Foliar (IAF) e Acúmulo de N nas Plantas de Milho no Tempo.....	39
3.6.2 Taxa de Crescimento da Cultura (TCC) e Taxa de Assimilação Líquida (TAL) ..	40
3.6.3 Produtividade, Peso de 1000 Grãos e Acúmulo de Nitrogênio no Grão	41
3.7 CONCLUSÕES.....	43
4. CAPÍTULO II.....	44
MODIFICAÇÕES DO METABOLISMO DE N DE PLANTAS DE MILHO INOCULADAS COM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> E <i>Azospirillum brasilense</i>	44
4.1 RESUMO.....	45
4.2 ABSTRACT	46
4.3 INTRODUÇÃO	47
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.4.1 Local de Estudo	48

4.4.2	Inoculação.....	48
4.4.3	Hidroponia	48
4.4.4	Sistema Hidropônico	50
4.4.5	Atividade da Nitrato Redutase (aNR).....	50
4.4.6	Frações Solúveis	50
4.4.7	Nitrogênio Total (N), Fósforo (P) e Potássio (K)	51
4.4.8	Análise Estatística.....	51
4.5	RESULTADOS	52
4.5.1	Acúmulo de Biomassa e Nutrientes.....	52
4.5.2	Atividade da Enzima Nitrato Redutase (aNR)	55
4.5.3	Frações Solúveis – N amino	55
4.5.4	Nitrato	56
4.5.5	Açúcares Totais	57
4.5.6	Amônio	58
4.6	DISCUSSÃO	60
4.6.1	Acúmulo de Biomassa e Nutrientes.....	60
4.6.2	Atividade da Nitrato Redutase (aNR).....	60
4.6.3	Frações Solúveis	61
4.7	CONCLUSÕES.....	63
5.	CONCLUSÕES GERAIS	64
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do milho é uma das mais importantes dentro do cenário da produção agropecuária no mundo, pois pode ser utilizada como: fonte de energia e nutrientes para a nutrição animal e humana, além de poder ser utilizada como matriz energética na produção de biocombustíveis. Por isso, a produção deste cereal é importante na balança comercial de muitos países. Atualmente, é o grão mais produzido no mundo, sendo responsável por 42% de todos os grãos gerados, seguido pelo trigo (30%), e arroz (18%) (CONAB, 2017).

No Brasil a cultura do milho vem aumentando anualmente a sua produção e produtividade. Isso pode ser observado através do levantamento realizado pelo IBGE em setembro de 2017, onde a estimativa da produção de milho em grãos foi de 97,8 milhões de toneladas somando as duas safras, mantendo a estimativa de safra recorde. Do volume total da produção, 30,4 milhões de toneladas (31,2%) são de milho 1ª safra ou safra de verão e 67,3 milhões de toneladas (68,8%) são de milho 2ª safra ou safra de inverno. Os produtores investem no milho 2ª safra, por este apresentar bons preços de mercado na ocasião da decisão de plantio, e por ser uma cultura que, em termos de produção, responde muito bem em sucessão à soja, além de ser tecnicamente recomendada para esta época de plantio (CONAB, 2017).

Para que o milho alcance altas produtividades é necessário que o solo possua uma fertilidade elevada, pois essa gramínea é altamente exigente em nutrientes. Uma das principais limitações para alcançar altos rendimentos com esta cultura está relacionada ao manejo da adubação nitrogenada. Isso se deve ao fato do nitrogênio (N) ter um papel muito importante em vários processos para a manutenção da vida da planta, como constituinte da molécula de clorofila, aminoácidos, bases nitrogenadas, coenzimas, enzimas e ácidos nucleicos e, dessa forma, é considerado o nutriente que mais limita a produção (ANDRADE et al., 2003; TAIZ E ZEIGER, 2004; ROBERTO et al., 2010).

Para diminuir essa demanda por fertilizantes nitrogenados, e seus efeitos devido ao uso de forma indiscriminada, algumas linhas de pesquisa vêm sendo desenvolvidas. Uma das alternativas que vem sendo estudada é a utilização de bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio. Para o desenvolvimento destes estudos, diferentes bactérias estão sendo utilizadas, dentre elas destacam-se a *Herbaspirillum seropedicae* e a *Azospirillum brasilense*. A bactéria *Herbaspirillum* é uma bactéria diazotrófica endofítica obrigatória, que foi descrita por Baldani et al (1986) em arroz. Estudos com essa bactéria vem produzindo resultados promissores. Exemplos desses resultados são os descritos por Alves (2007), onde observou incrementos de até 34 % na produção de grãos de milho. Já o *Azospirillum* é um gênero de bactéria diazotrófica facultativa, descrita por Tarrand et al. (1978). Essa é uma das bactérias mais estudadas, podendo ser encontrada na forma de inoculante comercial, também recomendado para a cultura do milho. Diversos estudos são encontrados descrevendo o efeito benéfico da interação desta bactéria com diferentes culturas (LANA et al., 2012; DARTORA et al., 2013; LONGHINI et al., 2016). Hungria et al. (2010), ao inocularem espécies selecionadas de *Azospirillum* em milho e trigo, encontraram incrementos de, respectivamente, 26 e 30% na produtividade de grãos dessas culturas, além de aumentos das absorções de nutrientes pelas plantas.

As bactérias diazotróficas existem naturalmente na maioria dos solos e apresentam ampla diversidade genética. Porém, para sua utilização como inoculantes em culturas agrícolas, faz-se necessária uma seleção de estirpes eficientes para este fim (ARDAKANI et al., 2011). Em geral, as bactérias diazotróficas, ao serem inoculadas em plantas de interesse

agronômico, podem estimular seu crescimento por múltiplos mecanismos, incluindo síntese de fito-hormônios, melhoria da nutrição nitrogenada, mitigação de estresse e controle biológico da microbiota patogênica (BASHAN e BASHAN, 2010).

A hipótese científica levantada foi que a inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do milho promove alterações no crescimento e no metabolismo vegetal, e consequentemente, na produção de grãos e na absorção de macronutrientes (N, P e K).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inoculação de duas bactérias diazotróficas, a estirpe ZAE94, de *Herbaspirillum seropedicae*, e a estirpe Sp245, de *Azospirillum brasilense*, em plantas de milho, quanto à capacidade de alterar o crescimento e a absorção de nitrogênio ao longo do desenvolvimento da cultura, bem como, avaliar a sua produtividade e o rendimento no peso de mil grãos. Além disso, buscou-se avaliar o efeito dessas bactérias no metabolismo de N das plantas de milho quando cultivados em sistema hidropônico com solução nutritiva com alta e baixa concentração deste elemento.

Com base no objetivo geral, a tese foi dividida em dois capítulos:

Capítulo I: Crescimento de Milho Inoculado com Bactérias Diazotróficas na Presença de Doses Crescentes de N Fertilizante;

Capítulo II: Modificações do Metabolismo de N de Plantas de Milho Inoculadas com *Herbaspirillum Seropedicae* e *Azospirillum Brasilense*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura do Milho

As recomendações nutricionais visam atender as prováveis limitações que as plantas poderão ter durante o seu desenvolvimento, com isso, identificar os insumos a serem aplicados de maneira mais econômica ao sistema solo-planta, e estas são feitas com base na análise de solo. Assim como em outras culturas, o milho também é exigente em fertilidade e requer que suas exigências nutricionais sejam atendidas, para que possa expressar todo seu potencial produtivo, em virtude da grande extração de nutrientes do solo (Rosa, 2017).

Um dos principais entraves encontrados para o cultivo do milho está relacionado à adubação, sendo o nitrogênio (N) o nutriente que mais limita a produção (ROBERTO et al., 2010), uma vez que ele exerce funções nas diferentes etapas do metabolismo vegetal. Este nutriente é de suma importância para um bom rendimento da cultura, estando associado principalmente ao crescimento e desenvolvimento e participando na molécula de clorofila, a qual é indispensável para a manutenção da atividade fotossintética da planta (MARTIN et al., 2011).

Para que o milho alcance altas produtividades é necessário que o solo possua uma fertilidade elevada, pois essa gramínea é altamente exigente em nutrientes. A produtividade do milho é dependente de uma série de fatores que vão desde a própria cultivar até o solo, a adubação, o clima, as práticas culturais, as pragas e as moléstias (FANCELLI e DOURADO NETO, 2004; FORNASIERI-FILHO, 2007). Coelho & França, 1995, afirmam que, para a cultura do milho alcançar produtividade de 3,65 t/ha, é necessário à extração média de 77 kg N ha⁻¹, 9 kg P ha⁻¹ e 83 kg K ha⁻¹. Os mesmos autores, trabalhando com doses moderadas a altas de fertilizantes em plantas de milho, observaram que a extração de N, P, K, Ca e Mg aumentou linearmente com o aumento na produção, e que a maior exigência do milho foi de N e K, seguindo-se do Ca, Mg e P (COELHO & FRANÇA 2014). A quantidade de nutrientes extraídos dependerá da produtividade obtida e do acúmulo de nutrientes nos grãos e em outras partes da planta (POLLMER et al., 1979).

Uma das variáveis determinantes da produção, como dito anteriormente, é a obtenção e o fornecimento de nutrientes necessários para a cultura, dentre os quais se destaca o nitrogênio, por participar da composição dos aminoácidos, proteína, clorofila e muitas enzimas essenciais que estimulam o crescimento e o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular (MARSCHNER, 1995; MALAVOLTA, 2006; GAVA et al., 2010). Por isso é o nutriente absorvido em maior quantidade pela cultura do milho e, também o mais limitante para a mesma.

A cultura do milho promove uma remoção de grandes quantidades de N do solo, principalmente na forma de amônio e nitrato, que são as formas mais absorvidas pelas plantas, sendo então uma cultura que tem boa resposta à adubação nitrogenada (CANTARELLA; DUARTE, 2008; COELHO et al., 2002).

Com relação ao nitrogênio recomenda-se aplicar 35 a 50 kg ha⁻¹ de N na semeadura do milho, ao passo que, em cobertura, sugere-se aplicar em dose total ou parcelada o restante da quantidade do nutriente calculada a partir da análise de solo e a expectativa de produtividade. Essa aplicação deverá ocorrer entre os estádios de quatro folhas completamente expandidas (V4) e de oito folhas completamente expandidas (V8). No entanto, a textura do solo (< 35% de argila), a disponibilidade hídrica e a dose de N (> 150 kg ha⁻¹) são indicadores de que se deve realizar o parcelamento da adubação nitrogenada (FANCELLI, 2010). Algumas recomendações de adubação nitrogenada também se baseiam no teor de matéria orgânica do

solo, devido ao teor de nitrogênio no solo ter alta relação com a matéria orgânica (MELLO et al., 1989), apresentar alta estabilidade nos valores e facilidade na sua determinação.

2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio por Bactérias Diazotróficas

A fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução de N gasoso (N_2) à amônia (NH_3). Esse processo é realizado por alguns organismos que habitam o solo e a planta, denominados fixadores de nitrogênio e ocorre graças à ação do complexo proteico da nitrogenase, enzima que catalisa a reação rompendo a tripla ligação existente entre os dois átomos de N (POSTGATE, 1982).

Essas bactérias também denominadas como diazotróficas, se associam a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade, podendo assim ser classificadas como diazotróficas de vida livre, que fixam nitrogênio para seu próprio uso; diazotróficas associativas, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma interação muito estreita com o simbiote, que possuem uma estreita ligação entre a planta e o microrganismo (EVANS e BURRIS, 1992; HUNGRIA et al., 2007). As bactérias que possuem habilidade de colonizar os tecidos internos das plantas e estabelecer intrínsecas relações de associação com seu hospedeiro, têm apresentado eficiente fixação de nitrogênio atmosférico, como é o caso de *Herbaspirillum* (SANTI et al., 2013).

Além disso, diazotróficos endofíticos podem apresentar vantagens em relação aos diazotróficos associados às raízes, uma vez que estes se encontram mais bem localizados para explorar as fontes de carbono disponibilizadas pelas plantas. Em adição, os diazotróficos endofíticos colonizam nichos específicos no interior das plantas que apresentam reduzido contato com oxigênio, a qual é necessária para a expressão da nitrogenase (DOBBELAERE et al., 2003). As plantas são consideradas um complexo microecossistema, composto por diferentes habitats e podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande diversidade de bactérias endofíticas (LODEWYCKX et al., 2002). Tal diversidade pode representar uma grande fonte de biodiversidade, largamente inexplorada.

As bactérias diazotróficas podem promover o crescimento vegetal tanto pela FBN como pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular, como o ácido indolacético, entre outros (MOREIRA et al. 2010). Assim, as bactérias diazotróficas associativas são consideradas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal e assumem papel importante na interação com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes, entre outros. Há muitas evidências de que o milho seja beneficiado de diversas formas pela interação com bactérias diazotróficas (DARTORA et al, 2016). As formas pelas quais a associação pode beneficiar o desenvolvimento e a produtividade das plantas são: a fixação biológica de nitrogênio (URQUIAGA et al., 1992); a produção de hormônios promotores de crescimento, como o ácido indolacético (SUMAN et al., 2001); a solubilização de fosfatos, (SINGH et al., 2007; SHUKLA et al., 2008; COMPANT et al., 2010); o aumento no teor de carbono orgânico do solo; e o aumento de N e retenção de nutrientes essenciais na rizosfera (YADAV et al., 2009).

2.3 Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP)

Bactérias promotoras de crescimento são conhecidas na literatura como “bactérias promotoras do crescimento de plantas” (BPCP), podem colonizar diferentes órgãos das plantas e exercem efeitos benéficos sobre as mesmas, podendo promover aumentos na taxa de germinação de sementes, no crescimento e desenvolvimento de órgãos vegetativos, na produção de flores e no rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo (AMORIM & MELO, 2002; DEY et al., 2004).

A utilização da terminologia de bactérias promotoras de crescimento vegetal foi concebida por volta dos anos 70 (KLOEPPER; SCHROTH, 1979), e desde então vem aumentando a utilização das mesmas em pesquisas visando a interação planta-microrganismos (BABALOLA, 2010; VESSEY, 2003).

Dentre os promotores de crescimento produzidos pelas BPCP que atuam no crescimento diferencial de plantas, destaca-se a produção de fitormônios, os quais contribuem nas taxas de respiração das raízes dos hospedeiros, metabolismo e abundância de raízes, além de melhorar a captação de água e minerais pelas plantas inoculadas (BABALOLA, 2010). Os principais fitormônios produzidos pelas BPCP são auxina, giberelina, etileno e citocinina (BERGER et al., 2013; HAYAT et al., 2010). A seguir, são descritas a importância dos fitormônios que estão relacionados com a interação planta-bactéria e o crescimento diferencial das plantas:

A auxina é um dos fitormônios que apresenta maior influência na sua produção, provocada pelas BPCP e esse fitormônio é o mais relatado na literatura. Por ser o de maior importância para o desenvolvimento das plantas, pois influencia o crescimento radicular, alongação celular, diferenciação dos tecidos, promove o crescimento da planta e atua na resposta das plantas a luz e a gravidade (BALDANI e BALDANI, 2005; REINHOLD-HUREK e HUREK, 2011; VESSEY, 2003). Esse é o grupo de fitormônio mais importante produzido pelas bactérias *Azospirillum*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas* spp. e *Herbaspirillum seropedicae* (BASTIAN et al., 1998; COUILLEROT et al., 2013);

As giberelinas são outro grupo importante de fitormônios de ocorrência nas plantas, pois influenciam a germinação de sementes, a alongação do caule, o florescimento e frutificação em plantas superiores. Estudos avaliando a produção de giberelinas em diversas espécies de plantas, fungos e bactérias, verificaram a produção de quatro giberelinas (GA1, GA3, GA4 e GA20) em sete espécies de bactérias, dentre elas *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, que são BPCP de ampla ocorrência em gramíneas de importância econômica, como o milho, trigo e cana de açúcar (BASTIAN et al., 1998; MACMILLAN et al., 2011).

Outro importante fitormônio produzido pelas BPCP é o gás etileno, o qual é um produto do metabolismo da planta e é requerido na quebra da dormência de sementes, aumento no número de raízes, indução ao florescimento, abscisão de folhas e frutos e amadurecimento de frutos (BABALOLA, 2010; BABALOLA et al., 2007). As BPCP têm a capacidade de induzir a enzima 1-aminociclopropano-carboxilato (ACC) deaminase e assim regular a produção de etileno pela planta. Devido ao fato da ACC ser um precursor direto do etileno, a diminuição da concentração de etileno regulada pela bactéria em combinação com a auxina, irá resultar no crescimento da planta, em especial no desenvolvimento radicular (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011; VARGAS et al., 2012).

As citocininas são fitormônios produzidos pelas plantas e que controlam diversos mecanismos do crescimento e desenvolvimento das plantas, tais como a divisão celular, diferenciação dos cloroplastos, senescência foliar e sinalização nutricional (ARKHIPOVA et al., 2007; YONEKURA-SAKAKIBARA et al., 2004). Dentre as BPCP capazes de sintetizar citocininas, destaca-se *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Azospirillum* spp., *Arthrobacter* spp., e *Pseudomonas* spp. (ARKHIPOVA et al., 2007; HUSSAIN; HASNAIN, 2011; VESSEY, 2003).

2.3.1 *Herbaspirillum seropedicae*

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria endofítica obrigatória, e recebe essa denominação por não possuir a capacidade de sobreviver por longos períodos no solo (BALDANI et al., 1997). Sua associação com gramíneas aparentemente inicia-se com a

adesão da bactéria à superfície radicular, seguida de colonização dos pontos de emergência das raízes secundárias e penetração por descontinuidades da epiderme. Ocorrem então rápida colonização e ocupação de espaços intercelulares da raiz, assim como de aerênquima, xilema e, finalmente, partes aéreas (JAMES, 1997; RONCATO-MACCARI et al., 2003; MONTEIRO et al., 2008).

Denominadas de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV), esses microrganismos, além de realizar o processo de FBN, possuem a habilidade de estimular o crescimento vegetal com a produção de hormônios de crescimento como auxinas e giberelinas, que promovem o crescimento radicular dos vegetais (DOBBELAERE et al. 1999; LAMBRECHT et al. 2000). Essas bactérias também possuem a capacidade de produzir e secretar hormônios vegetais que estimula o crescimento das plantas, atua na defesa do hospedeiro contra microrganismos patogênicos e pode ainda influenciar diretamente o aumento da produção de grãos (SCHMIDT et al., 2011).

Para demonstrar a capacidade de fixação de nitrogênio pela bactéria, ensaios de redução de acetileno, diluição isotópica de ^{15}N , análise transcricional da expressão entre genes repórteres e *nifH*, e análise de transcritos que codificam o complexo nitrogenase através de qRT-PCR, tem sido utilizada. Estas técnicas revelam a atividade da nitrogenase em diversas bactérias endofíticas em interação com gramíneas incluindo *G. diazotrophicus*, *Azoarcus sp* e *Herbaspirillum sp.* em arroz bem como rizobactérias do gênero *Azospirillum* em interação com milho (SANTI et al., 2013).

Alguns estudos destacam a o efeito da interação desta bactéria com diferentes gramíneas. Dotto et al. (2010) verificaram que a inoculação com *H. seropedicae* resultou em incremento de 8,6% na produtividade do milho. No entanto, a existência de certo grau de especificidade de algumas bactérias diazotróficas em relação ao hospedeiro torna o genótipo da planta um fator-chave na obtenção dos benefícios oriundos da associação planta-bactéria (REIS et al., 2000). Zilli et al. (2007), avaliando a produtividade de grãos de arroz e milho inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe ZAE94), obtiveram aumentos significativos com o híbrido de milho BRS 1010, quando inoculado. No arroz não foram observados incrementos significativos, quando inoculados com a estirpe ZAE94. Ferreira et al. (2010), avaliando a sobrevivência de bactérias diazotróficas em dois inoculantes à base de turfa, verificaram que a inoculação com a estirpe ZAE94 aumentou em até 13 e 19% na produtividade e o N-total dos grãos, respectivamente, na variedade de arroz IAC4440.

Estudos realizados por Dartora et al. (2013), avaliando o efeito da inoculação em milho, observou que, na fase vegetativa, o incremento proporcionado pela inoculação combinada das estirpes de *Herbaspirillum* no diâmetro basal do colmo em relação à testemunha foi de 15% e pode ser associado ao efeito de promoção do crescimento proporcionado pelas bactérias diazotróficas.

Neiverth et al. (2014) realizam estudo em casa de vegetação com diferentes cultivares de trigo, observaram que a cultivar CD 120 apresentou um aumento nos parâmetros produtivos quando associado com *Herbaspirillum seropedicae*.

2.3.2 *Azospirillum brasilense*

Bactérias do gênero *Azospirillum* são consideradas endofíticas facultativas (BALDANI et al., 1997), pois além de colonizarem os hospedeiros podem sobreviver no solo na forma de cistos (BASHAN & HOLGUIN, 1997). Apesar da especificidade com relação a seus hospedeiros ser baixa (BALDANI et al., 1997), a associação dessas bactérias fixadoras de nitrogênio é mais frequente com gramíneas (BALDANI et al., 1999). A colonização bacteriana da rizosfera ou da superfície da planta o processo complexo, pois para que ocorra, são necessárias múltiplas etapas, que iniciam com o deslocamento do microrganismo em

direção ao sistema radicular, passando pela adesão e distribuição, ao longo das raízes, que permite a sobrevivência e o crescimento da população de endofíticos (JHA et al., 2013; GIRI; DUDEJA, 2013).

Dentre as bactérias diazotróficas, o gênero *Azospirillum* foi descrito por Tarrand et al. (1978). Bactérias deste gênero têm sido encontradas em associação com plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (MAGALHÃES & DÖBEREINER, 1984; LANGE & MOREIRA, 2002), apresentando uma distribuição ecológica ampla (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987). *Azospirillum sp.* é um dos gêneros mais estudados de bactérias promotoras do crescimento de plantas atualmente devido a sua capacidade de colonizar muitas espécies de plantas (CASSÁN E DIAZ-ZORITA, 2016).

A biofertilização baseada em inoculantes microbianos apresenta forte potencial para melhorar o crescimento das plantas, e utilização de inoculantes contendo *Azospirillum brasilense*, vem sendo muito estudados (LARSEN et al., 2015; MAHMOOD et al., 2016; PEREG et al., 2016). Um exemplo é o que a Embrapa Soja desenvolvendo trabalhos testando diferentes estirpes de *A. brasilense* e *A. lipoferum* nas culturas do milho e do trigo demonstraram que a inoculação com *A. brasilense* proporcionou incrementos de 24 a 30% no rendimento de grãos da cultura do milho em relação ao controle sem inoculação resultando na identificação das primeiras estirpes autorizadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil (HUNGRIA et al., 2010).

Outros autores associam os aumentos na produção de biomassa seca ao estímulo que *A. brasilense* fornece para o desenvolvimento do sistema radicular, com o aumento da densidade e duração da raiz e do volume de raízes laterais, resultando em uma maior capacidade de exploração do solo e melhor utilização de água e nutrientes presentes (HUERGO et al, 2008).

Fernandes et al. (2008), diz que somente parte do nitrogênio requerido pela cultura do milho é fornecida pela bactéria *Azospirillum spp.* sendo necessário a complementação da adubação de nitrogênio, por apresentar grande importância devido ao N ser um dos nutrientes mais relevantes no aumento de rendimento da cultura.

Estudos realizados por Pankievicz et al. (2015), demonstraram que *Setaria viridis*, uma espécie de gramínea, inoculada com mutante excretador de amônio *Azospirillum brasilense*, cepa HM053, foi capaz de fixar o nitrogênio necessários para suprir a demanda diária de N da planta. Isto indica que, sob condições adequadas, *Setaria viridis* pode obter nitrogênio suficiente via fixação biológica de nitrogênio para promover o crescimento das plantas.

Estudo realizado em pastagem com essa bactéria, possibilitou reduzir as quantidades de N-fertilizantes aplicadas sem comprometer importantes componentes do rendimento, como o acúmulo de matéria seca e a altura das plantas (VOGEL et al., 2014).

2.4 Análise do Crescimento Vegetal

A análise de crescimento pode ser utilizada para estudar tanto o desenvolvimento de espécies vegetais quanto animais, contribuindo para melhor conhecimento dos fenômenos envolvidos nesse processo. Este tipo de análise pode ser de grande valor na avaliação das diferenças entre cultivares e também das características que definem a capacidade produtiva das plantas (SORATO, 2012).

A análise de crescimento tem sido usada por pesquisadores na tentativa de explicar diferenças no crescimento de ordem genética ou resultante de modificações do ambiente e constitui ferramenta eficiente para a identificação de ambientes favoráveis, além de identificar características que, no crescimento inicial, indiquem possibilidade de aumento no rendimento da planta adulta, favorecendo os trabalhos de melhoramento na busca de materiais mais produtivos (COSTA et al.,2011).

O estudo do crescimento vegetal é extremamente importante, pois conhecer como ocorre esse crescimento pode contribuir para determinar um manejo mais adequado da cultura e detectar possíveis problemas de desenvolvimento na lavoura.

O termo “análise de crescimento” se refere a uma série de métodos quantitativos que descrevem e interpretam o desempenho de uma planta crescendo sob condições naturais, ou controladas, dando uma aproximação explicativa, holística e integral para interpretar as formas e funções da planta (HUNT, 2003). Pereira & Machado (1987) consideram a análise de crescimento como método padrão para se medir a produtividade biológica de uma cultura, permitindo o estudo de diferentes cultivares de uma determinada cultura em seu ambiente de produção, requerendo informações que podem ser obtidas sem a necessidade de equipamentos sofisticados.

Entre as metodologias disponíveis, a análise de curva de crescimento apresenta grande destaque, a qual envolve o ajuste de modelos de regressão e serve ao propósito de estimar as causas do crescimento, inferindo sobre as contribuições dos diversos processos presentes no desenvolvimento vegetal. Dentre os vários tipos de modelos aplicáveis para esse fim, destacam-se os modelos de regressão não-lineares, os quais podem contribuir ou, até mesmo, facilitar a interpretação dos processos envolvidos no crescimento das plantas, já que seus parâmetros possibilitam interpretações práticas mais eficientes (SORATO, 2012).

A análise de crescimento, no contexto vegetal, refere-se a um conjunto útil de métodos quantitativos que descrevem e interpretam o desempenho de todo o sistema vegetal, seja ele cultivado em condições naturais, semi-naturais ou controladas. O crescimento, ainda nesse contexto, representa um aumento irreversível de alguns atributos físicos do vegetal, especialmente do material protoplasmático (HANT, 1978).

A análise de crescimento se baseia fundamentalmente no fato de que cerca de 90%, em média, da fitomassa seca acumulada pelas plantas, durante seu crescimento resulta da atividade fotossintética. Essa análise expressa as condições morfofisiológicas da planta e avalia sua produção líquida, derivada do processo fotossintético, resultado do desempenho do sistema assimilatório durante certo período de tempo (BENINCASA, 2003) e contribui para uma visão detalhada e até econômica de uma cultura (CHARLO, 2008).

No início do século XX alguns autores já demonstravam que várias estimativas de parâmetro de crescimento podiam ser derivadas de dados simples de medidas realizadas a campo (BLACKMAN, 1919; BRIGGS et al. 1920; FISHER, 1920; WEST et al., 1920) sendo, posteriormente, objeto de numerosos estudos que provocaram desenvolvimento adicional, especialmente em técnicas matemáticas (VERNON & ALLISON, 1963; RADFORD, 1967). Sendo assim, considerada em todo mundo como método padrão para a estimativa da produtividade biológica ou produtividade primária de comunidades vegetais (CRUZ, 2007; PEIXOTO & PEIXOTO, 2009; TSUMANUMA, 2009).

A dinâmica do crescimento vegetal pode ser acompanhada por meio de fórmulas matemáticas, sendo o primeiro passo utilizado para quantificar a produção vegetal, possibilitando avaliar a contribuição dos diferentes órgãos no crescimento final das plantas. A principal vantagem está na obtenção de informações a intervalos regulares, sem a necessidade de laboratórios e/ou equipamentos muito sofisticados, uma vez que as informações necessárias para levar a frente tais análises são a massa da matéria seca (fitomassa) da planta e a dimensão da área fotossintetizante (área foliar) (PEIXOTO et al. 2011).

Os fatores ambientais afetam as plantas diretamente, que pode ser por meio de alterações no metabolismo. A redução de recursos necessários para a produção (energia luminosa, CO₂, água e minerais) e a presença de toxinas ou temperaturas extremas fazem com que as plantas apresentem alterações em suas taxas ou padrões de crescimento, pois o crescimento é consequência dos processos metabólicos que foram afetados (FITTER, 1987).

Para a realização de uma análise de crescimento de maneira eficiente, vários tipos de modelos estatísticos podem ser utilizados (modelos lineares e não-lineares), de acordo com suas características, com a função de facilitar a interpretação dos processos envolvidos no sistema de produção vegetal (SORATO, 2012).

2.5 Metabolismo de Nitrogênio

A assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas, apresentando efeitos marcantes sobre a fitomassa e a produtividade final das culturas. Apesar de ser vital, é um processo dispendioso energeticamente às plantas, razão pela qual ocorre predominantemente nas folhas, centro de síntese de ATP e agentes redutores - fornecedores de elétrons (ANDRADE NETTO, 2005; SILVA, et al., 2010).

As duas principais formas em que o nitrogênio está presente no solo e disponível para as plantas são, na forma nítrica ($N-NO_3^-$) e na forma amoniacal ($N-NH_4^+$) (ARAÚJO et al., 2012), que é absorvido pelas raízes e translocado para folhas e caules (REICHARDT & TIMM, 2012). A nitrato redutase é considerada uma enzima muito importante na regulação do metabolismo do N, já que o nitrato absorvido pelas raízes deve ser reduzido a NH_4^+ antes de ser incorporado em compostos orgânicos no sistema radicular ou na parte aérea (PURCINO, et al., 1994; DEBOUBA, et al., 2013).

A NR das plantas superiores é uma flavoproteína formada por duas subunidades idênticas, com três grupos prostéticos: a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), o grupo heme, um complexo constituído entre o molibdênio (Mo) e uma molécula orgânica denominada pterina, razão porque é, também, denominada uma molibdopterina (CAMPBELL, 1999). A NR é regulada por uma série de estímulos ambientais e intrínsecos à planta, que regulam os mecanismos transcripcional, traducional e pós-traducional (CAMPBELL, 1999; KAISER; et al, 1999).

A via de assimilação do nitrato é um processo biológico essencial, por ser o principal caminho pelo qual o nitrogênio inorgânico é incorporado em compostos orgânicos (FALCÃO, 2006). Portanto, a atuação desta enzima é de fundamental importância na incorporação de nitrogênio inorgânico em moléculas orgânicas complexas, sendo a etapa limitante nesse processo. O NO_3^- absorvido pelas plantas pode ser assimilado nas raízes ou na parte aérea e também em ambos os locais (FORDE, 2002), para que isso ocorra, inicialmente o NO_3^- deve ser reduzido a NH_4^+ . A redução de nitrato ocorre no citossol e envolve a ação da enzima nitrato redutase (NR), produzindo nitrito, o qual adentra aos plastídeos nas raízes ou cloroplastos em folhas, sendo reduzido à amônia por ação da enzima nitrito redutase, a qual é fixada via glutamato sintase / glutamina sintase (GS/GOGAT) nos aminoácidos. A glutamina e o glutamato produzidos servirão de substrato para as reações de transaminação, para a produção de aminoácidos necessários à síntese de proteínas (DONATO, et al., 2004; LISERON- -MONFILS et al., 2013; LI et al., 2013).

As frações solúveis são variáveis de grande importância fisiológicas para as plantas, tais como o acúmulo de NO_3^- , N-amino e açúcares solúveis e NH_4^+ , são de fundamental importância para a pesquisa sobre nutrição de plantas e da nutrição nitrogenada (MARSCHNER, 1995; COMETTI, et al. 2004), além de poder ser utilizada como indicativo de estresse nutricional ou ambiental para as plantas, para estes tipos estresse a elevação dos teores de N-amino são indicativos (FERNADES, 1983).

CAPÍTULO I

CRESCIMENTO DE MILHO INOCULADO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA PRESENÇA DE DOSES CRESCENTES DE N FERTILIZANTE

2.6 RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito da inoculação de duas bactérias diazotróficas, a estirpe ZAE94, de *Herbaspirillum seropedicae*, e a estirpe Sp245, de *Azospirillum brasilense*, em plantas de milho, quanto à capacidade de alterar o crescimento e a absorção de nitrogênio ao longo do desenvolvimento das plantas, foram desenvolvidos dois experimentos de campo. O primeiro foi cultivado na safra de verão de 2015/2016 e o segundo na safra de inverno 2016. Em ambos os experimentos, adotou-se o arranjo fatorial composto por quatro níveis de adubação (0, 50, 100 e 150 kg N ha⁻¹), com diferentes inoculações (NI - não inoculado, Hs - *Herbaspirillum seropedicae* e Ab - *Azospirillum brasilense*), em quatro repetições. Os parâmetros avaliados foram: massa seca de parte aérea, área foliar, acúmulo de massa seca (W), índice de área foliar (IAF), taxa de crescimento da cultura (TCC), taxa de assimilação líquida (TAL), acúmulo de N na planta, produtividade, massa de 1000 grão e acúmulo de N no grão. A época de plantio influenciou na resposta das bactérias, pois na safra de verão foi possível observar as respostas mais expressivas, a inoculação promoveu o aumento no acúmulo de matéria seca e no índice de área foliar das plantas de milho, conseqüentemente, influenciando a TCC e a TAL. A inoculação promoveu um alongamento do período crescimento vegetativo, retardando a senescência foliar das plantas, que refletiu na produção de massa seca e no índice de área foliar. O efeito da inoculação da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* estirpe ZAE94 sobre a produtividade da cultura, foi evidenciado quando associada a dose de 100 kg N ha⁻¹, apresentando aumento de 35,8% na produtividade quando comparado ao tratamento controle, já a inoculado com *Azospirillum brasilense* quando associada esta mesma dose de nitrogênio apresentou aumento de 23,9% quando comparada a controle, esse ganho de produtividade foi observado na safra de verão. Para o peso de 1000 grãos e o acúmulo de N nos grãos a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* promoveu os maiores rendimentos, principalmente quando associado a dose de 100 kg N ha⁻¹.

Palavras chave: Análise do crescimento vegetal. Inoculação. *Herbaspirillum seropedicae*. *Azospirillum brasilense*.

2.7 ABSTRACT

In order to evaluate the effect of the inoculation of two diazotrophic bacteria, strain ZAE94, from *Herbaspirillum seropedicae*, and strain Sp245, from *Azospirillum brasilense*, on maize plants, on the ability to alter growth and nitrogen uptake over of the development of the plants, two field experiments were developed. The first one was cultivated in the summer crop of 2015/2016 and the second in the winter crop 2016. In both experiments, the factorial arrangement was composed of four levels of fertilization (0, 50, 100 and 150 kg N ha⁻¹), with different inoculations (NI - uninoculated, Hs - *Herbaspirillum seropedicae* and Ab - *Azospirillum brasilense*), in four replicates. The parameters evaluated were: aerial part dry mass, leaf area, dry matter accumulation (W), leaf area index (LAI), crop growth rate (TCC), net assimilation rate (TAL), N accumulation in the plant, yield, mass of 1000 grains, N accumulation in the grain. The planting time influenced the response of the bacteria, where in the harvest it was possible to observe the most expressive responses, the inoculation promoted the increase in dry matter accumulation and in the leaf area index of maize plants, consequently, influencing CBT and SUCH. The inoculation promoted an elongation of the vegetative period (2nd stage of the development of the crop), delaying the foliar senescence of the plants, which reflected in the dry mass production and in the leaf area index. In general, the effect of the inoculation of the diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* strain ZAE94 on the yield of the crop, the weight of 1000 grains and the accumulation of N in the grains, where the highest yields were found in the treatments inoculated with this bacterium, especially when associated the dose of 100 kg N ha⁻¹.

Key words: Plant growth, diazotrophic bacteria, inoculation.

2.8 INTRODUÇÃO

A utilização crescente e de forma indiscriminada, de fertilizantes nitrogenados tem resultado na contaminação dos lençóis freáticos e das águas superficiais. Isso ocorre devido à alta mobilidade que esse nutriente possui no solo, que pode ser lixiviado para o lençol ou então carreado via escoamento superficial aos mananciais, provocando a eutrofização dos ambientes aquáticos.

A identificação de formas de manejo da lavoura que possam diminuir a demanda nitrogenada das culturas, com baixo custo de produção e limitado impacto ambiental, torna-se cada vez mais importante para aumentar a margem líquida do produtor, preservar o ambiente e garantir segurança alimentar para a população mundial (SANGOY, 2013).

Diferentes linhas de pesquisa vêm sendo desenvolvidas: a) através do melhoramento vegetal, com o uso de plantas mais eficientes na utilização do nitrogênio, buscando melhorar a capacidade da planta em aproveitar o nutriente oferecido; b) utilização de fertilizantes de eficiência aumentada, com a capacidade de liberar o nutriente de forma controlada; c) utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN) em gramíneas, que teve início e desenvolvimento com os estudos da Doutora Johanna Döbereiner.

Dentre as alternativas destaca-se o uso de bactérias diazotróficas, capazes de fixar nitrogênio biologicamente e de produzir substâncias promotoras de crescimento vegetal. Algumas plantas podem formar associações com estas bactérias e obter N por meio da fixação biológica. Várias bactérias foram isoladas da cultura do milho, destacando-se as espécies *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* (REIS et al, 2000).

Existem diferentes formas de avaliar o efeito das bactérias diazotróficas na cultura do milho. Uma delas é através da análise do crescimento vegetal, onde pode ser observada nas diferentes fases fenológicas da cultura a contribuição que as bactérias possam estar promovendo em relação ao desenvolvimento das plantas.

A análise de crescimento consiste na medida do acúmulo de matéria seca e descreve as condições morfológicas das plantas em diferentes intervalos de tempo, permitindo avaliar o crescimento final da planta como um todo, e a contribuição dos diversos órgãos no crescimento total da planta (MAGALHÃES, 1985). Esse método tem sido utilizado para investigar efeitos de fenômenos ecológicos incluindo, adaptabilidade, diferenças genotípicas na capacidade produtiva, efeitos de competição e influência de práticas agrônomicas, sobre o crescimento das plantas. Destina-se à avaliação da produção líquida derivada do processo fotossintético, que é resultado do desempenho do sistema assimilatório durante certo período de tempo. O fundamento do método se baseia principalmente no fato de que cerca de 90% da massa seca produzida pela planta ao longo do seu crescimento resulta da atividade fotossintética (BENINCASA, 2003).

A dinâmica do crescimento vegetal pode ser acompanhada através de fórmulas matemáticas, sendo o primeiro passo utilizado para quantificar a produção vegetal. Sua principal vantagem está na obtenção de informações em intervalos regulares de tempo sem a necessidade de laboratórios e equipamentos sofisticados, uma vez que as informações necessárias para a análise, são a massa da matéria seca da planta e as dimensões da área foliar.

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da inoculação de duas bactérias diazotróficas, a estirpe ZAE94, de *Herbaspirillum seropedicae*, e a estirpe Sp245, de *Azospirillum brasilense*, em plantas de milho, quanto à capacidade de alterar o crescimento e a absorção de nitrogênio ao longo do desenvolvimento da cultura, bem como, avaliar a sua produtividade e o rendimento no peso de mil grãos das plantas.

2.9 MATERIAL E MÉTODOS

2.9.1 Área de Estudo

Os estudos foram realizados na área experimental da Embrapa Agrobiologia, localizada no município de Seropédica – RJ, que geograficamente está situada na latitude 22° 45' sul, longitude 43° 41' oeste e altitude 33 metros. O tipo de solo da área experimental é uma Planossolo Háptico e na Figura 1 são apresentados os dados climáticos referentes ao ano agrícola 2015/2016.

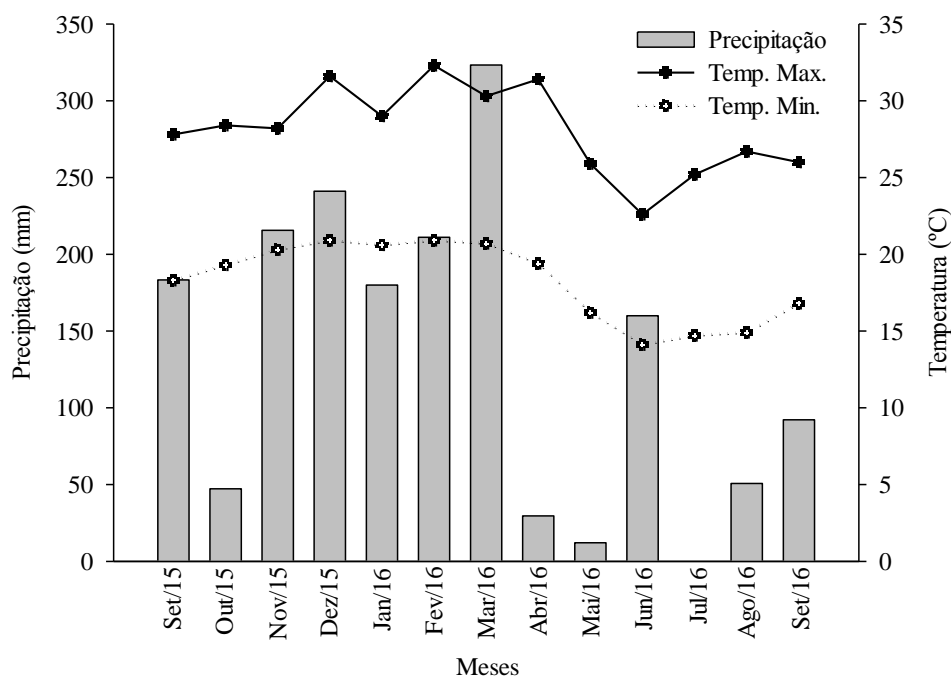


Figura 1. Dados climáticos do ano agrícola 2015/2016, onde pode ser observado as temperaturas máxima e mínima e a média de precipitação para cada mês ao longo do ano agrícola.

Foram implantados dois experimentos durante os períodos de plantio de primeira e segunda safra no ano agrícola de 2015/2016. Para isto foi utilizado o genótipo de milho híbrido SHS 5050. Esse híbrido é classificado como super precoce com ciclo médio de 110 dia, com início do ciclo reprodutivo até 60 dias. O primeiro experimento foi cultivado entre os meses de outubro de 2015 e fevereiro de 2016, já o segundo foi desenvolvido entre os meses de março e julho de 2016.

A área de plantio foi preparada de maneira convencional, através de aração e gradagem nas duas épocas de plantio. Após o preparo do solo a área foi sulcada, cada sulco de plantio possuía profundidade média de 15 cm, para que fosse possível realizar a adubação no sulco de plantio, sem que comprometer a germinação das sementes. Após a germinação o estande de plantas foi padronizado para 5 plantas por metro linear. Para diminuir o efeito dos tratamentos entre as parcelas, optou-se em espaçalas em 1,4 m, como pode ser observado na Figura 2.



Figura 2. Visão aérea da disposição do experimento, de realizado na safra de inverno, março a julho 2016.

Com base nos resultados da análise química do solo (Tabela 1) foi realizada adubação de acordo com a recomendação do Manual de Calagem e Adubação do Estado do Rio de Janeiro (FREIRE, et al. 2013). A adubação de fósforo (P), potássio (K), nas doses de 80 kg de P_2O_5 e 60 kg de K_2O por hectare respectivamente, em ambos os experimentos. Associado a essa adubação de P e K foi acrescentado uma formulação de micronutrientes na dose de 50 kg ha^{-1} . Já o N foi aplicado em cobertura em uma única vez 20 dias após a emergência da planta. As formulações comerciais utilizadas foram, para N foi o sulfato de amônia, P superfosfato simples, K cloreto de potássio e os micronutrientes foram acrescentados na forma de FTE Br 12 que era composto por, 7,1% de Ca; 5,7% de S; 1,8% de B; 2,0% de Cu; 0,1% de Mo e 9,0% de Zinco.

Tabela 1. Análise química de solo da área experimental.

pH em água	%C	Al	Ca	Mg	P	K
	cmolc dm^{-3}				mg L^{-1}	
6,28	0,67	0,00	1,86	0,74	17,67	70

OBS.: Procedimentos baseados no "Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Animal e Alimentos Embrapa NOGUEIRA & SOUZA, 2005".

Durante a condução dos experimentos quando necessário foi realizada irrigação, através de um sistema por aspersão. Para o controle de lagarta do cartucho, foi utilizado o defensivo recomendado para o controle da praga na cultura, respeitando as doses recomendadas e os períodos de carência do produto. O controle de plantas invasoras, foi realizado de forma manual através de capinas, sempre quando necessários.

2.9.2 Preparo dos Inoculantes e Inoculação

Foram utilizadas as bactérias *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe ZAE94 (= BR11417, isolada de raízes esterilizadas de arroz) e a *Azospirillum brasilense* estirpe Sp245 (= BR11005 – isolada de raízes de trigo plantado no Rio Grande do Sul, Brasil), bactérias essas que foram adquiridas junto ao Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner –

CRB-JD (sigla BR). A estirpe ZAE94 foi selecionada para milho baseado nos estudos prévios de Alves et al. (2015) e a estirpe Sp245 foi amplamente estudada por diferentes grupos, tendo seu genoma sequenciado por Zhulin and Wisniewsky-Dye (dados preliminares do projeto de sequenciamento do genoma disponível em <http://genomics.ornl.gov/research/azo>). Neste estudo a estirpe Sp245 foi utilizada como modelo de interação planta-bactéria.

As estirpes foram inicialmente crescidas em placas com meio de cultura sólido JNFb (BALDANI et al., 2014) com o objetivo de verificar a pureza. Para obtenção dos inoculantes, colônias puras foram inoculadas em tubos com 5 mL de meio DYGS (BALDANI et al., 2014) e multiplicadas por 24 h a 30°C em mesa agitadora a 175 rpm. Após esta etapa, 100 µl da suspensão foi inoculado em frascos contendo 75 mL do mesmo meio e multiplicado nas mesmas condições descritas anteriormente. A densidade óptica foi realizada a 600nm e ajustada para 1 de modo a obter um inóculo contendo aproximadamente 10^9 células mL⁻¹ e esta suspensão final foi inoculada em 175 g de uma turfa seca previamente moída, homogeneizada, autoclavada e ajustada em pH a 6,0. Pouco depois da inoculação, a turfa inoculada foi mantida a 30 °C durante 24 h, antes da aplicação final. Após este período, as sementes foram cobertas com o inóculo de turfa na razão de 250 g para 10 kg de semente de milho. O tratamento não inoculado recebeu a turfa autoclavada para um inoculante.

2.9.3 Condições Experimentais

O delineamento experimental utilizado, para os experimentos, foi em blocos ao acaso com o arranjo fatorial de 4x3 em 4 repetições, totalizando 48 unidades experimentais. Onde o primeiro fator foi composto de 4 doses de nitrogênio (0, 50, 100, 150 kg de N ha⁻¹) e o outro fator composto por 3 inoculações (NI – não inoculação, Hs – *Herbaspirillum seropedicae* e Ab – *Azospirillum brasilense*). Cada unidade experimental foi composta de 9 linhas com 5 metros cada linha, o espaçamento utilizado foi de 0,7 metros entre linhas com 5 plantas por metros linear, totalizando uma área de 31,5 m², para cada parcela. Como base no espaçamento utilizado a população de plantas foi de 71500 plantas ha⁻¹.

2.9.4 Análise do Crescimento Vegetal

Para a avaliação do crescimento vegetal em ambos os experimentos foram realizadas sete coletas distribuídas no tempo. Para o experimento desenvolvido na safra de verão, as coletas tiveram início 14 dias após a emergência (DAE) das plantas, com intervalo de sete dias entre as coletas, até a 5ª coleta. A partir desta coleta o intervalo foi de 14 dias entre as coletas. No experimento conduzido na safra de inverno houve uma pequena alteração no intervalo das coletas, onde a primeira coleta teve início 14 DAE das plantas, com um intervalo de sete dias entre as coletas, até a coleta 4, após esta coleta o intervalo passou a ser de 14 dias.

Durante as coletas os fatores avaliados foram massa seca de parte aérea (W), área foliar para determinação do Índice de Área Foliar (IAF). A partir destes parâmetros foram calculados a Taxa de Assimilação Líquida (TAL) e a Taxa de Crescimento da Cultura (TCC), teor de nitrogênio total, e ao fim do experimento foi avaliado produtividade de grão, massa de 1000 grãos e o N acumulado no grão.

2.9.5 Coletas

Para a realização da análise de crescimento foram coletadas três plantas por parcela, e a partir destas plantas foram realizadas as avaliações de massa seca de parte aérea e área foliar. Para a determinação da área foliar as plantas foram levadas imediatamente após a coleta para o laboratório, onde foi realizado as medidas de área foliar, para isso utilizando-se um integrador de área, LICOR 3100. Após esse processo, tanto as folhas como os colmos foram dispostos em saco de papel e levando a estufa de circulação forçada a 60°C para a

determinação da massa seca. Na Figura 3, pode ser observado o procedimento que foi utilizado em ambos os experimentos para as coletas realizadas ao longo do tempo do experimento, e a área da parcela que foi utilizada para a determinação da produtividade e peso de mil grãos.

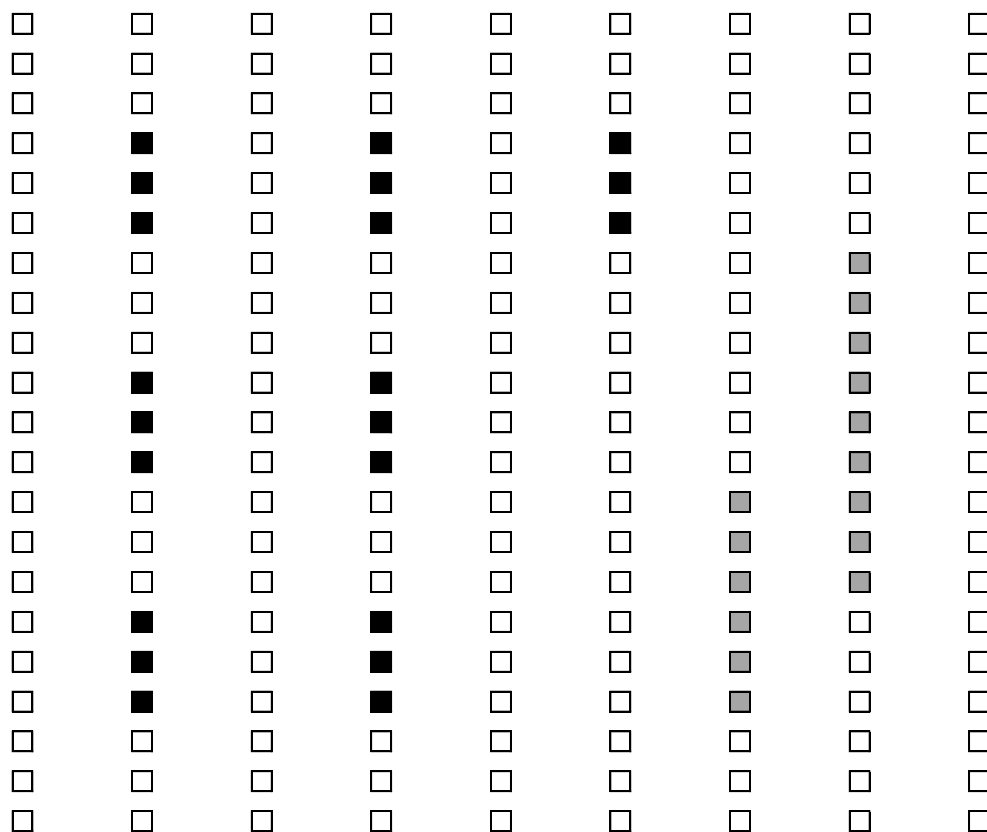


Figura 3. Representação da forma de coleta das plantas para análise de crescimento e produtividade, na parcela. □ Representam as plantas que foram deixadas como bordadura, ■ representam as plantas coletadas para a análise de crescimento e ■ representam as plantas que foram coletadas para quantificar a produtividade e peso de mil grão.

2.9.6 Avaliações Realizadas

Após a determinação da massa seca o material vegetal foi moído, em moinho do tipo willey em malha de 2 mm, para posterior determinação do N total da amostra. A determinação do N foi feita através de digestão sulfúrica como descrito por Malavolta et al., 1997.

Além do teor de N na massa seca da planta, também foi determinada a produtividade de grãos. Para isso foram coletadas 15 plantas de cada parcela, onde após a coletas as espigas foram debulhadas e o montante de grãos das 15 plantas foi pesado. A partir desse montante se retirava uma alíquota, para a determinação do teor de umidade dos grãos e a partir desta determinação corrigia-se a umidade do volume total de grão de cada parcela, para a umidade de 13%. Desta mesma alíquota era determinado o teor de N nos grãos. Para quantificar o teor de N no grão utilizou a mesma metodologia descrita para a determinação de N na massa seca de parte aérea. Além da umidade e do teor de N também foi realizado a partir desta alíquota a massa de mil grãos.

2.9.7 Taxa de Crescimento

Para a determinação das taxas de crescimento vegetal foi utilizado o método funcional de análise de crescimento. Para isso os dados primários coletados tanto de parte aérea quanto de área foliar, foram transformados em \ln , e a partir desta transformação foi utilizada a equação que melhor se ajustou aos dados. Neste caso, polinomial de segunda ordem para ambos os parâmetros. E a partir desta equação foi calculado a massa seca de parte aérea (W) e o índice de área foliar (IAF), taxa de crescimento da cultura (TCC) e a taxa de assimilação líquida (TAL), como descrito abaixo:

A massa seca foi ajustada a uma função exponencial polinomial de segunda ordem, $W = \text{Exp}(a+bt+ct^2)$ e sua linearização obtida por $\ln W = a + bt + ct^2$. Onde W significa os dados observados, t o tempo em dias após o plantio e os coeficientes a , b e c , obtidos por regressão, mediante o uso de planilha eletrônica. Da mesma forma a massa seca e o índice de área foliar (IAF) foram ajustados a uma função exponencial polinomial de segundo grau:

$$\text{IAF} = \exp(e + ft + gt^2)$$

$$\ln \text{IAF} = e + ft + gt^2$$

Assim foi possível obter por derivação os valores instantâneos das taxas de crescimento da cultura (TCC) e da taxa de assimilação líquida (TAL) (HUNT, 1982). A opção do modelo exponencial de 2º grau se deu em função do R^2 observado e do significado biológico das curvas obtidas.

A Taxa de Crescimento da Cultura (TCC) em $\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ representa a variação da massa seca acumulada pela planta, ao longo de um intervalo de tempo. Adotando o modelo exponencial polinomial de 2º grau tem-se que, a um dado instante de tempo (t), a sua derivada primeira vale:

A Taxa de Crescimento da Cultura (TCC) em $\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ representa a variação da massa seca acumulada pela planta, ao longo de um intervalo de tempo

$$\text{TCC} = dW / dt$$

Adotando o modelo exponencial polinomial de 2º grau, tem-se que, a um dado instante de tempo (t):

$$\text{TCC} = (b + 2ct) (a + bt + ct^2)$$

A taxa de assimilação líquida (TAL) representa a taxa de incremento da massa seca por unidade de área foliar existente na planta, expressa em $\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. Desta forma a TAL foi obtida por:

$$\text{TAL} = (1 / \text{IAF}) (dW / dt), \text{ desta forma a TAL foi obtida por:}$$

$$\text{TAL} = (b + 2ct) (a + bt + ct^2) / (e + ft + gt^2)$$

As curvas referentes aos acúmulos de nutrientes e suas respectivas taxas de acumulação absoluta de nutrientes foram obtidas seguindo a mesma metodologia descrita a cima para matéria seca.

2.9.8 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010). Onde os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Exceto o teste de homogeneidade das variâncias (teste de COCKRAN & BARTLET) que foi realizado utilizando o programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 2004). Atendendo assim, as pressuposições necessárias para a avaliação dos dados por testes paramétricos.

Os dados, após os testes de normalidade e homogeneidade, foram submetidos a análise de variância e, quando significativo os tratamentos, estes foram submetidos a testes de média. O teste de média utilizado foi o teste t a 5% de probabilidade, quando as variáveis avaliadas eram de natureza qualitativa (inoculação).

2.10 RESULTADOS

2.10.1 Acúmulo de Massa Seca (W)

A partir do ajuste dos dados originais de matéria seca, foram obtidos os coeficientes e o R^2 dos modelos ajustados (Tabela 2) e suas correspondentes curvas de acúmulo. Observa-se que todos os modelos apresentaram um bom ajuste, com R^2 acima de 93 %.

Tabela 2. Coeficientes dos modelos exponencial polinomial de 2º grau ajustados aos dados de massa seca, para as safras de verão e inverno.

Tratamentos		Safrá Verão		Safrá inverno	
		Equação	R ²	Equação	R ²
Zero N	NI	$y = -0,0012x^2 + 0,1528x + 1,8247$	0,98	$y = -0,0013x^2 + 0,1715x + 1,0628$	0,96
	Hs	$y = -0,001x^2 + 0,1483x + 1,8333$	0,99	$y = -0,001x^2 + 0,1422x + 1,6204$	0,96
	Ab	$y = -0,0011x^2 + 0,1562x + 1,6445$	0,99	$y = -0,0012x^2 + 0,1668x + 1,0602$	0,98
50 kg N ha ⁻¹	NI	$y = -0,0011x^2 + 0,1544x + 1,798$	0,99	$y = -0,0013x^2 + 0,1733x + 0,8998$	0,95
	Hs	$y = -0,001x^2 + 0,1367x + 2,1656$	0,98	$y = -0,0013x^2 + 0,1681x + 0,8671$	0,93
	Ab	$y = -0,001x^2 + 0,1428x + 2,0404$	0,99	$y = -0,0012x^2 + 0,1596x + 1,2849$	0,97
100 kg N ha ⁻¹	NI	$y = -0,0013x^2 + 0,1719x + 1,55$	0,99	$y = -0,0013x^2 + 0,1707x + 0,9416$	0,96
	Hs	$y = -0,0009x^2 + 0,1376x + 1,973$	0,99	$y = -0,0014x^2 + 0,1814x + 0,8138$	0,96
	Ab	$y = -0,0011x^2 + 0,152x + 1,7003$	0,99	$y = -0,001x^2 + 0,1446x + 1,4359$	0,97
150 kg N ha ⁻¹	NI	$y = -0,0012x^2 + 0,1693x + 1,442$	0,99	$y = -0,0013x^2 + 0,1807x + 0,7236$	0,95
	Hs	$y = -0,0008x^2 + 0,1268x + 2,3162$	0,99	$y = -0,001x^2 + 0,1463x + 1,3984$	0,94
	Ab	$y = -0,001x^2 + 0,1416x + 1,9388$	0,99	$y = -0,0009x^2 + 0,1307x + 1,7729$	0,98

Analisando os resultados de (W) em ambos os experimentos, nota-se que o desenvolvido no período de verão (Figura 4), apresentou valores de W superior ao experimento cultivado na safra de inverno (Figura 5), onde o pico máximo acumulado na safra de verão foi de 1500 g m⁻², enquanto que na safra de inverno foi próximo de 1100 g m⁻².

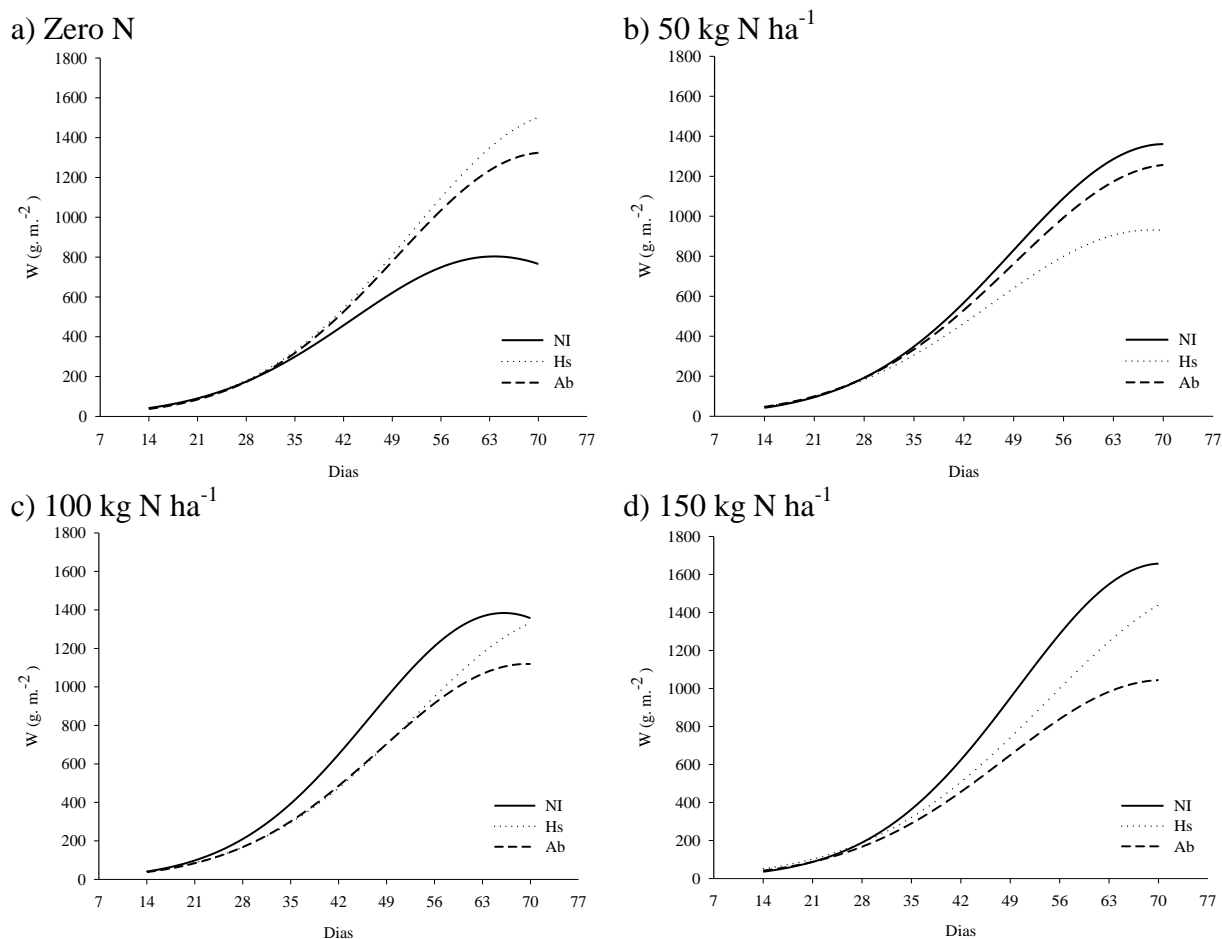


Figura 4. Acúmulo de matéria seca (W) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2º grau. Ensaio conduzido na Estação Experimental Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ; entre o período de outubro 2015 a fevereiro 2016 – Safra de Verão.

Para os dados de acúmulo W das plantas de milho, foi ajustada a equação do tipo polinomial de 2ª ordem (Figura 4 e Figura 5), comportamento esse também observado por outros pesquisadores, que trabalharam com híbrido simples de milho (GAVA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013). Pode-se notar que o crescimento do milho se divide em 3 fases, onde a primeira vai dos 14 aos 35 dias após a emergência (DAE), fase em que a planta acumula pouca massa seca; a segunda fase vai dos 35 a 56 DAE, onde as plantas acumulam grande quantidade massa seca, quase que linearmente; e a terceira fase, após aos 56 DAE, período em que a planta entra no estágio final de desenvolvimento. Outros pesquisadores também observaram essas 3 fases de crescimento, onde eles afirmam que, ocorre uma fase inicial de crescimento lento, seguida de uma fase de crescimento rápido, com acúmulo de 80-90% de toda a matéria seca, logo após podendo ocorrer uma fase final em que o crescimento se torna novamente lento, acumulando cerca de 7-9% da matéria seca total (LUCCHESI, 1984; GAVA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013).

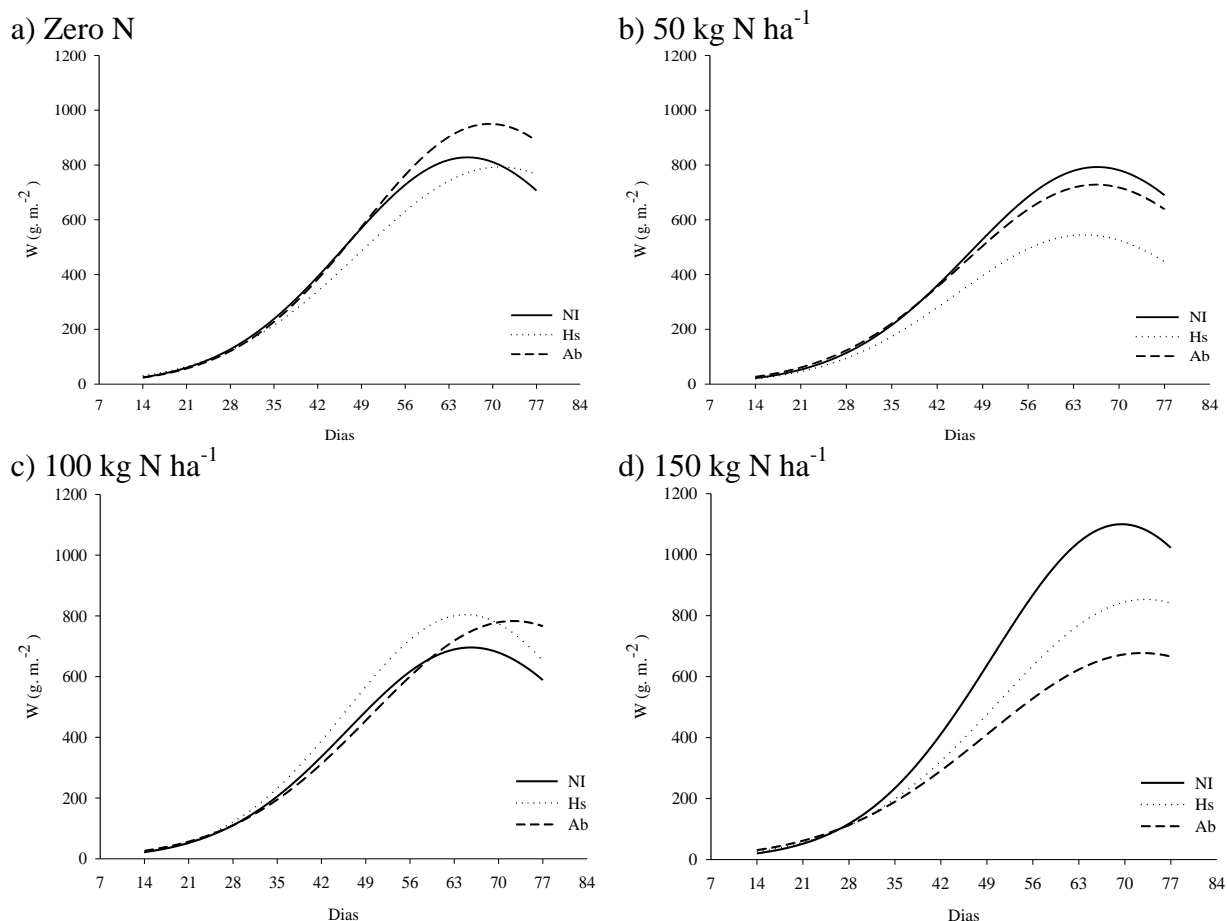


Figura 5. Acúmulo de matéria seca (W) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2º grau. Ensaio conduzido na Estação Experimental Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ; entre o período de março a julho 2016 - Safra Inverno.

Quanto ao efeito da inoculação nas diferentes doses de N, pode-se observar que na ausência de adubação no experimento de verão (Figura 4a), a inoculação promoveu aumento no W a partir dos 35 DAE. Aos 70 DAE, ponto máximo de W, a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* promoveu um incremento de 96% e a inoculação com *Azospirillum brasilense* de 73%, quando comparado ao tratamento não inoculado (NI).

Para o experimento de inverno (Figura 5), há uma diferença na resposta da inoculação quando comparado ao observado no verão, pois a partir do 35 DAE, nota-se diferença no W, onde os tratamentos que apresentam maior acúmulo foram o inoculado com *Azospirillum brasilense* e o não inoculado, quando comparados ao inoculado com *Herbaspirillum seropedicae*. Outra diferença nos resultados observados em relação a safra de verão, ocorreu aos 49 DAE, onde a inoculação com *Azospirillum brasilense* passou a apresentar acúmulo superior aos outros dois tratamentos. A partir dos 63 DAE o tratamento controle não inoculado atingiu o seu máximo de W, enquanto que os tratamentos inoculados atingiram aos 70 DAE.

Nas Figura 4b e Figura 5b, são apresentados os efeitos dos tratamentos associados a dose de 50 kg N ha⁻¹. Nesta dose, a presença da inoculação não promoveu maior W quando comparado ao tratamento controle, tanto para a safra de verão como na de inverno. No entanto, ao observar o comportamento das bactérias, nota-se que, o W com *Herbaspirillum seropedicae* foi inferior quando comparado com a inoculação com *Azospirillum brasilense*. Já para as doses de 100 e 150 kg N ha⁻¹ na safra de verão (Figura 4c e d) e para a dose de 150 kg

N ha⁻¹ na safra de inverno (Figura 5d), o comportamento para o W, foi o inverso so observada para a dose de 50 kg N ha⁻¹, para essa dose o maior W observado entre as doses está associado a inoculação com *Herbapirillum seropedicae*.

Na dose de 100 kg N ha⁻¹ (Figura 4Figura 5c), nota-se que a inoculação com *Herbapirillum seropedicae* proporcionou um maior W até aos 70 DAE, quando comparados aos demais tratamentos, atingindo seu máximo de acúmulo aos 63 DAE. Os tratamentos não inoculado e com *Azospirillum brasilense* apresentaram o mesmo comportamento até os 63 DAE, após esse período observa-se uma resposta diferenciada do tratamento com *Azopirillum brasilense*, que apresentou acúmulo superior ao não inoculado, atingindo o máximo de acúmulo aos 77DAE igualando-se ao tratamento Hs.

2.10.2 Taxa de Crescimento da Cultura (TCC)

Nas Figura 6 e Figura 7, é apresentado o efeito da inoculação nas diferentes doses de N, sobre a taxa de crescimento da cultura (TCC).

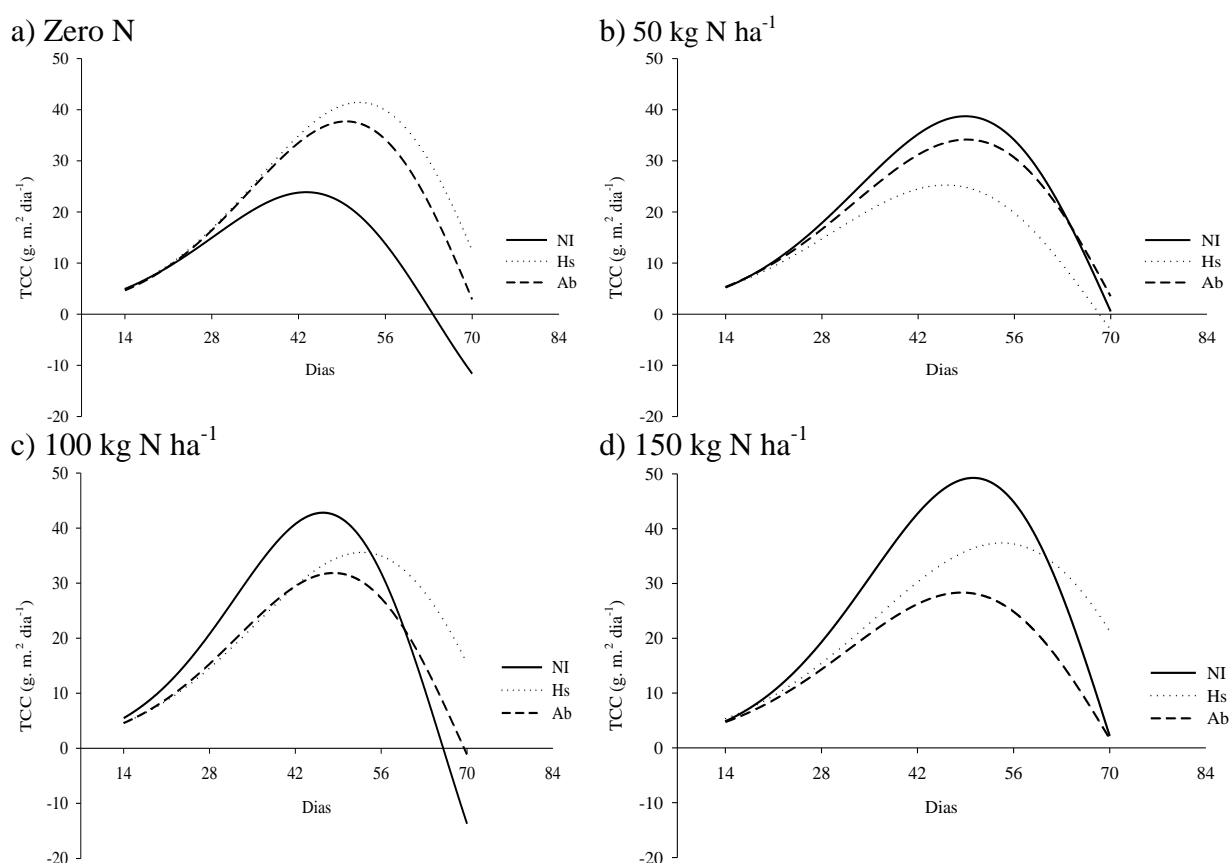


Figura 6. Taxa de crescimento da cultura (TCC) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de outubro 2015 a fevereiro 2016 - Safra de Verão. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2^o grau.

Na Figura 6, ao avaliar as curvas da taxa de crescimento da cultura (TCC) em função do tempo, para os diferentes tratamentos na ausência de adubação nitrogenada, verificou-se que a inoculação promoveu uma maior TCC, quando comparado ao tratamento não inoculado. Os tratamentos inoculados com *Herbapirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense* atingiram o máximo de produção próximo aos 56 DAE, com valores de 41,4 e 37,7 g m⁻² dia⁻¹, respectivamente, enquanto o não inoculado foi aos 42 DAE, com valor de 23,8 g m⁻² dia⁻¹. No tratamento não inoculado observa-se um curto período de crescimento inicial, até atingir o

ponto máximo de acúmulo, seguido por declínio nos valores de TCC, chegando a apresentar TCC negativa aos 63 DAE.

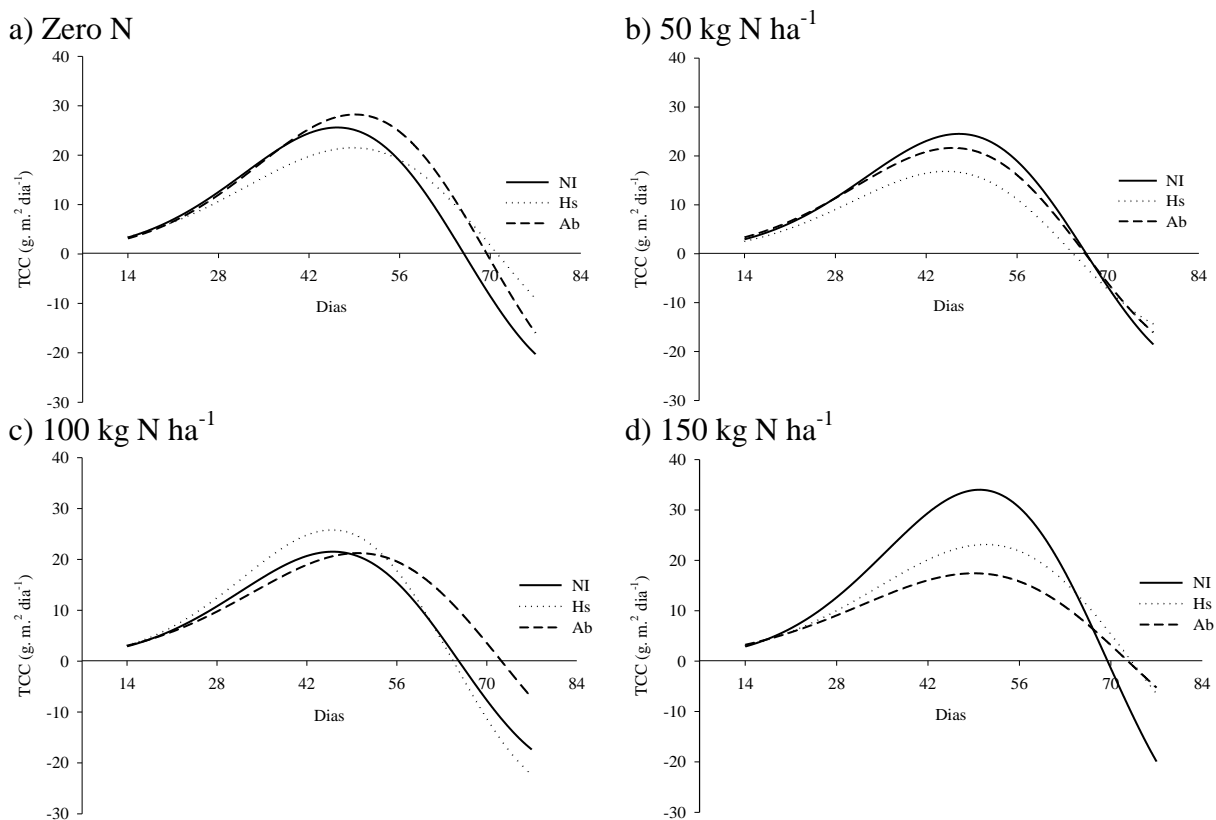


Figura 7. Taxa de Crescimento da cultura (TCC) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de março 2016 a julho 2016 – Safra de Inverno. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2^o grau.

Para a safra de inverno (Figura 7a), pode-se observar que a partir dos 28 DAE os tratamentos com *Azospirillum brasilense* e o não inoculado apresentaram TCC superior aos inoculados com *Herbaspirillum seropedicae*. Após os 42 DAE, a TCC do tratamento inoculado com *Azospirillum brasilense* passa a ser superior ao do não inoculado, pois nesse período o não inoculado atingiu o ponto máximo de TCC, e a partir daí decrescendo conforme a maturação das plantas devido à paralisação do crescimento vegetativo, perda de folhas e senescência. Nos tratamentos inoculados seu ponto máximo foi atingido entre os 42 e 56 DAE, como isso, promovendo uma maior produção de ambos os tratamentos quando comparados ao não inoculado, no entanto, para a inoculação com *Azospirillum brasilense* essa maior TCC foi observada logo após os 42 DAE, enquanto para a inoculação do *Herbaspirillum seropedicae* somente após os 56 DAE.

Para as doses de 50 e 150 kg N ha⁻¹, tanto na safra de inverno como de verão (Figura 6b e d; Figura 7b e d), a inoculação não promoveu aumento da TCC, quando comparados ao que não recebeu inoculação, essa mesma ausência de efeito já havia sido observada para o W (Figura 4b e d; Figura 5b e d). Observando o comportamento das diferentes inoculações, a maior TCC foi associada à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* quando comparada a inoculada com *Azospirillum brasilense*, nas doses de 0, 100 e 150 kg N ha⁻¹, para o período da safra de verão (Figura 6c), e para nas doses de 100 e 150 kg N ha⁻¹, safra de inverno (Figura 7).

Na dose de 100 kg N ha⁻¹, safra de verão (Figura 6c), nota-se o tratamento não inoculado apresentou TCC superior aos tratamentos inoculados até aos 42 DAE é neste

período que o tratamento não inoculado, atinge seu máximo de produção (42,7 g m⁻² dia⁻¹), entrando logo após em fase de declínio, fazendo com que após aos 56 DAE o tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* apresente TCC maior que o não inoculado, onde atinge seu ponto máximo de produção (35,6 g m⁻² dia⁻¹).

No experimento de inverno, ao observar o efeito dos tratamentos na dose de 100 kg N ha⁻¹ (Figura 7Figura 7c), o comportamento foi diferente do observado na safra de verão, onde a partir dos 28 a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* apresentou TCC superior aos tratamentos inoculados com *Azospirillum brasilense* e o não inoculado. Os tratamentos inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* e o não inoculado atingiram sua TCC máxima pouco depois dos 42 DAE, entrando em declínio linear e se tornando negativo antes dos 70 DAE, enquanto que o inoculado com *Azospirillum brasilense* apresentou sua TCC máxima próximo aos 56 DAE, fazendo como que a partir deste momento apresentasse TCC superior aos outros dois tratamentos.

2.10.3 Índice de Área Foliar

A partir do ajuste dos dados originais do índice de área foliar (IAF) (Tabela 3), foram obtidos os coeficientes e R² do modelo ajustado e suas correspondentes curvas. Assim como observado para W, todos os modelos apresentaram um bom ajuste, com R² acima de 90 %

Tabela 3. Coeficientes dos modelos exponencial polinomial de 2º grau ajustados aos dados de Índice de Área Foliar (IAF), para safra de verão e inverno.

Tratamentos	Safr Verão			Safr inverno		
		Equação	R ²		Equação	R ²
Zero N	NI	$y = -0,0015x^2 + 0,1578x - 3,2925$	0,91		$y = -0,0017x^2 + 0,1893x - 4,2027$	0,95
	Hs	$y = -0,0015x^2 + 0,1643x - 3,4009$	0,97		$y = -0,0012x^2 + 0,1449x - 3,3706$	0,95
	Ab	$y = -0,0017x^2 + 0,1841x - 3,7982$	0,94		$y = -0,0015x^2 + 0,1737x - 4,014$	0,95
50 kg N ha ⁻¹	NI	$y = -0,0014x^2 + 0,160x - 3,3214$	0,94		$y = -0,0012x^2 + 0,1542x - 3,8111$	0,94
	Hs	$y = -0,0011x^2 + 0,1279x - 2,6819$	0,90		$y = -0,0013x^2 + 0,1681x - 4,2007$	0,96
	Ab	$y = -0,0013x^2 + 0,1429x - 2,8798$	0,96		$y = -0,0013x^2 + 0,1587x - 3,6219$	0,97
100 kg N ha ⁻¹	NI	$y = -0,0018x^2 + 0,1854x - 3,6465$	0,96		$y = -0,0014x^2 + 0,1678x - 4,0382$	0,95
	Hs	$y = -0,0014x^2 + 0,1598x - 3,4934$	0,98		$y = -0,0016x^2 + 0,1846x - 4,3215$	0,94
	Ab	$y = -0,0017x^2 + 0,1865x - 3,9169$	0,96		$y = -0,0012x^2 + 0,1538x - 3,6826$	0,97
150 kg N ha ⁻¹	NI	$y = -0,0016x^2 + 0,1709x - 3,458$	0,97		$y = -0,0015x^2 + 0,1795x - 4,1918$	0,97
	Hs	$y = -0,0013x^2 + 0,1466x - 3,0547$	0,97		$y = -0,0011x^2 + 0,1435x - 3,5445$	0,94
	Ab	$y = -0,0015x^2 + 0,1753x - 3,9185$	0,94		$y = -0,0011x^2 + 0,1404x - 3,5303$	0,95

Para fins práticos, neste trabalho foi determinado o IAF a partir da relação da área foliar e a área de solo disponível para a planta. Nas Figura 8 e Figura 9, pode-se observar o efeito da inoculação sobre IAF, nas diferentes doses de N.

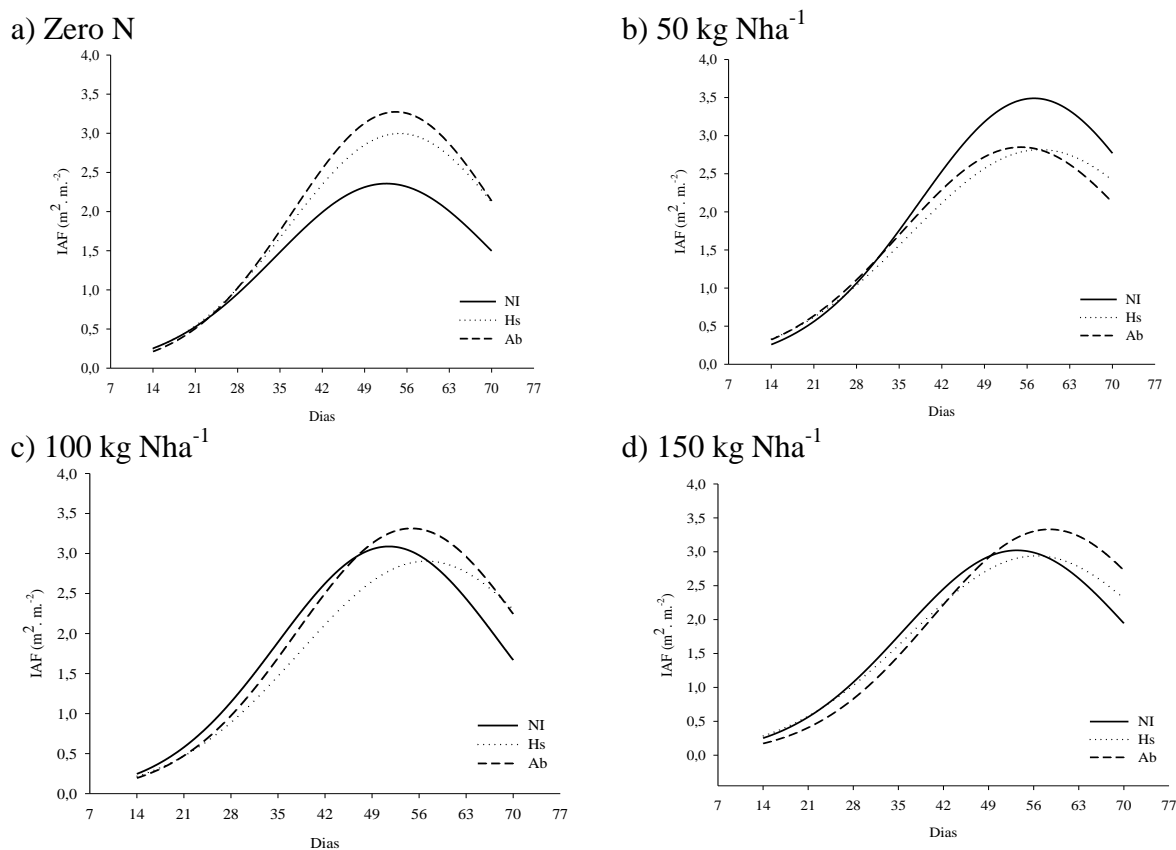


Figura 8. Índice de Área Foliar (IAF) de milho, em função do tipo de inoculação para cada dose de N, entre o período de outubro 2015 a fevereiro 2016 – Safra de Verão. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2º grau.

Na ausência de N (Figura 8a), observa-se os tratamentos que receberam a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*, apresentaram IAF superior a NI. Essa superioridade foi observada a partir dos 35 DAE, fase em que as plantas entram em crescimento exponencial. Esse mesmo comportamento também foi observado para o W e TCC. Ao se observar o efeito da inoculação sobre o IAF, ao contrário do que foi observado para W e TCC, a inoculação com *Azospirillum brasilense* foi quem apresentou maior índice.

Para o experimento de inverno (Figura 9a), a resposta da inoculação na ausência de nitrogênio apresentou alteração quando comparado ao encontrado no verão, pois na safra de inverno o tratamento não inoculado foi o que apresentou maior IAF, quando comparado aos tratamentos inoculados, apresentando IAF superior entre o período de 28 a 63 DAE. Após os 63DAE os tratamentos inoculados passam a apresentar IAF superior ao não inoculado, isso porque o não inoculado atinge seu IAF máximo aos 56 DAE, após esse período entrando em declínio.

Analisando o efeito da inoculação para a dose de 50 kg N ha⁻¹, safra de verão (Figura 8b), verifica-se que a inoculação, de ambas bactérias, não promoveu aumento no IAF quando comparado ao com ausência de inoculação. Até aos 42 DAE não foi observado diferença entre os tratamentos, entretanto, a partir dos 42 DAE, o tratamento não inoculado apresentou aumento no IAF, atingindo o valor máximo aos 56 DAE (3,5 m² m⁻²). Já na safra de inverno (Figura 9b), a inoculação com *Azospirillum brasilense* associada a dose de 50 kg N, promoveu IAF superior aos tratamentos inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* e o não inoculado, dos 21 aos 63 DAE. Após esse período, o inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* passou a apresentar IAF superior aos demais tratamentos. Comparando o tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* ao não inoculado só foi possível observar diferença a partir dos

49 DAE, onde o tratamento com *Herbaspirillum seropedicae* passou a apresentar IAF superior ao não inoculado. Em relação ao IAF máximo, o tratamento inoculado com *Azospirillum* atingiu seu máximo aos 56 DAE, enquanto que, os tratamentos com *Herbaspirillum seropedicae* e o não inoculado atingiram seu máximo aos 63 DAE.

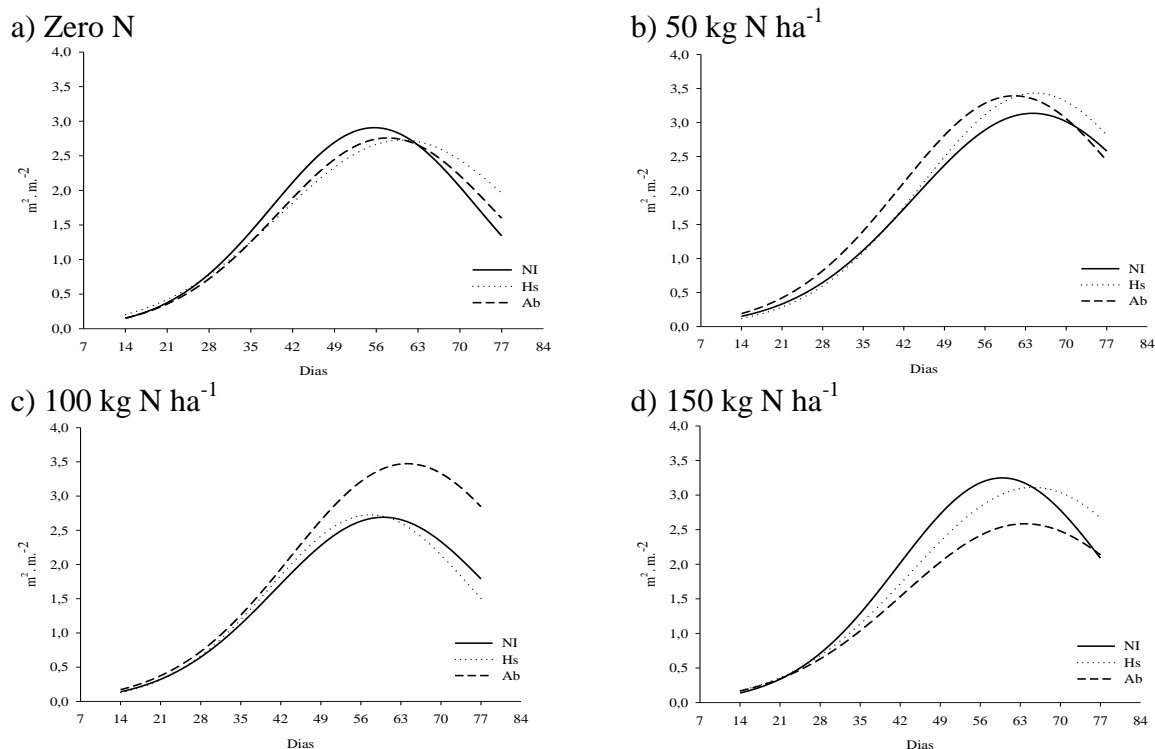


Figura 9. Índice de Área Foliar (IAF) de milho, em função do tipo de inoculação para cada dose de N, entre o período de março a julho 2016 – Safra de Inverno. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2º grau.

Na Figura 8c, observa-se que os tratamentos não inoculado e o com *Azospirillum*, foram superiores ao com *Herbaspirillum seropedicae* dos 28 aos 49 DAE. Aos 49 DAE, o tratamento não inoculado atingiu seu máximo de IAF ($3,0 m^2 m^{-2}$), após esse período, a inoculação com *Azospirillum brasilense* passou a ser superior tanto ao tratamento não inoculado quanto ao inoculado com *Herbaspirillum seropedicae*. A partir dos 56 DAE, o tratamento com *Herbaspirillum seropedicae* passa a apresentar IAF superior ao não inoculado, igualando-se ao inoculado com *Azospirillum brasilense* próximo aos 70 DAE. Isso ocorre, porque nessa fase as folhas do tratamento não inoculado já se encontram em senescência, enquanto que o inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* está com seu ponto máximo de IAF ($2,9 m^2 m^{-2}$). Para a safra de inverno (Figura 9c), o comportamento do efeito dos tratamentos associado a dose de 100 kg N, foi um pouco diferente, pois o tratamento com *Azospirillum brasilense* foi superior aos outros dois tratamentos a partir dos 49 DAE, atingindo máximo de IAF aos 63 DAE ($3,4 m^2 m^{-2}$), enquanto que, os tratamentos com *Herbaspirillum seopedicae* e não inoculado apresentaram o mesmo comportamento do início até o final do desenvolvimento.

Nos resultados obtidos para dose de 150 kg N na safra de verão (Figura 8d), pode-se observar que todos os tratamentos apresentaram IAF semelhantes até os 49 DAE, após esse período o tratamento inoculado com *Azospirillum brasilense* passou a apresentar maior IAF, quando comparado aos outros dois tratamentos. Para o experimento de inverno (Figura 9d), o tratamento não inoculado foi o que apresentou o maior IAF, dos 35 aos 63 DAE, a partir dos

63DAE o tratamento com *Herbaspirillum seropedicae* foi o que apresentou maior IAF quando comparado aos outros dois tratamentos.

2.10.4 Taxa de Assimilação Líquida (TAL)

Nas Figura 10 e Figura 11, são apresentadas as curvas referentes as taxas de assimilação líquida (TAL) da cultura, em função do efeito da inoculação nas diferentes doses de N, nas safras de verão e inverno.

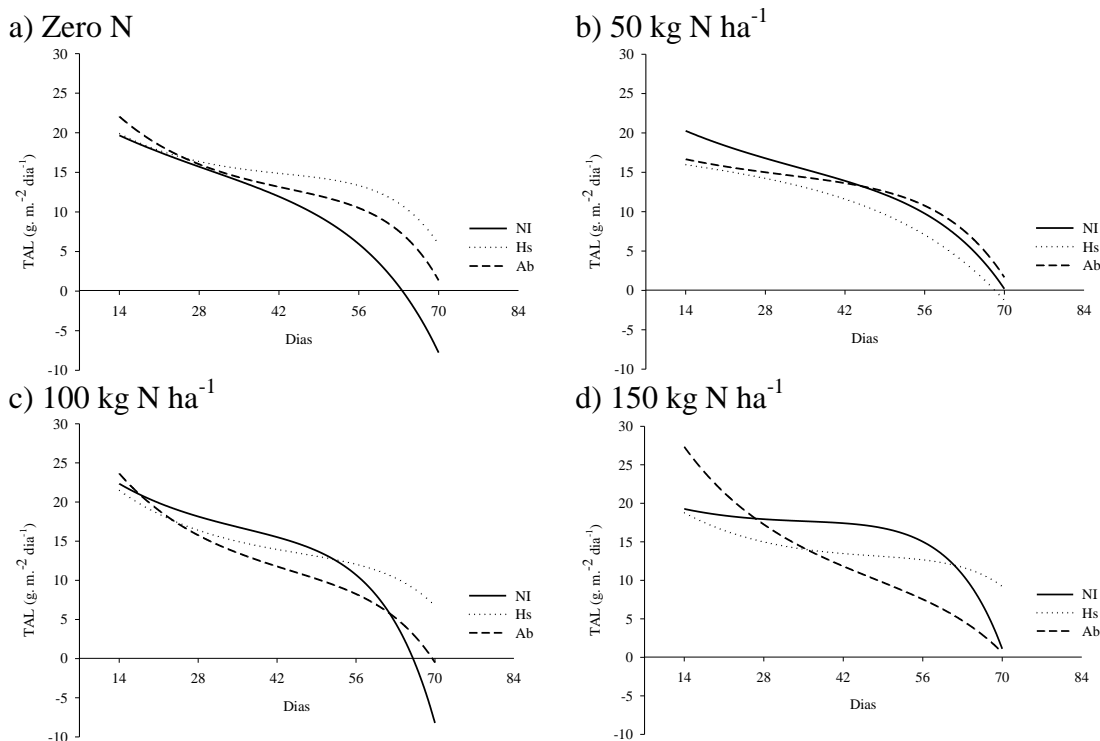


Figura 10. Taxa de Assimilação Líquida (TAL) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de outubro 2015 a fevereiro 2016 - Safra de Verão. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2° grau.

Na ausência de adubação nitrogenada, tanto para a safra de verão como de inverno (Figura 10a e Figura 11a), a inoculação promoveu maior TAL, quando comparada a ausência de inoculação. Observa-se que entre os tratamentos inoculados no período de verão (Figura 10a), a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* foi a que apresentou maior TAL quando comparado ao inoculado com *Azospirillum brasilense*. No entanto, para o período do inverno (Figura 11a), o que ocorreu foi o inverso, onde a maior TAL foi observada quando foi realizada a inoculação com *Azospirillum brasilense*.

Para a dose de 50 kg N ha^{-1} , na safra de verão (Figura 10b), o tratamento não inoculado foi o que apresentou TAL inicial superior aos tratamentos inoculados, essa superioridade foi observada até aos 42 DAE, após esse período a inoculação com *Azospirillum brasilense* igualou-se ao tratamento controle. Entretanto, a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* manteve-se do início ao fim do ciclo com TAL inferior aos outros dois tratamentos. No experimento desenvolvido no período do inverno (Figura 11b), o tratamento que não recebeu inoculação foi o que apresentou TAL superior aos tratamentos inoculados, durante o período de 28 a 56DAE, após esse período todos os tratamentos

inoculados passaram a apresentar a mesma TAL. Comparando a TAL com os outros resultados já discutidos, o comportamento observado para TAL foi semelhante aos observado para W, TCC e IAF, onde os tratamentos que receberam a inoculação foram inferiores ou iguais ao não inoculado.

Na dose de 100 kg N ha⁻¹, na safra de verão (Figura 10c), o tratamento não inoculado apresentou TAL superior aos demais tratamentos até os 56 DAE, após esse período observou-se um declínio acentuado, demonstrando a fase inicial de senescência da cultura, que se estende até aos 65 DAE, quando esta passa a apresentar valores negativos, representando assim a ausência da atividade fotossintética, como já discutido anteriormente para a TCC. Com isso, após os 56 DAE, observa-se que o tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* passa a apresentar valores superiores de TAL. Porém, o tratamento com *Azospirillum brasilense*, somente demonstrou superioridade ao não inoculado, quando este não apresentava mais TAL positiva, aos 65 DAE. No inverno (Figura 11c), a inoculação com *Herbaspirillum* associada a dose de 100 kg N ha⁻¹ foi a que apresentou as melhores TAL até aos 56 DAE, quando comparada aos outros dois tratamentos, no entanto, após esse período sua TAL diminuiu drasticamente passando a ser igual ao tratamento não inoculado, e tornando-se negativa antes dos 70 DAE, passando o tratamento inoculado com *Azospirillum brasilense* a apresentar TAL superior aos outros dois tratamentos a partir desse período.

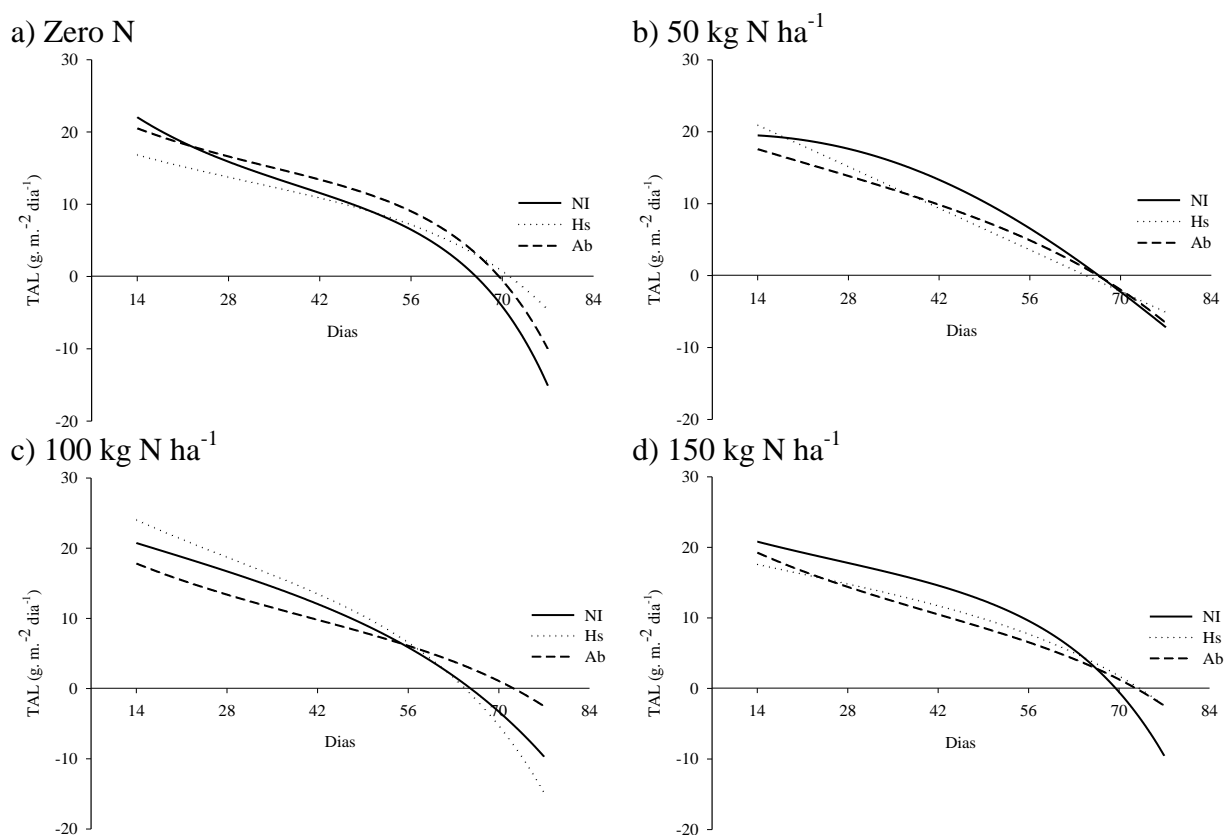


Figura 11. Taxa de Assimilação Líquida (TAL) da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de março a julho 2016 - Safra de Inverno. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2º grau.

Na Figura 10d, nota-se que a inoculação como *Azospirillum brasilense* associada a dose de 150 kg N ha⁻¹, apesar de apresentar inicialmente valor de TAL superior aos outros dois tratamentos (27, 3 g m⁻² dia⁻¹), ao longo dos dias de avaliação, esta apresentou uma distribuição decrescente da TAL. Enquanto que, os tratamentos não inoculado e o com

Herbaspirillum seropedicae, apresentaram uma distribuição constante ao longo dos dias de avaliação, decrescendo a partir dos 56 DAE. Outro ponto importante, foi que logo após os 28 DAE o tratamento não inoculado apresentou superioridade aos tratamentos inoculados, demonstrando assim, que a associação de bactérias com doses maiores de N, influenciar na atividade fotossintética da planta. Na safra de inverno (Figura 11d), o tratamento não inoculado apresentou superioridade na TAL quando comparado aos tratamentos inoculados (*Herbaspirillum seropedica* e *Azospirillum brasilense*), do início ao fim do ciclo da cultura.

2.10.5 Acúmulo de Nitrogênio

A partir do ajuste dos dados originais do acúmulo de N (Tabela 4), foram obtidos os coeficientes e R^2 do modelo ajustado e suas correspondentes curvas e taxas de acúmulo. Observa-se bom ajuste, acima de 88 %, para todos os modelos gerados.

Tabela 4. Coeficientes dos modelos exponencial polinomial de 2° grau ajustados aos dados de acúmulo de N, para safra de verão e inverno.

Tratamentos	Safra Verão			Safra inverno	
		Equação	R ²	Equação	R ²
Zero N	NI	$y = -0,0011x^2 + 0,1302x + 3,4819$	0,97	$y = -0,0011x^2 + 0,1344x + 3,317$	0,89
	Hs	$y = -0,0009x^2 + 0,1156x + 3,8207$	0,97	$y = -0,0008x^2 + 0,1011x + 3,9027$	0,88
	Ab	$y = -0,001x^2 + 0,132x + 3,2699$	0,97	$y = -0,0009x^2 + 0,1188x + 3,5747$	0,93
50 kg N ha ⁻¹	NI	$y = -0,0011x^2 + 0,1482x + 3,1175$	0,97	$y = -0,0015x^2 + 0,1797x + 2,35$	0,96
	Hs	$y = -0,0013x^2 + 0,1554x + 3,2106$	0,98	$y = -0,0014x^2 + 0,1685x + 2,3416$	0,92
	Ab	$y = -0,0014x^2 + 0,1765x + 2,6225$	0,99	$y = -0,0012x^2 + 0,1502x + 2,9866$	0,94
100 kg N ha ⁻¹	NI	$y = -0,0013x^2 + 0,1634x + 2,8816$	0,97	$y = -0,0012x^2 + 0,1507x + 2,7969$	0,94
	Hs	$y = -0,0016x^2 + 0,1861x + 2,6616$	0,99	$y = -0,0014x^2 + 0,1705x + 2,5174$	0,93
	Ab	$y = -0,0011x^2 + 0,1437x + 3,3632$	0,98	$y = -0,001x^2 + 0,1374x + 3,1255$	0,93
150 kg N ha ⁻¹	NI	$y = -0,0012x^2 + 0,1614x + 3,0657$	0,98	$y = -0,0012x^2 + 0,1594x + 2,6905$	0,94
	Hs	$y = -0,0011x^2 + 0,1527x + 3,011$	0,99	$y = -0,0009x^2 + 0,1293x + 3,2583$	0,92
	Ab	$y = -0,0011x^2 + 0,1534x + 3,0238$	0,98	$y = -0,0009x^2 + 0,1194x + 3,5648$	0,96

Os resultados para o acúmulo de N na planta, para as safras de verão e de inverno, podem ser observados nas Figura 12 e Figura 13.

Na safra de verão, na condição de ausência de adubação nitrogenada (Figura 12a), observa-se que a partir dos 42 DAE, a inoculação, tanto com *Azospirillum brasilense* quanto com *Herbaspirillum seropedicae*, promoveram aumento do acúmulo de N nas plantas. Este mesmo comportamento foi observado para, W, TCC, IAF e TAL. Na safra de inverno (Figura 13a), após o 28° DAE, observa-se diferenciação entre os tratamentos, onde o inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* apresentou o menor acúmulo de N, quando comparado aos demais tratamentos, ao longo de toda a avaliação. Os tratamentos não inoculado e com *Azospirillum brasilense*, apenas apresentaram diferença após os 56 DAE, onde o tratamento com *Azospirillum brasilense* apresentou maior acúmulo de N nas plantas.

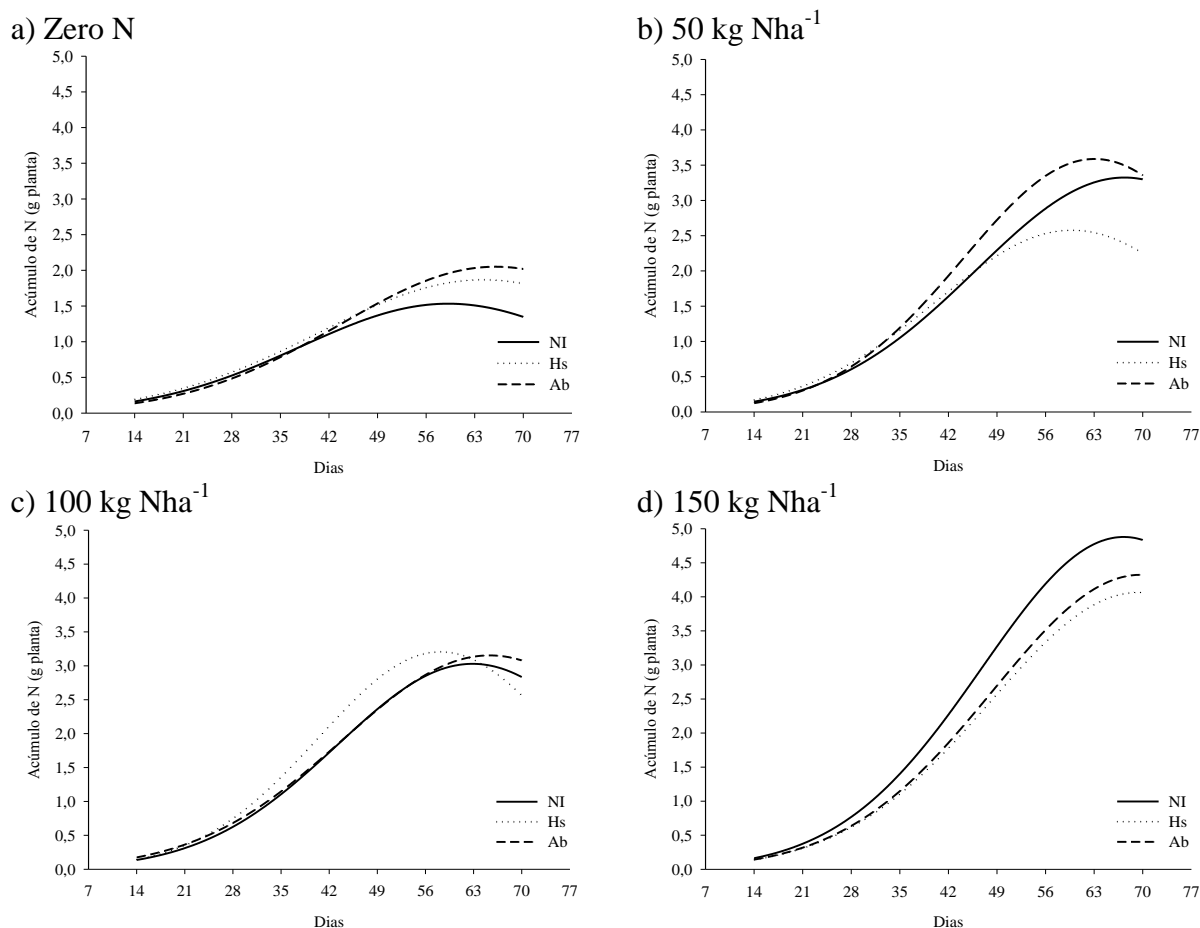


Figura 12. Acúmulo de N nas plantas de milho, da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de outubro 2015 a fevereiro 2016 - Safra de Verão. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2^o grau.

Para a inoculação associada a dose de 50 kg N ha⁻¹, no verão (Figura 12b), nota-se que, a inoculação com *Azospirillum brasilense* apresentou acúmulo de N superior aos outros dois tratamentos, a partir dos 28 DAE, apresentando seu máximo de acúmulo aos 63 DAE. No entanto, quando se observa a resposta do tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae*, verifica-se que este apresentou o mesmo comportamento que o não inoculado até aos 49 DAE, logo após esse período verificou-se que o tratamento não inoculado apresentou aumento considerável de N na massa seca das plantas, apresentando valores superiores aos obtidos com a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. Esse mesmo comportamento de resposta foi observado para a TAL, onde na fase final do experimento o tratamento inoculado com *Azospirillum brasilense* apresentou a maior taxa quando comparado aos outros dois. Na safra de inverno (Figura 13b), a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, apresentou resposta similar ao observado no verão, onde a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* foi inferior aos outros dois tratamentos, esse menor acúmulo foi observado a partir do 21 DAE. Já a inoculação com *Azospirillum brasilense* apresentou valores de acúmulo semelhantes ao com ausência de inoculação, durante toda a avaliação.

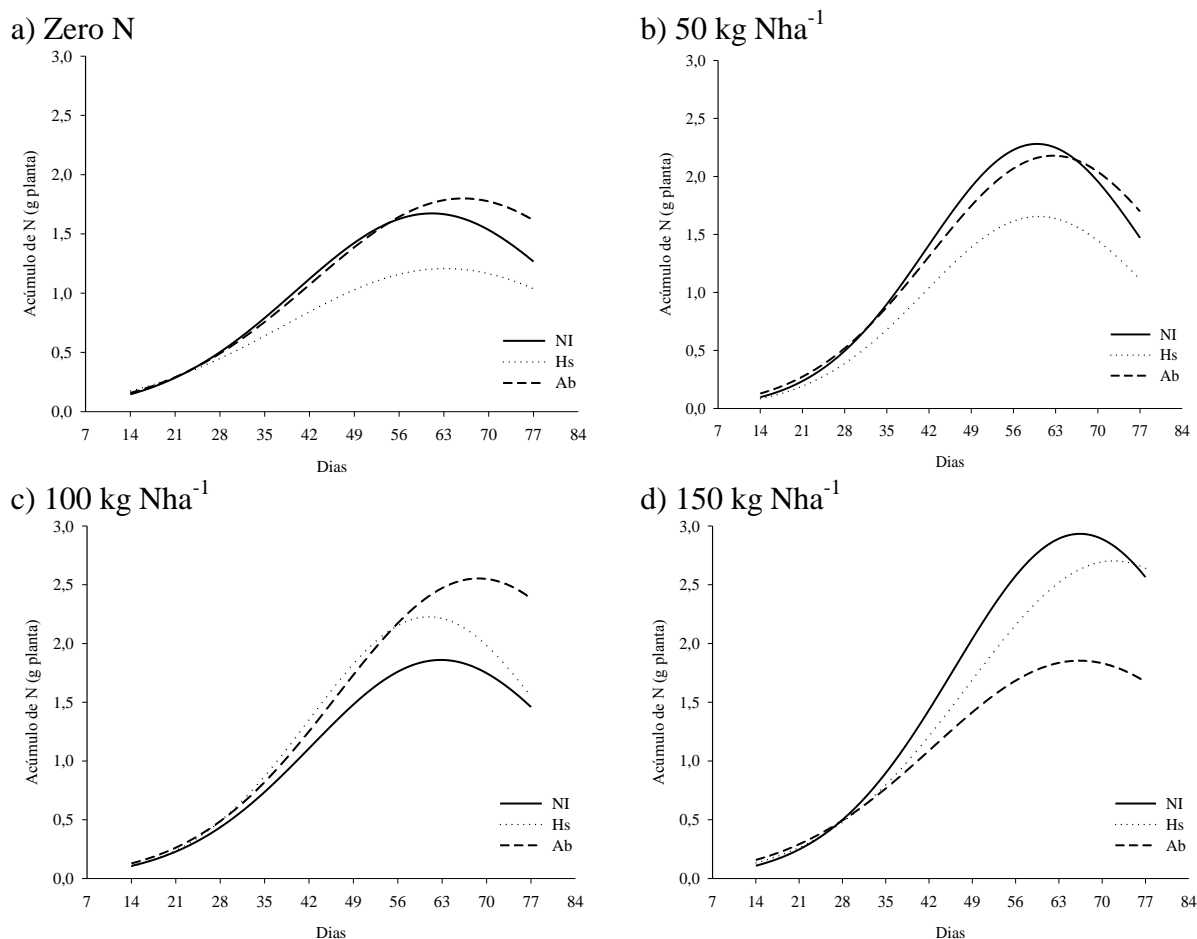


Figura 13. Acúmulo de N nas plantas de milho, da cultura do milho, em função do tipo de inoculação em cada dose de N, entre o período de março a julho 2016 - Safra de Inverno. Dados originais ajustados ao modelo polinomial de 2^o grau.

No experimento de verão a interação da inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* com a dose de 100 kg N ha⁻¹ (Figura 12c), foi a que apresentou maior acúmulo quando comparada aos outros dois tratamentos, esse maior acúmulo foi observado durante o período de 28 a 63 DAE, apresentando ponto máximo de acúmulo de N aos 58 DAE. Os outros dois tratamentos (*Azospirillum brasilense* e o não inoculado), apresentaram comportamento semelhante até o final do ciclo, apresentando o ponto máximo de acúmulo aos 65 DAE. Para o período de inverno (Figura 13c), ambos os tratamentos inoculados apresentam acúmulo de N superior ao tratamento não inoculado, essa diferença foi observada a partir 28 DAE até o fim do ciclo da cultura. Avaliando a resposta entre os dois tratamentos inoculados, nota-se que até 56 DAE, ambos os tratamentos apresentaram mesmo acúmulo de N, após esse período, a inoculação com *Azospirillum brasilense* passou a ser superior ao inoculado com *Herbaspirillum seropedicae*. Isso ocorreu porque aos 56DAE o tratamento com *Herbaspirillum seropedicae* atingiu se máximo de acúmulo de N, enquanto que tratamento com *Azospirillum brasilense* só alcança esse máximo aos 63DAE. Essa mesma resposta também foi observada para W, TCC e TAL.

O acúmulo de N na dose de 150 kg N ha⁻¹, tanto para a safra de verão como a de inverno (Figura 12d e Figura 13d), apresentou o mesmo comportamento que os outros parâmetros de crescimento (W, TCC, IAF e TAL) analisados, onde a inoculação não promoveu incremento no acúmulo de N quando compara ao tratamento não inoculado. Entretanto, na safra de inverno, ao comparar as duas inoculações, observa-se que a inoculação

com *Herbaspirillum seropedicae* apresentou acúmulo superior ao inoculado com *Azospirillum brasilense*, chegando ao final do ciclo a igualar-se ao tratamento não inoculado.

2.10.6 Produtividade, Peso de 1000 Grãos e Acúmulo de Nitrogênio

Na Figura 14, são apresentados os valores de produtividade obtidos nas safras de verão e inverno, e também referente ao ano agrícola.

Observando o efeito da inoculação sobre a produtividade de grãos, para o experimento de verão (Figura 14a), nota-se que a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* promoveu aumento significativo de produtividade quando comparado aos outros dois tratamentos (*Azospirillum brasilense* e não inoculado). A inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* apresentou produtividade superior nas doses de 0, 50 e 100 kg N ha⁻¹, o aumento comparado ao controle, foi na ordem de 16, 15 e 35%, respectivamente. Para a dose de 150 kg N ha⁻¹ (Figura 14a), não foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos com e sem inoculação. Avaliando o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* (Figura 14a), só é possível observar diferença significativa em relação ao tratamento não inoculado, quanto associado a dose de 100 kg N ha⁻¹, onde o incremento de produtividade em relação ao controle foi de 24 %.

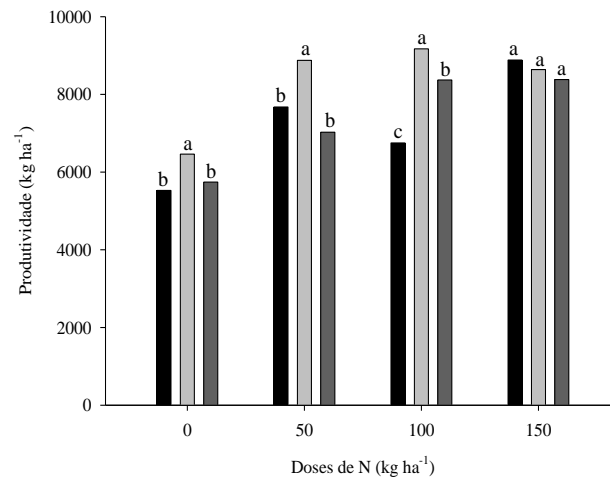
Para a safra de inverno (Figura 14b), não foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos testados. Como já apresentado, isso pode ser devido as condições ambientais, pois para que ocorra o efeito da inoculação, as condições ambientais precisam ser favoráveis. No entanto, apesar de não haver diferença significativa pode-se observar que a inoculação como *Herbaspirillum seropedicae* apresentou valores de produtividade maiores, quando comparado aos outros dois tratamentos, nas doses de 50, 100 e 150 kg N ha⁻¹. Os aumentos observados, quando comparados ao controle não inoculado, foram de 3, 9 e 16 % respectivamente. Já a inoculação com *Azospirillum brasilense* não apresentou aumento de produtividade em nenhuma das doses testadas.

Avaliando o efeito da inoculação na produção do ano agrícola (safra de verão+inverno) (Figura 14c), pode-se observar que, como já relatado para o período da safra de verão, as maiores produtividades estão associadas a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, apresentando diferença significativa na doses de 0, 50 e 100 kg N ha⁻¹. Quando comparado ao controle observa-se incrementos na produtividade, na ordem de 7, 14, 24%, respectivamente. Porém, mesmo sem apresentar diferença significativa, na dose de 150 kg N ha⁻¹, verificou-se aumento de produtividade quando comparado aos outros tratamentos, cerca de 4% (aproximadamente 560 kg de grãos ha⁻¹). A inoculação com *Azospirillum brasilense* só apresentou produtividade significativamente superior ao tratamento não inoculado quando associado a dose de 100 kg N ha⁻¹, onde o incremento em relação ao controle foi de 13%.

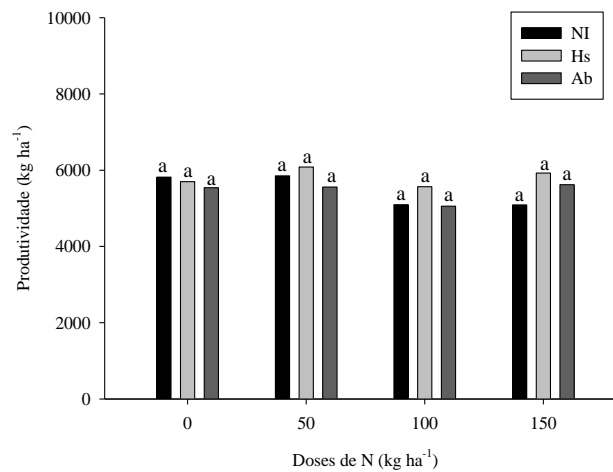
Na Figura 15, são apresentados os gráficos de regressão de produtividade, para cada tratamento (não inoculado, *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*) em função das doses de N, nas diferentes épocas. Ressalta-se que para cada condição avaliada foi ajustado o modelo mais adequado de regressão.

Nos resultados obtidos, para a safra de verão (Figura 15a), verifica-se que os tratamentos inoculados com *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, apresentaram como melhor ajuste a função quadrática, estando a maior produtividade associada a dose de 100 kg N ha⁻¹, enquanto que, para o tratamento não inoculado a função que melhor se ajustou a foi linear, onde a maior produtividade foi encontrada quando adicionado 150 kg N ha⁻¹. Analisando a posição das curvas e os coeficientes angulares, observa-se que, o tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* diferiu-se significativamente dos demais tratamentos, apresentando maior valor de produtividade, para a maioria das doses.

a) Safra verão



b) Safra inverno



c) Ano agrícola (safra de verão e safra de inverno)

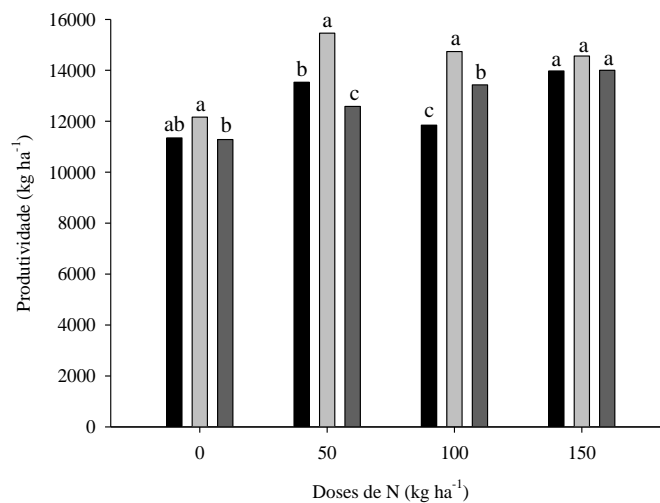
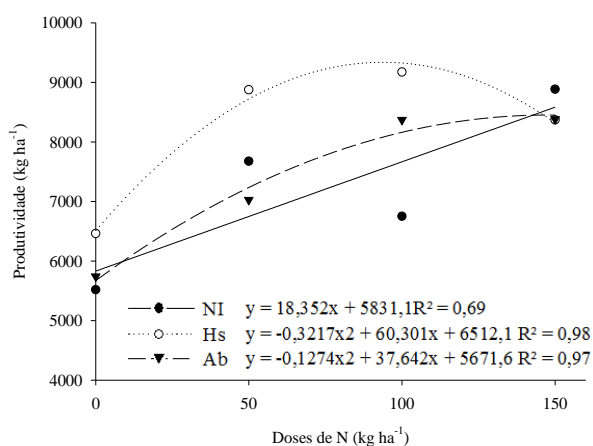
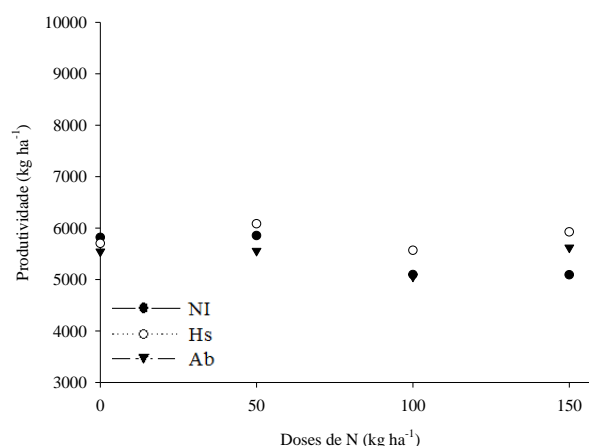


Figura 14. Produtividade de grãos em função do tipo de inoculação nas diferentes doses de N. Valores médios de quatro repetições. Letras distintas comparam as médias, em cada dose de N a 5% de probabilidade pelo teste t.

a) Safra verão



b) Safra inverno



c) Ano agrícola (safra de verão e safra de inverno)

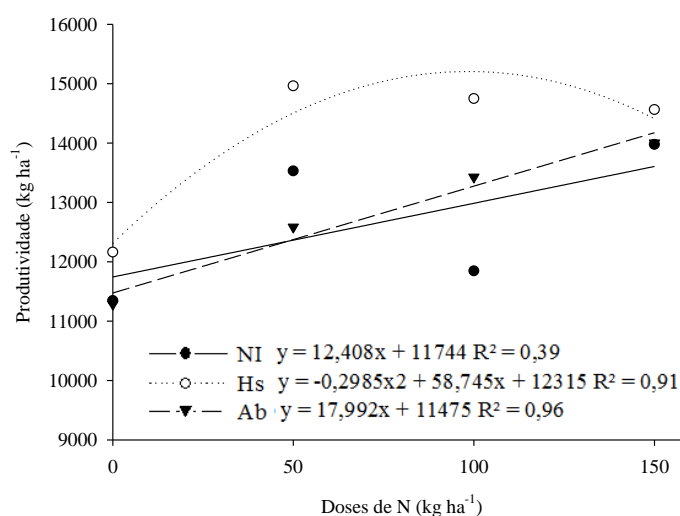


Figura 15. Modelos de regressão para a produtividade de grãos de milho, em função das doses de N (0, 50, 100 e 150 kg N ha⁻¹), para os tratamentos não inoculado (NI), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) e *Azospirillum brasilense* (Ab).

Avaliando a resposta da adubação na safra de inverno (Figura 15b), não foi possível observar o efeito das doses de N nos diferentes tratamentos inoculados, dessa forma não foi possível ajustar curvas de regressão aos dados obtidos. Entretanto, para o tratamento não inoculado, foi possível ajustar o modelo linear, que apresentou R^2 de 0,78; apesar de significativa a regressão, esta apresentou pequena redução de produtividade com o aumento das doses, esses dados não estão coerentes com o esperado, sendo assim necessárias futuras avaliações para confirmação dos dados obtidos.

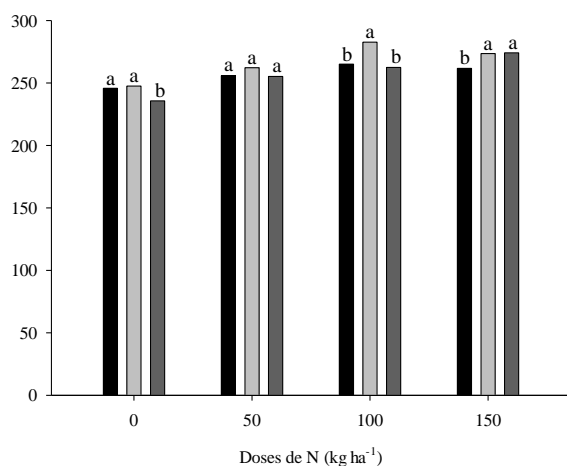
Para ano agrícola (Figura 15c), foi possível ajustar curvas de regressão para todos os tratamentos analisados. Porém, o tratamento NI apesar de significativa a regressão linear, apresentou baixo valor de R^2 (0,39). Para os tratamentos inoculados, as curvas de regressão apresentaram bom ajuste, com valores de R^2 de 0,91 para a regressão quadrática do *Herbaspirillum seropedicae* e 0,96 para a regressão linear do *Azospirillum brasilense*. Nota-se que a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* apresentou resposta quadrática, como observado na safra de verão, no entanto, a maior produtividade foi encontrada na dose de 50

kg Nha⁻¹, enquanto que, a inoculação com *Azospirillum brasilense*, apresentou resposta linear e maior produtividade na maior dose de N (150 kg N ha⁻¹).

Observando o efeito da inoculação em função das diferentes doses de N, pode-se observar que a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* associada a dose de 50 kg N ha⁻¹, na safra de verão e no ano agrícola (Figura 15a e c), apresentou produtividade próxima aos valores encontrados para as doses de 100 e 150 kg N ha⁻¹.

Na Figura 16, são apresentados os efeitos da inoculação associada as diferentes doses de N, sobre o peso de 1000 grãos. Em geral, como pode ser observado em ambas as épocas de plantio, o peso de 1000 grãos apresentou valor médio de 250g.

a) Verão



b) Inverno

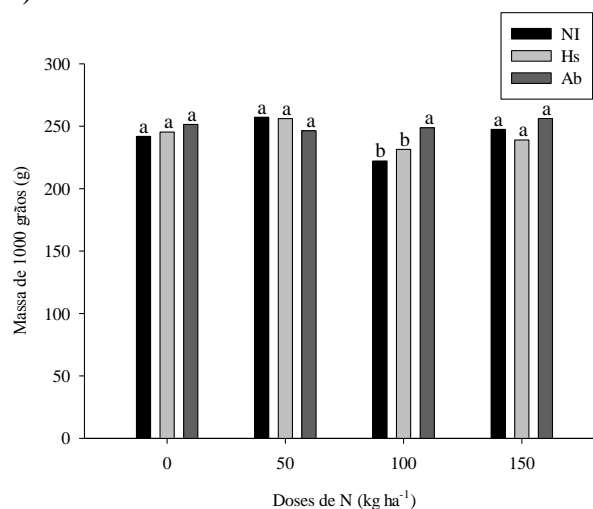


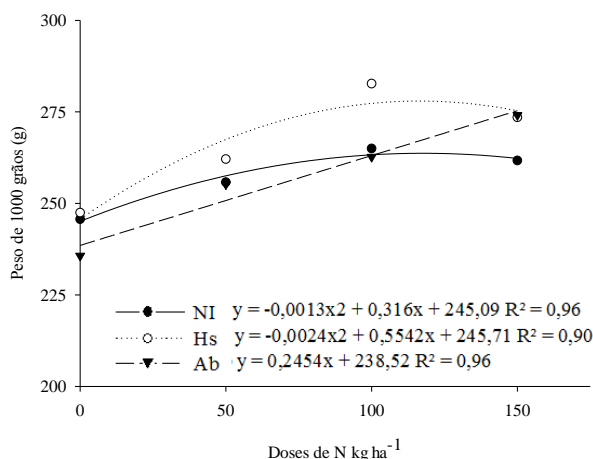
Figura 16. Peso de 1000 grãos em função do tipo de inoculação nas diferentes doses de N. Valores médios de quatro repetições. Letras distintas comparam as médias, em cada dose de N a 5% de probabilidade pelo teste t.

Na safra de verão (Figura 16a), avaliando o efeito da inoculação nas diferentes doses de N sobre o rendimento da massa de 1000 grãos, observa-se que a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* promoveu aumento significativo no peso de 1000 grãos quando associada as doses 100 e 150 kg N ha⁻¹. No entanto, a inoculação com *Azospirillum brasilense* somente apresentou aumento significativo quando associada a dose de 150 kg N ha⁻¹; na ausência de nitrogênio, este chegou a apresentar redução no peso de 1000 grãos quando comparado ao tratamento não inoculado.

No inverno (Figura 16b), somente na dose de 100 kg N ha⁻¹, foi observada diferença significativa entre os tratamentos, onde o tratamento com *Azospirillum brasilense* apresentou maior peso de 1000 grãos, quando comparado aos outros dois tratamentos.

Na Figura 17, são apresentados aos gráficos de regressão de peso de 1000 grãos, para cada tratamento (não inoculado, *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*) em função das doses de N, nas diferentes épocas.

a) Verão



b) Inverno

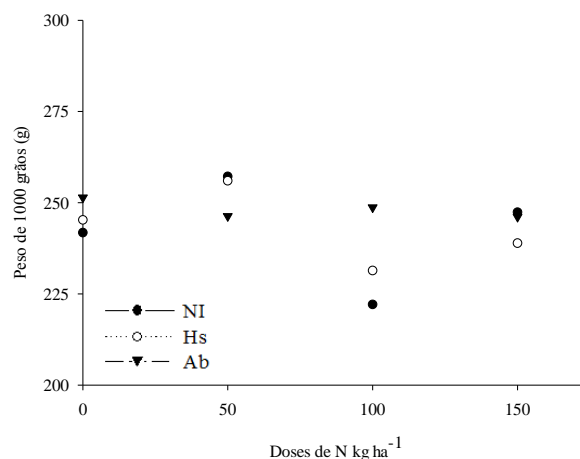


Figura 17. Modelos de regressão para o peso de 1000 grãos de milho, em função das doses de N (0, 50, 100 e 150 kg N ha⁻¹), para os tratamentos não inoculado (NI), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) e *Azospirillum brasilense* (Ab).

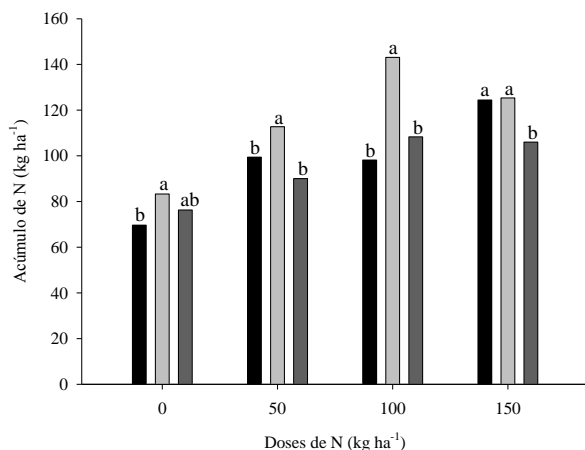
Na safra de verão (Figura 17a), os modelos de regressão apresentaram bom ajuste com R² acima de 95 %. Verifica-se que para os tratamentos inoculado com *Herbaspirillum* e o não inoculado, a função que melhor se ajustou aos dados foi a função quadrática, onde o maior peso de 1000 grãos, em ambos os tratamentos, foi associado a dose de 100 kg N ha⁻¹, enquanto que, o tratamento inoculado com *Azospirillum brasilense* melhor se ajustou a função linear, onde o maior peso obtido foi encontrado na maior dose de N (150 kg N ha⁻¹). Analisando a posição das curvas e os coeficientes angulares, observa-se que o tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* diferiu-se significativamente dos demais tratamentos, apresentando maiores valores de massa de 1000 grãos em todas as doses avaliadas.

Na safra de inverno (Figura 17b), não foi possível observar o efeito das doses de N em nenhum dos tratamentos (não inoculado, *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*), dessa forma não foi possível ajustar curvas de regressão aos dados obtidos.

Os valores de N acumulado no grão são apresentados na Figura 18, tanto para a safra de verão (a) como para a safra de inverno (b).

No estudo desenvolvido no verão (Figura 18a), pode-se observar que o acúmulo de N no grão seguiu o mesmo comportamento dos dados de produtividade e peso de 1000 grãos, onde a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* apresentou acúmulo do N no grão significativamente superior aos outros tratamentos, nas doses de 0, 50 e 100 kg N ha⁻¹, enquanto que na dose de 150 kg N ha⁻¹, só apresentou diferença significativa em relação ao tratamento inoculado com *Azospirillum brasilense*. A maior diferença no acúmulo de N em relação aos outros dois tratamentos (não inoculado e *Azospirillum brasilense*), foi na dose de 100 kg N ha⁻¹, onde a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* promoveu um incremento no acúmulo de 35 kg N ha⁻¹, que representa cerca de 32%. Para safra de inverno (Figura 18b), não foi observada diferença significativa entre os tratamentos utilizados em nenhuma das doses.

a) Verão



b) Inverno

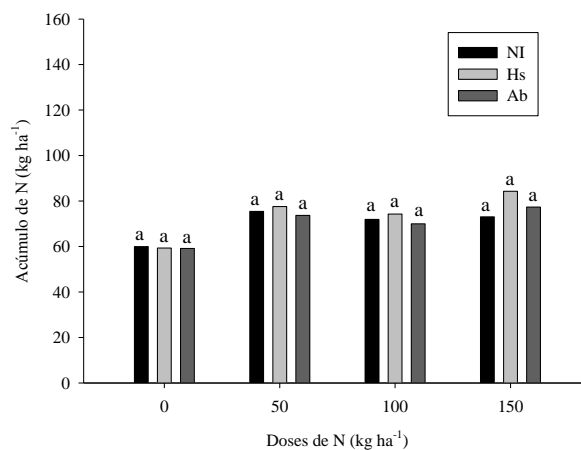
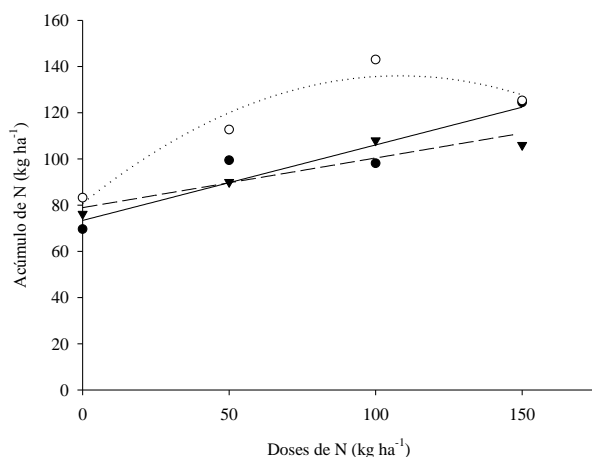


Figura 18. Nitrogênio acumulado nos grãos de milho, em função do tipo de inoculação nas diferentes doses de N. Valores médios de quatro repetições. Letras distintas comparam as médias, em cada dose de N a 5% de probabilidade pelo teste t.

Analisando o acúmulo de N entre as safras, observa-se que, assim como para a produtividade, os valores médios obtidos no inverno foram inferiores aos observados na safra de verão, uma diferença de aproximadamente 25 %.

Na Figura 19, são apresentados os gráficos de regressão para o acúmulo de N, em função das doses de N (0, 50, 100 e 150 kg N ha⁻¹), para os tratamentos sem inoculação e os inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* e com *Azospirillum brasilense*, nas diferentes épocas de cultivo (safra verão e safra inverno). Observa-se que para os dados apresentados em ambas as épocas, foi possível ajustar curvas de regressão com coeficientes de determinação (R²) satisfatórios, ou seja, acima de 70 %.

a) Verão



b) Inverno

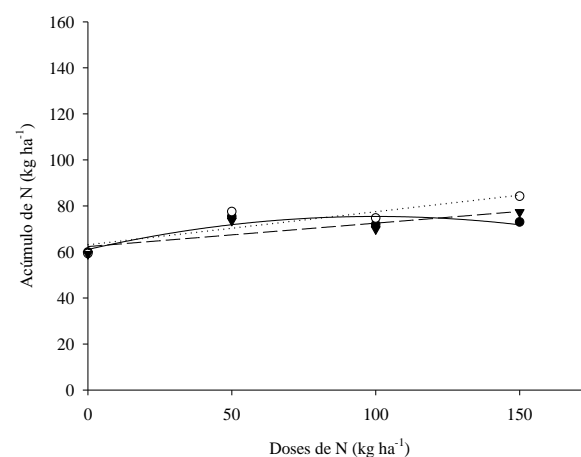


Figura 19. Modelos de regressão para o peso de 1000 grãos de milho, em função das doses de N (0, 50, 100 e 150 kg N ha⁻¹), para os tratamentos não inoculado (NI), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) e *Azospirillum brasilense* (Ab).

De acordo, com os dados apresentados para a safra de verão (Figura 19a), verifica-se que para o tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae*, a função que melhor se ajustou aos dados foi a função quadrática, onde o maior acúmulo de N nos grãos foi evidenciado na dose de 100 kg N ha⁻¹, comportamento similar foi apresentado anteriormente

para os dados produtividade e peso de 1000 grãos. Entretanto, para os tratamentos com *Azospirillum brasilense* e o não inoculado, o melhor ajuste obtido foi com a função linear, onde o maior acúmulo de N nos grãos está associado a maior dose de N (150 kg N ha⁻¹). No inverno, foi possível observar que para os tratamentos inoculados (*Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*) o melhor ajuste foi obtido pela função linear; e para o não inoculado foi adotada a função quadrática, onde o maior acúmulo foi observado na dose de 50 kg N ha⁻¹. No verão, assim como já foi evidenciado para outros parâmetros analisados, a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* foi a que apresentou maior coeficiente angular quando comparado aos demais tratamentos, apresentando maiores valores acúmulo de N nos grãos milho, em todas as doses avaliadas.

2.11 DISCUSSÃO

2.11.1 Acúmulo de Massa Seca (W), Índice de Área Foliar (IAF) e Acúmulo de N nas Plantas de Milho no Tempo

Diante dos resultados apresentados, pode-se observar que houve diferença na resposta a inoculação, tanto entre as épocas de plantio como entre as doses de N. Em geral, o experimento da safra de verão apresentou valores de W e IAF superiores ao do experimento cultivado na safra de inverno. Isso se deve, a combinação das altas temperaturas do ar com a alta irradiação, da safra de verão, favoreceu o desenvolvimento da cultura. Enquanto que, na safra de inverno, as baixas temperaturas do ar, baixa umidade relativa e os baixos níveis de irradiação não contribuíram para seu desenvolvimento. Alguns autores afirmam que, se o suprimento de água e de nutrientes minerais forem suficientes para a cultura, o que limitará as taxas de crescimento será basicamente temperatura e intensidade de luz (DIDONET et al. 1998; LOZADA et al., 1999; ALVES, et al., 2011; BERGAMASCHI & MATZENAUER, 2014).

Segundo estudos realizados por Hungria (2011) e Vogt et al., (2014), os efeitos da inoculação de sementes de milho são dependentes das características genéticas das plantas e das estirpes, bem como das condições de ambiente, sendo os resultados mais promissores associados a níveis de baixo e médio investimento na lavoura. Dartora et al. (2013), trabalhando com as mesmas bactérias observou que a inoculação foi capaz de promover um incremento de 12 % na massa seca quando comparado ao controle, quando a cultura foi desenvolvida na época de verão.

Os resultados, também apontaram para uma maior contribuição da inoculação no W e no IAF, quando as plantas foram cultivadas em condições de ausência de adubação, promovendo incrementos de até 96 % na massa seca das plantas de milho. Quadros et al. (2014), avaliando o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* no híbrido SHS5050 na ausência de adubação nitrogenada, observou que a inoculação promoveu um incremento na massa seca acumulada de 4,8 t ha⁻¹, quando comparado ao tratamento controle. Estes resultados indicam que a inoculação com Hs e Ab proporcionou melhor vigor vegetativo.

Em relação, a associação bactéria-adubação, observou-se que em doses baixas de N (50 kg N ha⁻¹) a associação com a bactéria *Azospirillum brasilense*, foi mais eficiente no W e no IAF. Alguns autores afirmam que a inoculação de *Azospirillum brasilense* tem a capacidade de produzir substâncias que vão favorecer o aumento do volume radicular, proporcionando maior exploração do solo, com isso, maior eficiência na absorção do nutriente, refletindo em maior massa seca nas plantas (VESSEY, 2003; HUNGRIA et al., 2010; SILVA, et al., 2015). Radwan et al. (2004), buscando quantificar a produção de fitormônios de crescimento por estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio, verificaram que as estirpes de *Azospirillum* chegam a produzir de três a sete vezes mais compostos indólicos (entre 300 a 500 µM) que as de *Herbaspirillum seropedicae*.

No entanto, quando associada a doses mais elevadas (100 e 150 kg N ha⁻¹), a associação com *Herbaspirillum seropedicae* se mostrou mais eficiente no W. Essa diferença no efeito da inoculação entres as bactérias, pode ser devido a forma de associação de cada bactéria com a planta. O estabelecimento endofítico, comparado ao ambiente rizosférico, tem sido considerado um evento importante para que as bactérias possam influenciar mais eficientemente no crescimento da planta, visto que, no interior do vegetal a competição microbiana é menor, este nicho é menos sujeito a flutuações ambientais e a interface de troca de metabólitos é mais direta quando comparada com a rizosfera (VINHAL-FREITAS E

RODRIGUES, 2010). Dessa forma, o *Azospirillum brasilense*, por ser um endofítico facultativo, torna-se mais vulnerável aos fatores ambientais, como temperatura, umidade, competição com micro-organismos do solo (DARTORA et al. 2013). Já o *Herbaspirillum seropedicae*, por ser uma bactéria diazotrófica endofítica obrigatória, sobrevive pouco no solo, colonizando nichos específicos no interior dos tecidos vegetais, este comportamento faz com que esta bactéria se torne mais eficiente na transferência dos compostos nitrogenados produzidos para a planta (OLIVARES, 1997; MOREIRA et al. 2010), além de, ser menos vulnerável aos fatores ambientais externos, ter menores limitações de substratos de carbono e menor competição com outros microrganismos existentes no solo (OLIVARES, 1997; MOREIRA et al., 2010).

Analisando o IAF ao longo do tempo, verificou-se que a inoculação com *Azospirillum brasilense* apresentou maiores valores quando comparado ao *Herbaspirillum seropedicae*, em todas as doses. Este mesmo comportamento foi evidenciado para o acúmulo de N nas plantas de milho, exceto para a dose de 100 kg N ha⁻¹. Muller (2013), diz que o IAF está associado ao teor de N na planta, pois se a planta apresentar deficiência de N conseqüentemente pode haver uma redução da síntese de clorofila, proteínas e citocinina, aumentando a senescência foliar reduzindo o IAF. Jones (1985) e França (2003) afirmam que a interceptação luminosa e a fotossíntese, tem grande dependência da área foliar e de sua duração, se houver uma redução na duração da área foliar conseqüentemente as plantas serão prejudicadas. Muller et al. (2016), também encontram resultados semelhantes, em seu experimento desenvolvido na safra de verão 2014/2015, onde foi observado o efeito positivo da inoculação de *Azospirillum brasilense* sobre IAF das plantas de milho.

2.11.2 Taxa de Crescimento da Cultura (TCC) e Taxa de Assimilação Líquida (TAL)

A análise de crescimento pode ser de grande valor na avaliação das diferenças entre cultivares e também das características que definem a capacidade produtiva das plantas (SORATO, 2012). Para este estudo foram determinadas as taxas de crescimento da cultura (TCC) e a taxa de assimilação líquida (TAL), com objetivo de identificar as principais diferenças no crescimento das plantas, quando estas são associadas a inoculação de bactérias diazotróficas.

A TCC representa a produção de biomassa por unidade de área do terreno em função tempo. Podendo assim, ser utilizada como indicativo da velocidade média de crescimento ao longo do período de observação (REIS e MULLER, 1978; PEREIRA e MACHADO, 1987; BENINCASA, 2003; GARCIA, et al., 2008). Enquanto que, a TAL é um parâmetro de crescimento que representa o incremento da fitomassa por unidade de área foliar, durante um determinado espaço de tempo, normalmente é descrito g. m⁻² dia⁻¹, sendo aceita como uma estimativa confiável da atividade fotossintética da planta (MAGALHÃES, 1985).

Diante disso, analisando os resultados obtidos em ambas as taxas, notam-se que estas corroboram com resultados os obtidos para W, onde a inoculação com Hs apresentou maiores valores TCC e TAL no tempo, quando associado as maiores doses (100 e 150 kg N ha⁻¹). Entretanto, quando associada a dose de 50 kg N ha⁻¹, o Ab demonstrou superioridade. Ressalta-se a importância da avaliação das taxas de crescimento, principalmente da TAL. Visto que, apenas a determinação do IAF, não seria suficiente para estimar a atividade fotossintética da planta, já que este parâmetro não acompanhou o comportamento apresentado para W e TCC.

Ao analisar as curvas de TCC, também foi possível identificar a influência da inoculação na fase vegetativa das plantas de milho, onde foi observado o prolongamento do 2º estágio do desenvolvimento da cultura. Segundo Zucareli et al. (2010), os valores de TCC após um aumento inicial, chegam a seus valores máximos, decrescendo conforme a maturação

das plantas devido à paralização do crescimento vegetativo, perda de folhas e senescência. No entanto, Sangoi et al. (2015), avaliando a inoculação do *Azospirillum brasilense* e sua interação com diferentes doses de N, observou que os tratamentos inoculados promoveram um retardamento da senescência foliar das plantas. Outros pesquisadores também dizem que as bactérias diazotróficas podem contribuir não apenas com a fixação de N, mas também através da produção de hormônios que estimulam o crescimento e desenvolvimento das plantas que podem levar ao retardamento de senescência foliar (LAMBRECHT et al., 2000; QUADROS, 2009).

2.11.3 Produtividade, Peso de 1000 Grãos e Acúmulo de Nitrogênio no Grão

A produtividade obtida em ambas as safras foi superior à média nacional, (Figura 14), onde para o período da safra de verão a média foi de 7600 kg ha⁻¹ e na safra de inverno foi de 5570 kg ha⁻¹, enquanto que, a nacional ficou em torno de 5200 kg ha⁻¹ de acordo como o 6º levantamento da CONAB para a safra 2016/2017 (CONAB, 2017).

Comparando o efeito promovido por cada bactéria na produtividade de grãos, pode-se notar que, o incremento de produtividade proporcionado pela inoculação de Hs foi sempre superior ao inoculado com Ab. Alves (2007), também observou incrementos na produtividade do milho na ordem de 24% e 34% com a utilização de *Herbaspirillum seropedicae*, tanto na safra de inverno quanto na de verão. Outros estudos avaliando a mesma bactéria, também encontraram resultados positivos em relação a inoculação (ZILLI et al., 2008; ALVES et al., 2015).

A inoculação com *Azospirillum*, só apresentou efeito positivo quanto associada a dose de 100 kg N ha⁻¹. A ausência no efeito da inoculação por *Azospirillum brasilense*, também foi evidenciado por outros autores, onde estes não foram capazes de observar efeito benéfico associado a inoculação com esta bactéria, em diferentes doses de N (CAMPOS et al., 2000; BARTCHECHEN et al., 2010; REPKE et al. 2013; PANDOLFO et al., 2015; MASCARELLO & ZANÃO – JÚNIOR, 2015). Entretanto, diversos trabalhos já relataram o efeito positivo da inoculação como *Azospirillum brasilense*, certificando os benefícios da promoção de crescimento que essa bactéria pode promover na cultura do milho (SWEDRZYNSKA & SAWICKA, 2000; HUNGRIA et al., 2010; PORTUGAL et al., 2012; KAPPES et al., 2013). Dartora et al. (2013) e Longhini et al., (2016), em seus estudos observaram que a inoculação promoveu aumento de produtividade na ordem de 900 e 500 kg grão ha⁻¹, respectivamente. Lana et al. (2012), também verificaram que a inoculação com *Azospirillum* proporcionou incrementos de 7 a 14% na produtividade de grãos de milho.

Observando o efeito da inoculação em função das diferentes doses de N, pode-se observar que a inoculação com Hs associada a dose de 50 kg N ha⁻¹, apresentou produtividade próxima aos valores encontrados para as doses de 100 e 150 kg N ha⁻¹. Essa mesma resposta foi observada por Breda et al. (2016) onde a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* associada a dose de 50 kg ha⁻¹, apresentou desempenho equivalente à aplicação de 100 kg N ha⁻¹ quanto a produtividade de grãos. Já Araújo (2014), observou que a inoculação de bactérias diazotróficas acrescidos de 30 kg N ha⁻¹ apresentaram resultados similares ao tratamento com a maior dose de N (120 kg N ha⁻¹) para massa de espiga, diâmetro da espiga, número de grãos por espiga, produção de massa seca da parte aérea e produtividade de grãos. Dessa forma, Hungria et al. (2010) destaca a possibilidade de redução da quantidade de N aplicada, na forma de fertilizantes químicos, quando esta é associada à inoculação.

Na dose de 150 kg N ha⁻¹, não foi evidenciado efeito dos tratamentos inoculados quando comparados ao tratamento sem inoculação. Esse mesmo comportamento foi observado por outros pesquisadores, que trabalhando com a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em diferentes doses de N, também não observaram incremento na produtividade

do milho (DOTTO et al., 2010; REPKE et al., 2013; ARAÚJO, et al., 2016). Segundo Carvalho et al. (2014), a eficiência da fixação biológica em bactérias diazotróficas é rapidamente reduzida ou mesmo inibida na presença de alta concentração de componentes de nitrogênio no solo, especialmente amônio, que pode causar a rápida inibição da atividade da nitrogenase, responsável pela conversão do nitrogênio atmosférico (N₂) à forma aceitável pela planta.

Avaliando o peso de 1000 grãos, nota-se que este seguiu o mesmo comportamento observado para a produtividade, exceto na dose de 50 kg N ha⁻¹ que não foi observado diferença entre os tratamentos. Onde, o maior rendimento no peso dos grãos foi observado nos tratamentos inoculados na dose 100 kg N ha⁻¹. Diferentes resultados são encontrados na literatura em relação ao efeito da inoculação no peso de 1000 grãos. Novakowski et al. (2011) avaliando o efeito da inoculação em milho, observou que o tratamento inoculado apresentou peso de 1.000 grãos superior aos tratamentos não inoculados. Entretanto, estudos realizados por Bartchechen et al. (2010), Pandolfo et al. (2015) e Sangoi et al. (2015), não identificaram efeito desta bactéria na produtividade de grãos e massa de mil grãos.

Diante dos resultados já apresentados, verifica-se que apesar do tratamento sem inoculação ter apresentado maior produção de massa seca total quando associado a adubação nitrogenada (Figura 4 e Figura 5), este não foi capaz de converter em maior produtividade e maior peso de 1000 de grãos. Evidenciando, que a associação com bactérias diazotróficas promove uma alteração no metabolismo da planta, fazendo com que esta torne-se mais eficiente na assimilação do nitrogênio pelas plantas de milho, refletindo assim, em maior produtividade e maior rendimento no peso dos grãos. Os resultados de acúmulo de nitrogênio nos grãos ratificam esta afirmação, onde os tratamentos inoculados com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* apresentaram maior acúmulo deste nutriente nos grãos em todas as doses de N. Machado et al. (1998), afirma que as bactérias influenciaram positivamente a absorção e a utilização do nitrogênio pelas plantas de milho da variedade Nitroflint, apesar de não ter apresentado diferença significativa a inoculação associada a 100 kg N ha⁻¹, acumulou 22 kg N ha⁻¹ a mais do que a mesma dose de N sem inoculação. Dartora et al. (2016), observou que a co-inoculação das duas bactérias (*Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*), promoveu incremento no acúmulo de N nos grãos, quando comparado aos outros tratamentos. Ferreira et al. (2003), avaliando o efeito da inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do trigo, observaram contribuição variando de 13% a 19% quando as plantas foram inoculadas, resultados similares também foram encontrados por Guimarães et al. (2003).

Diante dos dados apresentados, ao comparar as duas bactérias estudadas, pode-se evidenciar o efeito positivo da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, principalmente quando associada a dose de 100 kg N ha⁻¹, visto que, favoreceu de forma significativa o aumento da produtividade, do peso de 1000 grãos, e o acúmulo de N nos grãos. Moreira et al. (2010), afirmam que o *Herbaspirillum seropedicae*, por ser uma bactéria diazotrófica endofítica obrigatória, se torna mais eficiente na transferência dos compostos nitrogenados produzidos para a planta.

A resposta positiva das plantas à inoculação com bactérias diazotróficas pode ser atribuída a outros fatores, além da produção de substâncias promotoras do crescimento, tais como proteção contra fitopatógenos, alteração da atividade metabólica através de efeitos sobre membranas celulares (BASHAN et al., 2004), solubilização de fosfatos, aumento da resistência das plantas ao estresse e a própria fixação biológica de nitrogênio (GRAY e SMITH, 2005).

2.12 CONCLUSÕES

Há diferença de resposta de crescimento e produtividade entre a safra de verão e de inverno, sendo a resposta da inoculação verificada na safra de maior crescimento e produtividade.

A inoculação de bactérias diazotróficas promove o aumento no acúmulo de matéria seca e no índice de área foliar das plantas de milho, conseqüentemente, influenciando as taxas de crescimento da cultura e as taxas de assimilação líquida.

Quando associada a adubação, pode-se evidenciar ainda, que a inoculação promove um alongamento do período vegetativo (2º estágio do desenvolvimento da cultura), retardando a senescência foliar das plantas, refletindo na produção de massa seca e no índice de área foliar.

Na safra de verão o efeito da inoculação da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* estirpe ZAE94 foi superior à inoculação de *Azospirillum brasilense* estirpe Sp 245 na produtividade da cultura, no peso de 1000 grãos e no acúmulo de N nos grãos, onde as maiores produtividades são encontradas nos tratamentos inoculados com esta bactéria, principalmente quando associado a dose de 100 kg N ha⁻¹.

3. CAPÍTULO II

MODIFICAÇÕES DO METABOLISMO DE N DE PLANTAS DE MILHO INOCULADAS COM *Herbaspirillum seropedicae* E *Azospirillum brasilense*

3.1 RESUMO

A cultura do milho é muito responsiva a aplicação de nitrogênio (N), no entanto, para atingir altas produtividades é necessário a aplicação de altas doses deste nutriente. As bactérias diazotróficas *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 e *Azospirillum brasilense* Sp245 foram selecionadas para a inoculação deste cereal. Diante disso, o trabalho tem como objetivo avaliar o efeito destas duas espécies no metabolismo do N em plantas de milho, na presença de duas doses de nitrogênio em sistema hidropônico. Para tal, foi desenvolvido um experimento em casa de vegetação, utilizando cultivo hidropônico com aeração intermitente. Adotou-se um arranjo fatorial composto por dois níveis de adubação (3,0 mM e 0,3 mM de N), com diferentes inoculações (NI - não inoculado, Hs - *Herbaspirillum seropedicae* e Ab - *Azospirillum brasilense*), em oito repetições. Os parâmetros avaliados foram: massa seca de parte aérea, raiz e total, acúmulo de N, P e K na biomassa de raiz e parte aérea, atividade da enzima nitrato redutase e frações solúveis nas raízes e nas folhas. A inoculação alterou o metabolismo do nitrogênio e promoveu maior desenvolvimento das plantas de milho, bem como, maior acúmulo de P e K na parte aérea. Um processo mais intensivo de assimilação do N foi evidenciado quando as plantas foram inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae*, promovendo aumento dos teores nas folhas de N-amino e NH_4^+ e redução de NO_3^- e açúcares.

Palavras chave: Frações solúveis. Nitrogênio. *Herbaspirillum seropedicae*. *Azospirillum brasilense*

3.2 ABSTRACT

Maize culture is highly responsive to the application of nitrogen; however, to achieve high productivity, the application of high concentrations of N is required. The diazotrophic bacteria *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 and *Azospirillum brasilense* Sp245 were selected as promising inoculations for this cereal. The objective of this study was to evaluate the effect of these two species on N metabolism in maize plants, in the presence of two concentrations of nitrogen in a hydroponic system. For this purpose, maize was cultivated in a greenhouse, using hydroponic cultivation with intermittent aeration. A factorial arrangement composed of two levels of nitrogen (3.0 and 0.3 mM of N), with different inoculations (NI - not inoculated, Hs - *Herbaspirillum seropedicae*, and Ab - *Azospirillum brasilense*) was used, with eight replications. The parameters evaluated were: dry mass of aerial part, root, and total dry mass; accumulation of N, P, and K in the biomass of root and shoot; nitrate reductase activity; and soluble fractions in roots and leaves. The inoculation altered the N metabolism and promoted greater development of maize plants, as well as a higher accumulation of P and K in the aerial plant tissue. A more intensive process of N assimilation was evidenced when the plants were inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* strain ZAE94, leading to increased levels of NO_3^- and reduced N-amino, sugars and NH_4^+ in leaves associated with high N level, opposite of *A. brasilense* Sp245.

Key words: Soluble fractions. Nitrogen. *Herbaspirillum seropedicae*. *Azospirillum brasilense*.

3.3 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays L.*) é uma das mais importantes fontes de energia e nutrientes para alimentação animal e humana no mundo, e pode ser utilizado de diferentes formas, desde agente espessantes a produção de energia e na forma de etanol (RANUM et al. 2014). Devido à grande importância que essa cultura possui, hoje se busca formas de minimizar os custos de produção e da dependência de fertilizantes, principalmente nitrogenados. Com isso, diferentes linhas de pesquisa vêm sendo desenvolvidas, desde o melhoramento de plantas, buscando maior eficiência na utilização de nutrientes (LEA et al., 2006) a utilização da inoculação de bactérias diazotróficas (CASSAN et al., 2013).

A utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio em interação com a cultura do milho vem ganhando importância nos últimos anos baseado em pesquisas prévias sobre maior acúmulo de massa seca total e de grãos (DOBBELAERE et al., 2002; KUMAR et al., 2007; REIS JÚNIOR et al. 2008; ARAÚJO, et al., 2013) sendo hoje parte da tecnologia de produção desta cultura do Brasil, com a introdução de inoculação de bactérias diazotróficas usando a espécie *Azospirillum brasilense* (HUNGRIA et al., 2010). Porém, ainda são pouco conhecidos os mecanismos que atuam nesta interação (planta/bactéria) incluindo a produção de auxinas, óxido nítrico, carotenoides, entre outros (FIBACH-PALDI et al. 2012; CASSAN et al. 2013). Estes estudos foram feitos com a espécie *Azospirillum brasilense*, mais antiga e conhecida entre as diazotróficas associativas (TARRAND et al. 1978). Outras espécies são conhecidas pela sua promoção de crescimento em diferentes plantas como a espécie *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al. 1986), descrita como endofítica obrigatória por diferentes autores (MONTEIRO et al., 2012), e avaliada como promotora de crescimento em algumas plantas como o arroz (GYANESHWAR et al. 2002) e milho (MONTEIRO et al. 2008), mas os mecanismos de promoção podem ser diferentes entre estas espécies.

Em busca de um maior entendimento dos benefícios que essa interação promove para as plantas, estudo do efeito da bactéria sobre metabolismo de nitrogênio (N) se faz necessário e algumas formas de se buscar essa compreensão pode ser através da quantificação das frações solúveis do tecido vegetal, como N-amino, NO_3^- acumulado, açúcares e NH_4^+ e também através da atividade de algumas enzimas como a nitrato redutase.

A hipótese científica é que a inoculação com bactérias diazotróficas na cultura do milho promove alterações no crescimento e no metabolismo vegetal, e conseqüentemente, na produção de grãos e na absorção de macronutrientes (N, P e K). Para tal, foi idealizado este estudo, que teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação de duas espécies de bactérias diazotróficas no metabolismo de N das plantas de milho cultivado em sistema hidropônico com solução nutritiva com alta e baixa concentração de deste elemento.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Local de Estudo

Os estudos foram realizados em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, localizada no município de Seropédica – RJ, no período de julho a agosto de 2016. Esses experimentos foram desenvolvidos em um fatorial 2x3, com 8 repetições, onde o primeiro fator foi composto por duas doses de nitrogênio (0,3 mM e 3,0 mM de N da solução de Hoagland e Arnold (1954) modificada, e o segundo fator a inoculação sendo: não inoculado (NI), inoculado com a *Herbaspirillum seropedicae* (Hs - estirpe ZAE94) ou inoculado com *Azospirillum brasilense* (Ab – estirpe Sp245). O genótipo de milho utilizado foi o híbrido triplo SHS5050 produzido pela Companhia Santa Helena, proveniente da safra 2014/2015.

3.4.2 Inoculação

Foram utilizadas as bactérias *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe ZAE94 (= BR11417, isolada de raízes de arroz, esterilizadas superficialmente) e a *Azospirillum brasilense* estirpe Sp245 (= BR11005 – isolada de raízes de trigo plantado Rio grande do Sul, Brasil), bactérias essas que foram adquiridas junto ao Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner – CRB-JD (sigla BR). A estirpe ZAE94 foi selecionada para milho baseado nos estudos prévios de Alves et al. (2015) e a estirpe Sp245 foi amplamente estudada por diferentes grupos, tendo seu genoma sequenciado por Zhulin e Wisniewsky-Dye (<http://genomics.ornl.gov/research/azo>). Neste estudo a estirpe Sp245 foi utilizada como modelo de interação planta-bactéria.

As estirpes foram inicialmente crescidas em placas com meio de cultura sólido JNFb (BALDANI et al., 2014) com o objetivo de verificar a pureza. Para obtenção dos inoculantes, colônias puras foram inoculadas em tubos com 5 mL de meio DYGS (BALDANI et al., 2014) e multiplicadas por 24 h a 30°C em mesa agitadora a 175 rpm. Após esta etapa, 100 µl da suspensão foi inoculado em frascos contendo 75 ml do mesmo meio e multiplicado nas mesmas condições descritas anteriormente. A densidade óptica utilizada foi de 600nm ajustada para 1, de modo a obter um inóculo contendo aproximadamente 10^9 células mL⁻¹ e esta suspensão final foi inoculada em 175 g de uma turfa seca previamente moída, homogeneizada, autoclavada e ajustada em pH a 6,0. Pouco depois da inoculação, a turfa inoculada foi mantida a 30 °C durante 24 h, antes da aplicação final. Após este período, as sementes foram cobertas com o inóculo de turfa na razão de 250 g para 10 kg de semente de milho. O tratamento não inoculado recebeu apenas a turfa autoclavada.

3.4.3 Hidroponia

A pré-germinação das sementes recobertas com a turfa (inoculada ou não) foi realizada em tubetes contendo substrato comercial Multiplant[®] com a seguinte caracterização química determinada: N=0,67 %, e macroelementos (g kg⁻¹): P₂O₅=2,0; K₂O=2,12; Ca 20,0 e Mg 12,2. Em cada tubete foi adicionado uma semente e 10 dias após a germinação as plantas foram padronizadas quanto ao tamanho e levada para a realização da lavagem das raízes visando a retirada do excesso de substrato que pudesse está aderido a estas e levadas para o sistema hidropônico em vasos de 6 L de solução (Figura 20).

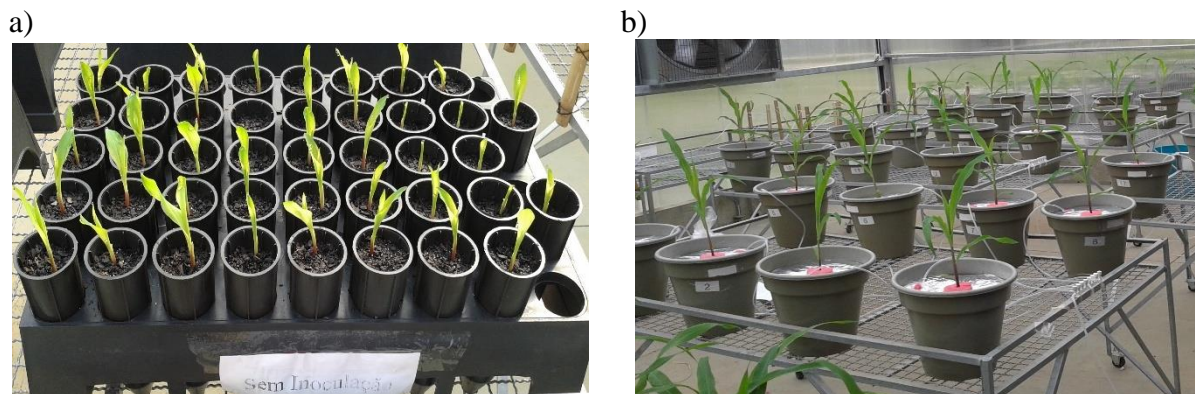


Figura 20. Representação do plantio das sementes em pós-germinação (a). Representação das plântulas transplantadas para cultivo hidropônico (b).

No sistema hidropônico foi utilizado a solução nutritiva modificada de Hoagland's (Hoagland and Arnold, 1954), descrita na Tabela 5, onde na solução 1 é descrita a solução de baixo N (0,3 mM de N) e na solução 2 a de alto N (3,0 mM de N). Em ambas as soluções, também foi adicionado 1 mL de solução estoque de micronutrientes para cada litro de solução nutritiva, contendo: 4,6 μM H_3BO_3 ; 0,5 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,2 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em 1 L de água deionizada.

Tabela 5. Solução nutritiva modificada de Hoagland utilizada no crescimento das mudas de cana-de-açúcar com 0,25 mM NO_3^- e 0,05 mM de NH_4^+ (solução 1) e com 2,5 mM de NO_3^- e 0,5 mM NH_4^+ (solução 2), nutrientes para 100 litros de solução nutritiva.

Sal, ácido ou base	Nutriente	1	2
		----- g-----	
Nitrato de magnésio	N- NO_3^-	3,21	6,41
Nitrato de cálcio		-	23,62
Sulfato de amônia	NH_4^+	0,33	3,3
Fosfato de potássio dibásico	P	-	8,71
Sulfato de potássio	K	17,35	17,35
Fosfato de potássio dibásico		8,71	-
Sulfato de magnésio	S- SO_4^-	21,26	18,17
Sulfato de cálcio		27,17	13,58
Ferro EDTA	Fe	1,5	1,5

A solução 2 foi utilizada em todos os vasos na primeira fase do experimento sendo aplicada a $\frac{1}{4}$ da força iônica (FI) na primeira semana, para adaptação das plantas ao cultivo hidropônico. Após os 20 dias as plantas foram restringidas a nitrogênio por 72 h, e após este período os vasos foram divididos em dois tratamentos, onde metade foram abastecidos com a solução 1 e a outra metade com a solução 2.

A cada dois dias foi realizado a correção do pH da solução nutritiva, utilizando quando necessário a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05N e/ou ácido clorídrico (HCl) 0,03 N para manutenção de valores de pH próximo a 5,5 e a cada quatro dias era realizada a troca da solução nutritiva do sistema.

3.4.4 Sistema Hidropônico

Durante os primeiros 20 dias após o transplante para os vasos, as plantas foram mantidas sobre suprimento de alta dose de nitrogênio e aos 20 realizou-se a primeira coleta (C1). Assim que foi realizada a C1, o N da solução nutritiva foi retirado por um período de 72 h, passado esse período de 72h foi realizada a segunda coleta (C2). Como já descritos anteriormente logo após a C2 os vasos foram divididos em dois tratamentos (alto e baixo N) e 7 dias após essa divisão foi realizada a terceira coleta (C3).

Nestas coletas foram retirados, 1,5 grama de raízes e 1,5 grama de folha de cada vaso. Para se ter um padrão de onde seria realizada essa coleta, utilizou-se como referencia a folha +1 (primeira folha totalmente expandida a partir do ápice foliar, sem a nervura central). Para determinação das frações solúveis 1 g de tecido foliar e 1 g de tecido radicular foram armazenados em álcool 80%. Para a determinação da atividade da nitrato redutase (aNR) foi coletado 0,5g de tecido foliar e 0,5g de tecido de raiz.

As coletas foram feitas entre 10 e 12 horas visando diminuir os efeitos circadianos da NR. Após o termino da C3, o material foi seco de forma separada, raiz e parte aérea, em estufa de ventilação forçada a 60 °C até que as amostras atingissem peso constate, depois as amostras foram moídas e realizado a determinação dos teores de N, P e K.

3.4.5 Atividade da Nitrato Redutase (aNR)

Foi realizada pelo método *in vivo* de acordo com Jaworski (1971) e adaptado para cana-de-açúcar por Santos et al., (2014). As coletas consistiram em amostras de 0,5 g dos fragmentos de tecido de raízes e da folha +1, cortadas a aproximadamente 1 cm da inserção no colmo. Os fragmentos foram acondicionados no escuro e adicionado 10 mL de solução extratora obtida a partir de 2,5 mL de tampão fosfato preparado com KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich) na concentração de 285 mmol dm^{-3} com pH 7,3; 2,5 mL de KNO_3 (Sigma-Aldrich) com concentração de 300 mmol dm^{-3} ; 1,0 mL de Tween 20 a 0,6% (v/v) e 4,0 mL de água deionizada. Logo após as amostras foram submetidas a vácuo (600 mm Hg) por 3 min e mantidas em banho-maria a 32°C, por 90 min. Após o período de incubação, foram retiradas alíquotas de 0,5 mL da solução de incubação de cada amostra e recolhidas em tubos de ensaio onde foram adicionados 0,5 mL de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) a 1%, 0,5 mL de n-naftil-etileno-diamino (Sigma-Aldrich) a 0,02%. As alíquotas permaneceram em repouso por 20 min e, então, foi acrescentada 4 mL de água deionizada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro, modelo 2000 UV (Bel Photonics) a 540 nm e a determinação da concentração de NO_2^- , obtida a partir de uma curva padrão usando NaNO_2 (Sigma-Aldrich). Desta forma, a atividade da enzima foi estimada pela quantidade de NO_2^- liberada pelos tecidos vegetais na solução de incubação e foi expressa em $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de matéria fresca.

3.4.6 Frações Solúveis Nitrogenadas e Açúcares Solúveis

Amostras de 1 g de tecidos foliares e raízes foram colocadas em 20 mL de álcool etílico, triturados por 3 min, homogeneizados e filtrados em 4 camadas de gaze. O filtrado foi então recolhido e transferido para funil de separação com uso de clorofórmio para separação das fases polar e apolar. A fase apolar foi descartada e a polar utilizada para as análises. Foi determinado simultaneamente os teores de nitrato e nitrito de acordo com Miranda et al. (2001), teores de N-amino livre pelo método da ninidrina segundo Yemm e Cocking, (1955), teores de amônio pelo método colorimétrico (MITCHEL, 1972; FELKER, 1977) e os teores de açúcares solúveis (YEMM e WILLIS, 1954).

3.4.7 Nitrogênio Total (N), Fósforo (P) e Potássio (K)

Após a pesagem, a parte e as raízes das plantas foram secas em uma estufa de ar de circulação forçada a 65 ° C até atingir um peso constante. As amostras foram inicialmente passadas em um tipo moinho Wiley (2 mm). Realizou-se a determinação de N, por digestão sulfúrica e destilação, já P foi K por digestão nitroperclórica, determinou-se P por colorimetria e K por fotometria de chama (MALAVOLTA et al., 1997).

3.4.8 Análise Estatística

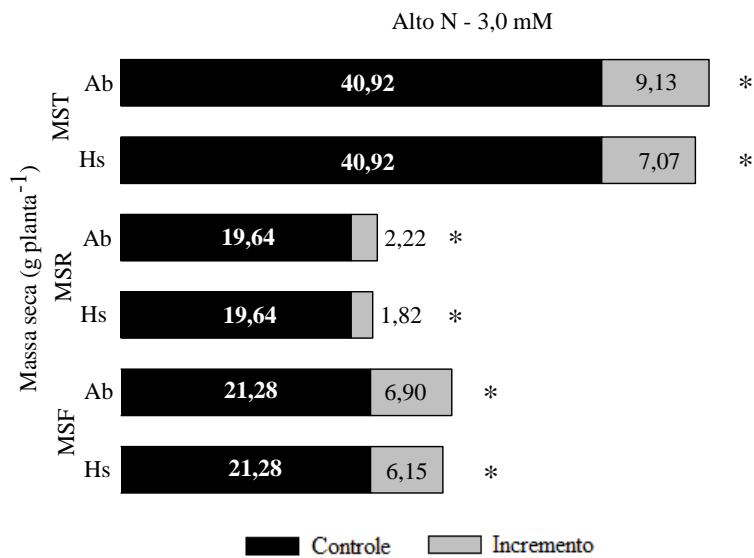
Os dados foram analisados no programa SAEG 9.0 (EUCLYDES, 2004) quanto a normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran & Bartlet), em seguida foram feitas análises de variância com auxílio do programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010). Os dados, após os testes de normalidade e homogeneidade, foram submetidos à análise de variância e, quando significativo os tratamentos, estes foram submetidos a testes de média. O teste de média utilizado foi o Tukey a 5% de probabilidade.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Acúmulo de Biomassa e Nutrientes

A massa seca das plantas de milho cultivadas em sistema hidropônico por 30 dias atingiu valores máximos de 50,05 g, sendo que 56 % deste foi acumulado na parte aérea das plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* na presença de 3,0 mM de N (Figura 21a). Esta mesma relação foi obtida com a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. No controle não inoculado, esta relação cai para 52 % apresentando significativa queda na massa seca acumulada tanto nas raízes como na parte aérea comparado aos tratamentos de inoculação nas duas concentrações de N (Figura 21a e b).

a)



b)

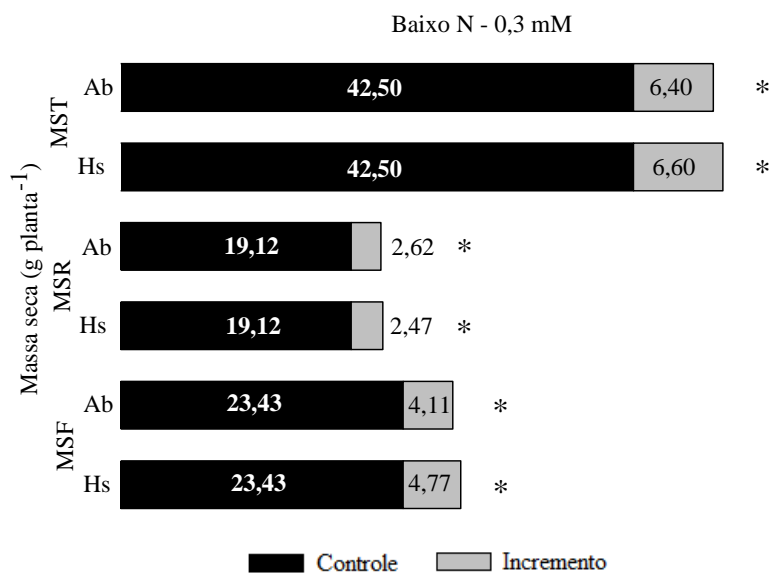


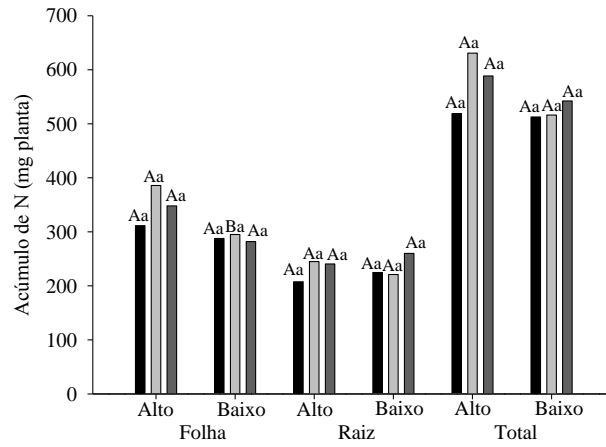
Figura 21. Massa seca de milho acumulada aos 40 dias sob condições hidropônicas e inoculada ou não com *Azospirillum brasilense* (Ab) e *Herbaspirillum seropedicae* (Hs). MSF - massa seca folha; MSR - massa seca da raiz; MST - massa seca total. Valor médio de 8 repetições. * diferem em $P < 0,05$ (teste de Tukey).

Para o acúmulo de N nas folhas, não houve diferença entre o controle e as plantas inoculadas (Figura 22a), tanto em alta dose de N quanto em baixa. Entretanto, quando se compara o efeito do tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* entre a dose alto e baixa de N, pode-se observar que a inoculação com esta bactéria, associada ao alto nível de N, promoveu maior acúmulo de N nas folhas. Esse resultado não foi observado nas raízes e no N total acumulado na planta.

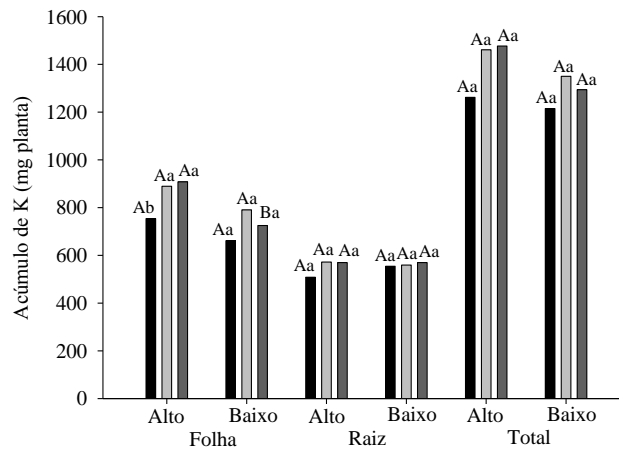
O nutriente acumulado em maior quantidade foi o K, seguido do N e mantendo uma proporção de 2:1 (p/p), já esperado para plantas de milho neste início do crescimento (Figura 22b). No milho inoculado com *Azospirillum brasilense*, este aumento foi de 20,4 % mais K na parte aérea das plantas inoculadas comparado ao controle, enquanto que a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* este aumento foi de 18%. Quando se reduziu o N na solução para 3,0 mM, o acúmulo de K foi menor na parte aérea das plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense*. Como K foi o nutriente de maior teor, ele também foi o mais sensível a influência dos tratamentos nesta primeira fase de crescimento.

Cultivadas com baixo N, estas relações de proporcionalidade foram mantidas. Não houve diferença entre o alto e baixo N, mas a inoculação modificou o P nos tecidos foliares na presença de alto N na coleta 1 (C1), sendo maior quando inoculado com Hs comparado ao controle NI (Figura 22c). Nas coletas subsequentes estas diferenças não foram observadas.

a) Total N



b) Total K



c) Total P

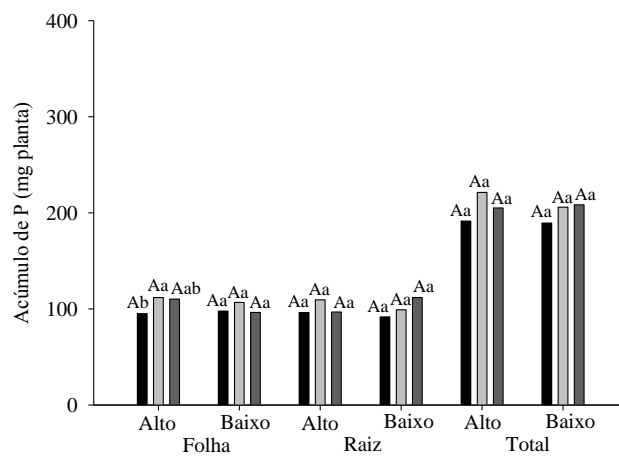


Figura 22. Nitrogênio (N), potássio (K) e fósforo (P) acumulados em plantas de milho aos 40 dias após o transplante para o vaso. NI - controle não inoculado, Hs - *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 e Ab - *Azospirillum brasilense* Sp245. As letras indicam diferenças significativas em $P < 0,05$ ($n = 8$). A letra maiúscula comparar os níveis de nitrogênio e a minúsculas comparam os tratamentos inoculação em cada dose de N.

3.5.2 Atividade da Enzima Nitrato Redutase (aNR)

Os resultados de atividade da aNR (Figura 23), foram divididos em atividade da enzima nas folhas e nas raízes. Observa-se que a maior atividade da enzima foi obtida nas folhas quando comparado a raiz. Nas folhas os valores acima de 0,6 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{MF}$, enquanto nas raízes todos os valores são inferiores a 0,3 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{MF}$, demonstrando que a maior parte do nitrato absorvido pelas plantas de milho são assimilados em suas folhas. Estes resultados são esperados para esta enzima quando comparado os diferentes tratamentos em ambos os órgãos, somente foi verificada diferença significativa na aNR entre as doses de N na C3, onde tanto na raiz quanto nas folhas, a condição de alto N promoveu maior aNR. Nas folhas a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe ZAE94 manteve a aNR nas plantas cultivadas com baixo N, mesmo com 14,5 % menos não foi estatisticamente menor. Nas raízes, com cerca de 25% da atividade foliar, a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* diferiu do controle na coleta 1 (C1). Já *Azospirillum brasilense* manteve a atividade com 0,3 mM comparada a solução com alto N na C3.

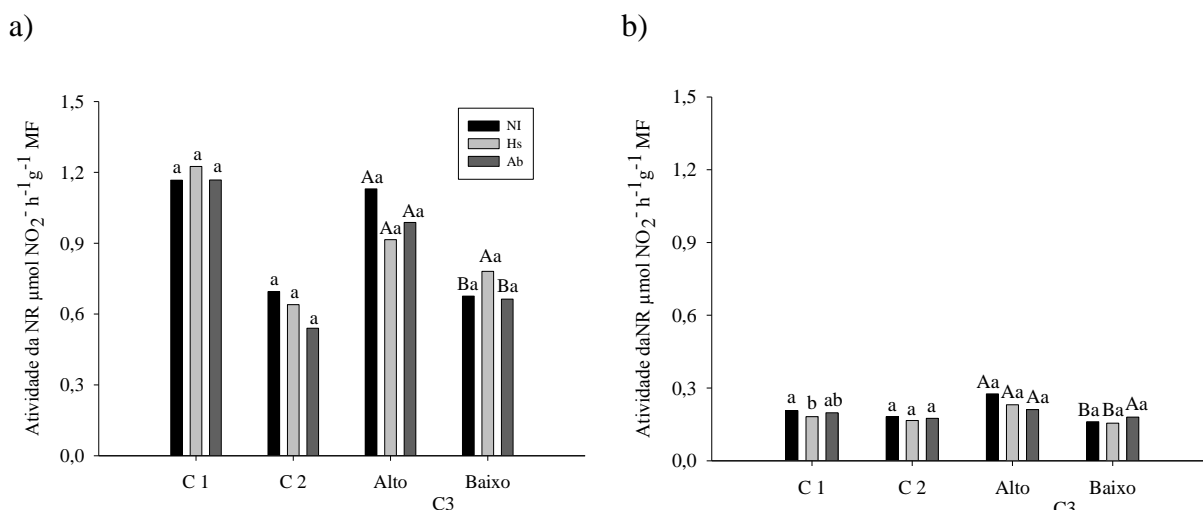


Figura 23. Atividade de nitrato redutase (aNR) em Massa fresca de parte aérea (a) e raízes de milho (b) inoculados ou não (NI) com *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (Hs), *Azospirillum brasilense* Sp245 (Ab). Avaliados aos 20 dias (C1), depois de 72 horas (C2) e na colheita final aos 40 dias (C3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas em $P < 0,05$ ($n = 8$). As letras maiúsculas comparam os níveis de nitrogênio e as minúsculas comparam os tratamentos inoculados nas coletas.

3.5.3 Frações Solúveis – N-amino

Na avaliação das frações solúveis, os tratamentos com inoculação modificaram diversos parâmetros (Figura 24). Na coleta C1, quando as plantas foram supridas com 3,0 mM de N durante 20 dias consecutivos, os tratamentos que receberam inoculação, tanto com *Herbaspirillum seropedicae* quanto com *Azospirillum brasilense*, foram os que apresentaram os maiores teores de N-amino nas folhas (Figura 24a) e menores teores na presença de *Herbaspirillum seropedicae* nas raízes (Figura 24b).

No entanto, após passarem por um período de “fome”, ou seja, período de 72 h sem suprimento de N (C2), notou-se um decréscimo considerável nos teores N-amino quando comparados a C1, não apresentando diferença significativa entre os tratamentos que receberam a inoculação em relação ao controle não inoculado (Figura 24a e b).

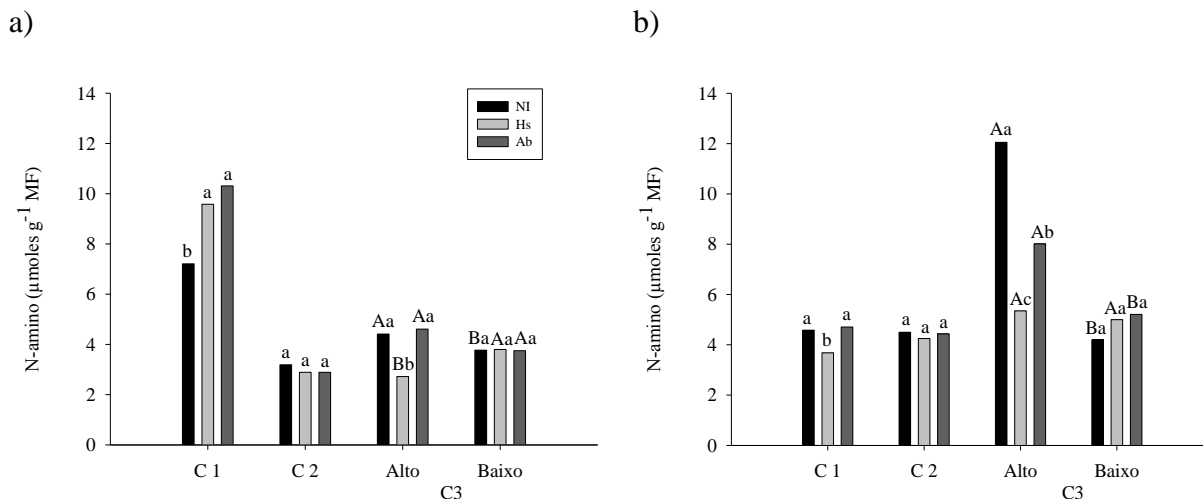


Figura 24. N-amino na massa fresca de parte aérea de milho (a) e raízes (b) inoculados ou não (NI) com *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (Hs), *Azospirillum brasilense* Sp245 (Ab). Avaliados aos 20 dias (C1), depois de 72 horas (C2) e na colheita final aos 40 dias (C3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas em $P < 0,05$ ($n = 8$), letras maiúsculas, comparam os níveis de nitrogênio e as minúsculas entre os tratamentos inoculados nas coletas.

Posteriormente, na C3, quando as plantas receberam os tratamentos com diferentes doses de N, alto (3,0mM de N) e baixo (0,3mM de N), verificou-se que em condições de alto N o tratamento que recebeu a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, apresentou o menor teor de N-amino nas folhas quando comparado aos outros dois tratamentos (inoculado com *Azospirillum brasilense* e o tratamento controle) (Figura 24a). Quando observado o efeito da dose de N em cada tratamento nota-se que, para o tratamento NI, com a diminuição do N em solução, houve também diminuição do teor de N-amino. Resultado oposto foi evidenciado quando as plantas foram inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae*, onde com a diminuição da dose de N ocorreu aumento no teor de N-amino na folha. No entanto, no tratamento com *Azospirillum brasilense* não foi observada diferença significativa entre as duas doses de N.

Nas raízes, observou-se que em condições de alto N (C1 e C3 alto), o tratamento com *Herbaspirillum seropedicae* foi o que apresentou os menores teores de N-amino (Figura 24b). Enquanto que, em condições de baixo N (C2 e C3 baixo), tanto nas folhas como nas raízes, não foi evidenciado diferença estatística entre os três tratamentos. Ao analisar em cada tratamento o efeito das doses de N, nota-se que nos tratamentos controle e com *Azospirillum brasilense* ocorreu diminuição no teor de N-amino nas raízes, quando associada a condição de baixo N. Entretanto, não foi observado diferença significativa para o tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae*.

3.5.4 Nitrito

Na C1, as plantas foram cultivadas com alto N por 20 dias, o tratamento que recebeu a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, foi o que apresentou os menores teores de NO_3^- nas folhas, uma redução de aproximadamente 4 vezes (Figura 25a) quando comparado aos outros dois tratamentos, sendo que esta diferença não foi observada na raiz (Figura 25b). Com 72 horas de “fome” (C2), os tratamentos que apresentavam elevados teores foliares decresceram rapidamente e o controle não inoculação manteve os valores similares ao inoculado com *Herbaspirillum seropedicae*, diferindo do inoculado com *Azospirillum brasilense* (Figura 25) reduzindo ainda mais nas raízes, sendo que com a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* apresentou uma redução significativa quando comparado ao

controle não inoculado (Figura 25b). É de se esperar que estas modificações sejam rápidas devido a grande mobilidade deste íon, mas a inoculação destas duas espécies de bactérias diazotróficas modificaram esta mobilidade de forma significativa, especialmente na presença de *Herbaspirillum seropedicae*. Após o ressuprimento de N, as raízes apresentaram maiores valores que a parte aérea. Estes resultados podem significar uma retomada mais rápida da incorporação deste íon em esqueletos de carbono nesta fase de crescimento mais elevado do milho (Figura 25b) e diferente nas folhas, com quantidade mesmo que pequenas, mas significativamente maior na presença da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* (Figura 25a). No entanto, ao adicionar uma baixa concentração de N na solução não foi evidenciada diferença entre os tratamentos, retornando à atividade basal (Figura 25).

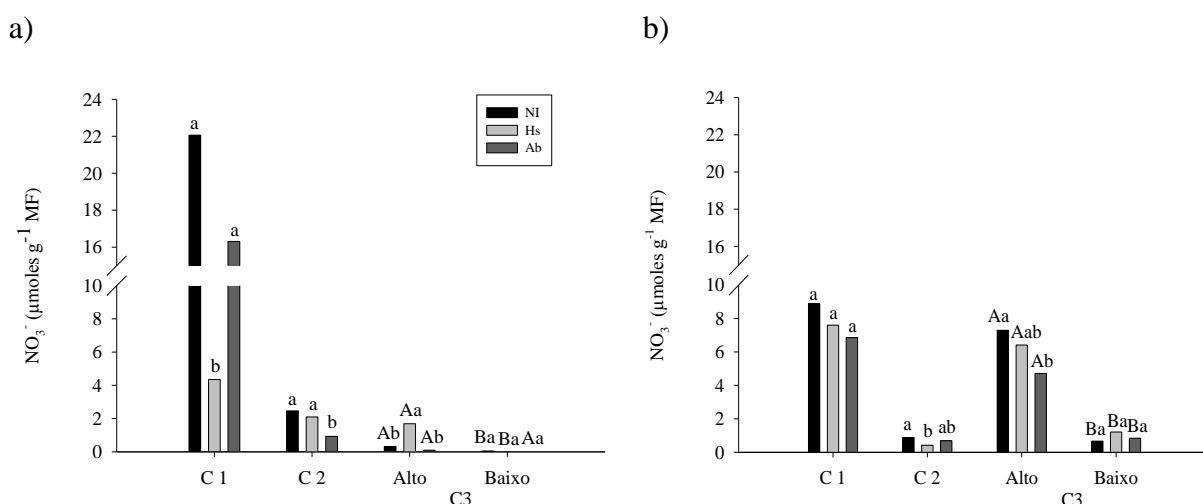


Figura 25. NO₃⁻ na Massa fresca de parte aérea (a) e raízes (b) de milho inoculados ou não (NI) com *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (Hs), *Azospirillum brasilense* Sp245 (Ab). Avaliados aos 20 dias (C1), depois de 72 horas (C2) e na colheita final aos 40 dias (C3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas em P < 0,05 (n = 8). As letras maiúsculas comparam os níveis de nitrogênio e as minúsculas comparam os tratamentos inoculados nas coletas.

Na coleta C2, que foi realizada após o período em que as plantas passaram por 72 h sem o fornecimento de N, só foi observado diferença significativa entre os tratamentos para NO₃⁻ na folha. Nesta coleta observou-se que o tratamento inoculado com *Azospirillum brasilense* apresentou menor teor de NO₃⁻ (Figura 25). Pode-se explicar esta redução devido a um maior consumo do NO₃⁻ que havia sido acumulado na fase anterior. Outra diferença foi observada na raiz onde o tratamento controle foi superior a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. Esta diferença pode ser devido a realocação do NO₃⁻ dentro da planta como citado anteriormente, onde a bactéria pode estar influenciando nesse processo.

3.5.5 Açúcares Totais

Aos 20 dias de crescimento do milho no sistema hidropônico, foi observado um menor teor de açúcares nas folhas (Figura 26a) comparado as raízes (Figura 26b) mostrando que as plantas neste início de crescimento translocaram os fotoassimilados para as raízes. Entretanto a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* diminuiu estes teores, em consonância com os menores teores de nitrato nos tecidos da parte aérea (Figura 26a) e significativamente maior nas raízes na presença de *Azospirillum brasilense* (Figura 26b). Na coleta C2, durante 72 h de “fome”, os teores de açúcar não diferiram, mantendo uma atividade basal nos dois tecidos (Figura 26).

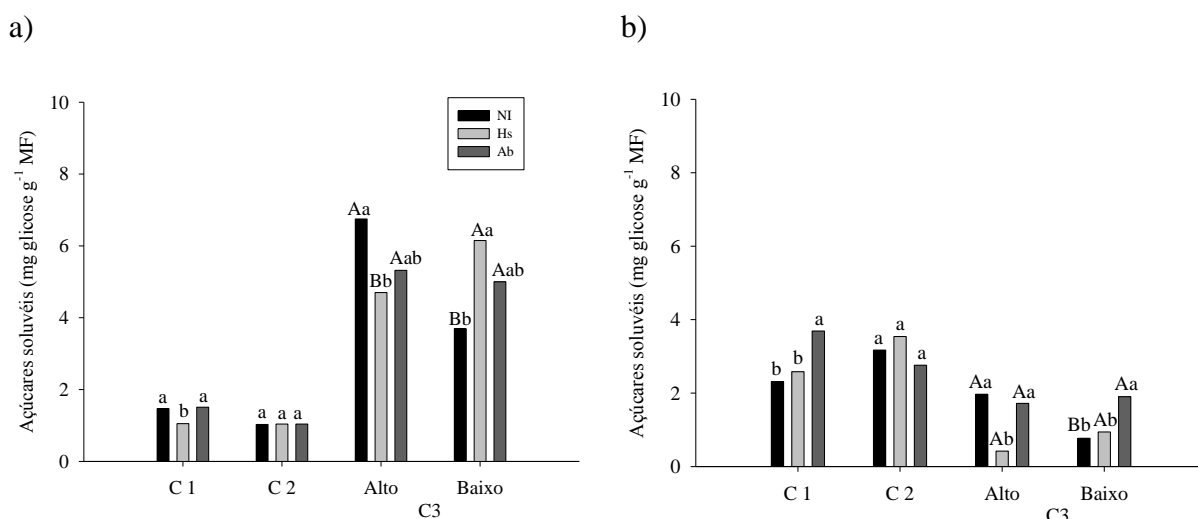


Figura 26. Açúcares totais em Massa fresca de parte aérea (a) e raízes (b) de milho inoculados ou não (NI) com *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (Hs), *Azospirillum brasilense* Sp245 (Ab). Avaliados aos 20 dias (C1), depois de 72 horas (C2) e na colheita final aos 40 dias (C3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas em $P < 0,05$ ($n = 8$). As letras maiúsculas comparam os níveis de nitrogênio e as minúsculas comparam os tratamentos inoculados nas coletas.

Após o período de “fome” e ressuprimento do N na solução, observou-se que na dose alta de N, o tratamento não inoculado foi o que apresentou o maior teor de açúcares solúveis (Figura 26a). Porém, quando associado a dose baixa N, o tratamento que recebeu a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* foi o que apresentou o maior teor de açúcares solúveis quando comparado ao controle não inoculado na parte aérea (Figura 26a) e a inoculação com *Azospirillum brasilense* nas raízes e comparáveis ao alto N (Figura 26b). Estes resultados podem ser associados a produção de massa seca e acúmulo de macronutrientes, pois o tratamento que apresentou maior aNR nas condições de baixo N (Figura 26) foi a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. Isto refletiu em maior massa seca da parte aérea dos tratamentos inoculados com *Herbaspirillum*, acumulando 13 mg de N comparado a inoculação com *Azospirillum* (Figura 22).

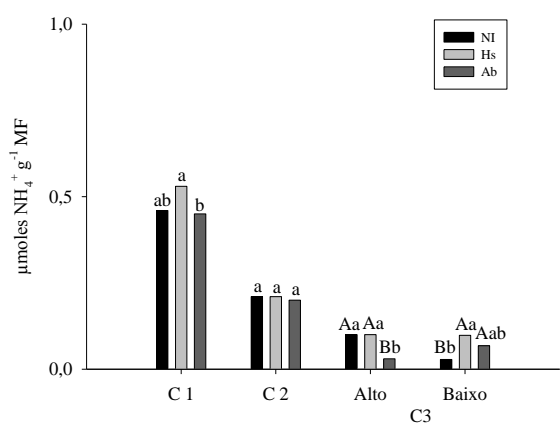
Nas raízes, o tratamento que recebeu a inoculação com *Azospirillum brasilense* foi o que apresentou maior teor tanto na C1 quanto na C3 em ambas as condições de N. No período sem suprimento de N (C2), não foi evidenciado diferença entre os tratamentos (Figura 26b). Comparando os resultados de açúcares totais e nitrato nos tecidos pode-se observar que nas folhas o nitrato foi consumido, sendo um reflexo da maior quantidade de açúcares totais, refletindo na incorporação deste íon aos esqueletos de carbono, em plena atividade fotossintética e de acúmulo de massa (Figura 26). As raízes foram o local de menor atividade metabólica, deixando um remanescente de açúcar maior em comparação à parte aérea (Figura 26b).

3.5.6 Amônio

Com relação a NH_4^+ na folha, os maiores teores foram observados na C1 (Figura 27a), e o inverso ocorreu nas raízes (C2 e C3) (Figura 27b). Estes resultados estão de acordo com os teores de NO_3^- nas folhas, que também foram maiores na C1 (Figura 27a), embora as proporções sejam muito menores ($22 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ comparado a $0,55 \mu\text{moles NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$). Nas coletas posteriores estes teores reduzem ainda mais, atingindo valores próximos a 0,2

$\mu\text{moles NH}_4^+ \text{g}^{-1}$ na C3, tanto em alto como em baixo N nas folhas (Figura 27a). Nas raízes ocorreu o inverso, sendo esta parte da planta a responsável pela assimilação e onde o mesmo será reduzido para incorporação nos esqueletos de carbono (Figura 27b). O tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* foi o que apresentou o maior teor na C1 e na C3 em baixo N (Figura 27a). Nas raízes o tratamento que apresentou os maiores teores foi o tratamento com a ausência de inoculação, tanto na C1 como na C3 em alto N (Figura 27b). Para o efeito das doses em cada tratamento, verificou-se que, tanto nas raízes quanto nas folhas, apenas o tratamento não inoculado apresentou redução do teor NH_4^+ quando foi aplicada uma menor dose de N na solução nutritiva (Figura 27). As diferenças do tratamento de inoculação só foram observadas nas folhas na C1 e C3 entre as estirpes avaliadas (Figura 27a).

a)



b)

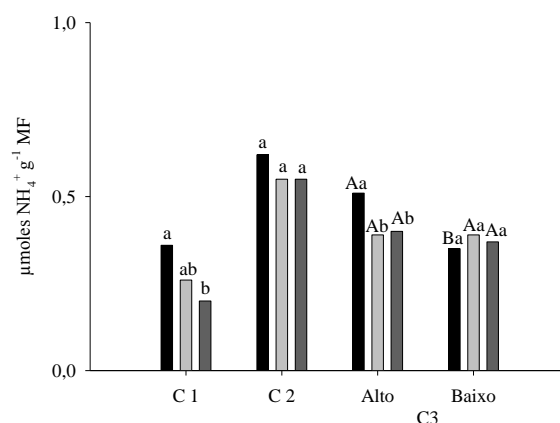


Figura 27. NH_4^+ na Massa fresca de parte aérea (a) e raízes (b) de milho inoculados ou não (NI) com *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (Hs), *Azospirillum brasilense* Sp245 (Ab). Avaliados aos 20 dias (C1), depois de 72 horas (C2) e na colheita final aos 40 dias (C3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas em $P < 0,05$ ($n = 8$). As letras maiúsculas comparam os níveis de nitrogênio e as minúsculas comparam os tratamentos inoculados nas coletas.

3.6 DISCUSSÃO

3.6.1 Acúmulo de Biomassa e Nutrientes

Para o acúmulo de massa seca das plantas aos 30 dias após o transplante das mudas para a hidroponia, os tratamentos que receberam a inoculação foram os que apresentaram os maiores valores. Os ganhos de massa seca, do tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* quando comparado ao não inoculado, na dose alta de N, na parte aérea, raiz e total, foram de 23, 9 e 16%, respectivamente. Para a inoculação com *Azospirillum brasilense*, foram de 24, 10 e 19 %. Na dose baixa de N o incremento na biomassa do tratamento com *Herbaspirillum seropedicae* foram de 17, 12 e 14% e o com inoculação de *Azospirillum brasilense*, foram 15, 11 e 13% (Figura 21). A associação de bactérias diazotróficas ao milho promove aumento de biomassa e produção de grãos como observado por Dobbelaere et al. (2002). A magnitude de resposta também está associada ao genótipo de milho testados (REIS JÚNIOR et al. 2008; ARAÚJO, et al., 2013); a estirpe/espécie (KUMAR et al., 2007) e a estirpe de uma mesma espécie (HUNGRIA et al., 2010). Este resultado de maior acúmulo de massa seca de plantas, grãos e nutrientes também foram evidenciados em outras culturas, como trigo (SALA et al., 2007) utilizando estirpes de *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas lurida* (SELVAKUMAR et al., 2009; 2011) ou mesmo arroz (GYANESHWAR et al., 2002).

Não foi encontrada diferença significativa no acúmulo de nitrogênio na biomassa das diferentes partes da planta (Figura 22). Entretanto, foi observado aumento deste nutriente acumulado nas folhas, associado aos tratamentos inoculados (*Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*) foram expressivos. Por exemplo, para o tratamento que recebeu a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* o aumento foi de 19 % e o inoculado com *Azospirillum brasilense* foi de 10 %, quando comparado ao tratamento não inoculado em dose alta de N na coleta C3. Para as doses baixas de N, a inoculação continuou proporcionando aumento no acúmulo de N, mas em uma proporção inferior a observada quando os tratamentos inoculados então associados a dose alta de N. Outros autores também confirmam que a inoculação promoveu um maior acúmulo de N na biomassa milho (ARAÚJO et al., 2013; ALVES et al., 2015). Este resultado pode ser entendido pela baixa eficiência do uso de N em cereais (PINTON et al., 2016).

Assim como observado para o N, verificou-se que para os acúmulos de K e P na folha, os maiores valores foram observados nos tratamentos que receberam a inoculação associado a dose alta de N quando comparado ao tratamento não inoculado (Figura 22b, c). A inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense* promoveu incrementos de P de 14 e 13% e de K de 15 e 16%, respectivamente. Dartora et al. (2016) avaliando a co-inoculação de bactéria diazotrófica em milho, observaram que a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* promoveu um aumento P das folhas de 12% quando comparado ao tratamento não inoculado. Para K, resultados similares foram encontrados por Araújo et al. (2013). O aumento no acúmulo de nutrientes está associado a maior produção de biomassa de raiz e parte aérea, na presença da inoculação, como também foi encontrado por diversos autores, em diferentes culturas (DOBBELAERE et al., 2002; KUMAR et al., 2007). Possivelmente, esse incremento deve-se a capacidade que as bactérias possuem de promover o crescimento vegetal, através da produção de fitormônios (CASSAN et al., 2013).

3.6.2 Atividade da Nitrato Redutase (aNR)

A aNR não foi afetada significativamente pela inoculação com as diferentes bactérias (Figura 23). Sabe-se que a assimilação de NO_3^- é rapidamente induzida pela presença externa

de NO_3^- (FORBE AND CLARKSON, 1999) sendo conhecido dois sistemas de alta afinidade e um para baixa afinidade. Dentro do sistema de alta afinidade temos o sistema induzido, conhecido como iHATS (inducible high-affinity transport system); e o outro constitutivo (cHATS). Já o sistema de baixa afinidade (LATS low-affinity nitrate transporte systems), sua atividade é constitutiva, se torna importante nas concentrações $> 1\text{mM}$ (FORDE, 2000). Pode-se dizer que nas condições avaliadas, os dois sistemas seriam ativos.

As taxas máximas de absorção de NO_3^- pelos sistemas de alta afinidade são geralmente vistas em poucas horas após o início do período de indução de NO_3^- , com taxas que, em seguida, diminuem significativamente devido, ao que se conhece. Aos efeitos inibitórios de feedback resultantes da acumulação dos produtos de sua assimilação, especialmente o iHATS e mesmo do LATS como descrito para cevada (FORDE, 2000).

Estudos mais recentes, apontam que para milho a maior contribuição na assimilação de nitrato, é feita pelo sistema HATS na presença de alto N e LATS para condições de baixo N (GARNETT et al., 2013). Outros sistemas assimilatório de nitrato estão sendo descobertos como os da família NPF, mas evidências moleculares destas atividades/funções neste estudo não foram avaliados. Neste caso foram utilizadas 72 h de ausência para que a assimilação prévia fosse utilizada e a planta estivesse ávida por novo suprimento, como observado na figura 22. Neste trabalho, a concentração alta foi 60 vezes maior que $50 \mu\text{M}$ (3mM), sendo claro que ambos os sistemas de afinidade de NO_3^- (baixo e alto) estavam sendo ativados. Os resultados aqui apresentados onde não houveram diferenças na aRN corroboram com estes estudos. Estudos realizados com a inoculação de *Azospirillum brasilense*, também não obtiveram efeito da inoculação sobre a atividade da enzima nitrato redutase (REIS JUNIOR et al, 2008). No entanto, El-Kommy et al. (2003) e Sala et al. (2007) demonstram que a inoculação desta mesma espécie promoveu maior aNR e aumento no metabolismo do N. Devido a grande influência ambiental e fase do crescimento atuarem de forma marcante nesta atividade, resultados controversos serão obtidos, mostrando que muito pouco se conhece sobre o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na assimilação de N em plantas de milho.

Analisando a aNR nos diferentes órgãos da planta de milho, observou-se que a folha foi onde apresentou a maior atividade da enzima conforme esperado. Resultado similar foi observado por Araújo e Machado (2006), onde os autores relatam que, quanto maior a disponibilidade de NO_3^- no meio de crescimento há tendência de obter maiores valores de aNR. Outro fator que se deve levar em consideração é que a assimilação de nitrato pelas raízes é regulada pela fotossíntese e apresenta uma atividade circadiana marcante (coletado no ápice da atividade diurna). No caso do milho o experimento foi conduzido no verão, fazendo com que a assimilação de C e N fosse a maior possível e desejável (DELHON et al. 1995). Outro fator atribuído ao NO_3^- refere-se ao seu estímulo à emissão de raízes laterais para o transporte de auxinas em adição a sua própria assimilação (KROUK et al., 2010). Entretanto os dados de massa seca de raízes não evidenciaram tal estímulo especialmente nas plantas inoculadas (Figura 21). No controle houve um incremento de 9 %, mas não foi significativo. Estes resultados podem ser explorados em estudos posteriores especialmente usando sistema de análise de imagem de raízes.

3.6.3 Frações Solúveis

Para os teores das frações solúveis encontrados nas folhas na coleta C1, fase em que as plantas estavam crescendo em condições normais de fornecimento de N, pode-se observar que, para os teores de N-amino (Figura 24) e NH_4^+ (Figura 27) o tratamento que recebeu inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* foi o que apresentou maior teor dessas duas frações, e menor teor de NO_3^- (Figura 25) e açúcares (Figura 26). Souza et al. (1999)

observaram que a redução no teor de açúcar estava associada a um aumento na concentração de aminoácidos livres na folha índice, o que poderia indicar uma intensa atividade metabólica com maior consumo de energia para assimilação do nitrogênio. Além disso, Santos et al. (2005), também afirmam que essa diminuição do teor de açúcar pode estar associada a uma maior assimilação de N pela planta para a formação de aminoácidos. Estes resultados colaboram com esta afirmação visto os teores de N-amino e NH_4^+ associados a este tratamento, que foram superiores quando comparado ao tratamento não inoculado.

O tratamento inoculado com Hs foi o que apresentou os menores teores de NO_3^- (Figura 25). Este fato pode ser explicado pela maior assimilação do N, como já discutido anteriormente; ou pelo maior acúmulo deste em outras partes da planta, como bainha e colmo, que não foram quantificadas. Segundo Crawford e Glass (1998), o nitrato pode ter vários destinos dentro da célula: estocagem no vacúolo, transporte para fora da célula, transporte para outros órgãos ou conversão para a amônio para ser incorporado em aminoácidos.

Após a coleta C2, as plantas foram divididas em dois grupos, onde um grupo passou a receber N na concentração ideal (alto N) e o outro grupo só recebeu 10 % do N necessário (baixo N). Uma nova coleta foi realizada (C3), onde foi observado inversão nos teores das frações, entre raiz e folha. Os teores de N-amino, NO_3^- e NH_4^+ , diminuíram na folha quando comparado a C1 (antes do estresse), e aumentaram na raiz. Já para o teor de açúcar ocorreu o inverso, antes do estresse os maiores teores eram observados nas raízes e após passou a ser observado nas folhas. Alguns autores descrevem esta inversão devido ao estresse por deficiência de N onde, sem N na folha para ser assimilado, as plantas tendem a acumular mais açúcares (HIRAI, et al., 2004; REMANS, et al., 2006; XU, et al., 2012). Os maiores teores de N-amino, NO_3^- e NH_4^+ encontrados nas raízes, pode ser atribuído a uma redução no transporte do elemento para as folhas, visto que a coleta foi realizada com apenas sete dias de ressurgimento do N.

Baseado nos resultados obtidos pode-se dizer que a inoculação de milho com duas estirpes/espécies de bactérias diazotróficas pode modificar a assimilação e o transporte de N no milho nas etapas iniciais de seu crescimento, favorecendo o acúmulo de massa, nutrientes e que o balanço C e N estão intimamente ligados nesta interação. Tanto o suprimento de N como a estirpe utilizada influenciaram as diferentes frações solúveis tanto na parte aérea como nas raízes, sendo estas modificações muito dinâmicas e necessitam de maiores estudos tanto no quesito tempo de coleta, fase de crescimento, como na quantidade e forma de N utilizado na presença do inoculante. Estudos moleculares e mesmo usando isótopos para o rastreamento destes compostos podem ajudar a elucidar os fatores modificados pela inoculação no ciclo de N deste cereal.

3.7 CONCLUSÕES

Neste estudo a inoculação de duas estirpes/espécies de Bactérias diazotróficas alteraram o metabolismo de nitrogênio e promoveram maior desenvolvimento das plantas de milho cultivado em sistema hidropônico durante o período experimental.

A inoculação refletiu em maior produção de massa seca independente da estirpe utilizada, tanto de parte aérea, raiz e total, sob ambas as condições de N. O acúmulo de K e P refletiram estes resultados, especialmente K, o macronutriente absorvido em maior quantidade, quando associado a maior dose de N. O acúmulo de N não mostrou diferenças nesta fase inicial de crescimento, mesmo as plantas sendo cultivadas com 0,3 mM de N.

Os maiores efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas, especialmente no metabolismo de nitrogênio, são observados sob condições ideais de N, apresentando maior aNR.

A inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* promoveu aumento dos teores de N-amino e NH_4^+ e redução dos teores de NO_3^- e açúcares na parte aérea das plantas inoculadas, indicando um processo mais intensivo de assimilação do N absorvido. *Herbaspirillum seropedicae* foi responsável pelas maiores modificações no metabolismo do milho, sendo que Ab, apresentou resultados diferentes nas coletas efetuadas, principalmente após o período de estresse, onde para algumas frações os diferentes tratamentos apresentaram comportamentos distintos entre si.

4. CONCLUSÕES GERAIS

As condições ambientais influenciaram diretamente a resposta da interação planta/bactéria, onde o período de maior temperatura e umidade (safra verão) promoveu respostas mais expressivas de ambas as bactérias, *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*.

Diante da avaliação do crescimento vegetal e da produção de grãos das plantas de milho, foi possível evidenciar o potencial da utilização de bactérias diazotróficas como insumo biológico, principalmente da espécie *Hesbaspirillum seropedicae*, uma vez que, a associação destas bactérias possibilita a redução dos custos com adubação, conseqüentemente, causando menor impacto ambiental, além de promoverem maior produtividade e melhor rendimento e qualidade dos grãos de milho.

Pode-se concluir que a inoculação promoveu alteração no metabolismo das plantas de milho, corroborando com os resultados, encontrados na análise de crescimento do primeiro capítulo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande diversidade de bactérias diazotróficas associativas está sendo cada vez mais estudada, mas pouco se conhece do potencial de aplicações de muitas espécies já descritas, como é o caso de *H. seropedicae*, esses estudos devem ser estimulados visando uma agricultura de menor custo e menor impacto ambiental, mas também valorizando o seu potencial biotecnológico.

É comprovado que a inoculação estimula uma série de reações bioquímicas entre raiz e bactéria envolvendo a produção de vários metabólitos secundários, produzidos tanto pelas plantas como pelas bactérias inoculadas. Neste trabalho, evidenciou-se que as bactérias promoveram respostas diferenciadas nas plantas de milho, nas duas épocas de plantio. No entanto, para a melhor compreensão da interação planta/bactéria, se faz necessário avaliar sua interação com diferentes genótipos de milho, uma vez que, o genótipo da planta desempenha papel importante na colonização pelas bactérias, o que deve estar relacionado com a relação rizosfera/bactéria. Outro ponto que deve ser considerado em estudos futuros, está relacionado a comparações em diferentes regiões edafoclimáticas, visto que, alterando-se o tipo de solo ou o clima, alteram-se também os fatores que afetam a relação planta/bactéria.

Para uma maior compreensão do efeito da inoculação no metabolismo de N, recomenda-se o aprofundamento e a repetição do experimento realizado, visto que, até o momento poucos estudos foram realizados sobre o efeito das bactérias diazotróficas, principalmente *H. seropedicae*, sobre o metabolismo de N nas plantas de milho.

O efeito da inoculação de bactérias diazotróficas no metabolismo de nitrogênio de plantas de milho, abre novos caminhos para o entendimento da ação dessas bactérias no desenvolvimento da cultura. Visto que, os resultados de metabolismo corroboram com os observados no crescimento vegetal, onde as duas estirpes/espécies de bactérias diazotróficas alteraram o metabolismo de nitrogênio, sendo mais eficientes na absorção e assimilação do elemento pelas plantas, promovendo maior desenvolvimento das plantas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G. C. Efeito da Inoculação de Bactérias dos Gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na Cultura do Milho. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- ALVES, G.C., VIDEIRA, S.S., URQUIAGA, S., REIS, V.M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. *Plant Soil*, v. 387, p. 307-321. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-014-2295-2>, 2015.
- ALVES, M.E.B; ANDRADE, C.L.T.; CÁRDENAS, R.R.; AMARAL, T.A.A.; SILVA, D.F. Identificação e Quantificação do Efeito de Fatores Ambientais da Produtividade da Cultura do Milho na Região de Janaúba, Mg. *Revista Brasileira de Agricultura Irrigada* v.5, nº. 3, p.188-201, ISSN 1982-7679 (On-line), 2011.
- AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora* parasítica e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, p. 565-568, 2002.
- ANDRADE NETTO, J. F. A atividade da enzima redutase do nitrato e glutamina sintase em cafeeiro Arábica. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP), Piracicaba, SP, 2005.
- ANDRADE, A.C.; FONSECA, D.M. da; QUEIROZ, D.S.; SALGADO, L.T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). *Revista Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, Especial ed., p.1643-1651, dez. 2003.
- ARAÚJO, A. P., MACHADO, C.T.T. IN: FERNANDES, M. S. Nutrição Mineral de Plantas. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Viçosa, MG, 2006. 59-78p.
- ARAÚJO, E. O. Quantificação da contribuição de bactérias diazotróficas na absorção de nitrogênio pela cultura do milho. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, 2014.
- ARAÚJO, E. O.; VITORINO, A. C. T.; MERCANTE, F. M. Doses de nitrogênio e inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho em condições de solo fértil. *Acta Agron.* v. 65, p. 16-23, 2016.
- ARAUJO, F.F., FOLONI, J.S.S., WUTZKE, M., MELEGARI, A.S., RACK, E., 2013. Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. *Semina: Ciênc Agr* 34, 1043-1054. <http://www.redalyc.org/html/4457/445744121009/>
- ARAÚJO, J. L.; FAQUIN, V.; VIEIRA, N. M. B.; OLIVEIRA de, M. V. C.; SOARES, A. A.; RODRIGUES, C. R.; MESQUITA, A. C. Crescimento e produção do arroz sob diferentes proporções de nitrato e de amônio. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 36, núm. 3, mayo - junio, p. 921-930, 2012.

- ARDAKANI, M. R.; MAZAHERI, D.; MAFAKHERI, S.; MOGHADDAM, A. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 17, p. 181-192, 2011.
- ARKHIPOVA, T. N.; PRINSEN, E.; VESELOV, S. U.; MARTINENKO, E. V.; MELENTIEV, A. I.; KUDOYAROVA, G. R. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil*, v. 292, p. 305-315, 2007.
- BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnological Letters*, v. 32, p. 1559-70, 2010.
- BABALOLA, O. O.; SANNI, A. I.; ODHIAMBO, G. D.; TORTO, B. Plant growth-promoting rhizobacteria do not pose any deleterious effect on cowpea and detectable amounts of ethylene are produced. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 23, p. 747-752, 2007.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, v. 77, p. 549-79, 2005.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, p. 911-922. 1997.
- BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., SELDIN, L., DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov: a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* v.36, p. 86-93. <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/>. 1986
- BALDANI, J.I., REIS, V.M., VIDEIRA, S.S., BODDEY, L.H., BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil* 384, 413-431. doi:10.1007/s11104-014-2186-6. 2014.
- BALDANI, J.L.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOIS, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e relações fertilidade, biologia e nutrição de plantas. Viçosa, SBCS/UFLA/DCS, p. 621- 666, 1999.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. microbiol.* v.29, p. 924-929, 1983.
- BARTCHECHEN, A., FIORI, C. C. L., WATANABE, S. H., & GUARIDO, R. C. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L.). *Campo Digital*, v. 5, p. 56-59, 2010.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. *Advances in agronomy*, v. 108, p. 77-136, 2010.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal Microbiology*, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum* – plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997 – 2003). *Canadian Journal of Microbiology*. v. 20. n. 8. p. 521 – 577, 2004.

- BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BOTTINI, R.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, v. 24, n. 1, p. 7-11, 1998.
- BENINCASA, M.M.P. *Análise de Crescimento de Plantas: noções básicas*. FUNEP, Jaboticabal, 41p, 2003.
- BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. *O milho e o clima*. Porto Alegre: Emater/RS-Ascar, 84 p. ISBN: 978-85-98842-11-0. 2014.
- BERGER, B.; BROCK, A. K.; RUPPEL, S. Nitrogen supply influences plant growth and transcriptional responses induced by *Enterobacter radicincitans* in *Solanum lycopersicum*. *Plant and Soil*, v. 370, n. 1-2, p. 641-652, 2013.
- BLACKMAN, V.H. The compound interest law and plant growth. *Ann. Bot.*, 33:353- 60, 1919.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V.M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, v.252, p.139 149, 2003.
- BREDA, F. A. DA F.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, n. 1, p. 45–52, jan. 2016.
- BRIGGS, G. E.; KIDD, R.; WEST, C. A quantitative analysis of plant growth. Part I. *Annals of Applied Biology*, v. 7, p. 103-123. 1920.
- CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase structure function and regulation on bridging to gap between biochemistry and physiology. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, v.50, p.277-303, 1999.
- CAMPOS, B.C. de; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante “Graminante” na cultura de milho. *Ciência Rural*, v.30, n.4, p.713-715, 2000.
- CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. *Tecnologia de Produção do Milho*. Viçosa: UFV, 2008. Cap. 5, p. 139-182.
- CARVALHO, T. L. G., BALSEMÃO-PIRES, E., SARAIVA, R. M., FERREIRA, P. C. G. E HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *Journal of Experimental Botany*, First published online: August 11, 2014, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eru319.2014>.
- CASSAN, F., VANDELEYDEN, J., SPAEPEN, S., 2013. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria PGPR. belonging to the genus *Azospirillum*. *J. Plant Growth Regul.* 33, 440-459. doi:10.1007/s00344-013-9362-4
- CHARLO HCO. *Análise de crescimento e marcha de acúmulo de nutrientes na cultura do pimentão, cultivado em substrato*. Jaboticabal: UNESP-FCAV. 66p. (Tese mestrado), 2008.
- COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. *Nutrição e adubação do milho*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2014.
- COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E.; PITTA, G. V. E.; ALVES, V. M. C.; HERNANI, L. C. *Cultivo do milho nutrição e adubação*. Sete Lagoas: Embrapa, p 12. (Comunicado técnico, 44), 2002.

- COELHO, A.M., FRANÇA, G.E., PITTA, G.E., ALVES, V.M.C., HERNANI, L.C. Nutrição e adubação do milho. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>, 2006.
- COMETTI, N.N.; MATIAS, G. C. S.; ZONTA, E.; MARY, W.; FERNADES, M. S. Compostos nitrogenados e açúcares solúveis em tecidos de alface orgânica, hidropônica e convencional. Horticultura Brasileira, Brasília, v.22, n. 4, p. 748-753, out./dez. 2004.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. Perspectivas para a agropecuária / Companhia Nacional de Abastecimento – v.1 – Brasília: - Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. ISSN: 2318-3241, 2017
- COMPANT, S.; CLÉMENT, S.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology & Biochemistry, v. 42, p. 669-678, 2010.
- COSTA, J. L.; LIMA, R. P.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N.; ERASMO, E. A. L. Crescimento inicial de plantas de pinhão manso em função do sombreamento no município de Gurupi-TO. J. Biotec. Biodivers. v. 2, N.4: p. 43-47, 2011.
- COULLEROT, O.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; WALKER, V.; FELTEN, A. V.; JANSA, J.; MAURHOFER, M.; DÉFAGO, G.; PRIGENT-COMBARET, C.; COMTE, G.; CABALLERO-MELLADO, J.; YVAN MOËNNE-LOCCOZ, Y. Comparison of prominent Azospirillum strains in Azospirillum-Pseudomonas-Glomus consortia for promotion of maize growth. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, n. 10, p. 4639-4649, MAY 2013.
- CRAWFORD, N.M., GLASS, A.D.M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends Plant Sci. 3, 389-395. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138598013119>. 1998.
- CRUZ, T. V. Crescimento e produtividade de cultivares de soja em diferentes épocas de semeadura no Oeste da Bahia. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, p. 99, 2007.
- DARTORA, J., GUIMARÃES, V. F., MARINI, D. AND SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com Azospirillum brasilense e Herbaspirillum seropedicae na cultura do milho. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 17, p. 1023-1029. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662013001000001>. 2013.
- DARTORA, J., MARINI, D., GONÇALVES, E.D.V., GUIMARÃES, V.F., 2016. Co-inoculation of Azospirillum brasilense and Herbaspirillum seropedicae in maize. R. bras. eng. agríc. Ambiente. 20, 545-550. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n6p545-550>. 2016.
- DEBOUBA, M.; DGUIMI, H.; GHORBEL, M. Expression pattern of genes encoding nitrate and ammonium assimilating enzymes in Arabidopsis thaliana exposed to short term NaCl stress. Journal of Plant Physiology, v. 170, n. 2, p. 155-60, 2013.
- DELHON, P., GOJON, A., TILLARD, P., PASSAMA, L. Diurnal regulation of NO₃⁻ uptake in soybean plants I. Changes in NO₃⁻ influx, efflux, and N utilization in the plant during the day/night cycle. J. Exp. Bot. 46: 1585-1594. <https://doi.org/10.1093/jxb/46.10.1585>. 1995.
- DEY, R., PAL, K. K.; BHATT, D. M.; CHAUHAN, S. M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (Arachis hypogaea L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological Research, 159:371-394, 2004.

- DIDONET, A. D.; RODRIGUES, O.; MARIO, J. L.; IDE, F.; TISOT, D. Temperatura base para os subperíodos de desenvolvimento de híbridos de milho. In: Reunião Técnica Anual Do Milho, 43. Reunião Técnica Anual Do Sorgo, 26., 1998, Veranópolis, Anais... Veranópolis: FEPAGRO, p. 100-101, 1998.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A., PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and maize. *Biol. Fertil. Soils*, v. 36, p. 284-297. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0534-9>. 2002
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, v. 212, p. 155-164, 1999.
- 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. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, v. 13, p. 1-13, 1992
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. *Science Tech, USA* 155p. 1987.
- DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G. de; SOUZA, E. S. de; FRANÇA, J. G. E. de; MACIEL, G. A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, p.1087-1093, 2004.
- DOTTO, A. P.; LANA, M. DO C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.5, p.376-382, 2010.
- DUIJFF, B.; GIANINIZZI-PEARSON, V. & LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopoly saccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytology*, Oxford, v. 135, p. 325-334, 1997.
- EL-KOMY, H.M., HAMDIA, M.A., ABD EL-BAKI, G.K. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. *Biol. Plantarum*, 46, 281-287. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1022819114860>. 2003
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Londrina: Editora Planta, p. 403, 2006.
- EUCLYDES, R., 2004. Sistema para análises estatísticas (SAEG 9.0). Viçosa: Funarbe, 2004.
- EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. eds *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman and Hall, p. 1-42, 1992.
- FALCÃO, V. R. Aspectos moleculares de nitrato redutase da macroalga marinha *Gracilaria tenuistipitata* (RHODOPHYTA): seqüenciamento do gene e estudo da expressão do RNA mensageiro. Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-graduação em Química, Universidade de São Paulo, SP. 132f, 2006.
- FANCELLI, A.L. Boas práticas para o uso eficiente de fertilizantes na cultura do milho. Piracicaba: IPNI - International Plant Nutrition Institute Brazil. 16p. (IPNI. Informações Agrônômicas, 131), 2010.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. 2ª ed. Guaíba: Agropecuária, p. 360, 2004.

- FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. *Anal. Chem.* 49, 1080-1080. <https://doi:10.1021/ac50015a053>. 1977.
- FERNANDES, F. C. S.; LIBARDI, P. L.; TRIVELIN, P. C. O. Parcelamento da adubação nitrogenada na cultura do milho e utilização do N residual pela sucessão aveia preta-milho. *Ciência Rural*, v. 38, n. 4. p. 1138-1141, 2008.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. *Turrialba*, v. 33, n. 3, p. 297-301, 1983.
- FERREIRA, D., 2010. Sisvar: versão 5.3. Lavras: UFLA.
- FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. *Acta Scientiarum Agronomy*, 32, n. 1, p. 179-185, 2010.
- FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. *Revista Agronomia*, v. 37, n. 2, p. 6-12, 2003.
- FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* V. 326, p. 99-108. <https://doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x>. 2012
- FILLEUR, S., DANIEL-VEDELE, F., 1999. Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* v. 207, p. 461-469. <https://doi.org/10.1007/s004250050505>. 1999.
- FISHER, R. A. Some remark on the methods formulated in a recent article on the quantitative analysis of plant growth. *Annals applied Biology*, v. 7, p. 367. 1920.
- FITTER, A. *Environmental Physiology of plant*. ed. 2. London, San Diego, Academic Press, p. 423. 1987.
- FORBE, B.G., 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 219-235. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00140-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00140-1)
- FORBE, B.G., CLARKSON, D.T., (1999) Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives. *Adv. Bot. Res.* 30:1-90.
- FORNASIERI FILHO, D. *Manual da cultura do milho*. Jaboticabal: Funep, 2007. 576p.
- FREIRE, L. R.; BALIEIRO, F. de C.; ZONTA, E.; ANJOS, L. H. C.; PEREIRA, M. G.; LIMA, E.; GUERRA, J. G. M.; FERREIRA, M. B. C.; LEAL, M. A. de A.; CAMPOS, D. V. B.; POLIDORO, J. C. (Ed.). *Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ. p. 430, 2013.
- GARCIA, A.; ANDRÉ, R. G. B.; GALBIATTI, J. A.; TANNOUS, S. ANÁLISE DE CRESCIMENTO DE UMA CULTURA DE MILHO SUBMETIDA A DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS. *Revista Científica da Fundação Educacional de Ituverava, Ituverava*, v. 5, n. 1, p.239-251, mar. 2008.
- GARNETT, T., CONN, V., PLETT, D., CONN, S., ZANGHELLINI, J., MACKENZIE, N., ENJU, A., FRANCIS, K., HOLTHAM, L., ROESSNER, U., BOUGHTON, B., BACIC, A., RAFALSKI, A., DHUGGA, K., TESTER, M., KAISER, B.N. The response of the maize nitrate transport system to nitrogen demand and supply across the lifecycle. *New Phytol* 198:82094. 2013.

- GAVA, G. J. C.; OLIVEIRA, M. W.; SILVA, M. A.; JERÔNIMO, E. M.; CRUZ, J. C. S.; TRIVELIN, P. C. O. Produção de fitomassa e acúmulo de nitrogênio em milho cultivado com diferentes doses de 15N-ureia. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 31, n. 4, p. 851-862, 2010.
- GIRI, R.; DUDEJA, S.S. Root Colonization of Root and Nodule Endophytic Bacteria in Legume and Non Legume Plants Grown in Liquid Medium. *Journal of Microbiology Research and reviews*, v. 1, n. 6, p. 75-82, 2013.
- GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, v.37, p.395-412, 2005.
- GUIMARÃES, S. L., BALDANI, J. I., BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. *Revista Agronomia, Seropédica*, v. 37, n. 2, p. 25-30, 2003.
- GYANESHWAR, P., JAMES, E.K., REDDY, P.M., LADHA, J.K., 2002. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminum-tolerant rice varieties. *New Phytol.* 154, 131–145. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00371.x>. 2002.
- HANT, R. Plant growth analysis. *Studies in Biology*, n. 96, Londres: Edward Arnold (Publishers) Ltd. p.67, 1978.
- HAYAT, R.; ALI, S. AMARA, U.; KHALID, R.; AHMEND, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, v. 60, p. 579-598, 2010.
- HIRAI, M., YANO, M., GOODENOWE, D.B., KANAYA, S., KIMURA, T., WAZUHARA, M., FUJIWARA, T., SAITO, K., 2004. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana* v. 101, p.10205–12010, 2004.
- HOAGLAND, D.R., ARNOLD, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular number 347. California Agricultural Experiment Station. 1950.
- HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M. & PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: Cassán FD & Salamone IG de (Eds.) *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Córdoba, Asociación Argentina de Microbiología. p.17-28, 2008.
- HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, p. 36, 2011.
- 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* 331, 413-425. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>. 2010.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 80 p. Documento, 283, 2007.
- HUNT, R. Growth analysis, individual plants. In: THOMAS B, MURPHY D.J.; MURRAY D. (eds.) *Encyclopaedia of Applied Plant Sciences*. London: Academic Press. p. 579-588, 2003
- HUNT, R. Plant growth analysis. *Studies in Biology* n. 96, Londres: Edward Arnold (Publishers) Ltd. p. 67, 1978.

- HUSSAIN, A.; HASNAIN, S. Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 27, p. 2645-2654, 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.
- JAWORSKI, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Bioch. Biophys. Res. Com.* 43, 1274-1279. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(71\)80010-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(71)80010-4). 1971.
- JHA, P.N.; GUPTA, G.; JHA, P.; MEHROTRA, R. Association of Rhizospheric/Endophytic Bacteria with Plants: A Potential Gateway to Sustainable Agriculture Greener. *Journal of Agricultural Sciences*, v. 3, n. 2, p. 73-84, 2013.
- KAISER, W. M.; WEINER, H.; HUBER, S. C. Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 105, n. 2, p. 385-390, 1999.
- KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; DAL BEM, E. A.; PORTUGAL, J. R.; VILELA, R. G. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 2, p. 527-538, 2013.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant-growth promoting rhizobacteria - evidence that the mode of action involves root microflora interactions. *Phytopathology*, v. 69, p. 1034-1034, 1979.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th International conference on plant pathogenic bacteria*. Angers-France: Station the Pathologie Vegetal et Phytobacteriologie, v. 2, p. 8879-882, 1978.
- KRAPP, A., FRASIER, V., SCHEIBLE, W.-R., QUESADA, A., GOJON, A., STITT, M., CABOCHE, M., DANIEL-VEDETE, F. Expression studies of Nrt2:1Np, a putative high-affinity nitrate transporter: Evidence for its role in nitrate uptake. *Plant J.* 14:723-731. <http://dx.doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00181.x>. 1998.
- KROUK, G.; LACOMBE, B.; BIELACH, A.; PERRINE-WALKER, F.; MALINSKA, K.; MOUNIER, E.; HOYEROVA, K.; TILLARD, P.; LEON, S.; LJUNG, K.; ZAZIMALOVA, E.; BENKOVA, E.; NACRY, P.; GOJON, A. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev. Cell*, 18: 927-937. <http://dx.doi:10.1016/j.devcel.2010.05.008>. 2010.
- KUMAR, B.; TRIVEDI, P.; PANDEY, A. *Pseudomonas corrugata*: A suitable bacterial inoculant for maize grown under rainfed conditions of Himalayan region. *Soil Biol. Biochem.* 39, 3093-3100. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.003>. 2007.
- LAM, H. M.; COSCHIGANO, K.; SCHULTZ, C.; MELO-OLIVEIRA, R.; TJADEN, G.; OLIVEIRA, I.; NGAI, N.; HSIEH, M. H.; CORUZZI, G. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell*, v. 7, p. 887-898, 1996.
- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indoles-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology*, London, v.8, p. 298-300, 2000.
- LANA, M. DO C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. H. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. *Revista Ceres*, v.59, p.399-405, 2012.

- LANGE, A., MOREIRA, F.M.A. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* v.26, p. 535-543, 2002.
- LARSEN, J.; JARAMILLO-LÓPEZ, P.; NÁJERA-RINCON, M. B.; GONZÁLEZ-ESQUIVEL, C. E. Interações bióticas na rizosfera em relação à dinâmica de nutrientes de plantas e solo. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, v. 15, p. 449 – 463, 2015.
- LEA, P.J., AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil 2006. *Ann Appl Biol* 149, 243–247. <https://doi:10.1111/j.1744-7348.2006.00101.x>. 2006.
- LISERON-MONFILS, C.; BI, Y. M.; DOWNS, G. S.; WU, W.; SIGNORELLI, T.; LU, G. CHEIN, X.; BONDO, E.; ZHU, T.; LUKENS, L. N.; COLASANTI, J.; ROTHSTEIN, S. J.; RAIZADA, M. N. Nitrogen transporter and assimilation genes exhibit developmental stage-selective expression in maize (*Zea mays* L.) associated with distinct cis-acting promoter motifs. *Plant Signaling & Behavior*, v. 8, n. 10, p. e260561-14, 2013.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. VAN DER. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 21, p.583-606, 2002.
- LONGHINI, V. Z.; SOUZA, W. C. R.; ANDREOTTI, M.; SOARES, N. A.; COSTA, N. R. Inoculation of diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization in topdressing in irrigated corn. *Rev. Caatinga*, v. 29, n. 2, p. 338 – 347, 2016.
- LOZADA, B. I.; ANGELOCCI, L. R. Efeito da temperatura do ar e da disponibilidade hídrica do solo na duração de subperíodos e na produtividade de um híbrido de milho. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, v. 7, n. 1, p. 37-43, 1999.
- LUCCHESI, A. A. Utilização prática da análise de crescimento vegetal. In: *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba. Anais. Piracicaba: ESALQ, p. 22, 1984.
- MACEDO, R. A. T. Influência de Fatores de Manejo Sobre a Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura da Soja em Áreas Experimentais e de Produção no Noroeste do Paraná. Dissertação de Mestrado. *Agronomia - Ciência do solo*, UFRRJ, 2003.
- MACHADO, A. T.; SODEK, L.; DÖBEREINER, J.; REIS, V. M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho nitroflint. *Pesq. Agrop. Brasileira*, v.33, n.6, p.961-970, 1998.
- MACMILLAN, J. REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, p. 435-443, 2011.
- MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M.G. (Ed.). *Fisiologia vegetal*. São Paulo: Universidade de São Paulo, v.1, p.332-349. 1985.
- MAGALHÃES, F. M. M., DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. *Revista de Microbiologia* 15: 246-252, 1984.
- MAHMOOD, A.; TURGAY, O. C.; FAROOQ, M.; HAYAT, R. Biopriming de sementes com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas: uma revisão *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 92, 2016.
- MALAVOLTA, E. *Manual de nutrição mineral de plantas*. Piracicaba: Editora Ceres, p. 631, 2006.
- MALAVOLTA, E., VITTI, G.C., OLIVEIRA, S.A. 1997. Princípios, métodos e técnicas de avaliação do estado nutricional. In: Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A., eds. *Avaliação do estado nutricional de plantas: princípio e aplicações*. 2.ed. Piracicaba. Potafos, p.115-230, 1997.

- MARSCHNER, H. Mineral nutrition in higher plants. London: Academic, p. 889, 1995.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, p. 889, 1995.
- MARTIN, T. N.; PAVINATO, P. S.; SILVA, M. R.; ORTIZ, S.; BERTONCELI. Fluxo de nutrientes em ecossistemas de produção de forragens conservadas. In: Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas, 4, Maringá. 2011. Anais... Maringá: Anais do Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas, 4, ES p.173-219, 2011.
- MASCARELLO, G. ZANÃO-JÚNIOR, L. A. Produtividade de milho em resposta a doses de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*. *Cultivando o saber*, p. 46-55, 2015.
- MELLO, F. A.; SOBRINHO, M. D. C. de ARZOLLA, S. SILVEIRA, R. I., NETTO, A. C.; KIEHL, J. C. de. Fertilidade do solo. São Paulo: Nobel, 1989.
- MIRANDA, K.M., ESPEY, M.G., WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5: 67-71, 2001. <http://doi:10.1006/niox.2000.0319>. 2001.
- MITCHELL, L. 1972. Microdetermination of nitrogen in plant & tissues. *J. AOAC*, 1, 1-3, 1972.
- MONTEIRO, R.A., BALSANELLI, E., WASSEM, R., MARIN, A.M., BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C., SCHMIDT, M.A., TADRA-SFEIR, M.Z., PANKIEVICZ, V.C.S., CRUZ, L.M., CHUBATSU, L.S., PEDROSA, F.O., SOUZA, E.M. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil*. v. 356, p. 175-196. <http://doi:10.1007/s11104-012-1125-7>. 2012.
- MONTEIRO, R.A., SCHMIDT, M.A., DE BAURA, V.A., BALSANELLI, E., WASSEM, R., YATES, M.G., RANDI, M.A.F., PEDROSA, F.O., DE SOUZA, E.M. Early colonization pattern of maize *Zea mays* L. Poales. Poaceae roots by Herbaspirillum seropedicae Burkholderiales, Oxalobacteraceae. *Genet Mol Biol*. v. 31, p. 932-937. <http://doi:10.1590/S1415-47572008005000007>. 2008.
- MOREIRA, F. M. DE S.; SILVA, K. DA; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. de. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, v.1, p.74-99, 2010.
- MÜLLER, T. M. Inoculação de *Azospirillum brasilense* associado a níveis crescente de adubação nitrogenada e o uso de bioestimulante vegetal na cultura do milho. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal. Guarapuava - PR, 2013
- MÜLLER, T. M.; SANDINI, I. E.; RODRIGUES, J. D.; NOVAKOWISKI, J. H.; BASI, S.; KAMINSKI, T. H. Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases corn yield. *Ciência Rural*, Santa Maria-RS, v.46, n.2, p. 210-215. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131283>. 2016
- NEIVERTH, A.; DELAI, S.; GARCIA, D. M.; SAATKAMP, K.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; GUIMARÃES, V. F.; SANTOS, M. F.; VENDRUSCOLO, E. C. G.; COSTA, A. C. T. Desempenho de diferentes genótipos de trigo inoculados com a bactéria promotora de crescimento de plantas *Herbaspirillum seropedicae*. *European Journal of Soil Biology*. 64 V., p. 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.07.001>. 2014
- NOWAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A.; NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Semina: Ciências Agrárias*, 32: 1687-1698, 2011.

- OLIVARES, F.L. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana de açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. Seropédica: UFRRJ, 1997. 344p. Tese Doutorado.
- OLIVEIRA, P.; NASCENTE, A. S.; KLUTHCOUSKI, J.; PORTES, T. A. Crescimento e produtividade de milho em função da cultura antecessora. *Pesq. Agropec. Trop.*, v. 43, n. 3, p. 239-246, 2013.
- PANDOLFO, C.M.; VOGT, G. A.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; MARCINICHEN, G.J; ZOLDAN, S. R. Desempenho de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado a doses de nitrogênio em cobertura. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, SC, v.27, n.3, p.94-99, 2015.
- PANKIEVICZ, V. C. S.; DO AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F. D. N.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHELLER, M. J.; ARISI, A. C. M.; STEFFENS M. B. R.; SOUZA E. M.; PEDROSA F. O.; STACEY, G.; FERRIERI, R. A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. *Plant J.*, 81, p. 907-919, 10.1111/tpj.12777. 2015.
- PEIXOTO, C. P.; CRUZ, T. V.; PEIXOTO, M. F. S. P. Análise quantitativa do crescimento de plantas: Conceitos e Prática. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, N.13; 2011.
- PEIXOTO, C.P.; PEIXOTO, M. de F. da S.P. Dinâmica do crescimento vegetal. In: CARVALHO, C. A. L. de; DANTAS, A.C.V.L.; PEREIRA, F.A. de C.; SOARES, A.C.F.; MELO FILHO, J.F. de; OLIVEIRA, G.J.C. de. *Tópicos em ciências Agrárias*. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009. p. 39-53.
- PEREG, L.; BASHAN, L.; BASHAN, Y. Avaliação da afinidade e especificidade do *Azospirillum* para plantas *Plant Soil* , v. 399, p. 389 – 414, 2016.
- PEREIRA, A.R.; MACHADO, E.C. Análise quantitativa do crescimento de vegetais. Campinas. Instituto Agrônômico. p. 33 (IAC-Boletim Técnico n. 114), 1987.
- PINTON, R., TOMASI, N., ZANIN, L. Molecular and physiological interactions of urea and nitrate uptake in plants. *Plant Signal. Behavior* 11:1. <http://doi:10.1080/15592324.2015.1076603>. 2016.
- POLLMER, W. G.; EBERHARD, D.; KLEIN, D.; DHILLON, B. S. Genetic control of nitrogen uptake and translocation in maize. *Crop Science*, v. 19, n. 1, p. 82-86, 1979.
- PORTUGAL, J. R.; ARF, O.; LONGUI, W. V.; GITTI, D. C.; BARBIERI, M. K. F.; GONZAGA, A. R.; TEIXEIRA, D. S. Inoculação com *Azospirillum brasilense* via foliar associada à doses de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, IAC/ABMS. p. 1413-1419, 2012.
- POSTGATE, J. R. *The Fundamentals of nitrogen fixation*. Cambridge: Cambridge University Press, 1982.
- PURCINO, A. A. C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, A. T.; MARRIEL, I. E. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 6, p. 41-46, 1994.
- QUADROS, P. D. Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
- QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHR, D. D.; CAMARGO, F. A. O. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 61, n.2, p. 209-218, 2014.

- RADFORD, P. J Growth analysis formulae: their use and abuse. *Crop Science*, Madison, v. 7, p. 171-175, 1967.
- RADWAN, T. E. E.; MOHAMES, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 39, n. 10, 2004.
- RANUM, P., PEÑA-ROSAS, J.P., GARCIA-CASAL, M.N., 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1312, 105–112. <http://doi:10.1111/nyas.12396>. 2014.
- REICHARDT, K.; TIMM, L. C. Solo, Planta e Atmosfera. Conceitos, processos e aplicações. 2 ed. 500p. Barueri, SP. 2012.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.
- REIS JUNIOR, F.B., MACHADO, C.T.T., MACHADO, A.T., SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *Rev. Bras. Ci. Solo*. 32, 1139–1146. <http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v32n3/a22v32n3.pdf>. 2008.
- REIS, G. G.; MULLER, M. W. Análise de crescimento de plantas - mensuração do crescimento. Belém, CPATU, p. 35, 1978.
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v. 19, p. 227-247, 2000.
- REMANS, T., NACRY, P., PERVENT, M., FILLEUR, S., DIATLOFF, E., MOUNIER, E., TILLARD, P., FORDE, B. G., GOJON, A. The Arabidopsis NRT1,1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *PNAC*, v. 103, p. 19206-19211, 2006.
- REPKE, R. A., CRUZ, S. J. S., SILVA, C. J., FIGUEIREDO, P. G. E BICUDO, S. J. Eficiência da *Azospirillum* brasileiro combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 12, p. 214-226, 2013.
- ROBERTO, V.M.O.; SILVA, C.D.; LOBATO, P.N. Resposta da cultura do milho a aplicação de diferentes doses de inoculante (*Azospirillum* brasileiro) via semente. In.: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 18, 2010. Goiânia. Resumos... Goiânia: Anais do Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathologica*, v.12, p.16, 1986.
- RONCATO-MACARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif gene in gramineous plants. *FEMS Microbiological Ecology* v.45, p. 39-47, 2003.
- ROSA, P. A. L. Acúmulo de matéria seca, extração e exportação de nutrientes por híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia. Área de conhecimento: Sistema de Produção. 98f., Ilha Solteira-SP, 2017.

- SALA, V. N. R., BRAN, E.J.B.N., FREITAS, J.G., SILVEIRA, A.P.D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. *Pesq. agropec. bras.* v. 42, p. 883-842. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000600010>. 2007.
- SANGOI, L.; SILVA, L. M. M.; MOTA, M. R.; PANISON, F.; SCHMITT, A.; SOUZA, N. M.; GIORDANI, W.; SCHENATTO, D. E. Desempenho Agronômico do Milho em Razão do Tratamento de Sementes com *Azospirillum* sp. e da Aplicação de Doses de Nitrogênio Mineral. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 39: p. 1141-1150. DOI: 10.1590/01000683rbc20140736. 2015.
- SANTI, C.; BOGUS, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, v. 111, p. 743 –767, 2013.
- SANTOS, C.L.R.; CAZETTA, J.O.; SARAN, L.M.; SANCHES, A. Otimização da análise da atividade da redutase do nitrato e sua caracterização em folhas de cana-de-açúcar. *Pesq. agropec. bras.* v. 49, n. 5, p. 384-394. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000500008>. 2014.
- SANTOS, L.A., BUCHER, C.A., SOUZA, S.R., FERNANDES M.S. Metabolismo de nitrogênio em arroz sob níveis decrescentes de nitrato. *Agronomia* 39: 28-33. <http://www.ia.ufrj.br/revista/Vol.%2039%20-2005/DPF/TRab.%20005%20-20Metabolismo%20de%20N.pdf>. 2005.
- SCHMIDT, M. A.; SOUZA, E. M.; BAURA, V.; WASSEM, R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, n. 3, p. 182-185, 2011.
- SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. *Biometrics*, Washington D.C., v.30, n.3, p.507-512, 1974.
- SELVAKUMAR, G., JOSHI, P., NAZIM, S., MISHRA, P.K., BISHT, J.K., GUPTA, H.S. Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984) a psychrotolerant bacterium isolated from a high altitude Himalayan rhizosphere. *Biologia* v. 64, p. 239-245. <http://doi.org/10.2478/s11756-009-0041-7>. 2009.
- SELVAKUMAR, G., JOSHI, P., SUYA, L.P., MISHRA, P.K., JOSHI, G.K., BISHT, J.K., BHATT, J.C., GUPTA A, H.S., 2011. *Pseudomonas lurida* M2RH3 (MTCC9245), a psychrotolerant bacterium from the Uttarakhand Himalayas, solubilizes phosphate and promotes wheat seedling growth. *World J. Microbiol. Biotechnol.* V. 27, p. 1129-1135. <http://doi.org/10.1007/s11274-010-0559-4>. 2011.
- SHUKLA, S. K.; YADAV, R.L.; SUMAN, A.; SINGH, P.N. Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in udic ustochrept soil. *Soil and Tillage Research*, v.99, p.158-168, 2008.
- SILVA, A. G.; DUARTE, A. P.; PIEDADE, R. C.; COSTA, H. P.; MEIRELES, K. G. C.; BORGES, L. P. Inoculação de Sementes de Milho Safrinha com *Azospirillum* e Aplicação de Nitrogênio em Cobertura. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.14, n.3, p. 358-370, 2015. <http://dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v14n3p358-370>.
- SILVA, G.J.; GUIMARÃES, C. T.; PARENTONI, S. N.; RABEL, M.; LANA, U. G. P.; PAIVA, E. Produção de haplóides androgenéticos em milho. *EMBRAPA Milho e Sorgo*, 2009. 17p. (Documentos 81).
- SILVA, P. C. C.; COUTO, J. L.; SANTOS, A. R. Absorção dos íons amônio e nitrato e seus efeitos no desenvolvimento do girassol em solução nutritiva. *Revista de Biologia e Ciências da Terra. São Cristovão-SE*, v. 10, n. 2, 2010.

- SINGH, K.P.; SUMAN, A.; SINGH, P.N.; LAL, M. Yield and soil nutrient balance of sugarcane plant-ratoon system with conventional and organic nutrient management in subtropical India. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v.79, p.209-219, 2007
- SORATO, A. M. C. Ajuste de modelo não linear ao crescimento de duas cultivares de feijoeiro em diferentes densidades de semeadura. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG, p.84. 2012.
- SOUZA, S.R., STARK, E.M.L.M., FERNANDES, M.S., MAGALHÃES, J.S. Effects of supplemental nitrogen on N-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars and crude protein of rice. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30: 711-724. <https://doi.org/10.1080/00103629909370240>. 1999.
- STIPP, S.R. & YAMADA, T. Nutrição e Adubação do milho. *Informações Agronômicas*, v.14, n.43, p.3-6, dez.1988.
- SUMAN, A.; SHASANY, A.K.; SINGH, M.; SHAHI, H.N.; GAUR, A.; KHANUJA, S.P.S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.17, p.39-45, 2001
- SWEDRZYNSKA, D.; SAWICHA, A. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of maize (*Zea mays* ssp. *saccharata* L.) under different cultivation conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 9, p. 505- 509, 2000.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Nutrição Mineral. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed. p.96-101, 2004.
- TARRANT, J.J., KRIEG, N.R., DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal Microbiology* 24: 976-980, 1978..
- TSUMANUMA G. Controle de ferrugem asiática e desempenho de duas cultivares de soja submetidas a diferentes fungicidas e épocas de aplicações. São Paulo, p.165. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escolar Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen 15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*, v.56, p.105-114, 1992.
- VARGAS L, GURJAO DE CARVALHO TL, GOMES FERREIRA PC, DIVAN BALDANI VL, BALDANI JI, HEMERLY AS. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. *Plant and Soil*, v. 356, p. 127-137, 2012.
- VERNON, A. J.; ALLISON, J. C. S. A method of calculating net assimilation rate. *Nature*, v. 200, p. 814, 1963.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizosphere as biofertilisers. *Plant and Soil* v. 255, p.571-586, 2003.
- VINHAL-FREITAS, I. C.; RODRIGUES, M. B. Fixação Biológica Do Nitrogênio Na Cultura Do Milho. *Agropecuária Técnica*, v. 31, n. 2, p. 143–154, 2010.
- VOGEL, G. F.; MARTINKOSKI, L.; RUZICKI, M. Efeitos da utilização de *Azospirillum brasilense* em poaceas forrageiras: importâncias e resultados ACSA - *Agropecuária Científica no Semi-Árido* , V. 10 , p. 1 – 6, 2014.

- VOGT, G. A.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; GALLOTTI, G. J. M.; PANDOLFO, C. M.; ZOLDAN, S. R. Desempenho de genótipos de milho na presença ou ausência de inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada de cobertura. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v.27, n.2, p.49-54, jul./out. 2014.
- WEST, C.; BRIGGS, G. E.; KIDD, F. Methods and significant relations in the quantitative analysis of plant growth. *New Phytologist*. v. 19, n. 7-8, p. 200-207. 1920.
- XU, G., FAN, X., MILLER, A.J., 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, v. 63, n. 1, p. 153-182. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105532>. 2012.
- YADAV, R.L.; SUMAN, A.; PRASAD, S.R.; PRAKASH, O. Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N-economy of sugarcane cultivation under subtropical climatic conditions of India. *European Journal of Agronomy*, v.30, p.296-303, 2009.
- YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of amino acid with ninhydrin. *Analyst*, v. 80, p. 209-213. <http://doi.org/10.1039/AN9558000209>. 1955.
- YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57, 508-514. 1954
- YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; KOJIMA, M.; YAMAYA, T.; SAKAKIBARA, H. Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to ciszeatin. *Plant Physiology*, v. 134, p. 1654–1661, 2004.
- ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. ; BALDANI, V. L. D. ; CORDEIRO, A. C. C. Contribuição da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para o rendimento de grãos de arroz e milho em Roraima. - Embrapa Roraima, Boletim de Desenvolvimento e Pesquisa Boa Vista – RR.; V.06; p. 20; 2007.
- ZILLI, J. E.; PERIN, L.; MARSON, B. F.; ALVES, G. C.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D. Rendimento de grãos da cultura do milho inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* no cerrado de Roraima. In: FERTBIO 2008,
- ZUCARELI, C.; RAMOS JUNIOR, E. U.; OLIVEIRA, M. A.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Índices biométricos e fisiológicos em feijoeiro sob diferentes doses de adubação fosfatada. *Revista Semina: Ciências Agrárias*, v.31, n.1, p.1313-1324, 2010.