

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

**DISSERTAÇÃO**

**Eficiência da Inoculação de *Herbaspirillum*  
*seropedicae* Estirpe ZAE94 em Dois Genótipos de  
Milho (*Zea mays*)**

**Farley Alexandre da Fonseca Breda**

**2014**



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

**EFICIÊNCIA DA INOCULAÇÃO DE *HERBASPIRILLUM  
SEROPEDICAE* ESTIRPE ZAE94 EM DOIS GENÓTIPOS DE  
MILHO (*ZEA MAYS*)**

**FARLEY ALEXANDRE DA FONSECA BREDA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Verônica Massena Reis**

*e Co-orientação do Professor*  
**Segundo Urquiaga**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2014

633.15

B831e

T

Breda, Farley Alexandre da Fonseca, 1985-

Eficiência da inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* Estirpe ZAE94 em dois genótipos de milho (*Zea mays*) / Farley Alexandre da Fonseca Breda – 2014.

44 f.: il.

Orientador: Verônica Massena Reis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do solo.

Bibliografia: f. 30-39.

1. Milho – Cultivo – Teses. 2. Milho – Inoculação – Teses. 3. Milho – Adubos e fertilizantes – Teses. 4. Nitrogênio – Fixação – Teses. I. Reis, Verônica Massena, 1961-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do solo. III. Título.

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

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

**FARLEY ALEXANDRE DA FONSECA BREDA**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 24/02/2014.

---

Verônica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia  
Orientadora

---

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

---

José Carlos Polidoro. Dr. Embrapa Solos

## **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.

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 mestrado.

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

A Rede FertBrasil por conseguir junto a CAPES a bolsa de Pós graduação.

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

A Gabriela Cavalcanti Alves, pela amizade, paciência, e pelos valiosos ensinamentos e sugestões.

A Embrapa Agrobiologia, pelo suporte laboratorial para à execução da dissertação.

Aos funcionários da área experimental da Embrapa Agrobiologia, pelo apoio e paciência durante toda a condução dos experimentos.

Aos técnicos de laboratório que direta ou indiretamente estiveram envolvidos no desenvolvimento dessa dissertação.

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 Bruna, Danilo e Ravine pela ajuda nos momentos de sufoco na execução deste trabalho.

Aos grandes amigos que fiz neste tempo de UFRRJ, Hugo Maia e Jesus Junior, amizade e por compartilharem momentos importantes da minha vida e que fazem parte da minha história.

A minha mais que namorada, 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.

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 2010 graduou-se em Engenharia Agrônoma pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 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 Agronômicos (NEAGRO). Ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da UFRRJ em março de 2012, concluindo seu trabalho de dissertação de Mestrado na presente data.

## RESUMO

BREDA, Farley Alexandre da Fonseca. **Eficiência da inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe ZAE94 em dois genótipos de milho (*Zea mays*)**. 2014. 42f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Atualmente com a constante demanda pelo aumento de produtividade e os sucessivos aumentos nos preços dos fertilizantes, principalmente os nitrogenados, novas tecnologias vem sendo estudadas. Uma que vem se destacando devido ao seu baixo custo de implantação e os seus promissores resultados é a fixação biológica de nitrogênio em gramíneas. O objetivo dessa dissertação foi estudar o efeito da inoculação da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* estirpe ZAE94, em dois genótipos de milho selecionados devido sua adaptação a condições climáticas e solos de baixa fertilidade, e quanto à capacidade de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, bem como, incrementar a produtividade da cultura. Para tal, foram implantados dois experimentos um no período da safrinha e outro na safra do ano agrícola 2012/2013. Em ambos os experimentos os híbridos de milho (BRS 1030 e BRS 1060) foram inoculados com a estirpe ZAE94, seguindo o delineamento experimental em blocos ao acaso com o fatorial de 2 x 2 x 3, sendo os fatores inoculação, genótipo e adubação respectivamente, com 6 repetições. As variáveis analisadas foram produtividade média, peso de 1.000 grãos, teor e acúmulo de nitrogênio nos grãos e eficiência do uso do nitrogênio fertilizante. Os resultados foram testados quanto a normalidade e homogeneidade, logo após submetidos à análise de variância e quando significativo, os mesmos foram submetidos ao teste de media. O teste de média utilizado foi o teste t, a 10%. Para todas as variáveis analisadas o híbrido BRS 1030, foi superior a BRS 1060. Para o fator inoculação, no período da safrinha, foi observada uma interação tripla para o peso de 1.000 grãos, onde quando a inoculação foi associada a maior dose de nitrogênio ela promoveu um aumento na produtividade do híbrido BRS 1060. No período da safra, independente do genótipo e da adubação utilizada observou-se que inocular a semente dos híbridos e sempre melhor do que não realizar a inoculação. Para eficiência do uso do nitrogênio fertilizante foi observado que, de forma geral, o BRS 1030 foi mais eficiente do que o BRS 1060.

**Palavras-chave:** Híbridos. Inoculante. Fixação Biológica de Nitrogênio.

## ABSTRACT

BREDA, Farley Alexandre da Fonseca. **Efficiency of inoculation of *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 strain in two genotypes of maize (*Zea mays*)**. 2014. 42p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Currently with the constant demand for increased productivity and successive increasing in the prices of fertilizers, especially nitrogen, new technologies are being studied. One that has been highlighted due to low cost of deployment and promising results is the biological nitrogen fixation in grasses. The aim of this work was to study the effect of inoculation of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain ZAE94 in two maize genotypes selected for the climatic conditions and low fertility soils, and the ability to reduce the use of nitrogen fertilizers, as well as increasing crop productivity. To this end, two experiments were implanted, one during the off-season and another in the harvesting of agricultural year 2012/2013. In both experiments the maize hybrids (BRS 1030 and BRS 1060) were inoculated with the ZAE94 strain, following the experimental design of a randomized block design with a factorial 2 x 2 x 3, comprising the inoculation, genotype and fertilization respectively, with six replicates. The variables analyzed were the average yield, weight of 1000 grains, content and accumulation of nitrogen in the grain and nitrogen use efficiency of fertilizer. The results were tested for normality and homogeneity, were subjected to analysis of variance, and when significant treatments, these were subjected to medium testing, using test t at 10%. For all variables the hybrid BRS 1030 was greater than the BRS 1060. For the inoculation factor and in the off-season, it was observed a triple interaction for weight of 1,000 grains; and when the inoculation is associated with the highest nitrogen rate it promoted an increase in the productivity of the hybrid BRS 1060. In harvesting period, regardless of genotype and fertilizer used, it was observed that inoculating the seed of hybrids was always better than without inoculation. For efficiency of nitrogen fertilizer usage it was observed that, in general, the BRS 1030 was more efficient than the BRS 1060.

**Key words:** Hybrids. Inoculant. Biological Nitrogen Fixation.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Análise química de solo da área experimental.....	11
<b>Tabela 2.</b> Valores de eficiência de utilização do fertilizante nitrogenado (EUFN) nos grãos de milho (%), em função dos genótipos, níveis de adubação e inoculação, na safra 2012/2013. ....	23
<b>Tabela 3.</b> Análise de variância produtividade de grãos na safrinha. ....	38
<b>Tabela 4.</b> Análise de variância produtividade dos grãos na safra. ....	38
<b>Tabela 5.</b> Análise de variância do peso de 1.000 grãos na safrinha. ....	39
<b>Tabela 6.</b> Análise de variância do peso de 1.000 grãos na safra. ....	39
<b>Tabela 7.</b> Análise de variância da %N nos grãos na safrinha. ....	39
<b>Tabela 8.</b> Análise de variância da %N nos grãos na safra. ....	40
<b>Tabela 9.</b> Análise de variância do total N acumulado nos grãos na safrinha. ....	40
<b>Tabela 10.</b> Análise de variância do total N acumulado nos grãos na safra. ....	40
<b>Tabela 11.</b> Análise de variância da eficiência do uso do fertilizante nitrogenado nos grãos na safra.....	41

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Médias mensais de temperatura e precipitação da região de estudo no período de maio de 2012 a março de 2013. Dados fornecidos pelo site do INMET (Estação automática de Seropédica – RJ)..... 10
- Figura 2.** Croqui referente aos dois experimentos..... 12
- Figura 3.** Comparação das médias de produtividade dos híbridos BRS1030 e BRS1060, independente do tratamento utilizado, referente à safrinha (A) e safra (B) 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t. .... 15
- Figura 4.** Produtividade média de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) entre as plantas de milho dos genótipos BRS1030 e BRS1060 sem adubação nitrogenada ou com 50 e 100  $\text{kg ha}^{-1}$  de N cultivadas na safrinha (A) e safra (B) de 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t. .... 16
- Figura 5.** Efeito da inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade média de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) independente do genótipo avaliado, referente safrinha (A) e safra (B) de 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t. .... 17
- Figura 6.** Comparação das médias de peso de 1.000 grãos (g) entre os genótipos BRS1060 e BRS1030 cultivadas na safrinha (A) e safra (B) 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t. .... 18
- Figura 7.** Média de peso de 1.000 grãos (g) entre as plantas de milho dos genótipos BRS1030 e BRS1060 sem adubação nitrogenada ou com 50 e 100  $\text{kg ha}^{-1}$  de N cultivadas na safrinha (A) e safra (B) de 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t. .... 19
- Figura 8.** Peso de 1.000 grãos (g) da produção das plantas de milho dos genótipos BRS1030 e BRS1060 sem inoculação ou com inoculação da estirpe ZAE94 cultivadas safrinha (A) e safra (B) de 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t. .... 19
- Figura 9.** Peso de 1000 grãos das plantas de milho dos híbridos BRS1030 e BRS1060 cultivados na safrinha de 2012 nos tratamentos inoculados e não inoculados com diferentes níveis de nitrogênio (0, 50 e 100  $\text{kg de N ha}^{-1}$ ). Valores médios de quatro repetições. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t. 20
- Figura 10.** Comparação das médias geral de %N dos híbridos BRS1030 e BRS1060, referente à safrinha (A) e safra (B) 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t. .... 21
- Figura 11.** Comparação das médias de N-total acumulado ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) dos híbridos BRS1030 e BRS1060, independente do tratamento utilizado, referente à safrinha (A) e safra (B) 2012/2013. .... 21
- Figura 12.** Média de acúmulo de nitrogênio nos grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) entre as plantas de milho dos genótipos BRS1030 e BRS1060 sem adubação nitrogenada ou com 50 e 100  $\text{kg ha}^{-1}$  de N cultivadas na safrinha (A) e safra (B) de 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10 % de probabilidade pelo teste t. .... 22

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1	Cultura do Milho.....	3
2.2	Nutrição, Adubação e FBN em Milho. ....	4
2.2.1	Nutrição e adubação .....	4
2.2.2	Fixação biológica de nitrogênio.....	5
2.3	Resultados da Inoculação de Bactérias Diazotróficas .....	5
2.4	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	8
2.5	Técnica de Diluição Isótopo de <sup>15</sup> N.....	9
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
3.1	Área de Estudo.....	10
3.2	Preparo do Inoculante e Inoculação.....	11
3.3	Condições Experimentais .....	11
3.4	Variáveis Analisadas .....	13
3.5	Nitrogênio Derivado do Fertilizante.....	13
3.6	Análise Estatística.....	14
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>15</b>
4.1	Produtividade de Grãos de Milho na Safrinha e Safra do Ano Agrícola 2012/2013... 15	
4.2	Peso de 1.000 Grãos de Milho Safrinha e Safra Ano Agrícola 2012/2013 .....	17
4.3	Teor e Acúmulo de Nitrogênio nos Grãos de milho Cultivados na Safrinha e Safra do Ano Agrícola 2012/2013 .....	21
4.4	Eficiência no Uso do N-Fertilizante .....	22
4.5	Efeito da Inoculação na Absorção e Acumulo de Fósforo e Potássio. ....	23
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>27</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>28</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil hoje se encontra entre os três maiores produtores de milho no mundo. Entre esses três países em primeiro está os Estados Unidos com 270 milhões de toneladas seguido da China com 200 milhões e em terceiro o Brasil com uma produção de 70 milhões, advindo de duas safras agrícolas, safra 2012/2013 (YAGUSHI, 2012).

O milho é utilizado como uma das principais fontes de energia para a alimentação humana e animal, e com o passar dos anos vem sendo utilizado por alguns países como matéria prima para a produção de etanol. Com isso houve um grande aumento pela demanda dos grãos e associando a uma quebra na safra 2011/2012 nos Estados Unidos, fez com que o preço dessa *commodity* se elevasse muito nesses últimos anos.

Apesar das inovações tecnológicas que se incorporam a cada ano ao setor agrícola, o manejo inadequado ainda configura um dos principais entraves ao crescimento e produtividade desta gramínea. O milho é bastante exigente em fertilidade do solo, com destaque ao nitrogênio (N), sendo que a deficiência desse macronutriente pode reduzir o rendimento de grãos entre 10 e 22% (SUBEDI; MA, 2009).

Embora apresente elevada taxa fotossintética, o milho é uma cultura muito influenciada por problemas de estresse ambiental dentre os quais se destacam aqueles relacionados à baixa fertilidade dos solos. O N constitui componentes essenciais da célula vegetal sendo considerado um nutriente fundamental estando envolvido no incremento da produtividade das culturas. Entretanto, os solos brasileiros apresentam, em sua maioria, baixo teor de N disponível tornando a adubação nitrogenada uma prática indispensável e, neste contexto, os fertilizantes minerais se destacam como a principal forma de adição do nutriente ao solo.

Devido a essa constante demanda pelo aumento de produção e a busca por tecnologias que visem à diminuição do uso de fertilizantes, principalmente os nitrogenados, e com a intenção de minimizar o custo de produção e diminuir o risco de contaminação dos cursos hídricos, novas pesquisas vem sendo desenvolvidas, e uma que vem ganhado muita atenção é o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas.

O estudo com FBN em gramíneas teve seu início na EMBRAPA Agrobiologia, com a pesquisadora JOHANNA DÖBEREINER na década de 50. Suas pesquisas foram com bactérias diazotróficas, que são microrganismos que possuem a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico e transferi-lo diretamente ou indiretamente para o tecido da planta através de uma associação onde não há a formação de nódulos. Essas bactérias associativas possuem a capacidade de infectar e colonizar as plantas de diversas formas, como por exemplo, através de ferimentos sobre a superfície de raízes, pelos radiculares e estômatos das plantas. A partir do conhecimento dessa associação entre bactéria e planta, foram sendo estudadas formas de inoculação desses microrganismos na planta onde a forma na qual a bactéria apresentou melhor adaptação foi inoculação via semente como é realizada para soja.

Hoje no mercado brasileiro são encontrados alguns inoculantes contendo bactérias diazotróficas para aplicação em milho, onde a principal bactérias que vem sendo usada é o *Azospirillum brasilense*, fruto da pesquisa da Dra Johanna Döbereiner. Outras espécies de bactérias diazotróficas também vêm sendo estudadas, sendo uma delas o *Herbaspirillum seropedicae*.

O gênero *Herbaspirillum* é uma bactéria diazotrófica endofítica, que possui a capacidade de oxidar diferentes fontes de carbono e fixar nitrogênio atmosférico em ambiente microaerófilico, e difere do gênero *Azospirillum*, que devido a características morfológicas, fisiológicas e moleculares este novo gênero foi definido em 1986 (BALDANI et al., 1986 a).

Desta forma, a geração de tecnologias pelos órgãos de fomento deve levar em consideração não apenas a otimização do processo produtivo em sistemas com elevada aplicação de tecnologia, mas também favorecer o modelo praticado pela agricultura de subsistência aumentando a disponibilidade de alternativas que visem o melhor desempenho em condições de baixa aplicação de insumos (ALVES, 2011).

O objetivo dessa dissertação foi estudar o efeito da inoculação da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* estirpe ZAE94, em dois genótipos de milho que são recomendados para a região de desenvolvimento do estudo, quanto à capacidade de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, bem como, incrementar a produtividade da cultura.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cultura do Milho

O milho (*Zea mays*) é caracterizado como planta monocotiledônea, da família das *Poaceas*, cujo ciclo fenológico varia de 90 a 205 dias, dependendo do genótipo e do clima (FAGERIA, 1989; NORMAN et al., 1995; TOLLENAAR & DWYER, 1999). É uma planta C<sub>4</sub>, sendo extremamente eficiente na assimilação de CO<sub>2</sub>, apresentando altas taxas de fotossíntese líquida, mesmo em elevados níveis de luz.

A origem do milho tem sido bastante estudada e várias hipóteses foram propostas. GALINAT (1995) relata que o milho descende do *teosinte*, que é uma gramínea com várias espigas sem sabugo, que pode cruzar naturalmente com o milho e produzir descendentes férteis. Segundo FORNASIERI FILHO (2007), o milho teve origem na América, e é largamente cultivado no mundo inteiro, sendo reputada a espécie mais cultivada e produtiva, se considerada individualmente, sua taxa de multiplicação é de 1:600 a 1:1000, o qual tornou-se o primeiro cereal submetido a rápidas e importantes transformações tecnológicas em sua forma de cultivo.

No Brasil o plantio ocorre praticamente durante o ano todo. Devido a isto e, para facilitar o acompanhamento conjuntural, se denomina a lavoura de acordo com a época de plantio: milho safra ou primeira safra, plantado de agosto a dezembro; e milho safrinha ou segunda safra, plantado de janeiro a maio. O período mais expressivo para o plantio ocorre na safra, mas o milho safrinha vem ganhando espaço, desde a década de 80, como alternativa viável de atividade econômica e de produto para consumo próprio no período de outono-inverno (PEDRINHO, 2009).

No início da expansão do milho safrinha, os rendimentos eram muito baixos e os investimentos em insumos eram desprezíveis, pois safrinha era sinônimo de risco e baixa tecnologia. Os rendimentos médios que são encontrados hoje são muito superiores aos encontrados nos primeiros anos de plantio, e também o investimento em insumos aumentou com o ganho e produtividade.

No Brasil essa cultura vem crescendo a cada ano devido ao aumento do consumo contínuo de seus subprodutos. Para o ano de 2012 a produtividade baseada no somatório da safra e da safrinha chegou a uma produção de 63,2 milhões de toneladas, com uma área de aproximadamente 14,8 milhões de hectares (IBGE, 2012).

A maior parcela dos grãos produzidos é destinada ao preparo de rações para alimentação animal, principalmente de aves e suínos, e para a produção de óleo comestível. Uma crescente parcela da produção de milho tem sido destinada a fabricação de produtos para a alimentação humana direta, tais como farinhas, cereais matinais, salgadinhos e xaropes de dextrose, indicando uma maior adoção do milho como fonte de alimento pelos brasileiros. A participação do milho tem crescido e deverá crescer ainda mais no setor da produção de plásticos biodegradáveis a partir de amido de milho (DA ROZ, 2003) e na produção de etanol. Na conjuntura atual de mercado, a tendência é que os preços permaneçam elevados, devido à crescente demanda para a produção de etanol e pelo grande aumento das importações do grão pela China, apesar da atual crise econômica mundial.

A importância do milho ainda está relacionada ao aspecto social, pois grande parte dos produtores brasileiros, não possui grandes extensões de terras, e cultiva para subsistência comercializando o excedente, fator que se reflete nas baixas produtividades médias. Portanto, pode-se, afirmar que há uma clara dualidade na produção de milho no Brasil: uma grande parcela de produtores que não estão envolvidos com a produção comercial e que atingem apenas baixos índices de produtividade, e uma pequena parcela de produtores, com elevado

índice de produtividade, com aplicação intensiva de tecnologia e elevado investimento de capital na produção de milho (DUARTE, 2002).

No Brasil existem varias empresas que desenvolvem cultivares de milho uma muito importante e a Embrapa Milho e Sorgo, ela desenvolve cultivares adaptadas as diferentes regiões do país, dois híbridos que são adaptados a diferentes regiões são o BRS 1030 e o BRS 1060.

BRS 1030 e BRS 1060 são híbridos simples, que quando comparados a outros híbridos comerciais, que são referenciais de aceitação e produtividade no mercado, também apresentam mesmo desempenho de produtividade e de características agronômicas tanto em ambientes com temperaturas noturnas mais amenas quanto em ambientes mais quentes, e possuem excelente estabilidade (PARETONI et al. 2004; GUIMARÃES et al., 2009).

## **2.2 Nutrição, Adubação e FBN em Milho.**

### **2.2.1 Nutrição e adubação**

O milho, assim como praticamente todas as espécies de plantas gramíneas, requer o uso de adubação nitrogenada para compensar a remoção desse nutriente e para complementar a quantidade suprida pelo solo. O nitrogênio (N) é o nutriente absorvido em maior quantidade pela cultura do milho e o nutriente que mais limita a produtividade desta cultura. É um nutriente facilmente perdido por lixiviação, volatilização e desnitrificação no solo e, como consequência, a sua eficiência de utilização pelas plantas dificilmente ultrapassa os 60%.

Cerca de 78% da constituição gasosa da atmosfera é formada por nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>). Esse nutriente é limitante para a produção primária, tanto na terra como no ambiente aquático, uma vez que o mesmo é o principal componente das enzimas que controlam as reações bioquímicas nas quais o carbono é reduzido e oxidado (SCHELSINGER, 1991). No entanto, os organismos eucariontes e a maioria dos procariontes são incapazes de absorver o N<sub>2</sub> e convertê-lo a uma forma assimilável. Os dois átomos de N encontram-se unidos de maneira muito estável por uma tripla ligação. Para que o N<sub>2</sub> possa ser convertido a uma forma assimilável, é necessário o fornecimento de temperatura e pressão muito elevadas (fixação industrial), processo esse que consome muita energia e encarece o preço do kg de N ou a presença de um sistema enzimático apropriado como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (FERNANDES & SOUZA, 2006).

Uma das formas de fornecimento de nitrogênio para a cultura do milho se dá através da mineralização da matéria orgânica, da reciclagem dos resíduos de culturas anteriores e dos fertilizantes nitrogenados minerais ou orgânicos.

Para que esse nutriente seja suprido naturalmente e necessário que o teor de matéria orgânica do solo esteja em níveis altos. Dentre os nutrientes disponibilizados pela matéria orgânica, o nitrogênio é o mais requerido pela a maioria das culturas. Segundo CANTARELLA et al., (2008), mais de 90% do N do solo encontra-se no compartimento orgânico, o que torna inevitável a associação de sua disponibilidade com o teor de MOS. De modo geral, parte substancial do N disponível provem da mineralização da própria MOS. De acordo com MOREIRA E SIQUEIRA (2002), cerca de 2 a 5% do reservatório de N orgânico total é mineralizado por ano.

Então, é fundamental a adoção de sistemas que possibilitem manter ou até aumentar o teor de matéria orgânica como: rotação de culturas, integração agricultura-pecuária, utilização de plantas de cobertura de solo, etc. Com um manejo adequado do solo é possível contar com contribuições de N mineralizado e utilizado pelas culturas de até 180 kg ha<sup>-1</sup> (SOUSA & LOBATO, 2004).

### 2.2.2 Fixação biológica de nitrogênio

Estima-se que a FBN contribua com a maior parte do N fixado anualmente (175 milhões de toneladas), ou seja, 65 % do total, o que o faz ser considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese, juntamente com a decomposição orgânica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Na agricultura, estima-se que a exploração da FBN contribua com cerca de 30% do nitrogênio necessário ao desenvolvimento das culturas (GALLAWAY et al., 2003).

A exploração agrícola da FBN tem sido motivada pela conscientização ecológica sobre o uso intensivo e, muitas vezes, abusivo dos agroquímicos além de representar uma diminuição no custo da produção. Geralmente a FBN está associada a plantas da família Fabaceae (antiga *Leguminosae*), as quais realizam uma simbiose mutualística com determinadas bactérias. Entretanto, estudos como o da pesquisadora brasileira Dra. JOHANNA DÖBEREINER, evidenciam que em plantas da família Poaceae, ocorre à associação com bactérias diazotróficas (BALDANI, et al., 1986b); DOBEREINER et al., 1995). No entanto, os resultados de inoculação em gramíneas forrageiras e cereais nem sempre têm apresentado aumento da produção (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Provavelmente isto ocorra devido à estirpe e espécie da bactéria utilizada, à variação genética da cultivar e às condições ambientais que são fatores que interferem diretamente no sucesso da inoculação (REIS et al., 2000a). SUMNER (1990) sugere que bactérias diazotróficas isoladas da mesma variedade da planta que se deseja inocular, são mais eficientes, especialmente quando a população nativa está presente. Na época estas bactérias eram denominadas de homólogas. Entretanto este conhecimento não se comprovou eficaz em estudos posteriores. ROESCH et al. (2005) complementam que organismos adaptados às condições ambientais da região podem apresentar melhores condições para concorrer com a microbiota nativa, tanto pela adaptação às condições edafoclimáticas, quanto pelo aumento populacional promovido pela inoculação. De fato as condições do solo, planta e ambiente são importantes na adaptação de microrganismos de uma forma geral e afetam também as bactérias diazotróficas.

De um modo ou de outro, a exploração agrícola da FBN depende do profundo conhecimento das bactérias diazotróficas, suas relações com as plantas superiores e com os demais membros da microflora do solo e da rizosfera (PEDRINHO, 2009). MARTINS et al. (2008) também ressaltaram que há necessidade de maior aprofundamento em estudos que determinem a real contribuição da FBN com o intuito de promover maior produtividade, assim como, contribuir para a preservação do meio ambiente. Apesar da constância com que as bactérias endofíticas são isoladas, ainda são pouco conhecidas suas potencialidades fisiológicas, que implicam diretamente nas possíveis trocas entre esses microrganismos e plantas.

### 2.3 Resultados da Inoculação de Bactérias Diazotróficas

Os trabalhos com bactérias diazotróficas associativas têm demonstrado resultados promissores com gramíneas, tais como o milho, trigo e cana de açúcar. Vários gêneros de microrganismos estão sendo estudados, dentre os quais *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* entre muitos outros. Dentre os microrganismos fixadores de N encontrados em associação com gramíneas, as espécies do gênero *Azospirillum* constituem um dos grupos mais estudados, com diversas pesquisas sobre sua ecologia, fisiologia e genética e dentre a grande variedade de espécies atualmente descritas a mais estudada é o *A. brasilense* (BALDANI et al., 1997; BASHAN & HOLGUIN, 1997).

*Azospirillum brasilense* é uma bactéria capaz de realizar o processo de fixação biológica do nitrogênio e de promover o crescimento das plantas, pela produção de diversos

hormônios vegetais que resultam em um maior crescimento das raízes e, conseqüentemente, em maior absorção de água e nutrientes. Essa descoberta no início da década de 1970 pela pesquisadora da Embrapa Dra. JOHANNA DÖBEREINER e se associa a diversas espécies de plantas, particularmente gramíneas, incluindo culturas de grande importância econômica para o Brasil, como o milho, o trigo e a cana-de-açúcar (BODDEY & DÖBEREINER, 1995) as quais, quando associadas à rizosfera das plantas podem, contribuir com a nutrição nitrogenada dessas plantas, tornando-se alvo de estudo por parte de pesquisadores em biologia e fertilidade do solo. Assim sendo, o manejo correto dessa possível associação *Azospirillum spp.* milho pode resultar em incrementos de produtividade e em diminuição dos custos de produção, principalmente da aquisição de fertilizantes nitrogenados (OKON & VANDERLEYDEN, 1997) que são de uso intensivo na cultura do milho. Estes mesmos autores fizeram levantamento de ensaios conduzidos por 20 anos e relataram que em 60 a 70% dos experimentos foram obtidos incrementos na produtividade devido à inoculação, com aumentos significativos na ordem de 5 a 30%.

O efeito da bactéria *Azospirillum spp.* no desenvolvimento do milho e em outras gramíneas, tem sido pesquisado, não somente quanto ao rendimento das culturas mas, também, com relação às causas fisiológicas que, possivelmente, aumentam esse rendimento.

Já em 1991 de acordo com MUÑOZ-GARCIA et al. a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasiliense* estirpe UAP 77, promoveu aumento na matéria seca de raízes, da ordem de 54 a 86% e de 23 a 64% na matéria seca da parte aérea. Por sua vez, SALOMONE & DÖBEREINER (1996) avaliando a resposta de diferentes genótipos de milho à inoculação de quatro estirpes de *Azospirillum spp.* isoladas na Argentina e três de raízes de sorgo e milho isoladas no Brasil, constataram aumento de peso de grãos, variando em diferentes genótipos, da ordem de 1.700 a 7.300 kg ha<sup>-1</sup>; contudo, tais resultados são bastante influenciados pelas condições de solo, ambiente e genótipos de planta e DIDONET et al. (1996) mencionam que são muitas as evidências de que a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasiliense* seja responsável pelo aumento da taxa de acúmulo de matéria seca, principalmente na presença de elevadas doses de nitrogênio, o que parece estar relacionado com o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação de nitrogênio. HUNGRIA et al. (2010) relatam em seus estudos que a adoção da tecnologia de inoculação com *Azospirillum* pode reduzir o uso de fertilizante nitrogenado em até 50% na cultura do milho.

OKON & VANDERLEYDEN (1997) baseando-se em dados acumulados durante 22 anos de pesquisa com experimentos de inoculação a campo, concluíram que o gênero *Azospirillum spp.* promove ganhos em rendimento em importantes culturas nas mais variadas condições de clima e solo. Contudo, salientaram que o ganho com a inoculação de *Azospirillum spp.* vai mais além do que simplesmente auxiliar na fixação biológica do nitrogênio, interferindo também no aumento da superfície de absorção das raízes da planta e, conseqüentemente, no aumento do volume de substrato do solo explorado. Tal constatação é justificada pelo fato da inoculação modificar a morfologia do sistema radicular, aumentando não apenas o número de radículas, mas, também, o diâmetro médio das raízes laterais e adventícias. Pelo menos parte, ou talvez muitos desses efeitos de *Azospirillum spp.* nas plantas, possam ser atribuídos à produção, pela bactéria, de substâncias promotoras de crescimento, entre elas auxinas, giberelinas e citocininas, e não somente a fixação biológica de nitrogênio.

Em trabalho conduzido por NETO (2008), a inoculação do produto à base de *Azospirillum brasiliense* proporcionou aumento significativo na produtividade de grãos de milho de 9021 kg ha<sup>-1</sup> para 9814 kg ha<sup>-1</sup>, ou seja, aumento médio de 9%. Já HUNGRIA et al. (2011), em uma parceria entre a Embrapa Soja e o Grupo da Universidade Federal do Paraná em 1996, foram realizados ensaios de laboratório e testes de eficiência agrônômica de

*Azospirillum* a campo em 18 ensaios. Todos os critérios da legislação brasileira para inoculantes estabelecidos pelo MAPA foram obedecidos. As estirpes de *Azospirillum* selecionadas foram as que apresentaram maior sobrevivência no solo, maior promoção de crescimento das plantas e maior adaptação às tecnologias utilizadas nas culturas do milho e do trigo. Os resultados obtidos neste estudo resultaram na autorização pelo MAPA das estirpes de *A. brasiliense* Ab-V4, Ab- V5, Ab-V6 e Ab-V7 para produção de inoculantes para a cultura do milho, uma vez que as mesmas resultaram em incrementos no rendimento de grãos de 662 a 823 kg ha<sup>-1</sup>, ou 24% a 30% em relação ao controle não inoculado.

Já as espécies descritas no gênero *Herbaspirillum* vêm também demonstrando papel importante na promoção de crescimento de plantas e podem também atuar no processo biológico de fixar nitrogênio. BALDANI et al. (1995) inocularam diferentes estirpes pertencentes a espécie *H. seropedicae* em sementes de arroz e observaram aumento de pelo menos 30% do nitrogênio total acumulado pela planta. GYANESHWAR et al. (2002) também inocularam esta mesma espécie em variedades de arroz tolerantes a alumínio. A inoculação aumentou significativamente o crescimento vegetal e o acúmulo de nitrogênio. O uso de estirpes de *H. seropedicae* imuno-marcadas ou com genes repórteres revelou que este expressa os genes nif ao colonizar raízes e partes aéreas de arroz (JAMES et al., 2002; RONCATO-MACARI et al. 2003), indicando que este endófito é capaz de fixar nitrogênio em planta. ALVES (2007) verificou que a inoculação de estirpes dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* contribuiu com até 34% do N absorvido em plantas de milho especialmente quanto inoculado em genótipos híbridos e este efeito foi maior na inoculação de milho safrinha.

GUIMARÃES et al. (2007) estudando a interação *Herbaspirillum seropedicae* e adição de molibdênio em duas cultivares de arroz notaram que uma da cultivares respondeu positivamente a inoculação mesmo sem receber a combinação com molibdênio, no tratamento que só foi realizado a inoculação apresentou média massa de matéria seca de planta de arroz superior ao tratamento que receberam a combinação inoculação dose de molibdênio. Já FERREIRA et al. (2010), selecionando inoculantes a base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas cultivares de arroz observou que massa seca e o N-total do grão os tratamentos inoculados com a estirpe ZAE94 (*H. seropedica*) nas turfás utilizadas e da estirpe M130 (*Burkholderia* sp) na turfa importada proporcionaram resultados estatisticamente igual ao controle nitrogenado. Tal fato sugere que a inoculação destas estirpes pode suprir até 20 kg de N ha<sup>-1</sup> para atingir o mesmo N-total e produtividade de grãos das plantas de arroz adubadas.

Para a cultura do milho, já estão disponíveis no mercado inoculantes registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e produzidos por quatro empresas no Brasil. Entretanto a única espécie registrada para tal aplicação é o *Azospirillum brasiliense*. Isto se deve ao fato de ser a primeira a ser descrita, a mais estudada mundialmente e a sua aplicação na agricultura já ser uma prática antiga em outros países como a Argentina, Colômbia, México, Egito entre outros. No Brasil o uso de inoculantes para gramíneas começou em 2010, embora este estudo tenha iniciado aqui sua aplicação comercial é recente.

Ferreira et al. 2010, trabalhando com a variedade de trigo BRS 296 em casa de inoculada com vegetação co as bactérias *Azospirillum brasiliense* Sp 245 e *Herbaspirillum seropedica* ZAE 94, observaram que a inoculação resultou num aumento de massa seca na ordem de 28 e 25,9%, respectivamente, na presença da metade da dose de N-fertilizante (40 kg de N/ha<sup>-1</sup>) e 12,1 e 18,1% na dose de 80 kg de N/ha<sup>-1</sup> em relação ao controle sem inoculação. Já o teor de nitrogênio na parte aérea não diferiu entre os tratamentos para nenhum dos níveis de nitrogênio avaliado.

## 2.4 Herbaspirillum seropedicae

Segundo EUZÉBY (2014) hoje o gênero *Herbaspirillum* compreende 16 espécies de bactéria que são: *H. seropedicae* (BALDANI et al. 1986a), *H. aquaticum* (DOBRITSA et al. 2010), *H. aurantiacum* (CARRO et al. 2012), *H. autotrophicum* (ARAGNO & SCHLEGEL, 1978 reclassificado por DING & YOKOTA, 2004), *H. canariense* (CARRO et al. 2012), *H. chlorophenolicum* (IM et al. 2004), *H. frisingense* (KIRCHHOF et al. 2001), *H. hiltneri* (ROTHBALLER et al. 2006), *H. huttiense* (LEIFSON 1962, reclassificado por DING & YOKOTA, 2004), *H. huttiense* subsp. *huttiense* (LEIFSON, 1962; DOBRITSA et al. 2010), *H. huttiense* subsp. *putei* (DING & YOKOTA 2004, reclassificado por DOBRITSA et al. 2010), *H. lusitanum* (VALVERDE et al. 2003), *H. putei* (DING & YOKOTA 2004), *H. rhizosphaerae* (JUNG et al. 2007), *H. rubrisubalbicans* (CHRISTOPHER & EDGERTON, 1930 reclassificado por BALDANI et al. 1996a) e *H. soli* (CARRO et al. 2012).

A espécie *H. seropedicae* foi descrita em 1986 como sendo uma bactéria diazotrófica endofítica, Gram-negativa, geralmente vibrióide, às vezes helicoidais e membro da subdivisão  $\beta$  das Proteobactérias. Foi a primeira espécie descrita do gênero e isolada de raízes de milho, sorgo, e arroz (BALDANI et al., 1986b). Mais tarde foi isolada de raízes, folhas e colmos de cana-de-açúcar, *Brachiaria decumbens* e *Digitaria decumbens* (BALDANI et al., 1996b), de raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar cultivada na Austrália (BODDEY et al., 1998), dendezeiro e pupunheira (FERREIRA et al., 1995), bananeiras (CRUZ et al., 2001), capim elefante (REIS et al., 2000b), e arroz inundado (RODRIGUES, 2004; BRASIL, 2005).

Esta espécie possui capacidade de oxidar diversas fontes de carbono e fixar nitrogênio atmosférico em ambientes microaerófilos (BALDANI et al., 1986a). Difere das espécies do gênero *Azospirillum* pelo seu menor tamanho, por apresentar mais de um flagelo, pela maior tolerância a variações de pH (5,3 a 8,0), pela atividade nitrogenase mais tolerante ao oxigênio ( $pO_2$  de até 3% contra 2% das espécies de *Azospirillum*), e por ter um conteúdo de G+C inferior em comparação com as bactérias do gênero *Azospirillum* (BALDANI et al., 1986a).

No final da década de noventa, uma nova classificação foi estendida para explicar o modo de colonização destes diazotrófos. As bactérias foram divididas em rizosféricas e endofíticas. As endofíticas foram descritas como aquelas que vivem no interior da planta, não apenas das raízes, e que podem ser isoladas de tecidos cuja superfície foi desinfestada, e que não causam danos visíveis às plantas (HALLMANN et al., 1997). As bactérias diazotróficas endofíticas foram então subdivididas em facultativas, como *Azospirillum* spp., e obrigatórias, como o *Herbaspirillum* spp., sendo estas capazes de crescer no interior de plantas como o arroz e transferir o nitrogênio fixado diretamente para o tecido vegetal e acredita-se com mais eficiência que as bactérias diazotróficas rizosféricas (BALDANI, et al., 1986a). Outra característica que o gênero *Herbaspirillum* possui como o *Azospirillum*, é o hábito de crescer em meio NFb semi-sólido (BALDANI et al. 1986a) sendo que para o melhor desenvolvimento inicial desta espécie, o meio tradicional NFb foi modificado reduzindo o pH final para 5,8 e a composição e concentração do tampão fosfato. Esta nova formulação foi denominada de JNFb (DÖBEREINER et al. 1995).

As bactérias endofíticas colonizam as plantas primeiro se aderindo à superfície das raízes, em seguida com a colonização das raízes laterais com penetração pela epiderme, envolvendo lipopolissacarídeos, exopolissacarídeos bacterianos, posteriormente ocupando os espaços intercelulares, colonizando também o xilema e parte aérea das plantas (MONTEIRO et al., 2012), ainda podem usar aberturas naturais (estômatos) ou artificiais (ferimentos) para sua entrada (BASHAN & DE-BASHAN, 2005). Estudo realizado por JAMES et al. (2002) comprovaram esse tipo de colonização de endofíticos como a espécie *Herbaspirillum seropedicae* que se encontra em coleóptilos, raízes laterais e junções destas com a principal, em espaços intercelulares da raiz, aerênquima e células corticais, com pequena entrada no

estelo e no tecido vascular, sendo encontradas colônias no xilema, folhas e caules de arroz. Em experimento com cana-de-açúcar micropropagada, OLIVEIRA et al. (2006) observaram o sucesso na colonização de plantas inoculadas com uma mistura de cinco espécies de bactérias endofíticas, indicando ainda que existe uma dinâmica de competição entre as espécies para dominar o ambiente vegetal.

## 2.5 Técnica de Diluição Isótopo de $^{15}\text{N}$

A técnica disponível mais adequada para quantificar a FBN é a diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  (BODDEY; URQUIAGA, 1992). Tal técnica possui a vantagem de ser integrada, pois permite quantificar a contribuição da FBN durante o ciclo de uma planta e a avaliar o N fixado que foi incorporado dentro da planta, tornando possível mensurar o benefício da FBN durante o crescimento da espécie em interesse (PEOPLES et al., 1989).

O método da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  para medição da FBN tem maior custo e apresenta dificuldades adicionais para emprego em ensaios de campo devido à necessidade de marcação de grande volume de solo (OLIVEIRA, 2012).

A utilização da técnica do isótopo estável  $^{15}\text{N}$  permite obter informações precisas da dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta. Se utilizarmos um adubo verde marcado com  $^{15}\text{N}$  é possível determinar no solo e na cultura plantada, em sequência, a porcentagem e a quantidade desse nutriente que deriva do adubo verde, bem como a porcentagem deste nas diversas partes da cultura (TRIVELIN, 2005).

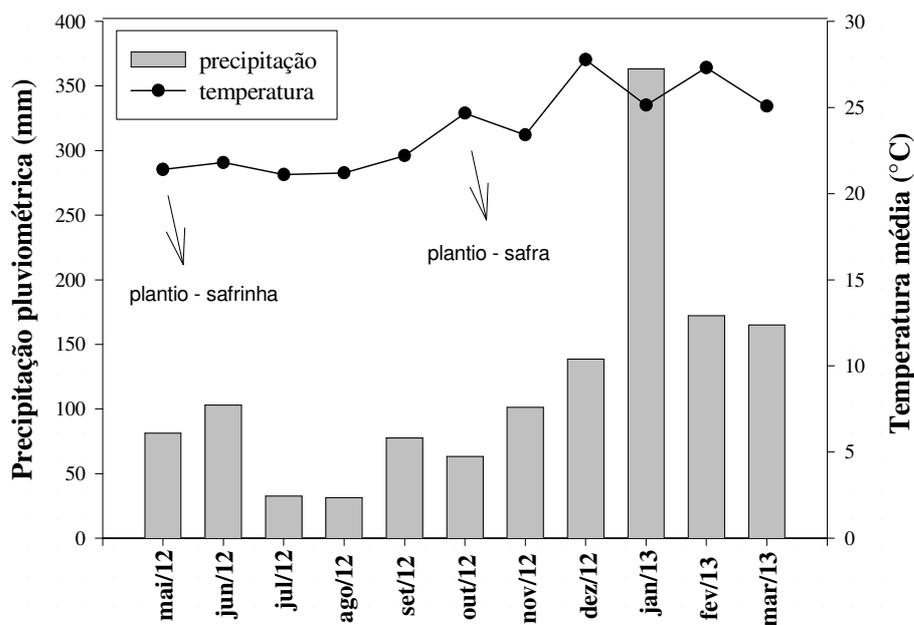
A técnica original de enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  (MCAULIFFE et al., 1958) e suas modificações posteriores (FRIED & MIDDLEBOE, 1977; CHALK, 1985; LEDGARD et al., 1985; CHALK; SMITH, 1994), se baseiam na alteração da proporção natural entre os isótopos  $^{14}\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$ , acrescentando adubos nitrogenados artificialmente enriquecidos, % de  $^{15}\text{N}$  superior a 0,3663%, e proporção conhecida ao meio de crescimento de plantas fixadoras de  $\text{N}_2$ . Portanto, as plantas que obtêm além do nitrogênio marcado proveniente do solo, o N atmosférico, sofrem uma diluição no seu enriquecimento em  $^{15}\text{N}$ . Quanto maior for a diluição, maior será a quantidade de N atmosférico incorporado, com isso, maior a contribuição da FBN (HE et al., 2003; QUESADA, 2005).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 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 solo da área experimental foi classificado como Planossolo Háptico de acordo com Santos et al. (2013). Solos desta ordem apresentam um horizonte B plânico imediatamente abaixo de um horizonte A ou E, podendo o último algumas vezes ser identificado como um horizonte E álbico.

Foram implantados dois experimentos um no período da safrinha em Maio 2012, e o segundo durante o período da safra em Outubro de 2012, para os dois períodos de plantio quando necessário foi realizada irrigação. O clima da região é do tipo Aw, segundo classificação de Köppen, com inverno seco e verão quente e chuvoso, e com temperatura média anual de 24°C. Os dados de média de temperatura e precipitação durante o desenvolvimento da cultura (safra e safrinha) são apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Médias mensais de temperatura e precipitação da região de estudo no período de maio de 2012 a março de 2013. Dados fornecidos pelo site do INMET (Estação automática de Seropédica – RJ).

Em ambos os experimentos foram utilizados dois híbridos simples desenvolvidos pela EMBRAPA milho e sorgo os híbridos escolhidos foram o BRS 1030, pois já havia apresentado resposta positiva em ensaios desenvolvidos anteriormente e o BRS 1060 foi escolhido por ter uma das linhagens em comum com o BRS 1030 e por ser o híbrido que substituirá o BRS 1030 no mercado no próximo ano.

No preparo do solo foi feita uma aração e duas gradagem nos dois experimentos, depois a área foi sulcada e demarcada parcela de 5mx5m totalizando 25 m<sup>2</sup>. Logo após, com o resultado da análise química de terra (Tabela 1) foi aplicada a adubação, de acordo com o Manual de Adubação do Estado do Rio de Janeiro (DE-POLLI, 1988), com 80 kg ha<sup>-1</sup> de

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 20 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O. Posteriormente, em cada cova foram plantadas 2 sementes a 3 cm de profundidade em ambos experimentos.

**Tabela 1.** Análise química de amostra de solo da área experimental.

pH em água	%C	Al S	H+Al S	Ca	Mg	P	K
Cmolc dm <sup>-3</sup>				mg L <sup>-1</sup>			
5,38	0,86	0,05	2,94	1,34	0,79	5,14	55

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

### 3.2 Preparo do Inoculante e Inoculação

Foi utilizada a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR11417 (também denominada de ZAE 94), bactéria essa que foi adquirida junto ao banco de bactérias da Embrapa Agrobiologia.

Tal isolado foi inicialmente crescido em placa com meio de cultura sólido JNFb (DÖBEREINER et al., 1995), com o objetivo de verificar a pureza. Para obtenção do inoculante, colônias puras foram inoculadas no meio de cultura DYG'S (RODRIGUES NETO, 1986) e multiplicadas por 24 horas a 30°C a 175 rpm (rotações por minuto). Após esta etapa 100µl da suspensão foi inoculado em frascos contendo 75 ml do mesmo meio Dyg's, e multiplicado nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida a concentração celular foi ajustada para 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> unidades formadoras de colônias (UFC) mL<sup>-1</sup>, numa densidade óptica igual a 1, lida no comprimento de onda λ = 436nm (SCHLOTTER et al., 1992).

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

### 3.3 Condições Experimentais

O delineamento experimental utilizado, em ambos os experimentos, foi em blocos ao acaso com o arranjo fatorial de 3x2x2 em 6 repetições, totalizando 72 unidades experimentais, onde cada unidade experimental era constituída de uma área de 5 m x 5 m totalizando 25 m<sup>2</sup> dentro dessa unidade experimental o espaçamento do milho foi de 1 m x 0,2 m entre planta com isso tendo uma população de 50.000 plantas por hectare (Figura 2).

Os três fatores são definidos como: adubação nitrogenada (N), inoculação (I) e genótipos (G), 3N x 2I x 2G, onde para adubação nitrogenada foi dividida desta forma, sem adubação, com 50 kg de N ha<sup>-1</sup> e com 100 kg de N ha<sup>-1</sup>, inoculação foi com e sem inoculação, e o ultimo fator dois genótipos de milho o BRS 1030 e o BRS 1060. Dentro do fator adubação foi criada uma microparcela de 3m x 1m, onde recebeu nitrogênio enriquecido, essas microparcels foram implantadas no centro da linha central das parcelas que receberam adubação. A concentração do enriquecimento variou de acordo com a dose de nitrogênio por hectare, onde a dose de 50 kg de N ha<sup>-1</sup> recebeu 1,6% de <sup>15</sup>N em excesso e na dose de 100 kg de N ha<sup>-1</sup> foi enriquecido com 0,6737% de <sup>15</sup>N em excesso e esse nitrogênio enriquecido está na forma de sulfato de amônia.

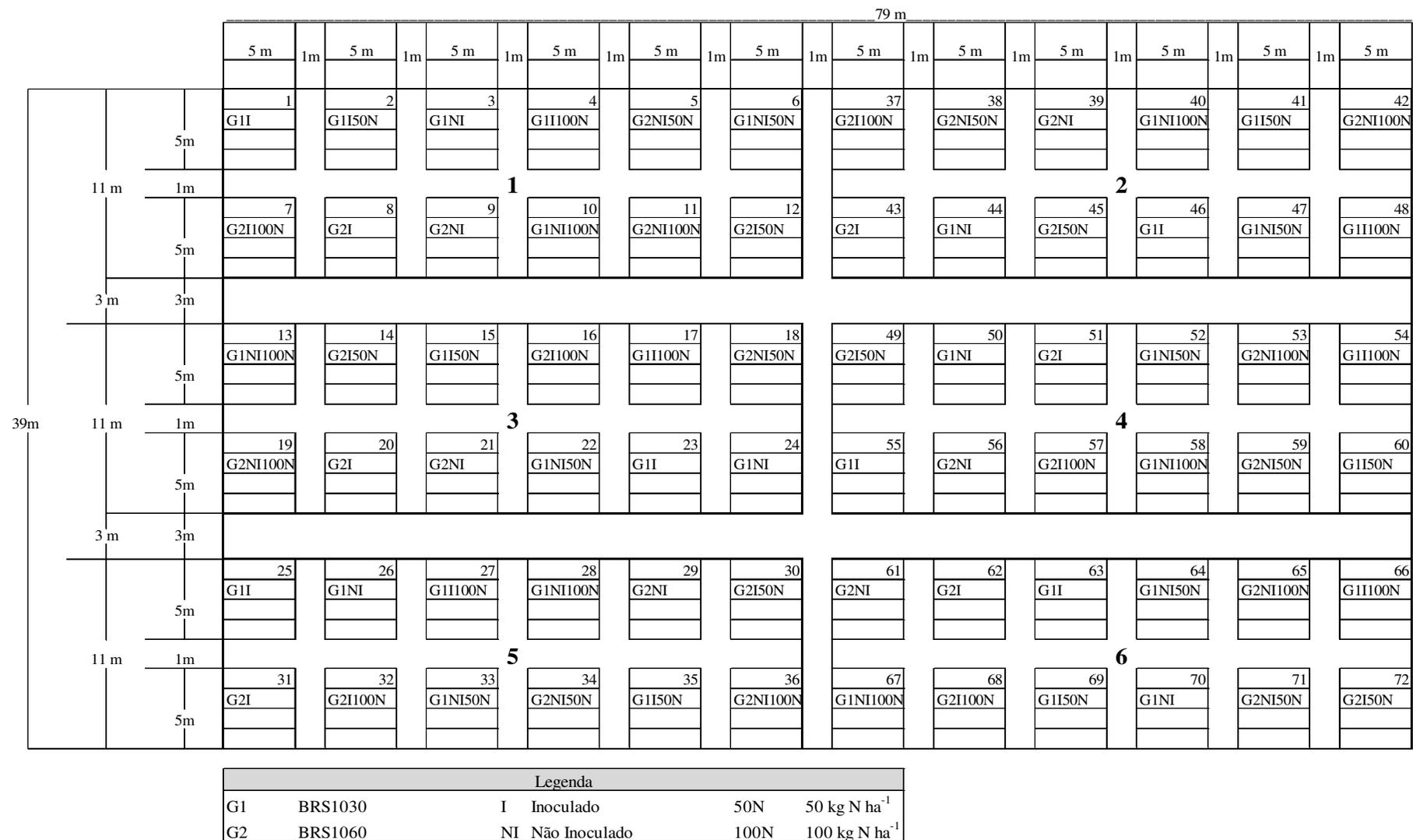


Figura 2. Croqui referente aos dois experimentos.

### 3.4 Variáveis Analisadas

Foram determinadas as variáveis agronômicas, produtividade e peso de 1.000 grãos, para avaliar o rendimento das plantas de milho, submetidas aos diferentes tratamentos propostos no estudo. Assim como, a concentração e acúmulo de nitrogênio nos grãos.

A produtividade foi obtida através da amostragem de 25 plantas colhidas aleatoriamente na parcela, isolando o efeito de bordadura. Após debulhar as espigas, foi realizada a pesagem da massa total de grãos, onde se retirou uma subamostra de peso conhecido, média de 300 g, sendo levada para estufa de circulação forçada a uma temperatura de 65° C, até a obtenção de peso constante, obtendo-se assim o teor de umidade dos grãos. Posteriormente, corrigiu-se a produtividade para a umidade padrão de 13%.

Os teores de nitrogênio nos grãos, foram obtidos através do procedimento descrito por CARMO et al. (2000), onde os extratos obtidos na digestão sulfúrica, foram analisados através da determinação de amônio, com destilação/titulação em semi-micro Kjeldhal (BREMMER, 1965). As amostras de 100 mg de grãos foram submetidas ao método de digestão pelo ácido sulfúrico concentrado mais catalisadores a 150 °C por 1 hora e a cada 30 min a temperatura era aumentada até 300 °C a 350° até o clareamento da solução. Estas amostras foram alcalinizadas com 20 ml de uma solução de NaOH a 50%, em seguida, destiladas em arraste a vapor e tituladas com solução alcoólica (ácido bórico + azul metil + vermelho metil) em destilador automático Kjeltex Auto-analyzer modelo 1030 (TECATOR, Höganäs, Sweden).

Utilizando os valores de produtividade e teores de N, determinou-se o nitrogênio total acumulado nos grãos de milho em kg ha<sup>-1</sup>.

### 3.5 Nitrogênio Derivado do Fertilizante

Foram realizadas análises de enriquecimento com <sup>15</sup>N nas amostras vegetais. Para as amostras de plantas e grãos foram coletadas três plantas inteira de cada microparcela que recebeu o fertilizante marcado, onde foram separadas as espigas, para serem debulhadas.

As amostras de planta e grãos foram secas em estufa de circulação forçada à 65° C até que o peso permanecesse constante, em seguida foram moídas em moinhos do tipo Wiley (2 mm) e posteriormente passadas em moinho de rolagem para diminuição da granulométrica das amostras (<40 mesh) (SMITH & MYUNG, 1990). Após a pulverização das amostras foi determinado o enriquecimento com <sup>15</sup>N por espectrometria de massa (BODDEY et al., 1994).

O enriquecimento do N aplicado variou de acordo com a dose de nitrogênio aplicado por hectare como já descrito anteriormente. Isso permitiu avaliar a quantidade de N derivada do fertilizante no solo e planta. Com este resultado foi possível calcular a eficiência do uso do N para o período de crescimento da cultura (ALVES et al., 2006).

A eficiência de utilização do fertilizante nitrogenado (%) foi calculada pela fórmula:

$$EUFN = (QNPSf/QF)/100$$
, em que:

QNPSf = quantidade de N derivado do fertilizante presente na planta, ou no solo;

QF= quantidade de N aplicada como fertilizante.

A QNPSf foi calculada multiplicando-se a quantidade de N total da planta, ou do solo, pela porcentagem de N da planta, ou do solo, derivada do fertilizante (%NPf ou %NSf).

A %NPf ou %NSf foi calculada pela fórmula:

$$\%NSf = (\%^{15}Nps/\%^{15}Nf)/100$$
, em que:

$\%^{15}Nps$ = porcentagem de átomos de <sup>15</sup>N em excesso na planta, ou solo;

$\%^{15}Nf$  é a porcentagem de átomos de <sup>15</sup>N do fertilizante em excesso (ALVES et al., 2006).

### **3.6 Análise Estatística**

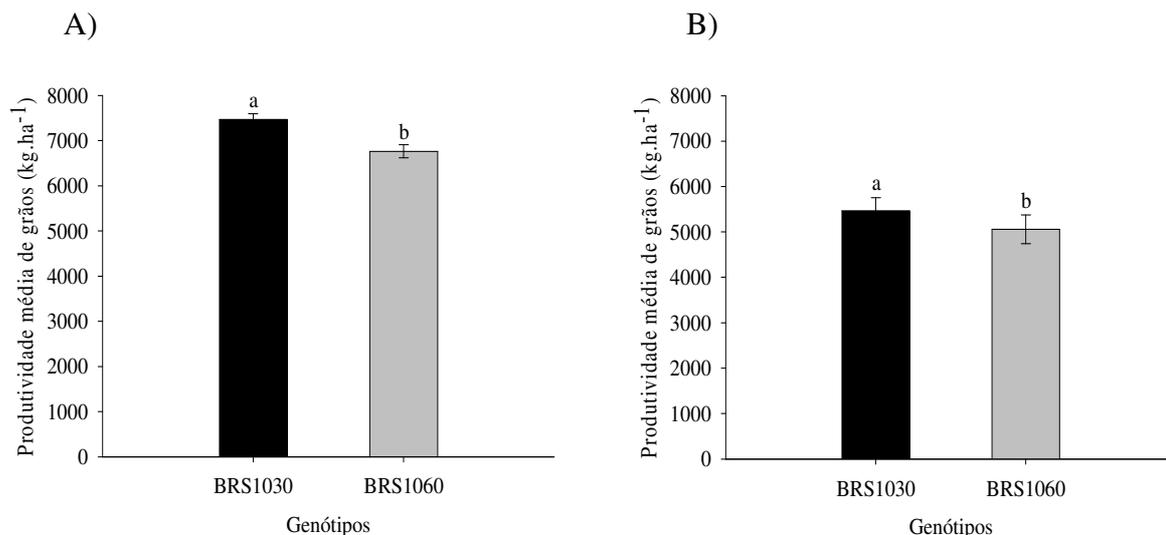
Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2007). Onde os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Exceto o teste de homogeneidade das variâncias (teste de COCKRAN & BARTLET) que foi realizado utilizando o programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983). Atendendo assim, as pressuposições necessárias para a avaliação dos dados por testes paramétricos.

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 teste t a 10% de probabilidade, quando as variáveis avaliadas eram de natureza qualitativa (genótipo e inoculação).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produtividade de Grãos de Milho na Safrinha e Safra do Ano Agrícola 2012/2013

Na Figura 3 podem ser observadas as médias de produtividade de grãos de milho dos dois híbridos (BRS1030 e BRS1060) cultivados na safrinha (Figura 3A) e na safra (Figura 3B) de 2012/2013.



**Figura 3.** Comparação das médias de produtividade dos híbridos BRS1030 e BRS1060, independente do tratamento utilizado, referente à safrinha (A) e safrinha (B) 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t.

De acordo com a Figura 3, verifica-se que a produtividade de ambos os híbridos, nos dois períodos analisados, foram superiores quando comparados à média nacional, que de acordo com IBGE (2012) foi estimada em 4.500 kg ha<sup>-1</sup>. No período da safrinha foram obtidos valores acima de 7.000 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto que no período da safrinha a produtividade atingiu valores próximos a 5.200 kg ha<sup>-1</sup>. Este comportamento difere do encontrado na literatura, onde são relatados maiores produtividades no período da safrinha (FARINELLI et al.; 2003; ALVES, 2011). A redução na produção de grãos na safrinha, quando comparado com a época normal de cultivo, está associada à ocorrência de déficits hídricos, que diminui a taxa fotossintética e a multiplicação celular, provocando redução da matéria verde total da planta e consequentemente redução na produtividade (VALOIS, 1992; EPAMIG, 2006). Entretanto, a produtividade pode ter sido influenciada pela boa distribuição de chuva que ocorreu durante o período da safrinha, acompanhado da temperatura média mais elevada durante o período de cultivo como já descrito anteriormente no material e métodos.

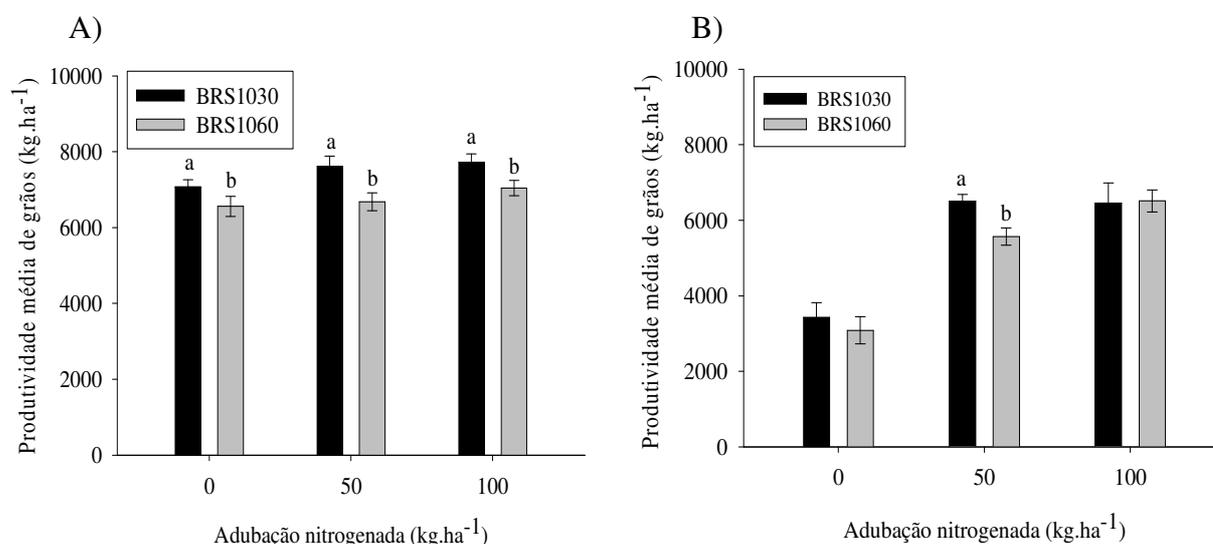
Analisando a variável genótipo (Figura 3), observa-se que o híbrido BRS1030 apresentou aumento significativo ( $p=0,10$ ) na produtividade em relação ao BRS1060, em ambos os períodos de cultivo. O primeiro híbrido teve uma produtividade média de 7.469 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto o segundo híbrido apresentou produtividade de 6.761 kg ha<sup>-1</sup> quando cultivado na safrinha. No período da safrinha a média de produtividade do híbrido BRS 1030 foi de 5.467 kg ha<sup>-1</sup>; já o BRS 1060 apresentou média de 5.056 kg ha<sup>-1</sup> cerca de 400 kg ha<sup>-1</sup> a mais.

Apesar dos dois híbridos serem recomendados para a região onde foi desenvolvido o estudo, o BRS 1030 apresentou melhor adaptação quando comparado ao outro híbrido estudado independente do período de cultivo. De acordo com o PARENTONI e colaboradores

(2004), o BRS 1030 tem mostrado melhor desempenho de produtividade e de características agrônômicas, tanto em ambientes de temperaturas noturnas mais amenas quanto em ambientes mais quentes (altitudes abaixo de 700 m, característica apresentada no ambiente estudado). Já o BRS 1060 apresentou melhores resultados em ambientes de altitude acima de 700 m, como descrito por GUIMARÃES et al. (2009).

Os fatores ambientais se referem basicamente a componentes climáticos e edáficos, cujos efeitos podem influenciar direta ou indiretamente no potencial produtivo das culturas. Considera-se que destes efeitos, os elementos climáticos são os mais impactantes na produção de milho, mesmo empregando-se alto nível tecnológico no manejo (AGENTA et al., 2003).

Na Figura 4 são apresentados os valores médios de produtividade de grãos de milho em função da dose de nitrogênio (0, 50, 100 kg de N ha<sup>-1</sup>) e dos genótipos (BRS 1030 e BRS 1060) cultivados nos dois períodos do ano agrícola 2012/2013.



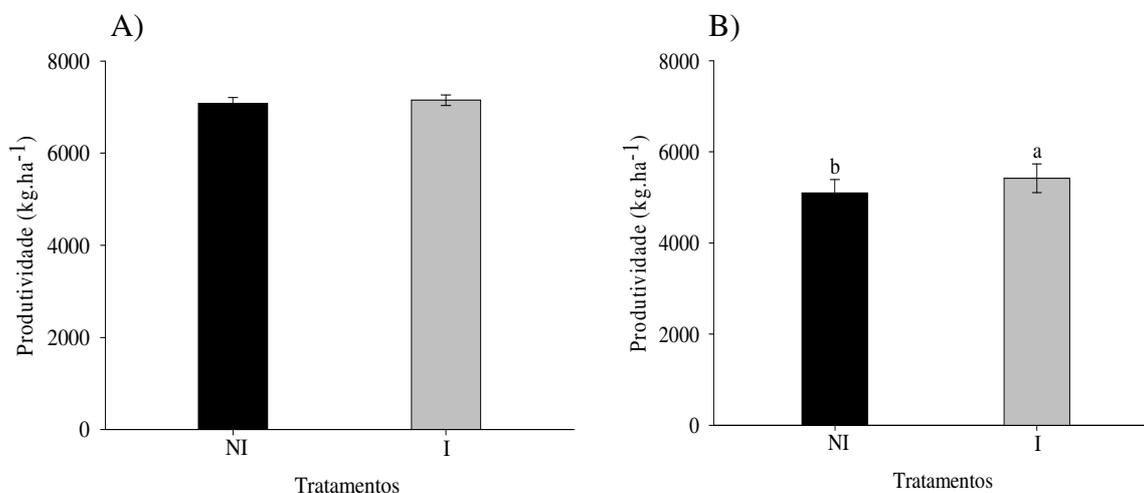
**Figura 4.** Produtividade média de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) entre as plantas de milho dos genótipos BRS1030 e BRS1060 sem adubação nitrogenada ou com 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup> de N cultivadas na safrinha (A) e safrã (B) de 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t.

Observando a resposta a adução dos híbridos, verifica-se que para a safrinha (Figura 4A) independente da dose utilizada, o híbrido BRS 1030 apresenta resposta superior quando comparado ao híbrido BRS 1060. Já para a safrã (Figura 4B) observa-se que a resposta do híbrido BRS 1030 só apresenta diferença significativa no teste t a 10% de probabilidade na dose de 50 kg de N ha<sup>-1</sup>, nota-se que o híbrido BRS 1030 produziu cerca de 900 kg ha<sup>-1</sup> a mais que o BRS 1060. Como discutido anteriormente essa melhor resposta se deve a melhor adaptação do híbrido BRS 1030 ao ambiente onde foram desenvolvidos os estudos.

Ao analisar a produtividade média de grãos do tratamento que não recebeu adubação nitrogenada, verifica-se que no período da safrinha, esta é superior a 6.000 kg ha<sup>-1</sup>, ou seja, acima da média nacional, que é 4.500 kg ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2012), evidenciando que o solo possuía capacidade satisfatória de suprimento de N, assim como dos demais nutrientes essenciais. Contudo, observa-se que devido ao cultivo sucessivo, houve um consumo dos nutrientes, principalmente do nitrogênio, visto que, a produtividade no período da safrã apresentou redução em torno de 50%, chegando a valores médios de 3000 kg ha<sup>-1</sup>. Diante disso, pode-se atribuir as maiores produtividades obtidas na safrinha, além das condições climáticas favoráveis, ao maior suprimento de nutrientes.

Na Figura 5 pode ser observado o efeito da inoculação, por *Herbaspirillum seropedicae* ZAE 94, na produtividade média de grãos de milho independente dos genótipos e

dos níveis de adubação nitrogenada para safrinha (Figura 5A) e safra (Figura 5B) 2012/2013.



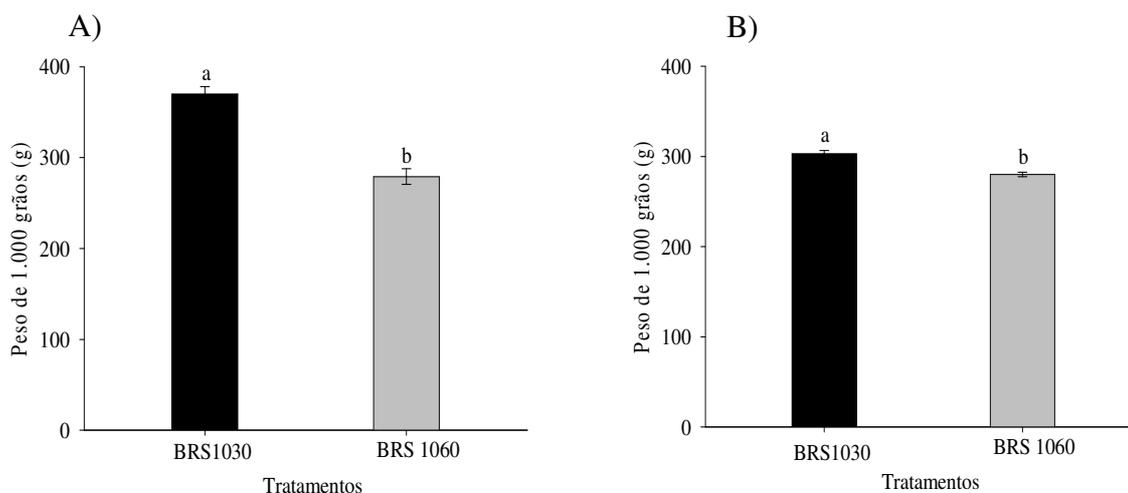
**Figura 5.** Efeito da inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade média de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) independente do genótipo avaliado, referente safrinha (A) e safra (B) de 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t.

No período da safrinha a produtividade do tratamento inoculado não diferiu significativamente quando comparado com o não inoculado. Já para o período da safra o fator inoculação (5.422 kg ha<sup>-1</sup> de grãos de milho) apresentou diferença significativa no teste t a 10% de probabilidade, quando comparado com o fator sem inoculação (5.101 kg ha<sup>-1</sup> de grãos de milho). Este incremento representa um aumento de produtividade de aproximadamente 300 kg ha<sup>-1</sup> (Figura 5). CAVALLET et al. (2000) estudando o efeito da inoculação de *Azospirillum spp* obteve resultados similares, onde analisando o efeito da inoculação, independente do tratamento utilizado no estudo, observaram que quando se inocula há um incremento de 17% em relação aos tratamentos não inoculados. Esse comportamento se repete nos estudos desenvolvidos por NOVAKOWISKI e colaboradores (2011) onde a produtividade de milho manteve-se superior com a inoculação de *A. brasilense* quando comparada ao controle, mesmo com o aumento da quantidade de N aplicada no inverno. MORAIS (2012), trabalhando com milho e utilizando alta e baixa tecnologia de plantio, observou que a inoculação dos híbridos com *Azospirillum* promoveu o aumento médio no rendimento de grãos de 4 a 7%. Diante disso, o autor concluiu que independente do híbrido e da tecnologia de produção, a prática de inoculação garante o retorno do investimento ao configurar maiores produtividades na cultura do milho.

#### 4.2 Peso de 1.000 Grãos de Milho Safrinha e Safra Ano Agrícola 2012/2013

O peso de 1000 grãos é um parâmetro considerado importante na avaliação de atributos físicos de qualidade de grão. Normalmente valores altos, de peso de 1000 grãos numa cultivar, significam maior qualidade do grão, apesar deste parâmetro não ter uma relação direta com os rendimentos em grãos mais elevados (LUIZ & MAGRO, 2007).

Na Figura 6 são apresentadas as médias de peso de 1.000 grãos para os híbridos BRS 1030 e os BRS 1060 para o ano agrícola 2012/2013.

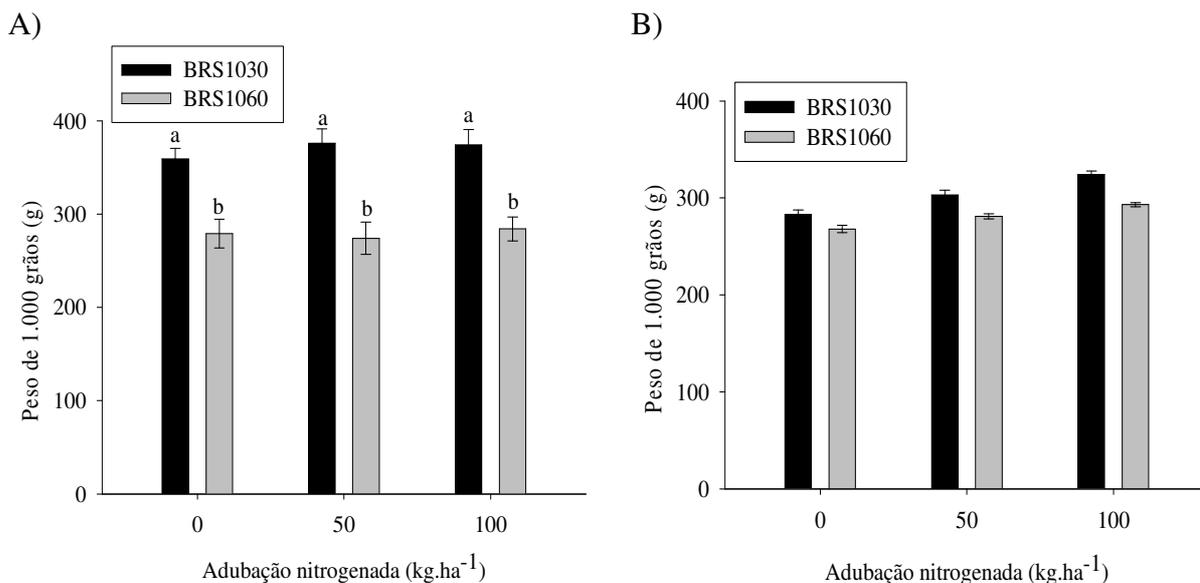


**Figura 6.** Comparação das médias de peso de 1.000 grãos (g) entre os genótipos BRS1060 e BRS1030 cultivadas na safrinha (A) e safrã (B) 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t.

Assim como, observado para produtividade, o peso de 1.000 grãos apresentou diferença significativa pelo teste t a 10% de probabilidade, entre os genótipos estudados. No período da safrinha o híbrido BRS1030 apresentou média de 370 g, enquanto o híbrido BRS 1060 valores médios de 279 g, que representa uma diferença de 25% no peso de 1000 grãos dos híbridos. Esta diferença significativa também é encontrada para o período da safrã onde o BRS 1030 apresenta peso superior ao do BRS 1060, o primeiro apresentou peso de 303 g e o segundo 280 g, esse incremento representa um ganho no peso de 1000 grãos de aproximadamente 7,5%, ratificando assim a melhor adaptação do híbrido BRS 1030 as condições ambientais da região. De acordo com GUIOMAR (2011), o peso de 1000 grãos têm uma relação intrínseca com a genética da cultivar, apesar de poderem existir fatores externos que condicionem este atributo.

CICHORSKI et al. (2010), avaliando os parâmetros de produção de milho de diferentes híbridos na região de Cascavel-PR, também observaram diferença significativa no peso de 1000 grãos. Estudos desenvolvidos por CRUZ et al. (2004) e CARVALHO et al. (2005), destacam que, em um ambiente a manifestação fenotípica é o resultado da ação do genótipo sob influência do meio. Onde, a comparação entre híbridos com diferentes estruturas genéticas é particularmente importante, devido às variadas condições ambientais nas quais o milho é cultivado, levando assim a diferentes respostas.

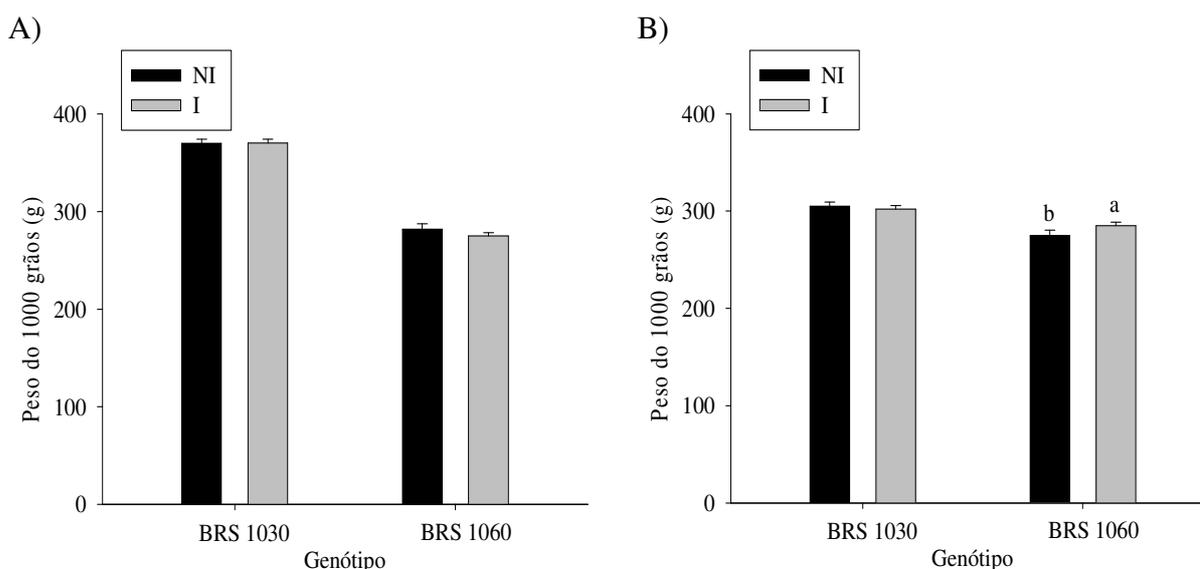
Na Figura 7 são apresentados os valores médios de peso de 1.000 grãos de milho em função da dose de nitrogênio (0, 50, 100 kg de N ha<sup>-1</sup>) e dos genótipos (BRS 1030 e BRS 1060) cultivados nos dois períodos do ano agrícola 2012/2013.



**Figura 7.** Média de peso de 1.000 grãos (g) entre as plantas de milho dos genótipos BRS1030 e BRS1060 sem adubação nitrogenada ou com 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup> de N cultivadas na safrinha (A) e safra (B) de 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t.

Observando a resposta a adução dos híbridos, verifica-se que na safrinha (Figura 7A) independente da dose de nitrogênio utilizada, o híbrido BRS 1030 apresenta peso de 1.000 grãos superior quando comparado ao híbrido BRS 1060, Essa superioridade do híbrido BRS 1030 já havia sido observado para a produtividade. Já para a safra (Figura 7B) observa-se que não houve diferença significativa no peso de 1.000 grãos entre os híbridos.

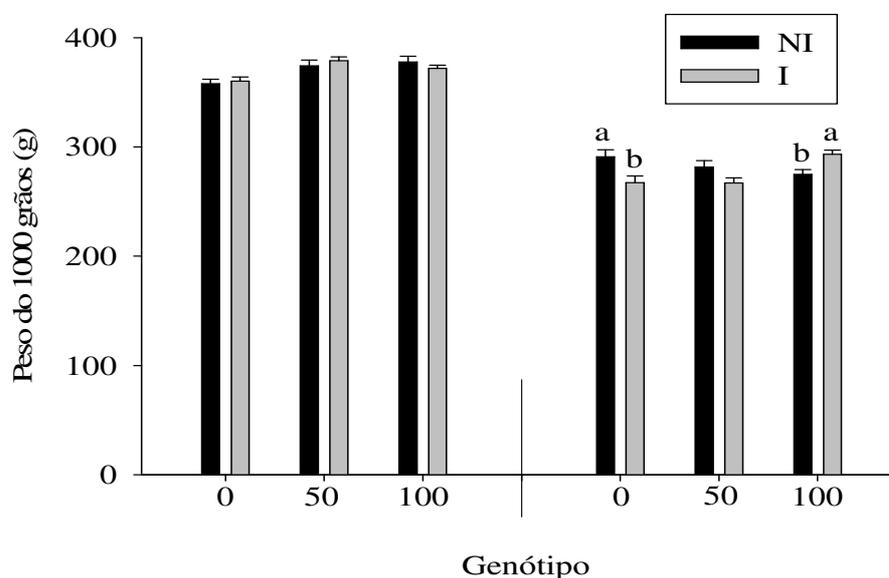
O efeito da interação entre genótipo e inoculação, no peso médio de 1.000 grãos, na safrinha (Figura 8A) e safra (Figura 8B) 2012/2013, são apresentados na Figura 8.



**Figura 8.** Peso de 1.000 grãos (g) da produção das plantas de milho dos genótipos BRS1030 e BRS1060 sem inoculação ou com inoculação da estirpe ZAE94 cultivadas safrinha (A) e safra (B) de 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t.

Observa-se que para o período da safrinha tanto o híbrido BRS 1030 com o BRS 1060 não apresentaram diferença significativa entre o tratamento inoculado e o não inoculado. No período da safra, o híbrido BRS 1030 também não apresentou resposta significativa frente à inoculação. Porém, o híbrido BRS 1060 apresentou resposta significativa positiva, onde o tratamento inoculado apresentou o peso médio de 1.000 grãos de 285 g, enquanto que o não inoculado apresentou peso médio de 275 g, esse aumento representa um incremento de 3,5% na massa dos grãos. NOVAKOWISKI et al. (2011) avaliando o efeito da inoculação de *Azospirillum* em milho, também observaram que ao realizar a inoculação o tratamento inoculado apresentou peso de 1.000 grãos superior aos tratamentos não inoculados. COELHO (2001), também trabalhando com cultura do trigo observou que a inoculação com *Azospirillum sp.* promoveu um aumento significativo no do peso de 1.000 grãos.

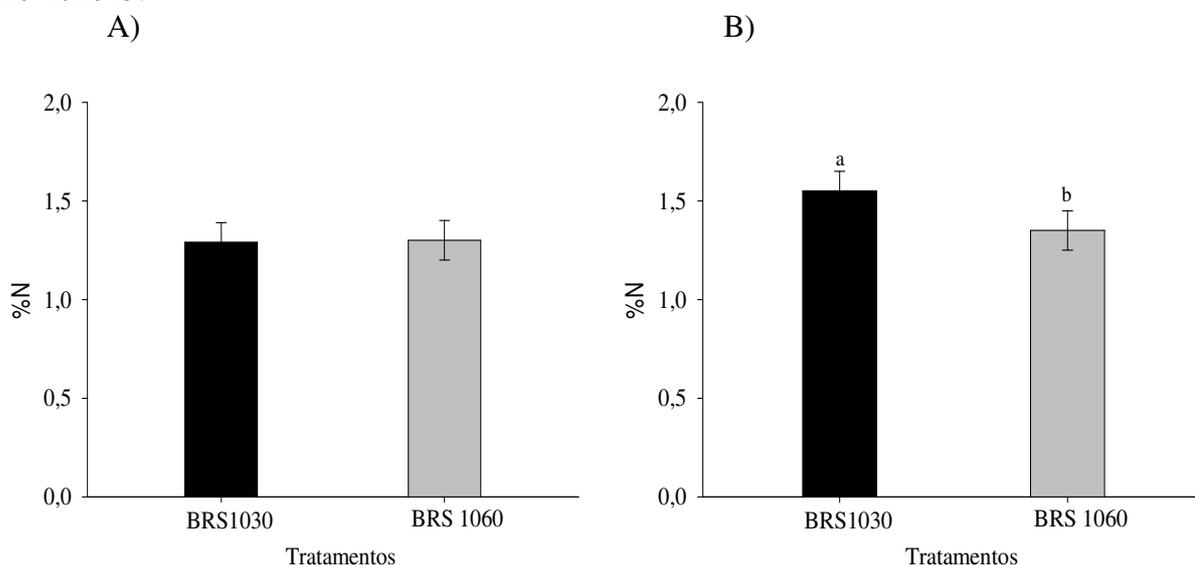
No período da safrinha, foi identificado efeito significativo, pelo teste de média t a 10% de probabilidade, na interação entre genótipo, adubação e inoculação (Figura 9) . O híbrido BRS 1060 apresentou uma interação positiva significativa, quando se tem a condição de maior dose de nitrogênio (100 kg ha<sup>-1</sup>) associado à inoculação. Entretanto, ao analisar os tratamentos controle (com e sem inoculação) do BRS 1060, observa-se que a inoculação promoveu um efeito negativo, causando redução no peso de 1000 grãos. DOBBELAERE et al., (2003) obtiveram respostas positivas de inoculação com *Azospirillum* sob altos níveis nutricionais de N, indicando que as respostas das plantas não são decorrentes apenas da fixação biológica de N na rizosfera, mas que outros mecanismos estão envolvidos. OKON & LABANDERA-GONZALEZ, (1994), em seus estudos, evidenciaram que este incremento pode estar associado ao efeito que as bactérias promovem no crescimento radicular das plantas, ocasionado pela indução de substâncias promotoras de crescimento como auxina e citocinina. SALA et al. (2007) trabalhando com a cultura do trigo notaram incrementos 5,93% na massa de 1.000 grãos, devido à presença da inoculação associada à adubação nitrogenada.



**Figura 9.** Peso de 1000 grãos das plantas de milho dos híbridos BRS1030 e BRS1060 cultivados na safrinha de 2012 nos tratamentos inoculados e não inoculados com diferentes níveis de nitrogênio (0, 50 e 100 kg de N ha<sup>-1</sup>). Valores médios de quatro repetições. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t.

### 4.3 Teor e Acúmulo de Nitrogênio nos Grãos de Milho Cultivados na Safrinha e Safra do Ano Agrícola 2012/2013

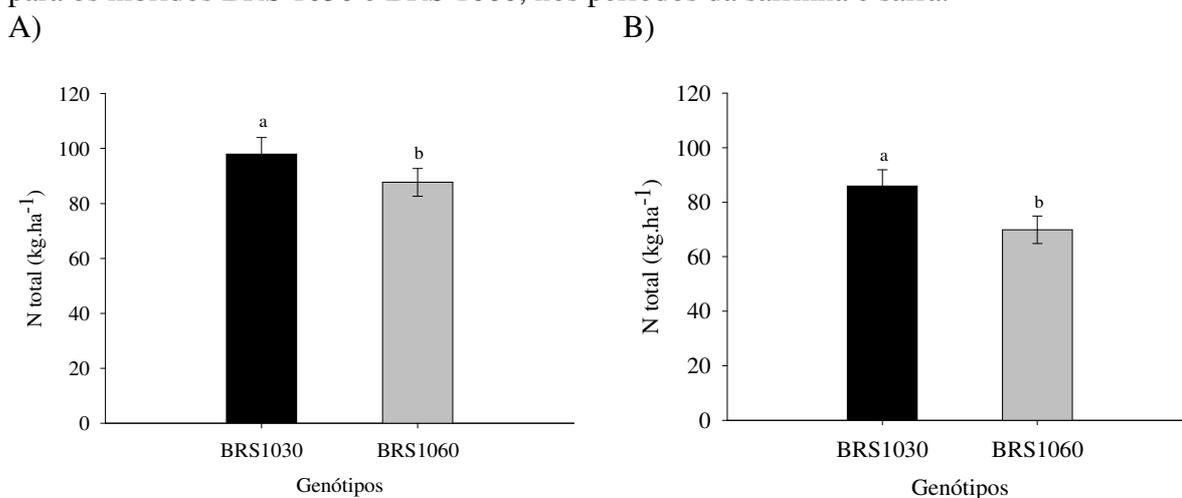
Na Figura 10, observa-se a comparação das médias gerais de % N nos grãos de milho dos híbridos BRS1030 e BRS 1060, para o período da safrinha e safra do ano agrícola 2012/2013.



**Figura 10.** Comparação das médias geral de %N dos híbridos BRS1030 e BRS1060, referente à safrinha (A) e safrinha (B) 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10% de probabilidade pelo teste t.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que no período da safrinha não houve diferença significativa ( $p=0,10$ ) quando se compara a % N nos grãos milho entre os híbridos. No entanto, no período da safrinha, pode-se observar que o híbrido BRS 1030 apresentou aumento significativo na % N quando comparado ao BRS 1060, estes apresentaram, respectivamente, 1,55 e 1,35 % de N nos grãos.

A Figura 11 apresenta a comparação de médias de N acumulado nos grãos de milho, para os híbridos BRS 1030 e BRS 1060, nos períodos da safrinha e safrinha.

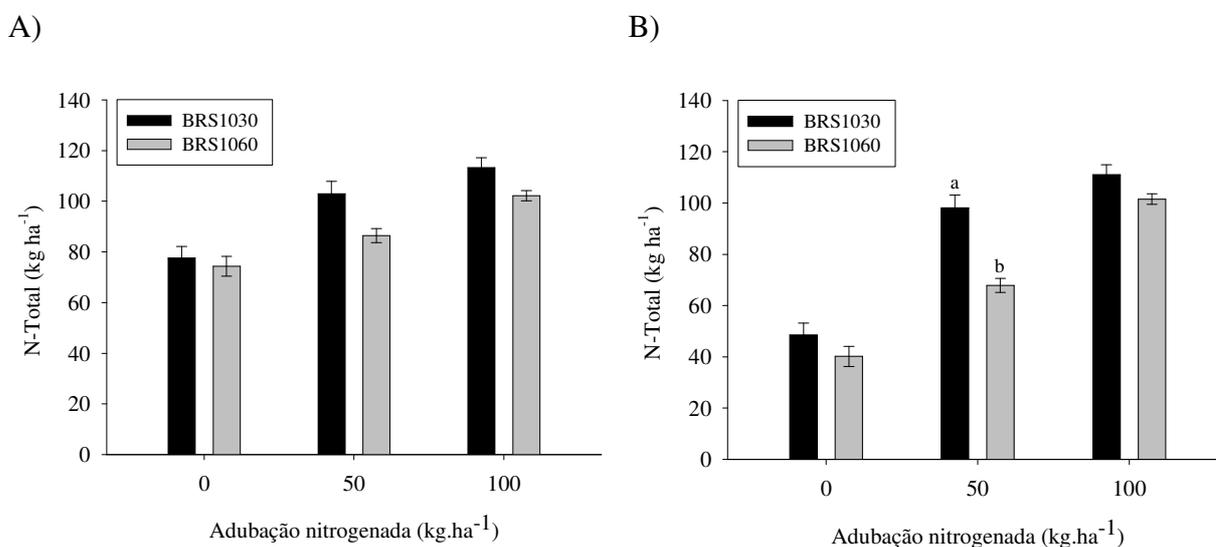


**Figura 11.** Comparação das médias de N-total acumulado (kg ha<sup>-1</sup>) dos híbridos BRS1030 e BRS1060, independente do tratamento utilizado, referente à safrinha (A) e safrinha (B) 2012/2013.

No que diz respeito ao nitrogênio total acumulado nos grãos de milho (Figura 11), este acompanhou o rendimento de grãos, sendo o híbrido BRS 1030 superior em acumular nitrogênio quando comparado ao híbrido BRS 1060, em ambos os períodos de cultivo. ALVES (2011) também evidenciou resposta superior do híbrido BRS 1030 em acumular nitrogênio quando o comparou com a variedade BR106.

No período safrinha, pode-se evidenciar a importância da determinação do N-total acumulado, uma vez que, apenas com os dados de concentração de nitrogênio não foi possível identificar a diferença entre os híbridos, devido ao efeito de diluição das concentrações pela maior produção. Entretanto, ao analisar a quantidade total de N acumulado na massa total de grãos essa diferença torna-se nítida, promovendo aumento de aproximadamente 16 kg N ha<sup>-1</sup>.

Na Figura 12 são apresentados os resultados da interação genótipo x adubação, para acúmulo de nitrogênio nos grãos de milho em ambos os períodos de cultivo para o ano agrícola 2012/2013.



**Figura 12.** Média de acúmulo de nitrogênio nos grãos (kg ha<sup>-1</sup>) entre as plantas de milho dos genótipos BRS1030 e BRS1060 sem adubação nitrogenada ou com 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup> de N cultivadas na safrinha (A) e safra (B) de 2012/2013. Letras distintas comparam as médias a 10 % de probabilidade pelo teste t.

No período da safrinha não foi observado significância no acúmulo de nitrogênio nos grãos, em função da interação genótipo x adubação. Porém, no período da safra pode-se observar que para a dose de 50 kg de N ha<sup>-1</sup>, a interação foi significativa ( $p=0,10$ ), quando se compara os híbridos. Onde a superioridade do híbrido BRS 1030 foi de 31 kg de N ha<sup>-1</sup> quando comparado ao outro híbrido.

#### 4.4 Eficiência no Uso do N-Fertilizante

De acordo com a Tabela 2, observa-se que o híbrido BRS1030 apresentou média geral de EUFN superior ao BRS1060. Este comportamento também foi evidenciado, ao desdobrar a interação genótipo x adubação, onde na dose de 50 kg ha<sup>-1</sup>, o genótipo BRS1030 apresentou cerca de 6% de EUFN a mais que o BRS 1060. Confirmando assim, o melhor desempenho no rendimento médio de grãos, que está associado a um metabolismo mais eficiente na assimilação e conversão em grãos do nutriente absorvido.

**Tabela 2.** Valores de eficiência de utilização do fertilizante nitrogenado (EUFN) nos grãos de milho (%), em função dos genótipos, níveis de adubação e inoculação, na safra 2012/2013.

Genótipos	50 kg ha <sup>-1</sup>			100 kg ha <sup>-1</sup>			Média geral
	Não inoculado	Inoculado	Média	Não inoculado	Inoculado	Média	
BRS1030	35,02	35,67	<b>35,35 A</b>	35,34	32,13	<b>33,74A</b>	<b>34,54 A</b>
BRS1060	29,75	28,41	<b>29,08 B</b>	37,18	30,46	<b>33,82 A</b>	<b>31,45 B</b>
Média geral	32,39	32,04	32,22	36,26	31,30	33,78	33,00

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si nas colunas pelo teste t a 10% de probabilidade.

Diversos estudos realizados com milho mostraram grande variação na determinação da EUFN sendo que essa variação segundo TORBERT et al. (1992), ocorrem principalmente, em função do tipo de solo, condições climáticas, qualidade e tipo do fertilizante. Todavia GAVA et al. (2010) estudando a eficiência de utilização do nitrogênio fertilizante pelos grãos de milho quando submetidos a diferentes níveis de adubação nitrogenada, obtiveram resultados aproximados aos encontrados no presente estudo, onde nas doses de 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup>, os valores de EUFN foram de 30% e 33%, respectivamente. No entanto, com o aumento do nitrogênio aplicado (doses de 150 e 200 kg N ha<sup>-1</sup>) os autores observaram que a eficiência foi reduzida, provavelmente, por existir uma maior quantidade de N prontamente disponível para planta, com isso podendo ocorrer perdas pelos processos de volatilização, lixiviação, desnitrificação, resultando em uma menor EUFN.

#### 4.5 Efeito da Inoculação na Absorção e Acumulo de Fósforo e Potássio.

Como podemos observar, na Tabela 3 são descritos os resultados de extração de fósforo no grão para o período da safra. Apesar de todos os tratamentos terem recebido a mesma dose de adubo fosfatado (80 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ ha<sup>-1</sup>), quando se analisa a extração do fósforo associada a diferentes doses de nitrogênio, nota-se que quanto mais nitrogênio a planta recebeu, mais fósforo ela foi capaz de acumular nos grãos. Resultados semelhantes foram encontrados por MORAIS (2012), onde ela observou que o teor de fósforo nas plantas de milho aumentou em função do fornecimento de N via adubação. Esse resultado sugere que a maior ou menor disponibilidade de N pode exercer efeito na assimilação de fósforo. Essa interação entre esses dois nutrientes, também já foi descrita por outros autores na cultura do milho (MACHADO et al., 2004; BULL 1993; REIS JÚNIOR et al., 2008)

**Tabela 3.** Valores de fósforo total extraído pelos grãos de milho (kg ha<sup>-1</sup>), em função dos genótipos, níveis de adubação de nitrogênio e inoculação, na safra 2012/2013.

N	1030		1060		Média Geral
	NI	I	NI	I	
0	22,47	22,84	18,65	17,98	<b>20,48</b>
50	40,34	40,79	29,24	23,63	<b>33,50</b>
100	39,58	36,04	<b>34,38 b</b>	<b>42,21 a</b>	<b>38,05</b>
Média	34,13	33,21	27,42	27,94	
Média Geral	<b>33,67 A</b>		<b>27,68 B</b>		

Médias seguidas de letras minúsculas e maiúsculas diferem entre si nas colunas teste t a 10% de probabilidade.

Como já observado para produtividade, nitrogênio extraído no grão e peso de 1000 grãos, para absorção de fósforo (Tabela 3) também foi observada diferença significativa entre

os híbridos, sendo o BRS 1030 o mais eficiente. Como já dito anteriormente, isso se deve a maior adaptação do híbrido a condição climática da região.

Ainda observando a Tabela 3, nota-se que ocorreu interação significativa entre a inoculação, genótipo e adubação. No híbrido BRS 1060, quando foi associada inoculação à dose de 100 kg N/ha<sup>-1</sup>, verificou-se efeito positivo sobre a extração de P, apresentando uma extração de 7,83 kg de P/ha<sup>-1</sup> superior a do mesmo tratamento com ausência de inoculação. Outros autores trabalhando com a cultura do trigo, em experimento de campo, também evidenciaram um aumento na absorção de N e P em virtude da associação das plantas com bactérias promotoras de crescimento (GALAL et al. 2000; PANWAR e SINGH, 2000), possivelmente devido ao maior desenvolvimento radicular. KUSS (2006) trabalhando com arroz observou efeito considerável sobre o sistema radicular, onde há um desenvolvimento e aumento de raízes adventícias e pêlos absorventes, que são muito importantes para a absorção de fósforo.

Na Tabela 4, são apresentados os resultados de potássio extraído no grão. Verifica-se que com o aumento da dose de nitrogênio aplicado, independente do genótipo estudado, houve um aumento do acúmulo de potássio no grão. O híbrido BRS 1030 foi mais eficiente na absorção de potássio, assim como observado para as outras variáveis analisadas.

Como observado para P, também houve interação significativa entre inoculação, genótipo e adubação para K, onde o híbrido BRS 1060 quando inoculado e adubado com a dose de 100 kg de N ha<sup>-1</sup> apresentou uma maior extração (14,67 kg K ha<sup>-1</sup>) quando comparado ao tratamento com ausência de inoculação. Isso pode ter ocorrido devido à promoção de crescimento que a inoculação pode proporcionar, como já descrito para fósforo.

**Tabela 4.** Valores de potássio total extraído pelos grãos de milho (kg/há<sup>-1</sup>), em função dos genótipos, níveis de adubação de nitrogênio e inoculação, na safra 2012/2013.

N	1030		1060		Média Geral
	NI	I	NI	I	
0	31,99	36,97	26,41	25,13	<b>30,02</b>
50	67,73	62,12	45,43	37,18	<b>53,13</b>
100	65,84	59,75	<b>51,35 b</b>	<b>66,02a</b>	<b>60,73</b>
Média	55,17	52,83	41,06	42,78	
<b>Média Geral</b>	<b>54,00 A</b>		<b>41,92B</b>		

Médias seguidas de letras maiúsculas e minúsculas diferem entre si nas colunas pelo teste t a 10% de probabilidade.

Na Tabela 5 pode-se verificar os valores de potássio extraído no grão referente à época da safrinha, como podemos observar, não houve aumento da absorção de potássio com o aumento das doses de nitrogênio como ocorrido no período da safra. Já com relação a diferença de híbridos o BRS 1030 foi superior ao BRS 1060 como já encontrado para as outras variáveis estudadas.

**Tabela 5.** Valores de potássio total extraído pelos grãos de milho ( $\text{kg/há}^{-1}$ ), em função dos genótipos, níveis de adubação de nitrogênio e inoculação, na safrinha 2012/2013.

N	1030		1060		Média Geral
	NI	I	NI	I	
0	23,39	23,18	<b>24,55 a</b>	<b>19,36 b</b>	22,62
50	23,92	23,76	18,81	19,14	21,41
100	22,14	20,81	19,11	21,56	20,90
Média	23,15	22,58	20,83	20,02	
Média Geral	<b>22,88A</b>		<b>20,42B</b>		

Médias seguidas de letras maiúsculas e minúsculas diferem entre si nas colunas pelo teste t a 10% de probabilidade.

Para o período da safrinha, também se verificou interação entre inoculação, genótipo e adubação, onde o BRS 1060 apresentou diferença significativa entre inoculado e não inoculado apenas no tratamento que não recebeu adubação nitrogenada. Onde, o não inoculado apresentou maior absorção de potássio do que o tratamento que recebeu inoculação, mesmo comportamento foi observado para peso de 1000 grãos para o período da safrinha.

## 5 CONCLUSÕES

No período da safra, foi possível evidenciar, de forma geral, o efeito da inoculação da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* estirpe ZAE94 sobre a produtividade da cultura, onde os maiores rendimentos foram encontrados nos tratamentos inoculados.

Na safrinha, evidenciou-se interação significativa entre genótipo, adubação e inoculação. Onde, o híbrido BRS 1060 apresentou valores mais elevados de peso de 1.000 grãos quando se tem a condição de maior dose de nitrogênio ( $100 \text{ kg ha}^{-1}$ ) associado à inoculação.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

No que diz respeito à fixação biológica de nitrogênio em gramíneas, observa-se uma grande diversidade de bactérias, com diferentes mecanismos de fixação, levando a diferentes respostas, devido à especificidade entre espécie de bactéria e planta, além de serem fortemente afetadas pelo ambiente (disponibilidade de nitrogênio, oxigênio e outros microrganismos). Nesse sentido, é evidente a importância de estudos mais abrangentes que demonstrem a interação planta/microrganismo/ambiente de forma aprofundada, de acordo com o desenvolvimento da cultura.

Portanto, a busca por genótipos de milho que formem associações mais eficientes com bactérias diazotróficas, em condições de campo, é uma estratégia importante.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENTA, G.; SANGOI, L.; SILVA, P. R. F.; RAMPAZZO, C.; GRACIETTI, L. C.; STRIEDER, M. L.; FORSTHOFER, E. L.; SUHRE, E. Potencial de rendimento de grãos de milho em dois ambientes e cinco sistemas de produção. *Scientia Agraria*. v.4, p.27-34, 2003.

ALVES, A. C. Métodos para quantificar a volatilização de N-NH<sub>3</sub> em solo fertilizado com ureia. Pirassununga, Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) 41f, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2006.

ALVES, G. C. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2007.

ALVES, G. C. Estudo da interação da bactéria BR 11417 de *Herbaspirillum seropedicae* com plantas de milho. 52 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2011.

ARAGNO, M.; SCHLEGEL, H. G. Physiological characterization of the hydrogen bacterium *Aquaspirillum autotrophicum*. *Archives of Microbiology*, v.116, p 221-229, 1978.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L. and DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36, 86-93, 1986a.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D; SELDIN, L. AND DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*. 29: 91-92, 1997.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSÉN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. and DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 46, p.802-810. 1996a.

BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, F. L.; DOBEREINER, J. Selection of *Herbaspirillum* spp. associated with rice seedlings amended with 15N-labeled fertilizer. In: BODDEY, R. M.; RESENDE, A. S, editors. *International Symposium on Sustainable agriculture for the Tropic: The Role of Biological Nitrogen Fixation*, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p. 202-203, 1995.

BALDANI, V.L.D., ALVAREZ, M.A., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*, v. 90, 35–46, 1986b.

BASHAN, Y.; de-BASHAN, L. E. Plant Growth-Promoting In: HILLEL, D., In Encyclopedia of soils in the environment. 1.ed, Oxford, v. 1, pp. 103-115, 2005.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 43, p. 103-102, 1997.

BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas no cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. In: Reunião brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas, 23., reunião brasileira sobre micorrizas, 7., simpósio brasileiro de microbiologia do solo, 5., reunião brasileira de biologia do solo, 2., 1998, Caxambu, MG. Resumos... Lavras: UFLA / SBCS / SBM, 1998. p. 809. FERTBIO 1998.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Calculations and assumptions involved in the use of the B-values and <sup>15</sup>N isotope dilutions techniques for the estimation of the contribution of plant-associated biological N<sub>2</sub>-fixation. Plant and soil, v. 145, p. 151-155, 1992.

BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas utilizando o isótopo <sup>15</sup>N. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: Embrapa-CNPAF, p.471-494, 1994.

BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. Fertilizer Research, v.42, p.241-250, 1995.

BRASIL, M. da S. Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz. 137 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitotecnia)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ, 2005.

Bremner J. M. Methods of soil analysis Part 2- Chemical and Microbiological Properties, number 9 in the series Agronomy American Society of Agronomy, Inc., Publisher USA, p. 1149-1178, 1965.

BREMNER, J. M.; MULVANEY, R.L.; Urease activity in soils. In: BURNS, R.G., ed. Soil Enzymes. Academic Press, p. 149-196, 1978.

BULL, L. T. Nutrição mineral do milho. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. (eds.) Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafós, p. 63-145, 1993.

CANTARELLA, H., ANDRADE, C. A., JUNIOR, D. M. 2. Matéria orgânica do solo e disponibilidade de nitrogênio para as plantas. In: SANTOS, G. A., SILVA, L. S., CANTANELLAS, L. P., CAMARGO, F. A. O. (Eds) Fundamentos da Matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais & subtropicais. Rev. e atual. Porto Alegre: Metrópole. 582p, 2008.

CARMO, C. A. F. S.; ARAÚJO, W. S.; BERNARDI, A. C. C.; SALDANHA, M. S. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Embrapa Solos, Circular Técnica n. 6, p.41, 2000.

CARRO, L.; RIVAS, R.; LEÓN-BARRIOS, M.; GONZÁLEZ-TIRANTE, M.; VELÁZQUEZ, E. and VALVERDE, A. *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., isolated from volcanic mountain soil, and emended description of the genus *Herbaspirillum*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology v. 62, p.1300-1306, 2012.

CARVALHO, H. W. L.; Cardoso, M. J.; Leal, M. L. S.; Santos, M. X.; Tabosa, J. T.; Souza, E. M. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho no Nordeste brasileiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 40, p. 471-477, maio 2005.

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

CHALK, P. M. Estimation of N<sub>2</sub> fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving <sup>15</sup>N enrichment and their application. Biology and Fertility of soils, v. 17, p. 389-410, 1985.

CHALK, P. M.; SMITH, C. J. <sup>15</sup>N isotope dilution methodology for evaluating the dynamics of biologically fixed N in legume-non-legume associations. Biology and Fertility of Soils, v. 17, p. 80-84, 1994

Christopher, W. N.; Edgerton, C. W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. Journal of Agricultural Research 41, 259–267, 1930.

CICHORSKI, J. L.; SOUZA, G. J.; MORAIS, L.; SANTOS, R. F.; MOREIRA, G. C. Avaliação da produtividade de híbridos de milho na região de Cascavel – PR. Cultivando o Saber, Cascavel, v.3, n.4, p.116-125, 2010.

COELHO, M. A. O. Atividade da nitrato redutase, composição mineral e caracteres da planta de trigo associados à aplicação de molibdênio, à peletização e à inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*. 148f. Tese (Programa de Pós graduação em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2001.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. de S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3. ed. Viçosa: Editora UFV v. 1, 480 p, 2004.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16 S Ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril.) Applied and Environmental Microbiology, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DA RÓZ, A. L. Prepared biodegradable plastics from starch. San Carlos: Polymers, v.13, p.4, 2003.

DE-POLLI H; ALMEIDA DL. Manual de Adubação para o Rio de Janeiro. Itaguaí: Ed. Universidade Rural, 179p, 1988.

DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasiliense*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.16, p.645-651, 1996.

DING (L.) and YOKOTA (A.): Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.54, p.2223-2230, 2004.

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

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

DOBRITSA, A. P.; REDDY, M. C. S. and SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.60, p.1418-1426, 2010.

DUARTE, J. O. Cultivo do milho: importância econômica. Sete Lagoas: CNPMS - EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002.

EPAMIG.- Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Cultivo do milho no sistema plantio direto. Informe agropecuário, v.27, n.233, Belo Horizonte, MG, jul./ago. 2006.

EUCLYDES, R. F. *Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG*. Central de Processamento de Dados. Viçosa, MG: UFV. 68p. (Manual do usuário), 1983.

EUZÉBY, J. P. M. LPSN- List of prokariotic names with Standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/-allnamesdl.html>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2014.

FAGERIA, N. K. Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas. Brasília, DF:EMBRAPA-DPU. 245 p. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 18), 1989.

FARINELLI, R.; PENARIOL, F. G.; BORDIN, L.; COICEV, L.; DOMINGOS FORNASIERI FILHO, D. Desempenho agrônomo de cultivares de milho nos períodos de safra e safrinha. *Bragantia*, v.62, p.235-241, 2003.

FERNANDES, M.S. & SOUZA, S.R. Absorção de nutrientes. In: ed. Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.115-152, 2006.

FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: international symposium on sustainable agriculture for the tropics – the role of biological nitrogen fixation, Angra dos Reis, RJ. Abstracts... Seropédica: EMBRAPA-CNPAB; UFRRJ, 1995. p. 210, 1995.

FERREIRA, D. F. Sisvar, versão 5.4. DEX/UFLA. Disponível em: <http://www.dex.ufla.br/danielff/sisvar>. 2007.

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*, v. 32, p. 179-185, 2010.

FERREIRA, J. S.; MOREIRA, L. L. Q.; GIORI, F. G.; REIS, V. M. Avaliação de duas variedades de trigo inoculadas com bactérias diazotróficas na ausência ou presença de doses de N-fertilizantes, em condições de casa-de-vegetação. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 61. Empresa de Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Agrobiologia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ISSN 1676-6709, Seropedica-RJ. 2010.

FERREIRA, J. S.; MOREIRA, L. L. Q.; GIORI, F. G.; REIS, V. M. Avaliação de duas variedades de trigo inoculadas com bactérias diazotróficas na ausência ou presença de doses de N-fertilizantes, em condições de casa-de-vegetação. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 61. Empresa de Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Agrobiologia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ISSN 1676-6709, Seropedica-RJ. 2010.

FORNASIERI FILHO, D. Manual da cultura do milho. Jaboticabal: FUNEP, p. 576, 2007.

FRIED, M.; MIDDLEBOE, V. Measurement of amount of nitrogen fixed by legume crop. *Plant and Soil*, v. 47, p. 713-715, 1977.

GALAL, Y. G. M.; EL-GHANDOUR, I. A.; ALY, S. S.; SOLIMAN, S. GADALLA, A. Non-isotopic method for the quantification of biological nitrogen fixation and wheat production under field conditions. *Biology and Fertility of Soils*, v. 32, p.47-51, 2000.

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

GALLAWAY, J. N., ABER, J. D., ERISMAN, J. W., SEITZINGER, S.P., HOWARTH, R. W., COWLING, E. B., COSBY, J. B. The Nitrogen Cascade. *BioScience*. v.53, p. 341-356. 2003.

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 <sup>15</sup>N-uréia. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 31, n. 4, p. 851-862, out./dez, 2010.

GUIMARÃES, P. E. O; PARENTONI, S. N; PACHECO, C. A. P; GUIMARÃES, M. L. J. M; SILVA, A. R; CARDOSO, M. J; ROCHA, L. M. P; COSTA, R. V; OLIVEIRA, J; COTA, L. V; CARVALHO, H. W. L; GODINHO, V. P. C; CECCON, G; MACHADO, A. T; BASTOS, E. A; VILARINHO, A. A; SOUZA, F. R. S; DIAS, W. P; EMGYDIO, B. M; GARCIA, J. C; WRUCK, F; CASELA, C. R. BRS 1060 – Híbrido Simples de Milho. Comunicado Técnico 169. ISSN 1679-0162 Sete Lagoas, MG, Dezembro, 2009.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, p. 393-398, 2007.

GUIOMAR, P. M. C. Avaliação do comportamento de cultivares de milho na presença da helmintosporiose causada por *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônoma). Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2011.

GYANESHWAR, P., JAMES, E. K., REDDY P. M., LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytologist*. v.154, p.131-145, 2002.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F., KLOPPER J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.895-914. 1997.

HE, X. H.; CRITCHLEY, C.; BLEDSOE, C. Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.22, p. 531-567, 2003.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: EMBRAPA-SOJA. 36p. (Documentos n. 325. EMBRAPA-SOJA, ISSN 1516-781X), 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 wheat in Brazil. *Plant and Soil*, v. 331,p. 413-425, 2010.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da produção agrícola, fevereiro, 2012

IM, W. T.; BAE, H. S.; YOKOTA, A. and LEE, S. T. *Herbaspirillum chlorophenicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.851-855, 2004.

JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W. L.; REDDY, P. M.; IANNETTA, P. P. M.; OLIVARES, F. L.; LADHA, J.K. Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promoting Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *The American Phytopathological Society*, v.15, p. 894-906, 2002.

JUNG, S. Y.; LEE, M. H.; OH, T. K. and YOON, J. H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.57, p.2284-2288, 2007.

KIRCHHOF (G.), ECKERT (B.), STOFFELS (M.), BALDANI (J.I.), REIS (V.M.) and HARTMANN (A.):*Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p.157-168, 2001.

KUSS, A. V. Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. Santa Maria, Tese (doutorado em Ciência do Solo) 109f, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2006.

LEDGARD, S. F.; MORTON, R.; FRENEY, J. R.; BERGERSEN, F. J. Assessment of the relative uptake of added and indigenous soil nitrogen by nodulated legumes and reference plants in the  $^{15}\text{N}$  dilution measurement of  $\text{N}_2$  fixation: derivation of the method. *Soil Biology and Biochemistry*, v.17, p. 317-321, 1985.

LEIFSON, E. The bacterial flora of distilled and stored water. III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. *International Bolletín of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*, v.12, p.161–170, 1962.

LUIZ, C. B. F.; MAGRO, S. R. Controle biológico das pragas da espiga, sobre parâmetros qualitativos e quantitativos na cultura do milho de safrinha em Ubitatã/PR. *Campo Mourão*, v. 2, n.1, p. 13-21, 2007.

MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; REIS JR, F. B.; VILELA, A. L. Acumulação de nitrogênio, fósforo e zinco e índices de eficiência de utilização e translocação de nutrientes em milho submetido a dois níveis de adubação nitrogenada. In: *Fertbio*, Lages, 2004.

MARTINS, R. C. R.; BORTOLUCI, J. P.; FLOH, E. I. S.; BARBOSA, H.R. Associações in vitro entre bactérias endofíticas diazotróficas e calos de cana-de-açúcar. In: *Simpósio brasileiro sobre ecofisiologia, maturação e maturadores em cana-de-açúcar*. Botucatu. Anais. Botucatu: UNESP, 2008.

MCAULIFFE, C.; CHAMBLEE, D.S.; URIBE-ARANGO, H.; WOODHUSE JUNIOR, W. W. Influence of organic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by  $^{15}\text{N}$ . *Agronomy Journal*, v. 50, p. 334-337, 1958.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS; L. C. C.; SCHIMIDT, 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 and Soil*, v.356, p. p.175-196, 2012.

MORAIS, T. P. Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense* em híbridos de milho. 71f, Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: UFLA, p. 626, 2002.

MUÑOZ-GARCIA, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; VALDÉS, M. Promoción del crecimiento del maíz por cepas productoras de siderófos de *Azospirillum* y *Pseudomonas* fluorescentes. In: *Congreso Nacional de La Fijacion Biologica Del Nitrogeno Y I Encuentro Iberoamericano De Investigacion Sobre Fijacion De Nitrogeno*, 3. Cuernavaca. Anais... Cuernavaca, México, p.61. 1991.

NETO, C.R.B. Efeito do nitrogênio e da inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense* no rendimento de grãos de milho. Trabalho de Conclusão de Curso UEPG. Ponta Grossa. p. 27, 2008.

NORMAN, M. J. T.; PEARSON, C. J.; SEARLE, P. G. E. *The ecology of tropical food crops*. 2. ed. Melbourne: Cambridge University Press, 430 p, 1995.

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A. M.; NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1687-1698, 2011.

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

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. Applied and Environmental Microbiology, New York, v.63, n.7, p.366-370, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. Plant and Soil, v. 284, p.23-32, 2006.

OLIVEIRA, C. A. Estimativa de Fixação Biológica de Nitrogênio em cana-de-açúcar por delta 15N. 80f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Gestão de Recursos Agroambientais ) – Instituto de Agrônomo, Curso de Pós-Graduação em agricultura tropical e subtropical. Campinas, SP, 2012.

PANWAR, J. D. S.; SINGH, O. Response of *Azospirillum* and *Bacillus* on growth and yield of wheat under field conditions. Indian Journal of Plant Physiology. New DELHI, V. 5, P. 108-110, 2000.

PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E. G.; SANTOS, M. X.; PACHECO, C. A. P.; GUIMARÃES, P. E. O.; MEIRELLES, W. F.; RIBEIRO, P. H. E.; CORREA, L. A.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; ALVES, V. M. C.; FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA, F. T. F. Milho Híbrido Simples BRS 1030. Comunicado técnico 108. ISSN 0101-5605. Sete Lagoas, MG. Dezembro, 2004.

PEDRINHO, E. A. N. Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.). 87f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal, SP. 2009.

PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE, D. F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated in the field. Canberra: ACIAR, p. 76 (ACIAR Monograph, 11), 1989.

QUESADA, D. M. Parâmetros quantitativos e qualitativos das biomassa genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com potencial para uso energético, na forma de carvão vegetal. 2005. P. 65, Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

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. Revista Brasileira de Ciência do solo, v.32, p. 1139-1146, 2008.

REIS, J. R., F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBERREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 35, p. 985-994, maio 2000a.

- REIS, V.M., BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., DOBBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.19, p.227-247. 2000b.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J. R. V. A.; VICTOT, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. Citri Tipo B. *Summa Phytopathologica*, v. 12, p. 16, 1986.
- RODRIGUES, L. da S. Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado. 94 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ, 2004.
- ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. O.; SELBACH, P.A.; SÁ, E. S.; Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. *Ciências Rurais*, Santa Maria-RS, v. 35, p. 1201-1204, 2005.
- 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
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S. and HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.56, p.1341-1348, 2006.
- SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em 83 condições de campo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.6, p.833-842, 2007.
- SALOMONE, G.; DÖBEREINER, J. Maize genotypes effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and Fertility of Soils*, v.21, p.193-196, 1996.
- SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. de; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. de. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 353 p. 2013.
- SCHELSINGER, W. H. Biogeochemistry: an analysis of global changr. San Diego: Academic Press, p. 443, 1991.
- SCHILOTTER, M.; BODE, W.; HARTMANN, A.; BEESE, F. Sensitive chemoluminescence-based immunological quantification of bacteria in soil extracts with monoclonal antibodies. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 24, p. 399-403, 1992.
- SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. *Biometrics*, Washington D.C., v.30, p.507-512, 1974.
- SMITH J.L. & MYUNG H. Rapid procedures for preparing soil and KCl extracts for 15N analysis. *Communication In Soil Science And Plant Analysis*, v. 21, p. 2173-2180, 1990.

SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. Adubação com nitrogênio. In: SOUSA, D. M. S.; LOBATO, E. (Ed.). Cerrado: Correção do solo e adubação. 2.ed. Brasília: EMBRAPA. p.129-144, 2004.

STRLIOTTO, R. Protocolo operacional para a prepare da turfa para produção de inoculante rizobiano. Embrapa Agrobiologia, Seropedicac-RJ, 4p, 2000.

SUBEDI, K. D.; MA, B. L. Assessment of some major yield-limiting factors on maize production in a humid enviroment. *Field Crops Research*, v.110, p. 21-26, 2009.

SUMNER, M.E. Crop responses to Azospirillum inoculation. *Advances in Soil Sciences*, v.12, p.54-123, 1990.

TOLLENAAR, M.; DWYER, L. M. Physiology of maize. In: SMITH, D. L.; HAMEL, C.(Ed.). *Crop yield, physiology and processes*. Berlin: Springer-Verlag, cap. 5. p.169-201, 1999.

TORBERT, H. A.; MULVANEY, R. M.; HEUVEL, V.; HOEFT, R. G. Soil type and moisture regime effects on fertilizer efficiency calculation methods in a N-15 tracer study. *Agronomy Journal*, v. 84, p. 66-70, 1992.

TRIVELIN, P. C. O. Isótopos Estáveis. Espectrometria de Massas para Determinação de Razão Isotópica de Elementos de Baixo Número Atômico (IRMS). A Técnica de Traçador e a Diluição Isotópica. In. CENA-USP, Piracicaba, 2005.

VALOIS, A. C. C. Eficiência comparativa de quatro métodos de seleção em uma população melhorada de milho (*Zea mays* L.). 78 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1992.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A. and IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, 53, 1979-1983.

YAGUSHI, J. T. Milho - Análise da Conjuntura Agropecuária. SEAB/DERAL (Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná/ Departamento de economia rural). outubro de 2012. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/milho\\_12\\_13.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/milho_12_13.pdf) acessado em janeiro de 2014.

## 8 ANEXOS

### 8.1 Tabelas de Análise de Variância Safrinha

**Tabela 6.** Análise de variância produtividade de grãos na safrinha.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	5	8030386,961861	1606077,392372	3,673	<b>0,0061</b>
Inoc	1	101718,540800	101718,540800	0,233	0,6315
Genot	1	9022992,721606	9022992,721606	20,636	<b>0,000</b>
Adub	2	3855669,707003	1927834,853501	4,409	<b>0,0167</b>
Inoc*Genot	1	3953,679606	3953,679606	0,009	0,9246
Inoc*Adub	2	1477013,785725	738506,892862	1,689	0,1941
Genot*Adub	2	520987,215019	260493,607510	0,596	0,5547
Inoc*Genot*Adub	2	986109,338886	493054,669443	1,128	0,3312
Erro	55	24048096,756872	437238,122852		
Total corrigido	71	48046928.707378			
CV(%)	9,29				
Média geral	7115,5805556	Número de Observações		72	

**Tabela 7.** Análise de variância produtividade dos grãos na safra.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	3375652,088873	843913,022218	1,702	0,1655
Inoc	1	1544443,572042	1544443,572042	3,116	<b>0,0875</b>
Genot	1	2534928,932402	2534928,932402	5,114	<b>0,0287</b>
Adub	2	122160248,053603	61080124,026802	123,220	<b>0,0000</b>
Inoc*Genot	1	100346,515215	100346,515215	0,202	0,6550
Inoc*Adub	2	360287,937223	180143,968612	0,363	0,6974
Genot*Adub	2	2473159,856303	1236579,928152	2,495	<b>0,0941</b>
Inoc*Genot*Adub	2	1359074,626510	679537,313255	1,371	0,2645
Erro	44	21810825,776327	495700,585826		
Total corrigido	59	155718967,358498			
CV(%)	13,38				
Média geral	5261,73316	Número de Observações		60	

**Tabela 8.** Análise de variância do peso de 1.000 grãos na safrinha.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	5	7959,896494	1591,979299	5,732	<b>0,0003</b>
Inoc	1	175,281606	175,281606	0,631	0,4304
Genot	1	149087,121422	149087,121422	536,811	<b>0,000</b>
Adub	2	1306,716669	653,358335	2,353	<b>0,1046</b>
Inoc*Genot	1	228,053606	228,053606	0,821	0,3688
Inoc*Adub	2	882,967803	441,483901	1,590	0,2132
Genot*Adub	2	1501,813186	750,906593	2,704	<b>0,0759</b>
Inoc*Genot*Adub	2	2230,116586	1115,058293	4,015	<b>0,0236</b>
Erro	55	15274,999139	277,727257		
Total corrigido	71	48046928,707378			
CV(%)	5,13				
Média geral	324,6711111		Número de Observações	72	

**Tabela 9.** Análise de variância do peso de 1.000 grãos na safra.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	506,691833	126,672958	0,885	0,4809
Inoc	1	177,676042	177,676042	1,241	0,2713
Genot	1	7766,850375	7766,850375	54,357	<b>0,0000</b>
Adub	2	10925,013583	5462,506792	38,160	<b>0,0000</b>
Inoc*Genot	1	628,884375	628,884375	4,393	<b>0,0419</b>
Inoc*Adub	2	211,360583	105,680292	0,738	0,4838
Genot*Adub	2	600,612250	300,306125	2,098	0,1348
Inoc*Genot*Adub	2	402,869250	201,434625	1,407	0,2556
Erro	44	6298,534167	143,148504		
Total corrigido	59	27518,492458			
CV(%)	4,09				
Média geral	292,325833		Número de Observações	60	

**Tabela 10.** Análise de variância da %N nos grãos na safrinha.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	5	0,160361	0,032072	2,015	<b>0,0908</b>
Inoc	1	0,022050	0,22050	1,385	0,2443
Genot	1	0,001422	0,001422	0,089	0,7661
Adub	2	1,448844	0,724422	45,505	<b>0,000</b>
Inoc*Genot	1	0,026450	0,026450	1,661	0,2028
Inoc*Adub	2	0,003033	0,001517	0,095	0,9093
Genot*Adub	2	0,027411	0,013706	0,861	0,4284
Inoc*Genot*Adub	2	0,013300	0,006650	0,418	0,6606
Erro	55	0,875572	0,015919		
Total corrigido	71	2,578444			
CV(%)	9,72				
Média geral	1,2977778		Número de Observações	72	

**Tabela 11.** Análise de variância da %N nos grãos na safra.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	0,114610	0,028653	0,927	0,4570
Inoc	1	0,000807	0,000807	0,026	0,8724
Genot	1	0,556807	0,0556807	18,013	<b>0,0001</b>
Adub	2	1,040303	0,520153	16,827	<b>0,0000</b>
Inoc*Genot	1	0,000027	0,000027	0,001	0,9767
Inoc*Adub	2	0,030463	0,015232	0,493	0,6143
Genot*Adub	2	0,082303	0,041152	1,331	0,2746
Inoc*Genot*Adub	2	0,028463	0,014232	0,460	0,6340
Erro	44	1,360110	0,030912		
Total corrigido	59	3,213893			
CV(%)	12,08				
Média geral	1,4553333		Número de Observações	60	

**Tabela 12.** Análise de variância do total N acumulado nos grãos na safrinha.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	5	3824,435044	764,887009	5,111	<b>0,0006</b>
Inoc	1	67,125422	67,125422	0,449	0,5058
Genot	1	1906,531250	1906,531250	12,741	<b>0,0008</b>
Adub	2	12245,060536	6122,530268	40,915	<b>0,0000</b>
Inoc*Genot	1	119,918422	119,918422	0,801	0,3746
Inoc*Adub	2	283,067436	141,533718	0,946	0,3946
Genot*Adub	2	533,991358	266,995679	1,784	0,1775
Inoc*Genot*Adub	2	415,332836	207,666418	1,388	0,2582
Erro	55	8230,245689	149,640831		
Total corrigido	71	27625,707994			
CV(%)	13,18				
Média geral	92,8147222		Número de Observações	72	

**Tabela 13.** Análise de variância do total N acumulado nos grãos na safra.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	514,331083	128,582771	0,693	0,6011
Inoc	1	275,847042	275,847042	1,486	0,2294
Genot	1	3877,048935	3877,048935	20,881	<b>0,0000</b>
Adub	2	39053,197963	19526,598982	105,167	<b>0,0000</b>
Inoc*Genot	1	22,094802	22,094802	0,119	0,7318
Inoc*Adub	2	240,606863	120,303432	0,648	0,5280
Genot*Adub	2	1502,082190	751,041095	4,045	<b>0,0244</b>
Inoc*Genot*Adub	2	492,944743	246,472372	1,327	0,2756
Erro	44	8169,569637	185,672037		
Total corrigido	59	54147,723258			
CV(%)	17,49				
Média geral	77,8941667		Número de Observações	60	

**Tabela 14.** Análise de variância da eficiência do uso do fertilizante nitrogenado nos grãos na safra.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	5	236,539635	47,307927	1,158	0,3492
Inoc	1	114,546302	114,546302	2,803	<b>0,1030</b>
Genot	1	29,343769	29,343769	0,718	0,4025
Adub	1	84,561752	84,561752	2,070	0,1591
Inoc*Genot	1	120,935752	120,935752	2,960	<b>0,0942</b>
Inoc*Adub	1	22,756302	22,756302	0,557	0,4605
Genot*Adub	1	64,056302	64,056302	1,568	0,2188
Inoc*Genot*Adub	1	1,774852	1,774852	0,043	0,8361
Erro	35	1430,045281	40,858437		
Total corrigido	47	2104,559948			
CV(%)	19,37				
Média geral	32,9972917		Número de Observações	60	

**Tabela 15.** Análise de variância do fósforo total acumulado no grão safra.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	521,282960	130,320740	3,288	<b>0,0192</b>
Inoc	1	0,576240	0,576240	0,015	0,9046
Genot	1	538,201500	538,201500	13,577	<b>0,0006</b>
Adub	2	3327,126703	1663,563352	41,967	<b>0,0000</b>
Inoc*Genot	1	7,718507	7,718407	0,195	0,6612
Inoc*Adub	2	55,779430	27,889715	0,704	0,5003
Genot*Adub	2	554,298970	277,149485	6,992	<b>0,023</b>
Inoc*Genot*Adub	2	200,946243	100,473122	2,535	<b>0,0908</b>
Erro	44	1744,133440	39,639396		
Total corrigido	59	6950,063993			
CV(%)	20,52				
Média geral	30,6803333		Número de Observações	60	

**Tabela 16.** Análise de variância do potássio total acumulado no grão safra.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	2684,358743	671,089686	6,163	<b>0,0005</b>
Inoc	1	1,513682	1,513682	0,014	0,9067
Genot	1	2189,016802	2189,016802	20,102	<b>0,0001</b>
Adub	2	10229,363130	5114,681565	46,968	<b>0,0000</b>
Inoc*Genot	1	61,752615	61,752615	0,567	0,4554
Inoc*Adub	2	343,788363	171,894182	1,578	0,2177
Genot*Adub	2	1051,234303	525,617152	4,827	<b>0,0127</b>
Inoc*Genot*Adub	2	526,885830	263,442915	2,419	<b>0,1007</b>
Erro	44	4791,504817	108,897837		
Total corrigido	59	21879,504817			
CV(%)	19,37				
Média geral	32,9972917		Número de Observações	60	

**Tabela 17.** Análise de variância do potássio total Acumulado no grão safrinha.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	15,851773	3,962943	0,580	0,6787
Inoc	1	7,038375	7,038375	1,030	0,3157
Genot	1	89,768202	89,768202	13,139	<b>0,0007</b>
Adub	2	31,029343	15,514672	2,271	0,1152
Inoc*Genot	1	0,196082	0,196082	0,029	0,8663
Inoc*Adub	2	30,922770	15,461385	2,263	0,1160
Genot*Adub	2	44,067243	22,033622	3,225	<b>0,0493</b>
Inoc*Genot*Adub	2	48,978443	24,489222	3,584	<b>0,0261</b>
Erro	44	171,621667	6,832311		
Total corrigido	59	568,473898			
CV(%)	12,08				
Média geral	21,6468333		Número de Observações	60	