
INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* ASSOCIADA À ADUBAÇÃO NITROGENADA REDUZIDA EM HÍBRIDOS DE MILHO

LIBÓRIO, Paloma Helena da Silva¹
BÁRBARO-TORNELI, Ivana Marino
NÓBILE, Fábio Olivieri de
ANUNCIACÃO, Maria Gabriela
MIGUEL, Fernando Bergantini
SILVA, José Antonio Alberto da

Recebido em: 2016.09.14

Aprovado em: 2016.10.05

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.1559

RESUMO: Objetivou-se avaliar o comportamento de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*, estirpes: AbV5 e AbV6, em dose reduzida de N. Dois experimentos em diferentes anos agrícolas foram conduzidos em delineamento experimental de blocos ao acaso, sendo o primeiro em 2007/08: com quatro repetições composto por um híbrido nos seguintes tratamentos: Testemunha sem N e sem *Azospirillum* (*FAzos*); N recomendado para a cultura (dose usual); ½ da dose de N usual; ½ da dose de N usual + *FAzos* turfoso e ½ da dose de N usual + *FAzos* líquido. O segundo conduzido na safra 2012/13, foi em arranjo fatorial 2 x 5, com oito repetições, composto por dois híbridos testados nos tratamentos já supracitados com alteração apenas da inoculação com *Azospirillum* nas formulações (*FAzos*) de veículo turfoso e líquido que tramitou da fase de testes para formulação comercial veículo: líquido. Avaliou-se parâmetros agronômicos no início do florescimento e na colheita. De modo geral, a associação de ½ de dose de N usual e *FAzos* foi equivalente ao tratamento que recebeu o total da dose de nitrogênio recomendada quanto aos parâmetros avaliados no híbrido DKB 390. Houve superioridade do híbrido DKB 390 VT PRO 2 TM em relação ao BM 502, fato atribuído como próprio do genótipo e não da interação com as estirpes da bactéria. Concluiu-se que a prática de inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*: estirpes AbV5 e AbV6, pode ocorrer de forma associada a adubação nitrogenada reduzida pela metade, parcelada na semeadura e cobertura.

Palavras chave: Bactéria diazotrófica. Genótipos. Nitrogênio. Interação. *Zea mays* L.

INOCULATION WITH *Azospirillum brasilense* ASSOCIATED WITH REDUCED NITROGEN FERTILIZATION IN MAIZE HYBRIDS

SUMMARY: This study aimed to evaluate the behavior of maize hybrids inoculated with *Azospirillum brasilense*, strains: AbV5 and AbV6 in reduced dose of N. Two experiments in different growing seasons were conducted in experimental design was a randomized complete block, with the first in 2007/08: with four replications composed of a hybrid evaluated in the following treatments: Control without N and without inoculation (*FAzos*), N recommended for culture (usual dose); ½ of the usual dose of N; ½ of the usual dose of N + *FAzos* (peat) and ½ of the usual dose of N + *FAzos* (liquid). The second in 2012/13 was with eight replications and treatment arranged in a 2 X 5 factorial, consisting of two maize hybrids tested in treatments already above with changing only the *FAzos* formulation liquid and peat carrier that has handled the testing phase for the commercial liquid inoculant. They evaluated parameters at flowering and harvesting. Overall, the combination of ½ of the usual dose of N and *FAzos* was equivalent to the treatment they received the total recommended nitrogen rate for the parameters evaluated in DKB 390. There was superiority of hybrid DKB VT PRO 390 2 TM relative to BM 502, being assigned the same as its own genotype and not the interaction of strains of the *bacteria*. It was concluded that the practice of the seed inoculation with *Azospirillum brasilense*: strains AbV5 and AbV6, may occur in association with nitrogen fertilization halved, split at sowing and coverage.

Keywords: Diazotrophic bacteria. Genotypes. Interaction. Nitrogen. *Zea mays* L.

¹ Estudante Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos - UNIFEB

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais cultivados em todo território mundial, sendo que fatores como a fertilidade do solo e o nível tecnológico adotado no uso de insumos afetam diretamente a produção, sendo a produtividade da cultura garantida pela utilização de elevadas quantidades de adubos nitrogenados (MAJEROWICZ et al., 2002; DARTORA et al., 2013; JORDÃO; MUNIZ, 2014).

O fornecimento do N via fertilizantes químicos é um dos, senão o principal, fator responsável pelo alto custo de produção da cultura, pois a conversão industrial, por meio da quebra da molécula de N₂ para a obtenção dos adubos nitrogenados é um processo dispendioso, aumentando o custo e limitando a produção (PEREIRA, 2014).

Uma das alternativas para assegurar elevadas produtividades com redução no consumo de fertilizantes nitrogenados consiste na inoculação com bactérias diazotróficas, que possuem a capacidade de fixação de N atmosférico no solo, deixando-o disponível às plantas (HUNGRIA, 2011). Nessa associação não simbiótica ocorre a colonização da rizosfera pelas bactérias e não há penetração delas nos tecidos radiculares nem formação de nódulos como na soja. Além disso, essas bactérias estimulam a produção de hormônios nas plantas, como a auxina, que promove o crescimento de raízes, refletindo-se em maior capacidade de uso de água e nutrientes, sobretudo em situações de seca ou salinidade (TIEN et al., 1979).

Diversos estudos foram conduzidos principalmente com a Embrapa-Soja utilizando inoculantes com formulação líquida ou sólida (turfa) à base de *Azospirillum* que culminaram na seleção de estirpes com características importantes como maior sobrevivência no solo, maior promoção de crescimento das plantas e maior adaptação às tecnologias utilizadas nas culturas do milho e trigo. Atualmente as empresas produtoras de inoculantes priorizam a utilização de *Azospirillum brasilense* das estirpes AbV5 e AbV6 (HUNGRIA, 2011).

Contudo, apesar da inoculação com *A. brasilense* ser uma tecnologia barata e de baixo impacto ambiental, sua indicação técnica ainda precisa ser melhorada, levando-se em conta, entre outros fatores, os genótipos e o nível de investimento adotado na lavoura. Adicionalmente, é necessário buscar e avaliar novas estirpes e tipos de formulações de inoculantes para aumentar a eficiência da inoculação com o objetivo de diminuir a dose de fertilizantes nitrogenados ou aumentar o rendimento de grãos da cultura do milho (PANDOLFO et al., 2015).

Relatos indicam que o sucesso da inoculação parece estar diretamente relacionado com a especificidade da interação entre genótipos de plantas e estirpes de bactérias, bem como, outros fatores relacionados como o ambiente (HUNGRIA, 2011; BRACCINI et al., 2012, PANDOLFO et al., 2015). A resposta diferencial de genótipos de milho as estirpes da bactéria foram retratadas em alguns estudos como o de Garcia de Salomone et al. (1996) que avaliando o comportamento de 12 cultivares inoculados com estirpes específicas de *Azospirillum*, constataram que a eficiência da inoculação é dependente do genótipo do hospedeiro e da bactéria, sugerindo-se que selecionando os genótipos adequados, a fertilização nitrogenada pode ser parcialmente substituída pela inoculação com *Azospirillum*. Montañez et al. (2005) também verificaram diferenças nas respostas de genótipos às bactérias que colonizam a rizosfera das plantas. Alguns destes genótipos se mostraram mais responsivos a interação com bactérias diazotróficas em relação á fixação biológica do nitrogênio, além do que o nível de adubação nitrogenada pode influenciar nesse processo. Outros benefícios associados foram relatados em estudo de avaliação do efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* AZ39 em dois genótipos de milho, cultivados em anos, locais e manejos diferentes. Neste estudo, foi verificado que a inoculação promoveu incremento de 15,4% e

7,4% na produção de grãos no primeiro e no segundo ano do experimento, respectivamente, em relação ao tratamento que não recebeu fertilização com nitrogênio e inoculação (LANA et al., 2012).

Além disso, existe a necessidade de elucidar a interação entre inoculação e a aplicação de N, em razão da diversidade de resultados obtidos nas mais diversas situações em que ele foi empregado (PANDOLFO et al., 2015).

Isto posto, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* - estirpes: AbV5 e AbV6 associada a adubação nitrogenada reduzida sobre parâmetros agronômicos em híbridos de milho em dois anos agrícolas.

MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram conduzidos nos anos agrícolas de 2007/2008 e 2012/2013 no município de Colina, São Paulo, em área pertencente à sede do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana (48°32'38" de longitude oeste, 20°43'05" de latitude sul e altitude de 568 metros). O solo pertence à classe Latossolo Vermelho distrófico, típico, textura média, hipoférico, muito profundo, revelo suave ondulado (Typic Haplustox) (EMBRAPA, 2009), e as glebas, diferentes entre os anos agrícolas, apresentavam os seguintes atributos químicos na camada 0-20 cm: pH (CaCl₂): 4,9; P: 6 mg dm⁻³; K: 1,7 mmolc dm⁻³; matéria orgânica (M.O.): 16 g dm⁻³; Ca: 14 mmolc dm⁻³; Mg: 7 mmolc dm⁻³; H + Al: 25 mmolc dm⁻³; SB: 22,7 mmolc dm⁻³; CTC: 47,7 mmolc dm⁻³; V%: 48 no ano agrícola 2007/2008 e pH (CaCl₂): 5,1; P: 3 mg dm⁻³; K: 2,3 mmolc dm⁻³; matéria orgânica: 26 g dm⁻³; Ca: 21 mmolc dm⁻³; Mg: 10 mmolc dm⁻³; H + Al: 24 mmolc dm⁻³; SB: 33,3 mmolc dm⁻³; CTC: 57,3 mmolc dm⁻³; V%: 58, no ano agrícola 2012/2013. O clima da região pode ser classificado como Cwa, ou seja, tropical de altitude com inverno seco, temperatura do mês mais quente maior que 22° C e temperatura do mês mais frio entre -3° e 18° C (KÖPPEN (2001)).

Tanto no ano agrícola 2007/2008 (Experimento 1), bem como, em 2012/2013 (Experimento 2) o milho foi implantado em sucessão a soja. No experimento 1, avaliou-se o desempenho do híbrido simples precoce DKB 390 por meio da inoculação das sementes com formulação a base de *Azospirillum brasilense* em fase de testes, ou seja, o inoculante não tinha sido lançado comercialmente na época, sendo suas principais características: *FAzos turfoso*: Formulação turfosa (Empresa formuladora: Stoller do Brasil Ltda) com as estirpes AbV5 e AbV6 e suporte tipo turfa; *FAzos líquido*: Formulação líquida com suporte tipo água. Como garantia dos produtos teve-se a concentração de 10⁸ bactérias viáveis por mL ou g e dose de 200 mL ou 200 g do produto comercial por hectare, veiculado (misturado) às sementes. No experimento 2 foram utilizados dois genótipos de milho como oportunidade de testar a especificidade com as estirpes AbV5 e AbV6 de *Azospirillum brasilense* contidas em inoculante comercial Masterfix® L Gramíneas lançado pela mesma empresa e denominado no caso específico do presente trabalho *IAzos líquido* com as características: formulação líquida de *Azospirillum brasilense*, cepas - estirpes AbV5 e AbV6, concentração mínima 2 x 10⁸ células viáveis mL⁻¹), na dose recomendada pelo fabricante, de 100 mL ha⁻¹ para inoculação via semente. Os híbridos testados foram: BM 502: um híbrido duplo precoce, com excelente estabilidade em plantios de verão e safrinha, e o híbrido DKB 390 VT PRO 2TM semelhante ao convencional de uso no experimento 1, com acréscimo da tecnologia VT PRO 2® que é o resultado da junção de duas tecnologias: Roundup Ready 2, que confere tolerância a aplicação de glifosato no controle de plantas daninhas e o YieldGard VT PRO, que é a segunda geração do milho geneticamente modificado para o controle de pragas como a broca-da-colmo (*Diatraea saccharalis*), lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e da lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) (YIELDGARD, [200-]).

As doses de *FAzos* (veículo: líquido e turfoso) e *IAzos* (líquido) necessárias para cada quilograma de sementes, foi calculado com base na quantidade de sementes necessárias para implantação de um hectare, e a população de plantas indicada para os híbridos.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso com quatro e oito repetições respectivamente, para os experimentos 1 e 2. As unidades experimentais foram compostas por seis fileiras de cinco metros espaçadas em 0,8 m, utilizando-se as quatro fileiras centrais como área útil, onde foram efetuadas as avaliações do experimento 1 e no experimento 2, foram de quatro fileiras de cinco metros espaçadas em 0,8 m, utilizando as duas fileiras centrais como área útil onde avaliou-se a maioria dos parâmetros agrônômicos e as laterais para coleta de plantas para determinação dos parâmetros de biomassa. Como bordadura experimental, foram semeadas duas linhas com os híbridos utilizados, contornando todo o experimento 2.

Os tratamentos estudados no experimento 1 foram: 1: Testemunha sem N e sem inoculação com *FAzos*; 2: N recomendado para a cultura (dose usual); 3: $\frac{1}{2}$ da dose de N recomendado para a cultura; 4: $\frac{1}{2}$ da dose de N + *FAzos turfoso* e 5: $\frac{1}{2}$ da dose de N + *FAzos líquido*. No experimento 2 os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial simples 2 x 5, sendo o primeiro fator referente aos híbridos e o segundo fator constituiu-se dos tratamentos: 1: Testemunha sem N e sem inoculação com *IAzos*; 2: $\frac{1}{2}$ da dose de N; 3: $\frac{1}{2}$ da dose de N + *IAzos*; 4: N recomendado para a cultura (dose usual) e 5: N recomendado para a cultura (dose usual) + *IAzos*.

O solo foi preparado de maneira convencional, através de uma gradagem pesada, uma aração e duas gradagens niveladoras, sendo que no momento da semeadura a umidade do solo encontrava-se adequada.

No experimento 1, para todos os tratamentos no sulco de plantio foram aplicados a mistura de 40 g m⁻¹ linear de superfosfato simples (para dose de 90 kg ha⁻¹ de P₂O₅) e 6,67 g m⁻¹ linear de cloreto de potássio (para dose de 50 kg ha⁻¹ de K₂O). No experimento 2: 90 g m⁻¹ linear de superfosfato simples (90 kg ha⁻¹ de P₂O₅) e 8,28 e 3,31 g m⁻¹ linear de cloreto de potássio (para respectivamente dose de 50 kg ha⁻¹ no plantio e 20 kg ha⁻¹ em cobertura de K₂O). O sulfato de amônio (S.A.) na adubação de semeadura de ambos os experimentos foi aplicado da seguinte forma: nos tratamentos que envolveram a dose de N recomendado para a cultura (dose usual) utilizou-se 12 g m⁻¹ linear (30 kg ha⁻¹ de N) e nos tratamentos com $\frac{1}{2}$ da dose de N recomendado para a cultura: 6 g m⁻¹ linear (15 kg ha⁻¹ de N). Em cobertura, cerca de, 25 a 30 dias após o plantio foram adicionados nos tratamentos que constaram de dose usual: 36 g m⁻¹ linear de S.A. (90 kg ha⁻¹ de N) e nos tratamentos com, $\frac{1}{2}$ da dose de N: 18 g m⁻¹ linear de S.A. (45 kg ha⁻¹ de N).

A semeadura foi realizada manualmente, colocando-se aproximadamente 45 sementes em 5,0 metros lineares. Todas as sementes foram tratadas com o inseticida 'Cruizer' contra pragas do solo, sendo a inoculação com *FAzos* turfoso e líquido, bem como, com o *IAzos* foram realizadas por último, no mesmo dia da semeadura. Além disso, adotaram-se alguns cuidados visando garantir uma maior eficiência no processo, como a inoculação realizada à sombra e distribuição uniforme dos produtos em todas as sementes.

Após aproximadamente 20 dias da semeadura, foi realizado um raleio das plantas em excesso. Assim sendo, o estande inicial foi de aproximadamente 28 plantas em 5 m, considerando 0,8 m de espaçamento entrelinhas; para ambos os experimentos.

Foram também realizadas a aplicação de herbicida Primestra Gold na dosagem de 1,0 L/100 L de H₂O em pós-semeadura e pré-emergência de plantas daninhas, sendo que complementaram-se o controle das mesmas através de capinas manuais, deixando-se a cultura livre da competição com essas plantas por todo ciclo. No experimento 2, utilizou-se também o herbicida Atrazina principalmente para controlar

corda-de-viola na dose de 3,8 L/250 L de H₂O.

O controle para as lagartas do cartucho, quando essas pragas atingiram o nível de controle, foi efetuado de acordo com as normas técnicas para a cultura (EMBRAPA, 2010), mesmo para o híbrido transgênico DKB 390 detentor da tecnologia VT PRO 2®.

No início do florescimento, para o experimento 1 foram coletadas 5 plantas por parcela onde avaliou-se a massa seca radicular (MSR) medida em gramas planta⁻¹; comprimento radicular (CR) medido em centímetros; massa seca da parte aérea (MSF) medida em g planta⁻¹, altura média de plantas (AP), medida do nível do solo até o ponto de inserção da última folha, medida em metros e altura média de inserção da espiga (AE): medida do nível do solo até a inserção da primeira espiga, medida em metros. A colheita foi realizada manualmente na área útil da parcela, para posterior cálculo da produtividade final (PP) em kg.ha⁻¹, variável estimada pela colheita das espigas presentes na área útil das parcelas, as quais foram trilhadas, e foi determinada a massa de grãos, ajustada para 14% de umidade. Além disso, avaliou-se a massa de mil sementes (P1000) efetuada pela pesagem de mil sementes em cinco repetições por parcela, expressa em gramas.

Na mesma época para experimento 2 realizou-se a coleta de 3 plantas/parcela, para posterior pesagem inicial, trituração, pesagem do material triturado para acomodação em estufa de circulação forçada de ar a 65° C/150 h (pré-secagem) e 105° C/16 h (secagem definitiva) e pesagem do material retirado da estufa para determinação da MSF. Os cálculos foram obtidos dividindo-se massa seca pelo número de plantas avaliadas e os resultados expressos em g.planta⁻¹. Foram realizadas também avaliações da AP e AE. Na colheita deste experimento foram coletadas aleatoriamente dez espigas por parcela dentro da área útil onde foram retiradas as palhas para contagem individual de número de fileiras de grãos por espiga (FE) e número de grãos por fileira (GF), obtendo-se assim seus valores médios. As espigas foram devolvidas as respectivas parcelas, para avaliação da PP em kg ha⁻¹ e a massa de cem sementes (P100) em gramas em 10 repetições por parcela. Os dados coletados de ambos os experimentos foram submetidos à análise de variância e ao teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando constatados efeitos significativos dos tratamentos, as médias foram comparadas pelos testes de Duncan (Experimento 1) e Tukey (Experimento 2) a 5% de probabilidade, empregando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2003).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os resultados do experimento 1, referente ao desempenho do híbrido DKB 390 inoculado nas sementes com formulações a base de *Azospirillum brasilense* em fase de testes. Para CR foram detectadas diferenças estatísticas significativas pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade, sendo que, os tratamentos 2 e 4 promoveram acréscimos significativos neste parâmetro em relação aos demais tratamentos (1, 3 e 5), sendo estes sem diferenças estatísticas entre si. Em relação a MSF, destacaram-se como superiores aos demais, os tratamentos com dose total de N (tratamento 2) e tratamento 5 (1/2 dose N + FAzoz líquido).

Tabela 1 – Parâmetros agronômicos avaliados em resposta à inoculação de sementes de milho DKB 390 com formulações à base de *Azospirillum brasilense* associada a adubação nitrogenada reduzida. Colina-SP. Ano Agrícola: 2007/2008. Experimento 1.

Parâmetros agronômicos							
Tratamentos	CR (cm) ¹	MSF (g) ¹	MSR (g) ¹	AP (m) ¹	AE (m) ¹	PP (kg ha ⁻¹) ¹	P1000 (g) ^{1,2}
1	29,20 B	129,10 B	39,59 B	2,21 A	1,28 A	10296,25 BC	323,26 C
2	30,85 A	136,20 A	41,90 B	2,29 A	1,27 A	10428,50 BC	349,74 AB
3	29,17 B	125,15 BC	32,45 C	2,28 A	1,25 A	10231,00 C	338,25 BC
4	31,05 A	121,15 C	26,90 D	2,28 A	1,26 A	11114,50 A	363,02 A
5	28,55 B	131,25 AB	50,25 A	2,22 A	1,27 A	10782,25 AB	350,68 AB
CV (%)	2,71	3,18	8,81	2,32	6,12	3,30	4,00

¹médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5%; 1 = Testemunha sem N e sem *FAzOs*; 2 = N recomendado para a cultura (dose usual); 3 = ½ da dose de N recomendado para a cultura; 4 = ½ da dose de N + *FAzOs* turfoso e 5 = ½ da dose de N + *FAzOs* líquido; *FAzOs* = formulações de veículo turfoso e líquido a base de *Azospirillum brasilense*: estirpes AbV5 e AbV6 (em fase de testes); CR = comprimento da raiz; MSF = massa seca da parte aérea; MSR = massa seca da raiz; AP = altura média de plantas; AE = altura média de espigas; PP = produtividade de grãos; P1000 = massa de mil grãos; ² em 5 repetições na parcela. CV (%) coeficiente de variação experimental.

Para MSR, o melhor tratamento foi aquele em que utilizou-se de metade da dose de N + *FAzOs*, sendo que os demais tratamentos não tiveram resposta superiores à testemunha. Segundo Muñoz-Garcia et al. (1991) a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasiliense* cepa UAP 77, provocou aumento na matéria seca de raízes, da ordem de 54 a 86% e de 23 a 64% no peso seco da parte aérea. Já, Reis Júnior et al. (2008) não observaram efeito da inoculação de milho com *A. amazonense* na produção de matéria seca da parte aérea. Entretanto, plantas inoculadas apresentaram maior produção de matéria seca de raízes, quando comparadas à de plantas não inoculadas.

Deste modo, dependendo do parâmetro analisado, verifica-se que a redução para metade da dose de N usualmente recomendada para a cultura, se complementada com a formulação (turfa ou líquido) à base de *Azospirillum brasilense*, se traduz em mesmo efeito que o uso do dobro da dose de nitrogênio mineral. Estes resultados obtidos fornecem indícios de benefícios econômicos e ambientais, haja visto, que menores doses de nitrogênio correspondem a menores custos e minimização da poluição ambiental causada pelas possíveis perdas dos fertilizantes nitrogenados por lixiviação e volatilização.

Variações em função do tipo de inoculante à base de *Azospirillum brasilense* utilizado foram notadas no presente trabalho, concordando com os resultados obtidos por Reis (2007).

De modo geral, a inoculação com formulação a base de *Azospirillum brasilense* não alterou a AP e AE, o que é positivo, visto que, quanto maior a altura de plantas, maior o índice de tombamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Cavallet et al. (2000) que verificaram que produtos a base de *Azospirillum* spp. não incrementam significativamente a estatura de plantas.

Os níveis de produtividade de grãos (PP), obtidos no experimento 1, foram considerados muito bons, o que pode ser verificado na Tabela 1. Ao analisar-se este parâmetro, verifica-se que os melhores tratamentos foram aqueles associados ao *Azospirillum* (tratamentos 4 e 5), diferindo significativamente da testemunha e do tratamento que recebeu metade da dose de nitrogênio (tratamento 3), o que evidencia o efeito agrônomico benéfico das formulações com *Azospirillum*. O melhor tratamento em destaque foi o tratamento 4 (1/2 de dose de N + *Azospirillum turfoso*) que foi inclusive superior ao tratamento 2, com dose total de nitrogênio. No caso do tratamento 5, mesmo com dose reduzida de nitrogênio, este obteve uma produtividade equivalente ao uso da dose total de nitrogênio recomendada para a cultura (tratamento 2). De acordo com Oliveira et al. (2007) a associação de inoculantes com adubos nitrogenados concorre para promover reduções nas doses de nitrogênio necessárias, em níveis idênticos de produtividade.

Machado et al. (1998) estudando o efeito da adubação nitrogenada associada à inoculação com uma mistura de estirpes de bactérias diazotróficas em milho constataram aumento de produção de 4.830 kg.ha⁻¹ para 5.790 kg.ha⁻¹ devido à inoculação, quando aplicaram a dose de 100 kg.ha⁻¹ de N.

Ainda em relação à produtividade, não houve diferenças significativas entre os tratamentos 1, 2 e 3, em outras palavras, não foi evidenciado nesta situação específica do experimento 1, resposta da cultura ao nitrogênio. No entanto, quando da adição do *Azospirillum* às sementes, nas duas formulações testadas, houve um incremento significativo de produtividade, o que pode ser explicado pelas ações benéficas dessas bactérias junto às raízes das plantas, conforme descrito na literatura sobre este assunto.

Em concordância com os resultados de produtividade, o P1000 seguiu níveis de resposta semelhantes, sendo os melhores resultados encontrados nos tratamentos 4 e 5, ou seja, naqueles onde havia a associação de metade da dose de nitrogênio com o *Azospirillum brasilense*.

No experimento 2 (Tabela 2), os CV (%) situaram-se entre 1,88 a 8,95, estando estes valores dentro da faixa preconizada por Fritsche-Neto et al. (2012), Buzinaro (2013) e Revolti (2014). Para FV genótipos, nota-se significância pelo teste F para AP, GF, FE, P100 e PP, indicando que os híbridos em estudo diferem entre si para esses parâmetros. Já, para a FV tratamentos, apenas MSF, P100 e PP apresentaram diferenças significativas a 1% e GF a 5% de acordo com o teste F. Com relação a FV interação genótipos versus tratamentos, nenhum dos parâmetros agrônômicos, mostrou diferença significativa de acordo com o teste F. Isto evidencia que não ocorreu resposta diferenciada nos parâmetros dos diferentes genótipos com relação aos tratamentos testados, demonstrando que os genótipos e os tratamentos responderam de forma independente.

Tabela 2 –Resumo da análise de variância de parâmetros agrônômicos avaliados em dois híbridos de milho submetidos a diferentes tratamentos envolvendo inoculação com inoculante comercial do tipo líquido (*IAzos*) a base de *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada reduzida. Colina-SP. Ano Agrícola 2012/13. Experimento 2.

F.V.	Parâmetros agrônômicos							
	G L	MSF g planta ⁻¹	AP m	AE m	GF	FE	P100 ¹ g	PP kg ha ⁻¹
GENÓTIPOS (G)	1	0,001NS	8,104* *	1,134NS	230,148 **	85,569* *	21,020* *	5,644* *
TRATAMENTOS (T)	4	29,61**	0,104N S	1,072NS	3,939*	1,317NS	18,250* *	17,013* *
BLOCO	7	1,96NS	0,599N S	1,698NS	2,461*	0,713NS	1,620NS	0,474NS
G X T	4	1,697NS	0,600N S	0,641NS	0,322NS	2,126NS	0,516NS	2,100NS
RESÍDUO	63	-	-	-	-	-	-	-
MÉDIA GERAL	-	91,78	2,49	1,42	35,51	17,05	35,30	11363,8 0
CV (%)	-	8,95	3,54	8,53	3,82	4,05	1,88	7,04

^{NS}, **, * não significativo, significativo a 1% e 5% pelo teste F, respectivamente; MSF = massa seca da parte aérea; AP = altura média de plantas; AE = altura média de espigas; GF = número de grãos por fileira; FE = número de fileiras de grãos por espiga; P100 = massa de cem grãos; ¹ = 10 repetições na parcela e PP = produtividade de grãos. Fonte de variação (F.V.); Interação genótipo versus tratamentos (G X T); coeficientes de variação experimentais em (%) CV; graus de liberdade (GL);

Considerando o efeito de tratamentos, na média dos híbridos avaliados, observa-se que para P100 e PP, os tratamentos que envolveram ½ de dose de N + inoculação, dose usual de N e dose usual de N + inoculação destacaram-se e não diferiram significativamente entre si e foram superiores quando comparados aos tratamentos que envolveram a testemunha e ao tratamento com 1/2 de dose usual de N, não diferindo também estatisticamente entre si. (Tabela 3). De modo semelhante ao experimento 1, no experimento 2, é também perceptível que metade de dose de N usualmente recomendada para a cultura associada a inoculação com *Azospirillum brasilense* pode ser utilizada em detrimento dos tratamentos que fazem uso de 100% de dose de N independente da inoculação ou não com *Azospirillum brasilense*, quando se busca incrementos em biomassa foliar, peso e rendimento de grãos. Contrariando os resultados encontrados por Mello (2012) que em estudo envolvendo as mesmas estirpes da bactéria concluiu que a inoculação via sementes não influenciou o componente de produção rendimento de grãos de híbridos de milho DKB 245 e AG 8025. Por Pandolfo et al. (2015) que em milho cultivado em Latossolo Vermelho com diferentes doses de N em cobertura, na presença de inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* concluíram que a prática não aumenta o rendimento de grãos e não altera a massa de mil grãos.

Tabela 3 – Parâmetros agronômicos que apresentaram ou não significância para efeito de tratamentos na média dos híbridos de milho avaliados. Colina, SP. Ano agrícola 2012/2013. Experimento 2.

Tratamentos/	1	2	3	4	5
Parâmetros agronômicos					
MSF¹ (g planta ⁻¹)	76,67 B	83,28 B	102,61 A	98,31 A	98,02 A
AP¹ (m)	2,50 A	2,49 A	2,50 A	2,51 A	2,47 A
AE¹ (m)	1,44 A	1,37 A	1,43 A	1,42 A	1,44 A
GF¹	34,94B	34,94B	35,24AB	36,43A	36,01AB
FE¹	16,77 A	17,30 A	17,17 A	17,04 A	17,00 A
P100^{1,2} (g)	34,40 B	34,66 B	35,84 A	35,80 A	35,80 A
PP¹ (kg.ha ⁻¹)	10347,68 B	10586,11 B	11861,35 A	12027,36 A	11996,51 A

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 1 = Testemunha sem N e sem *IAzos*; 2 = ½ da dose de N recomendado para a cultura; 3 = ½ da dose de N + *IAzos*; 4 = N recomendado para a cultura (dose usual) e 5 = N recomendado para a cultura (dose usual) + *IAzos*, sendo *IAzos* = Inoculante comercial com veículo líquido a base de *Azospirillum brasilense*: estirpes AbV5 e AbV6; MSF = massa seca da parte aérea; AP = altura média de plantas; AE = altura média de espigas; GF = número de grãos por fileira; FE = número de fileiras de grãos por espiga; P100 = massa de cem grãos; PP = produtividade de grãos; ² 10 repetições na parcela.

Por outro lado, para o efeito de genótipos na média dos tratamentos testados, o híbrido DKB 390 VT PRO 2 TM mostrou valores médios para AP, FE, P100 e PP (Tabela 4) estatisticamente superiores aos do outro híbrido testado, fato atribuído como próprio do genótipo e não da interação com as estirpes da bactéria.

Tabela 4. Parâmetros agronômicos que apresentaram ou não significância para efeito de genótipos na média dos tratamentos testados envolvendo inoculação com *Azospirillum brasilense* e doses de fertilizante nitrogenado. Colina, SP. Ano agrícola 2012/2013. Experimento 2.

Genótipos/ Parâmetros Agronômicos	BM 502	DKB 390 VT PRO 2TM
MSF ¹ (g planta ⁻¹)	91,75 A	91,80 A
AP ¹ (m)	2,47 B	2,52 A
AE ¹ (m)	1,43 A	1,40 A
GF ¹	37,81 A	33,21 B
FE ¹	16,34 B	17,77 A
P100 ^{1,2} (g)	34,96 B	35,64 A
PP ¹ (kg ha ⁻¹)	11151,17 B	11576,43 A

¹Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. MSF = massa seca da parte aérea; AP = altura média de plantas; AE = altura média de espigas; GF = número de grãos por fileira; FE = número de fileiras de grãos por espiga; P100 = massa de cem grãos; e PP = produtividade de grãos; ² = 10 repetições na parcela.

Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com Braccini et al. (2012) que verificaram que plantas de milho que receberam metade da dose de nitrogênio e inoculação com *Azospirillum brasilense* mostraram valores de massa seca de planta semelhante aos tratamentos que receberam 100% da dose de nitrogênio e superior as plantas que não receberam inoculação com *A. brasilense*. Com Quadros (2009) e Lana et al. (2012) que observaram que a inoculação promoveu incremento em termos de massa seca da parte aérea em milho. Os mesmos autores relatam que o aumento da massa seca da parte aérea pode implicar em maior produção de biomassa, conseqüentemente em maior produtividade.

Em relação a altura média de plantas, resultados semelhantes foram achados por Lana et al. (2012) que também não verificaram, avaliando as respostas da cultura do milho à inoculação com *Azospirillum* associada à adubação nitrogenada, efeito da inoculação sobre a altura de planta. Por outro lado, Hungria (2011) após a inoculação com as estirpes AbV5 e AbV6 de *A. brasilense* observou contribuições em relação ao crescimento radicular e altura de plantas de milho em ensaios de campo.

A alta taxa de remoção de nitrogênio pela cultura do milho, implica no uso intensivo da adubação nitrogenada. Assim quando se deseja a obtenção de elevadas produtividades e maior eficiência de utilização do adubo é recomendado o seu parcelamento (BARROS NETO, 2008). Entretanto, Lana et al. (2012) verificaram, aumento em rendimento de milho submetido a inoculação via sementes na ausência de adubação nitrogenada. Bartchechen et al. (2010) também encontraram ganhos em produtividade com a inoculação de *A. brasilense*. Fiori et al. (2010) observaram resultados superiores de produtividade no tratamento que recebeu apenas inoculação quando comparada com a testemunha sem adubação nitrogenada. Novakowiski et al. (2011) e Martins et al. (2012) também notaram resultados superiores para a produtividade em milho ao inocularem a cultura com a mesma bactéria do gênero *Azospirillum*, independente da forma de inoculação. Já, Mello (2012) concluiu em relação a dois anos de estudo em áreas diferentes que a inoculação das estirpes de *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6 em sementes não influenciam o rendimento de grãos e os componentes do rendimento dos híbridos de milho testados: DKB 245 e AG 8025. Por outro lado, Revolti (2014) estudando a interação da inoculação com *A. brasilense* em genótipos de milho, em três doses de nitrogênio em cobertura para vários caracteres, verificou que há efeito positivo da inoculação, principalmente quando não é utilizado nitrogênio em cobertura.

Neste sentido, e nas condições do presente trabalho, cabe ressaltar que, devido aos elevados custos praticados em relação aos fertilizantes nitrogenados, o uso de fontes alternativas em substituição a adubação nitrogenada pode se tornar economicamente viável, sendo capaz de promover a manutenção de

produtividades elevadas em milho, contudo, tal manejo não exclui a adubação nitrogenada parcelada por completo. Assim, os resultados obtidos neste trabalho e para as condições avaliadas, a adoção da prática de inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* deve ocorrer de forma associada ou complementar a adubação nitrogenada reduzida em 50% parcelada na semeadura e cobertura.

CONCLUSÃO

Nas condições em que este trabalho foi conduzido, pode-se concluir que:

- 1) A inoculação de sementes de milho DKB 390 com *Azospirillum brasilense*, tanto na formulação líquida como turfosa, interferiram positivamente na maioria dos parâmetros agrônômicos avaliados;
- 2) O uso de metade da dose de nitrogênio (parcelado na semeadura e cobertura) associada à inoculação, seja na formulação líquida ou à base de turfa, nas doses de 200 mL ou 200 g de inoculante por hectare, respectivamente, foi eficiente agronomicamente;
- 3) A produtividade de grãos com a associação de metade da dose de nitrogênio e *Azospirillum brasilense* foi equivalente ao tratamento que recebeu o total da dose de nitrogênio recomendada para a cultura.
- 4) Não houve influência do uso das formulações de *Azospirillum*, testadas neste trabalho, nos parâmetros altura de plantas e altura de inserção de espigas.
- 6) Há efeito positivo na prática de inoculação das sementes com inoculante comercial formulação líquida associada a redução da adubação nitrogenada recomendada em 50% no rendimento de grãos dos híbridos de milho testados: DKB 390 VT PRO 2TM e BM 502.
- 7) A resposta à inoculação associada a doses de adubação nitrogenada não variou em função dos genótipos testados.

REFERÊNCIAS

BARROS NETO, C.R. **Efeito do nitrogênio e da inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense* no rendimento de grãos de milho.** Trabalho de Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa. 28 f. 2008.

BARTCHECHEN, A.et al. Efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L.). **Campo Digit@I**, v.5, p.56-59, 2010.

BRACCINI, A.L.et al. Seed Inoculation with *Azospirillum brasilense* Associated with the Use of Bioregulators in Maize. **Revista Caatinga**, v.25, p.58-64, 2012.

BUZINARO, R. **Interação de genótipos de milho vs locais, anos e épocas de semeadura.** 2013. 56f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista `Júlio de Mesquita Filho`, Jaboticabal.

CAVALLET, L.E.et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, p.129-132, 2000.

DARTORA, J.et al. Adubação nitrogenada associada a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.10, p. 1023-1029, 2013.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Embrapa e UFPR desenvolvem primeiro inoculante para milho e trigo (2009)**, Disponível em: <<https://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/agosto/1a-semana/embrapa-e-ufpr-desenvolvem-primeiro-inoculante-para-milho-e-trigo/>> Acesso em: 05 jul. 2010.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Normas técnicas para a cultura do milho (2010)**, Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/pragas.htm> Acesso em: 12 ago. 2011.

FERREIRA, D.F. Programa Sisvar.exe. **Sistemas de Análises de Variância**. Versão 5.3. 2003.

FIORI, C.C.L.et al. Efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho (*Zea mays* L.). **Campo Digit@l**, v.5, p. 56-59, 2010.

FRITSCHÉ-NETO, R.et al. Genome-wide selection for tropical maize root traits under conditions of nitrogen and phosphorus stress. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.34, p.389-395, 2012.

GARCIA DE SALAMONE, I.E.et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the aSN isotope dilution technique. **Biol Fertil Soils**, 23, p. 249-256, 1996.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**, Londrina: Embrapa Soja, ISSN 1516-781X, 325, p.36, 2011.

JORDÃO, L.T.; MUNIZ, A.S. Fixação Biológica de Nitrogênio No Milho 2ª Safra. Bactérias do gênero *Azospirillum* disponibilizam nitrogênio no solo e incrementam a produtividade do milho 2ª safra. **Portal ciência do solo**. Disponível em: <<http://www.cienciadosolo.com.br/>>. Acesso em 21 jan. 2014.

KÖPPEN, W. Climatologia. In: PEREIRA, A.R.; ANGELOCCI, L.R.; SENTELHAS, P.C. (Ed), **Agrometeorologia: fundamentos e aplicações práticas**. Guaíba: Agropecuária. 478 p. 2001.

LANA, M.C.et al. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Rev. Ceres**, v.59, p.399-405, 2012.

MACHADO, A.T.et al. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33. p. 961-970, 1998.

MAJEROWICZ, N.et al. Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasil, Bot.**, v.25, p. 129-136, 2002.

MELLO, N. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho e trigo**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo.

MONTAÑEZ, A.et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by 15N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biol Fertil Soils**, 45, p. 253-263 doi:10.1007-s00374-008-0322-2, 2005.

MUÑOZ-GARCIA, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; VALDÉS, M. Promoción del crecimiento del maíz por cepas productoras de sideróforos 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...** México. p. 61-61. 1991.

NOVAKOWISKI, J.H.et al. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.32, n.1, p.1687-1698, 2011.

OLIVEIRA, P.P.A.; OLIVEIRA, W.S.; BARIONI JUNIOR, W. **Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio.** São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste 7p. 2007. (Circular Técnica, 54).

PANDOLFO, C.M. et al. Desempenho de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado a doses de nitrogênio em cobertura. **Agropecu. Catarin.**, Florianópolis, v.27, n.3, p. 94-99, nov. 2014/fev. 2015.

PEREIRA, L. de M. **Qualidade de sementes, teor de nitrogênio e expressão gênica em genótipos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*.** 2014. 56f. Tese (Doutorado) UNESP, FCAV, Jaboticabal.

QUADROS, P.D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul.** 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 62 p.

REIS JUNIOR, F.B. et al. 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, V.M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas.** Seropédica. EMBRAPA Agrobiologia, 22p. 2007.

REVOLTI, L.T.M. **Interação genótipo vs formas de inoculação com *Azospirillum brasilense* em milho.** 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado) UNESP, FCAV, Jaboticabal.

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

YIELDGARD. **Tecnologia que protege o milho.** [200-]. Disponível em <<http://www.yieldgard.com.br/default.asp>> Acesso em: 21 jul. 2013.

