

**Universidade Federal de São João Del-Rei**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia**

DENISE PACHECO DOS REIS

**PRODUTIVIDADE DE MILHO E ECOLOGIA  
MICROBIANA DA RIZOSFERA DE PLANTAS SOB  
DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E NÍVEIS DE  
NITROGÊNIO**

SÃO JOÃO DEL REI  
MINAS GERAIS - BRASIL  
FEVEREIRO 2015

DENISE PACHECO DOS REIS

**PRODUTIVIDADE DE MILHO E ECOLOGIA  
MICROBIANA DA RIZOSFERA DE PLANTAS SOB  
DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E NÍVEIS DE  
NITROGÊNIO**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del Rei como parte dos requisitos para obtenção do título de “Magister Scientiae” (MS).

SÃO JOÃO DEL REI  
MINAS GERAIS - BRASIL  
FEVEREIRO 2015

DENISE PACHECO DOS REIS

**PRODUTIVIDADE DE MILHO E ECOLOGIA MICROBIANA DA RIZOSFERA DE  
PLANTAS SOB DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E NÍVEIS DE  
NITROGÊNIO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del Rei como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de “Magister Scientiae” (MS).

Aprovada: 23 de fevereiro de 2015



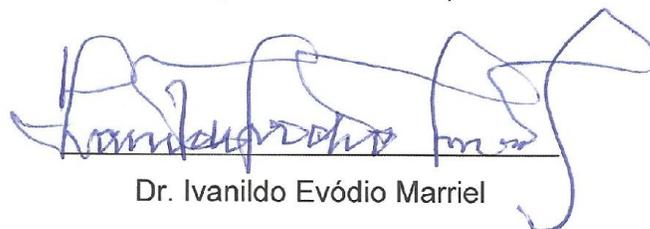
Dra. Sylvia Morais de Sousa Tinoco  
(Membro Interno)



Dra. Eliane Aparecida Gomes  
(Membro Externo)



Dra. Cynthia Maria Borges Damasceno  
(Suplente)



Dr. Ivanildo Evódio Marriel  
(Orientador)

*Dedico este trabalho aos meus pais, Maria  
da Saúde e Sebastião dos Reis.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

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

Ao PPBE- Programa de Pós graduação em Bioengenharia -, pela oportunidade da formação concedida.

Aos professores EMBRAPA/UFSJ.

A Embrapa Milho e Sorgo, pela possibilidade de realização do trabalho.

Ao Dr. Ivanildo Evódio Marriel pela orientação, pelos ensinamentos, pela ajuda prestada para a execução do trabalho

A Dra Christiane Abreu de Oliveira Paiva e ao Dr. Lauro José Guimarães pela paciência, auxílio e orientação

A todos do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, pelo auxílio e convivência, especialmente a Ketleyn pela ajuda nas análises.

A todos do Núcleo de Biologia Aplicada pelo suporte de análises moleculares em especial a Dra Eliane, Ubiraci e Ana Laura.

Aos funcionários dos Campos Experimentais: Reynaldo, Dênio e Marquinhos e aos Laboratórios do Apoio pelas demais análises.

Aos colegas de curso Lucas e Vander, pelo ajuda, tempo de estudos e conhecimentos

A minha querida amiga e colega de mestrado Bárbara, pela amizade, incentivo para fazer o mestrado, conhecimentos e estudos durante todos os anos desde a graduação.

A Flávia pela amizade incentivo, e boa vontade em ajudar sempre que necessário.

A Lívia, que se tornou uma grande amiga pelos ótimos momentos juntas, pelos estudos, pelo conhecimento e incentivo.

As amigas Dardânia. Luciana, Luana, Kênia M. Kênia O. Rafa, Luciana R. Gê, Sana e Girlane, Eveline e Vânia pela amizade e incentivo sempre.

A todos os amigos do melhoramento Milho (Prainha, Peninha, Paulo Evaristo, Eduardo, Fábio, Daniel, Malcon) e aos colegas do melhoramento de sorgo pela amizade, carinho e incentivo.

As funcionárias da Biblioteca e do Protocolo da Embrapa pelo auxílio sempre que necessário.

As minhas queridas amigas de infância Gracilene, Érica, Gisele e Naiara pelo carinho e apoio incondicional.

Ao Osni, Beth, D. Zezé e Sr. Nelson pelo carinho e incentivo

A todos os familiares que sempre apoiaram e deram força para que isso se realizasse em especial: Adriana, Alexandre, Josiane e Júlio.

Aos colegas de disciplina do Programa de Pós-Graduação da UFSJ.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

.

*“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferentes”*

*(Roger Von Oech)*

REIS, Denise Pacheco (MS). Universidade Federal de São João del Rei, Fevereiro de 2015. **Produtividade de milho e ecologia microbiana da rizosfera de plantas sob diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio**. Orientador: Ivanildo Evódio Marriel. Co-orientadores: Christiane Abreu de Oliveira Paiva e Lauro José Moreira Guimarães.

## RESUMO

A contribuição da fixação biológica de Nitrogênio de forma eficiente é essencial para a sustentabilidade em sistemas agrícolas. A busca por métodos alternativos de aplicação de inoculantes vem sendo estudadas afim de reduzir e melhorar absorção de N, assim como também as avaliações da ecologia de microrganismo do solo para uma agricultura mais sustentável. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes métodos de inoculação do *Azospirillum* em milho que otimizem a fixação biológica associativa e a ecologia microbiana da rizosfera, visando aperfeiçoar o uso desta tecnologia como aporte de nitrogênio deste inoculante. Para isso foram testados: seis métodos de aplicação de inoculante (no sulco; semente; via foliar aos 10 dias após a germinação (DAG); sulco + via foliar 20 DAG; semente + via foliar aos 20 DAG; via foliar aos 10DAG e 20DAG; e sem inoculante) e três doses de N em cobertura (0, 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> N) em blocos casualizados, com parcela subdivida, sendo dose de N nas parcelas e métodos de aplicação nas subparcelas. As avaliações de parâmetros agrônômicos foram realizadas através do Acúmulo da massa seca, teor de nitrogênio na parte aérea, teor de N nos grãos, acúmulo de N nos grãos, produção de grãos, peso de 100 grãos e teor. E os parâmetros ecológicos foram verificados através de análises enzimáticas (arginase, urease, e fosfatases) e diversidade genética e funcional. Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas. Os resultados indicam aumentos de produtividade relativa de grãos em função da inoculação em comparação ao tratamento controle. Populações diazotróficas podem sofrer influência de métodos de inoculação e da interação dele com as doses de N. A dinâmica de N na rizosfera pode sofrer alterações pela interação método x dose e a diversidade genética e metabólica pode ser influenciada pela dose de N aplicada.

**Palavras-chave:** *Zea mays L.*, *Azospirillum*; Sustentabilidade

REIS, Denise Pacheco (MS). Universidade Federal de São João del Rei, Fevereiro de 2015. **Produtividade de milho e ecologia microbiana da rizosfera de plantas sob diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio**. Orientador: Ivanildo Evódio Marriel. Co-orientadores: Christiane Abreu de Oliveira Paiva e Lauro José Moreira Guimarães.

### ABSTRACT

The contribution of biological nitrogen fixation efficiently is essential for sustainability in agricultural systems. The search for alternative methods of application of inoculants have been studied in order to reduce and improve N uptake, as well as evaluations of soil microorganism ecology to a more sustainable agriculture. The aim of this study was to evaluate different methods of inoculation of *Azospirillum* in corn that optimize the associative fixation and microbial ecology of rhizosphere, aiming to improve the use of this technology as nitrogen contribution of this inoculant. For that were tested: six methods of inoculant application (in the groove; seed; foliar at 10 days after germination (DAG), groove + foliar 20 DAG; seed + foliar at 20 DAG; foliar and the 10 and 20 DAG, and without inoculation) and three doses of N (0, 40 and 80 kg ha<sup>-1</sup> N) blocks, with subdivided plot, with N rate in the plots and subplots application methods. Evaluations of agronomic parameters were performed using the accumulation of dry matter, nitrogen content in the shoot N content of grains, N accumulation in grains, grain yield, grain yield, weight of 100 grains and protein content in grain. And the ecological parameters were verified by enzymatic analyzes (arginase, urease, and phosphatase) and genetic and functional diversity. The data were subjected to statistical analysis. The results indicate that increases relative grain yield in relation to inoculation in comparison to the control treatment. Diazotrophic populations can be influenced by inoculation methods and his interaction with the doses of N. The dynamics of N in the rhizosphere may be changed through the interaction method x dose and the genetic diversity and metabolic may be influenced by N rate applied.

**Keywords:** *Zea mays L* ; *Azospirillum*; Sustainability

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
SUMÁRIO.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. USO DE FERTILIZANTE NITROGENADOS NA AGRICULTURA.....	1
1.2. A CULTURA DO MILHO.....	2
1.3. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	4
1.4. USO DE INOCULANTES EM MILHO.....	5
1.5. COMUNIDADE MICROBIANA DA RIZOSFERA.....	6
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>8</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	8
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
3.1. HÍBRIDO DE MILHO E <i>AZOSPIRILLUM</i> .....	8
3.2. FATORES EXPERIMENTAIS.....	9
3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	9
3.4. PREPARO DO INOCULANTE.....	10
3.5. PARÂMETROS AVALIADOS NA CULTURA DE MILHO.....	10
<b>3.5.1. Determinação da Massa Seca e teor de N na parte aérea.....</b>	<b>10</b>
<b>3.5.2. Produtividade de Grãos , Peso de 100 grãos, Teor de N no Grão, Teor de proteína e Acúmulo de N nos grãos.....</b>	<b>11</b>
3.6. PARÂMETROS ECOLÓGICOS DA COMUNIDADE MICROBIANA DA RIZOSFERA DAS PLANTAS.....	11
<b>3.6.1. Análise Quantitativa de Fungos e Bactérias Totais.....</b>	<b>12</b>
<b>3.6.2. Análise Quantitativa de Bactérias Diazotróficas.....</b>	<b>12</b>
<b>3.6.3. Análise Enzimática em Amostras de Solo da Rizosfera.....</b>	<b>13</b>

3.6.3.1. Enzima arginase.....	13
3.6.3.2. Enzima urease.....	13
3.6.3.3. Fosfatase Ácida e Alcalina.....	14
<b>3.6.4. Diversidade Funcional da População Bacteriana.....</b>	<b>14</b>
<b>3.6.5. Diversidade genética da comunidade Bacteriana da Rizosfera.....</b>	<b>15</b>
3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	16
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
4.1. PARÂMETROS DA CULTURA DO MILHO.....	16
4.1.1. Massa Seca, Teor de , Peso de 100 grão e Produtividade.....	16
4.1.2. Teor de N, Acúmulo de N e Proteína nos Grãos.....	18
<b>4.2 PARÂMETROS ECOLÓGICOS DA COMUNIDADE MICROBIANA DA RIZOSFERA DAS PLANTAS.....</b>	<b>20</b>
4.2.1. Análise Quantitativa de Fungos e Bactérias Totais.....	20
4.2.2. Análise Quantitativa de Bactérias Diazotróficas.....	21
4.2.3 Análises Enzimáticas em Amostras de Solo da Rizosfera.....	23
4.2.3.1. Enzimas Arginase e Urease.....	23
4.2.3.2. Enzimas Fosfatase Ácida e Alcalina.....	25
4.2.4. Diversidade Funcional da População Bacteriana.....	27
4.2.5. Diversidade Genéticas da População Bacteriana em Solo Rizosférico.....	29
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Valores médios de teor de N na parte aérea (N%) para os diferentes métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense*.....18
- Figura 2- Valores médios densidade de Número mais provável (NMPx10<sup>3</sup>) de bactérias diazotróficas da rizosfera de milho sob diferentes métodos de aplicação de inoculante *Azospirillum brasilense*. e doses de N em cobertura.....22
- Figura 3- Valores médios para atividade da arginase das amostras ( $\mu\text{gN-NH}_4^+\text{h}_1\text{g}^{-1}$ . Solo) para os diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio.....24
- Figura 4- Valores médios da atividade da urease das amostras ( $\mu\text{gN-NH}_4^+\text{h}_1\text{g}^{-1}$ . Solo) nos para os diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio.....25
- Figura 5- Valores médios da atividade da fosfatase ácida ( $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$  solo) nos tratamentos de diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio.....26
- Figura 6- Valores médios atividade da fosfatase alcalina ( $\mu\text{g p nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$  solo) nos tratamentos de diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio. ....26
- Figura 7- Soma da atividade total /AWCD (leitura de 590 nm) de utilização de fontes de carbono do extrato microbiano em cada amostra de solo rizosférico com diferentes métodos de aplicação do inoculante e doses de N em cobertura.....27
- Figura 8- Regressão linear do efeito significativo da dose  $p<0,05$  .Soma da atividade total /AWCD (leitura de 590 nm) de utilização de fontes de carbono do extrato microbiano em cada amostra de solo rizosférico inoculadas com diferentes método de aplicação do inoculante e doses de N em cobertura.....28
- Figura 9- Dendrograma representando a diversidade de espécies alocadas em grupos provenientes da rizosfera de plantas de milho sob diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio.....31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos métodos de aplicação do inoculante.....	9
Tabela 2- Médias dos tratamentos para as características de Massa seca-MASP (kg.ha <sup>-1</sup> ), Peso de 100 grãos (g), Produtividade (kg.ha <sup>-1</sup> ) e Produtividade relativa (PGR/control=100).....	19
Tabela 3- Médias dos tratamentos para as características Teor de N no grãos(%), Acúmulo de N no grão (kg.ha <sup>-1</sup> ) e Proteína (g Kg).....	20
Tabela 4- Número de Unidades Formadoras de Colônias para bactéria e e fungos totais (log UFC/g) em meio BDA e Martin, presentes na rizosfera de milho, inoculados sob diferentes métodos de aplicação e doses de N.....	21
Tabela 5- Densidade de bactérias diazotróficas da rizosfera de plantas de milho sob diferentes métodos de aplicação do inoculante e doses de N em cobertura quantificadas Número Mais Provável (NMP x 10 <sup>3</sup> ) bactérias g <sup>-1</sup> solo.....	23
Tabela 6- Índice de Shannon (H) e utilização dos substratos (S) da diversidade funcional de amostras da rizosfera de milho sob diferentes forma de aplicação do inoculante e doses de N.....	29

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. USO DE FERTILIZANTE NITROGENADOS NA AGRICULTURA

O bioma cerrado ocupa uma área de 24% do território brasileiro sendo considerado a última fronteira agrícola do planeta (Borlaug 2002; Resende & Guimarães, 2007). Por muitos anos foi considerado impróprio para o uso agrícola, devido ao fato do solo ser predominante do tipo latossolo que tem como principais características a baixa fertilidade natural, alta acidez e elevadas concentrações de alumínio (Habte 1995; Ferreira *et al.* 2007). Todavia, devido ao emprego de novas tecnologias de cultivo, o desenvolvimento de culturas adaptadas e a melhoria da prática agrícola na região (Rezende 2002), o levou a ser atualmente o maior produtor de grãos do Brasil (Conab 2014).

Para manter um alto padrão produtivo, considerando que a maioria dos solos de regiões tropicais são pobres em N, são aplicadas grandes quantidade de adubos químicos principalmente nitrogenados (Ohland *et al.* 2005; Souza 2006; Bastos *et al.* 2008). Uma vez que o N é um dos macronutrientes essenciais para as plantas, e é encontrado em grandes quantidades como constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios, clorofila, entre outras moléculas (Taiz & Zeiger, 2004). No solo, pode estar na forma de nitrato, amônia, aminoácidos e peptídeos. A forma que as plantas assimilam difere em espécies vegetais, absorvendo principalmente as formas inorgânicas, como nitrato ou amônio (Willians & Miller, 2001; Fageria *et al.* 2003; Souza & Fernandes, 2006). A via de assimilação desse mineral é vital para as necessidades da planta, sendo um processo que controla o crescimento e desenvolvimento e apresenta um efeito marcante sobre a produtividade final (Malavolta, *et al.* 1997; Taiz & Zeiger, 2004; Martins *et al.* 2008).

A importação de fertilizantes para uso agrícola é muito elevada em relação a produção nacional. Somente de fertilizantes nitrogenados é importado 82%, enquanto a produção nacional é somente de 18%. A grande dependência do

mercado externo traz risco de no futuro, o país enfrentar escassez de insumos básicos. Isso ocorre, porque países produtores de fertilizantes, como China, Índia e EUA são também grandes consumidores (ANDA 2011).

O uso constante de insumos químicos e em altas doses contribuem com impactos negativos nos agroecossistemas, através da erosão, contaminação de águas superficiais e subterrâneas, resíduos químicos nos solos, efeitos nos organismos edáficos e aquáticos, danos à saúde humana (Campanhola *et al.* 1997). No caso do N ainda podem ocorrer perdas por volatilização, desnitrificação, lixiviação e emissões de óxido nitroso (Fageria & Baligar, 2005).

Com o aumento populacional, ocorre também uma maior demanda por alimentos (Godfray *et al.* 2010), o que impulsiona o setor agrícola e exige aumentos significativas da produtividade, e como consequência há aumento na utilização de adubos químicos, principalmente, os nitrogenados. Assim, um dos grandes desafios para a agricultura nos próximos anos, será continuar desenvolvendo de forma sustentável, e para isso, é necessário que o setor agrícola aumente a eficiência no uso de fertilizantes. De forma que se produza mais com determinado nível de insumo, ou que produza a mesma proporção aplicando menores doses. Uma das alternativas para aumentar a eficiências no uso de fertilizantes é utilizar fontes alternativas de nutrição como é o caso da fixação biológica de nitrogênio e biodisponibilização de fósforo ( Martha Jr *et al.* 2014).

## 1.2. A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L) é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae (Fornazieri 1999), de metabolismo C4 (Gaut *et al.* 2000), Com origem americana, seus primeiros registros foram encontrados mais precisamente no México (Garcia *et al.* 2006). É uma das culturas mais antigas do mundo, existe há pelo menos 6.000 anos de acordo com estudos realizados através de escavações arqueológicas e medições por desintegração radioativa (Piperno & Flannery, 2001)

O desenvolvimento desse cereal é afetado por uma série de fatores tais como a própria cultivar, o solo, a adubação, o clima, as práticas culturais, as pragas e as moléstias ( Fornasieri-Filho 2007). Esta entre as culturas mais produzidas no Brasil, tem uma grande variedade de utilização na sociedade moderna, sendo um dos produtos agrícolas de maior distribuição mundial, no que se refere à produção e consumo. (Silva 2009). Sua utilização é destinada à fabricação de produtos derivados ou consumidos diretamente para alimentação animal (suínos, bovinos e aves) e humano. Assim é uma cultura com grande destaque na economia tanto nacional, como global.

No cenário de produção mundial do grão o Brasil é o terceiro no ranking, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China, sendo responsável por 8% das 988 milhões de toneladas produzidas segundo levantamentos do USDA (2014). Na safra brasileira 2013/2014 a produção foi de 79.905 milhões de toneladas em uma área de 15,82 milhões de hectares.

Os estados com maior produção desse grão são Mato Grosso, Paraná e Mato grosso do Sul, sendo que 29% da área agrícola do país é destinada ao seu cultivo (CONAB 2014) onde é aplicado em torno de 3,792 milhões de toneladas de adubos sendo a demanda por N de  $20 \text{ kg ha}^{-1}$  de N para cada tonelada de grão produzido (Coelho *et al.* 2010). A exigência dessa cultura por esse nutriente muda conforme os diferentes estádios de desenvolvimento da planta, sendo requerido em pouca quantidade nos estádios iniciais elevando-se com a taxa de crescimento e tendo seu pico durante o florescimento até o início da formação de grãos (Arnon 1975).

O Brasil mesmo sendo o terceiro em produção de grão, ainda apresenta uma baixa produtividade em relação aos dois primeiros lugares( Estados Unidos e China). O que ocorre devido a implantação da cultura em épocas inadequadas, pequena densidade de plantio, o uso de cultivares com pouca adaptação à região e/ou ao sistema de produção inserido, inadequadamente correção e a adubação do solo e o baixo uso de fertilizantes, principalmente a adubação de N em cobertura. (Cruz *et al.* 2009; Fonseca 2014)

### 1.3. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O N está presente em grande quantidade na atmosfera, porém não pode ser prontamente assimilados pelas plantas. A capacidade de reduzir nitrogênio atmosférico a amônia, está restrita a um pequeno grupo de microorganismos denominados diazotróficos, através do processo conhecido como Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (Didonet *et al.* 2000), que acontece devido a presença de um sistema enzimático apropriado, o complexo da nitrogenase (Reis *et al.* 2006).

No Brasil, pesquisas com diazotróficas tiveram início há mais de 40 anos, através da pesquisadora Johanna Döbereiner e seus colaboradores (Moreira *et al.* 2010). Na década de 80 iniciaram os estudos com gramíneas, onde através de técnicas de quantificação da FBN, comprovou-se que algumas dessas espécies de plantas podem obter contribuições significativas de N (Boddey & Döbereiner, 1995).

Estima-se que a maior parte de N fixado anualmente- 175 milhões de Toneladas (65% do total), seja contribuição da FBN, o que faz com que ela seja o segundo processo biológico mais importante do planeta, juntamente com a decomposição da matéria orgânica, atrás apenas da fotossíntese (Moreira & Siqueira, 2002).

No que diz respeito a contribuições da FBN em agroecossistemas, a maior parte ocorre pela associação simbiótica de plantas da família Leguminosae (=Fabaceae) com bactérias pertencentes a diversos gêneros conhecidos como rizóbios. Este tipo de simbiose em leguminosas é facilmente identificado, devido à formação de estruturas especializadas nas raízes chamadas nódulos (Hungria *et al.* 2007). No Brasil a FBN em soja é um exemplo de grande sucesso, através da utilização de inoculantes com *Bradyrhizobium* há a possibilidade de uma economia anual de US\$ 3 bilhões em adubos nitrogenados. O que fez com que ela se tornasse altamente competitiva no mercado mundial por não depender de insumos nitrogenados (Hungria *et al.* 2005).

Em gramíneas no processo de FBN é secretado somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada suprimindo apenas parcialmente as necessidades das plantas. Desse modo, ao contrário das leguminosas, a

inoculação dessas culturas com esses microrganismos, ainda que fixem nitrogênio, não conseguem suprir totalmente as necessidades das plantas em relação ao N (HUNGRIA 2011). O que de acordo com Hungria *et al.* (2010), para a cultura do milho mesmo se for considerada uma substituição parcial de 50% de fertilizantes nitrogenados por biofertilizantes, pode-se conseguir uma economia de cerca 52 kg.ha<sup>-1</sup> de N.

#### 1.4.USO DE INOCULANTES EM MILHO

O uso de inoculantes tem sido utilizados na cultura do milho no intuito de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenado. A inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum*. proporcionam incremento de massa seca, de acúmulo de N nas plantas e produtividade de grãos, principalmente se a associação for entre bactéria e genótipos não melhorados e em condições de baixa disponibilidade de N (Okon & Vanderleyden, 1997)

A aplicação do inoculante em milho, tem como método mais utilizado a inoculação via semente, todavia a utilização de fungicidas e inseticidas no tratamento das mesmas pode causar elevada mortalidade das bactérias (ARAÚJO 2006). Recentemente tem se estudado o uso de métodos alternativos, como é o caso da inoculação via sulco que a apresenta vantagem pela redução dos efeitos tóxicos do tratamento de sementes sobre a população de bactérias fixadoras (Zamariolli & Galvão 2012). Todavia, ainda são necessários mais estudos para que ocorra a recomendação de um método alternativo como acontece na soja onde já se recomenda a inoculação via sulco.

Os benefícios da inoculação com esses tipos de microrganismos vão além da fixação biológica de nitrogênio, razão pela qual as bactérias são classificadas como promotoras de crescimento de plantas (Bashan *et al.* 2004; Hungria, 2011). A morfologia do sistema radicular de plantas inoculadas com *Azospirillum* apresentam alterações, como o aumento do número de radículas e do diâmetro médio das raízes laterais e adventícias, o que beneficia uma melhor exploração do volume do solo e aumenta a superfície de absorção (Bashan *et al.* 2004; Bergamaschi, 2006). Esse

aumento radicular já foi confirmado em estudos realizado por Hungria (2011), onde ocorreu também um aumento na altura das plantas, coloração mais esverdeada pelo maior teor de clorofila em plantas de milho.

Em estudo desenvolvido por Hungria (2011) foi verificado que a inoculação das sementes de milho com *A. brasilense* aumentou a produção de milho em 24% em relação o controle. Cavallet *et al.* (2000) observou aumento significativo de 17% na produtividade de grãos, no comprimento médio das espigas de 13,6 para 14,4cm e aumento de 23 a 64% massa seca da parte aérea de plantas de milho com a inoculação na semente com *Azospirillum brasilense* (Braccini *et al.* 2010).

O uso de bactérias fixadoras de N para incrementar a cultura do milho e outras gramíneas é ainda recente e pouco utilizado, quando comparado com outros organismos biofertilizantes como o rizóbio para a FBN em leguminosas. Tal fato pode ser explicado devido as interações com variadas práticas de manejo da cultura, do solo e diferentes ambientes. Além disso, há necessidade de mais investimentos em pesquisa na área de FBN para plantas não leguminosas, que pode ser justificada pela capacidade que o Brasil tem de gerar economia de fertilizantes nitrogenados entre 30 a 50 kg ha<sup>-1</sup> com adoção da técnica de inoculação com *A. brasilense* no milho (Hungria *et al.* 2010). Assim a FBN é uma tecnologia que pode contribuir para o aumento da produtividade e/ou mitigação de impactos em ecossistemas.

## 1.5. COMUNIDADE MICROBIANA DA RIZOSFERA

O manejo do solo e a exploração da microbiota presente em sistemas agrícolas tem sido estudadas para otimizar a produção e sustentabilidade (Freitas & Rodrigues, 2010). Bactérias e fungos presentes no solo, atuam na decomposição da matéria orgânica do solo, processos vitais como na ciclagem de nutrientes do solo (Whitman *et al.* 1998) e podem ser usados como bioindicadores ecológicos através da estudos da diversidade genética e funcional.

A rizosfera é um ambiente rico em populações microbianas onde acontecem inúmeros processos de interação entre os diferentes grupos de macro e

microrganismos e as plantas (Andrade & Nogueira, 2005). A comunidade microbiana que ali se encontra apresenta uma enorme diversidade em estado de equilíbrio dinâmico, o que reflete diretamente no ambiente físico, químico, biológico e suas relações (Ehrenfeld *et al.* 2005). Sendo que esses microrganismos podem ser influenciados pelas espécies de plantas, devido a diferenças na exsudação radicular e rizodeposição em diferentes regiões da raiz (Costa *et al.* 2006).

Na agricultura existe um interesse em microrganismos que desempenham funções específicas no solo ou que fazem associações com plantas como é o caso das diazotróficas (Röesch 2007). Dentre as bactérias que fixam N e são capazes de se associarem a gramíneas, as do gênero *Azospirillum* são as mais estudadas, principalmente as espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* que juntamente à *A. amazonense* têm sido encontradas em associações com plantas de milho, arroz, sorgo e gramíneas forrageiras (Reis *et al.* 2006).

Microrganismos fixadores também são produtores de fitormônios vegetais como auxinas (Reis *et al.* 2006), solubilização de fosfato inorgânico (Verma *et al.* 2001), e ações indiretas como o controle biológico (Benchimol *et al.* 2000), produção de sideróforos (Lodewyckx *et al.* 2002) e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (Jetiyanon & Kloepper, 2002). Apresentam competitividade durante o processo de colonização por terem versatilidade no metabolismo de N e Carbono (C). Como fontes de C têm preferência pelos ácidos orgânicos como malato, piruvato e succinato, sendo também utilizadas frutose e glucose (Quadros 2009). Quanto às fontes de N, as principais são amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e N<sub>2</sub> (Trentini 2010).

O conhecimento sobre essa diversidade de espécies presentes na comunidade microbiana somente foi possível graças aos avanços de estudos em técnicas moleculares, onde é possível a identificação de espécies diretamente da amostragem. O que representou um grande avanço, uma vez que nem todos os microrganismos são possíveis de ser cultivados em laboratório.

## 2. OBJETIVO

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes métodos de inoculação do *Azospirillum* em milho visando aperfeiçoar o uso desta tecnologia como aporte de nitrogênio nessa cultura.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência de seis métodos de inoculação com *Azospirillum* sobre o rendimento da cultura do milho
- Avaliar a influência de três doses de N sobre a resposta à inoculação com *Azospirillum*
- Avaliar os impactos da inoculação com *Azospirillum* sobre a ecologia microbiana da rizosfera de plantas de milho.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. HÍBRIDO DE MILHO E AZOSPIRILLUM

Foi utilizado o híbrido simples BRS1055 desenvolvido pelo programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo. O inoculante utilizado foi obtido a partir da mistura de duas estirpes de *Azospirillum brasilense* homólogas, na proporção 1:1, pertencentes à coleção de bactérias diazotróficas do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo – Embrapa Milho e Sorgo.

### 3.2. FATORES EXPERIMENTAIS

Foram avaliados, seis métodos de aplicação do inoculante e um tratamento sem inoculação ( controle) (Tabela 1) em diferentes doses de N. Para isso, realizou-se a adubação de base utilizando 300 Kg.ha<sup>-1</sup> do formulado 8-28-16 (N-P-K). A adubação em cobertura foi efetuada 30 dias após a germinação em três níveis diferentes (N0: sem aplicação de N; N1: aplicação de 40 kg.ha<sup>-1</sup> de N; e, N2: aplicação de 80 Kg.ha<sup>-1</sup> de N). A fonte de Nitrogênio utilizada em cobertura foi na forma de Uréia.

Tabela 1 – Descrição dos métodos de aplicação do inoculante.

Métodos de inoculação	
1	Inoculante aplicado no sulco
2	Inoculante aplicado na semente
3	Inoculante aplicado em pulverização-10 dias após a germinação (DAG)
4	Inoculante aplicado no sulco + pulverização-20 DAG
5	Inoculante aplicado na semente + pulverização-20 DAG
6	Inoculante aplicado em pulverização-10 DAG + 20 DAG
7	Sem inoculante/controle

### 3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A condução do experimento ocorreu em área experimental da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, na safra 2012-2013.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com parcelas subdivididas e quatro repetições. Os níveis de nitrogênio foram distribuídos nas parcelas enquanto as formas de inoculação nas subparcelas. Essas foram constituídas de 4 linhas de 6 m de comprimento espaçadas de 0,7 m entre linhas e 0,2m entre plantas. Para a área útil da subparcela foram consideradas as duas linhas centrais.

### 3.4. PREPARO DO INOCULANTE

O inoculante foi preparado de acordo com a metodologia utilizada por Oliveira *et al* (2012). A estirpe selecionada foi cultivada em caldo de soja triplicaseína, durante 72h, a temperatura de 29°C sob agitação constante. Após esse período, as culturas foram centrifugadas, ressuspendidas em solução salina (0,85% NaCl) e ajustadas para densidade ótica igual a 1,0 a 500 nm, que equivale a aproximadamente  $10^8$  células viáveis por mL.

A inoculação nas sementes foi realizada com adição de suspensão de célula (inoculante) a sementes, utilizando-se carvão vegetal moído como veículo e goma de fécula de mandioca. A inoculação ocorreu no laboratório e, após concluída, realizou-se o plantio. A inoculação via sulco e pulverização foi realizada com a suspensão em forma líquida através de aplicador de CO<sub>2</sub>.

### 3.5. PARÂMETROS AVALIADOS NA CULTURA DE MILHO

Durante o estágio de florescimento, foram coletadas três plantas/por subparcela para avaliar o acúmulo de massa seca e teor de nitrogênio. Ao final do ciclo, foi determinado o acúmulo de N, produção de grãos, peso de 100 grãos e teor de proteínas nos grãos.

#### 3.5.1. Determinação da Massa Seca e teor de N na parte aérea

Para determinação da massa seca dos tecidos vegetais as três plantas coletadas por subparcela foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, sob temperatura de 65°C até atingir massa constante. Posteriormente, as amostras foram pesadas e a variável expressa em Kg.ha<sup>-1</sup>.

Após a determinação da massa seca, as plantas foram moídas para retirada de uma subamostra de 300g para análise de determinação do teor de N na parte

aérea. Elas foram analisadas de acordo com o metodologia de Dumas, que consiste na oxidação total da amostra na presença de oxigênio em elevadas temperaturas, seguida de redução dos óxidos de nitrogênio e detecção do nitrogênio molecular produzido. Para isso utilizou-se de um analisador de Nitrogênio, marca LECO, modelo FP-528, provido de carrossel-amostrador com 35 posições.

### **3.5.2. Produtividade de Grãos , Peso de 100 grãos, Teor de N no Grão, Teor de proteína e Acúmulo de N nos grãos**

Para avaliar a produtividade de grãos, as espigas foram colhidas nas duas linhas centrais das subparcela, eliminando 0.7m nas extremidades. Retirou-se toda a palha das espigas, e procedeu-se a debulha dos grãos de cada subparcela. Posteriormente foi determinado o peso de grãos, o qual foi corrigido para umidade 13% e expresso em  $\text{Kg.ha}^{-1}$ . Foi realizada a contagem de 100 grãos de cada subparcela e posteriormente a pesagem.

Para determinação do teor de N nos grãos, uma amostra de grãos de cada subparcela foi seca sob temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$  até atingir massa constante. Posteriormente as amostras foram moídas e o teor de N determinado pela metodologia de proposta por Dumas. Posteriormente, os valores obtidos foram multiplicado por 6,25 para obtenção do teor de proteína no grão. O teor de N, também foi multiplicado pela produtividade para obtenção do acúmulo de N no grão.

### **3.6. PARÂMETROS ECOLÓGICOS DA COMUNIDADE MICROBIANA DA RIZOSFERA DAS PLANTAS**

A coleta de amostras de solo rizosférico para a avaliação de parâmetros ecológicos foi realizada durante o estágio de florescimento. As plantas foram retiradas do solo com o sistema radicular inteiro. As raízes foram sacudidas e somente o solo aderido às raízes foi considerado como solo rizosférico. Este foi colocado em sacos plásticos

estéreis, peneirado e armazenado em recipiente de vidro e conduzido ao laboratório para análise.

### **3.6.1. Análise Quantitativa de Fungos e Bactérias Totais**

A análise quantitativa de fungos e de bactérias em amostras de solo da rizosfera das plantas foi realizada através da pesagem de amostras de 5g de solo rizosférico que foram suspensas em 45 mL de solução salina (NaCl, 0,85% p/v) e agitadas durante 1 hora em temperatura ambiente, em agitador de mesa rotatório. Posteriormente retirou-se uma alíquota de 1mL para realização de diluições seriadas decimais de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  para a contagem de microrganismos.

As alíquotas retiradas foram de 0,1  $\mu$ l da diluição  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , posteriormente transferidas para placas contendo o meio de cultura sólido para bactérias (BDA) e fungos (Martin) respectivamente, usando fungicida e antibiótico. Após a incubação durante 5 dias, efetuou-se a contagem das colônias e os resultados foram expressos em unidade formadora de colônias por gramas de solo (UFC  $g^{-1}$  solo).

### **3.6.2. Análise Quantitativa de Bactérias Diazotróficas**

O método utilizado para a contagem de bactérias diazotróficas foi o Número Mais Provável (NMP), conforme descrito por Döbereiner *et al.* (1995). Onde se inoculou 0,1mL de cada diluição em vidros de penicilina, contendo 5 mL de meios de cultura NFB semi-sólido. Após esse período, realizou-se a contagem das bactérias nas amostras, baseando-se na presença de película característica de bactérias diazotróficas, nos meios de cultura. Usou-se a tabela de McCrady (DÖBEREINER *et al.* 1995) para determinar, pelo método estatístico, a população de bactérias presente nas amostras.

### 3.6.3. Análise Enzimática em Amostras de Solo da Rizosfera

Realizou-se a análise das atividades das enzimas arginase e urease envolvidas na dinâmica de nitrogênio e fosfatase ácida e alcalina envolvidas na dinâmica de fósforo. A atividade da arginase (taxa de hidrólise da arginina) foi determinada através do método proposto por Alef & Kleiner (1986). A atividade da uréase (taxa de hidrólise da ureia) foi verificada através do método proposto por Kandeler & Gerber (1988). A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro a (660nm).

A determinação da atividade das fosfatases ácida e alcalina foi analisada seguindo o método preconizado por Tabatabai et al. (1994). Ele se fundamenta na análise da concentração de p-nitrofenol resultante da hidrólise enzimática de p-nitrofenil fosfato.

#### 3.6.3.1. Enzima arginase

Amostras de 1,0 g de solo foram colocadas em tubos falcon tratadas com 0,25 mL de solução de L-arginine (0,2 g/L) e incubadas por duas horas, a 37 °C. Após a incubação, adicionou-se 4 mL de solução de KCl, 1M em cada amostra que ficaram sob agitação por 30 minutos. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante de cada amostra foi retirada e misturada a 1,0 mL da solução de reagentes para colorimetria. Após sessenta minutos, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 660 nm.

#### 3.6.3.2. Enzima urease

Amostras de 0,5 g de solo foram tratadas com 0,25 mL de solução de ureia (4,8 g/L) e incubadas por uma hora a 37 °C. Após a incubação, adicionaram-se 5mL

de solução de KCl, 1 M em cada amostra que ficaram sob agitação por 30 minutos. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante de cada amostra foi retirada e misturada a 1,0 mL da solução de reagentes para colorimetria. Após sessenta minutos, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 660 nm.

### 3.6.3.3. Fosfatase Ácida e Alcalina

Amostras de 0,15 g de solo foram colocadas em microtubos e tratadas com 0,48 mL de solução contendo TRIS e os ácidos málico, cítrico e bórico. O pH dessa solução é ajustado de acordo com a fosfatase, 6,5 para ácida e 11 para alcalina. Depois adicionou-se solução aquosa de p-nitrofenil fosfato 0,05M e deixou-se incubado por uma hora a 37°C. Após a incubação, adicionou-se 0,12 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> e 0,48 mL de NaOH, seguindo-se à centrifugação a 8000g e leitura a 400nm

### 3.6.4. Diversidade Funcional da População Bacteriana

A determinação da diversidade funcional bacteriana foi realizada através da metodologia descrita por Zak *et al.* (1994). Amostras de 5 g de solo foram suspensas em 90 mL de solução salina (0,85% NaCl) e agitadas em um agitador de bancada por um período de 30 min. Cerca de 5 mL dessa suspensão foram centrifugados a 1.900 g (Super T21, Sorvall, EUA) durante 15 min. Alíquotas de 120µL do sobrenadante foram transferidas para cada cavidade das placas EcoPlate (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA) que é composta por três grupos de 31 substratos diferentes (ácidos carboxílicos, carboidratos, polímeros, aminoácidos, amidos), além do controle (cavidade sem substrato). As placas foram incubadas no escuro durante 5 dias, com realizações de leitura no intervalo de 24, 48, 72, 96 e 120 horas em um espectrofotômetro leitor de placas (Labsystems, MultSkán, MS, EUA), em 590 nm,

onde foi medido o desenvolvimento da cor pela oxidação de substratos durante a respiração dos microrganismos. Utilizou-se a leitura de 72 horas para cálculos dos componentes da diversidade funcional. Os componentes da diversidade funcional, atividade total (AWCD), utilização dos substratos (S) e índice de Shannon (H) foram estimados de acordo com Zak *et al.* (1994). Os valores da atividade total foram transformados utilizando-se a média das leituras dos 31 substratos de cada amostra e repetição por AWCD (Average Well Colour Development), por meio da divisão da atividade de utilização dos substratos - leitura em absorbância (nm) da cor desenvolvida - em cada cavidade pelo valor médio da leitura da placa inteira (GARLAND & MILLS, 1991). Os valores acima de zero foram considerados como reação positiva, e evidenciam a utilização de substratos e os valores negativos, a ausência de uso do substrato.

### **3.6.5.. Diversidade genética da comunidade Bacteriana da Rizosfera**

Avaliou-se a diversidade genética das bactérias através da extração do DNA do solo rizosférico, reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Utilizou-se como amostragem duas repetições e cinco métodos de inoculação e sem inoculante, nas três doses de N.

O DNA total da população de bactérias foi extraído a partir de 0,25 mg de solo das amostras, com uso do protocolo do kit de extração de DNA MOBIO *Power Soil*.

Os fragmentos de DNA foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR), com os "primers" universais para bactérias (região 16S) 968F GC e R1401(NÜBEL *et al.* 1996). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 30 seg; 56°C por 30 seg, 72°C por 1 min; 72 ° C por 5 min e 10° C.

Para a realização da Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE), os produtos da PCR foram aplicados em gel de 6% de poliacrilamida em tampão TAE 0,5X (Tris-acetate 20 mM e EDTA 0,5 mM), contendo um gradiente de

40 a 65% de agentes desnaturantes (ureia e formamida deionizada). A eletroforese foi realizada em um equipamento DCode™ Detection Mutation System (Bio-Rad, California, USA). O gel foi submetido à eletroforese durante 16 horas a 60 °C e 75V e corado em solução de Gel Red™ (Biotium, Hayward, Califórnia, USA) diluída 3.300 x em 0,1 M NaCl por 30 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, Rochester, NY, USA).

As bandas obtidas no DGGE, foram analisados utilizando o software BioNumerics versão 6.0 (Applied Maths, St. MartensLatem, Belgium). As imagens digitalizadas foram convertidas e normalizadas usando o marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA). Os padrões foram integrados, a similaridade foi calculada utilizando correlação de Pearson (HÄNE *et al.* 1993). Para a análise de agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean).

### 3.7. ANALISES ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise de variância e comparações de médias pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade para as características avaliadas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os aplicativos computacional Sisvar (2010).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PARÂMETROS DA CULTURA DO MILHO

#### 4.1.1. Massa Seca, Teor de , Peso de 100 grão e Produtividade

A massa seca avaliada nos diferentes métodos de inoculação apresentaram valores médios que variaram entre 4.888 Kg.ha<sup>-1</sup> para a inoculação na semente na dose de 80 Kg.ha<sup>-1</sup> de N e 7.570 Kg.ha<sup>-1</sup> para a inoculação Pulverização 10 DAG + 20 DAG na dose 0. O método de inoculação que apresentou maior acréscimo de

massa seca foi o de inoculação Pulverização 10 DAG + 20 DAG na dose 0, com média de valores de  $7.570 \text{ Kg.ha}^{-1}$ . Os resultados demonstram que não existe significativas ( $p < 0,05$ ) para essa característica (Tabela 2).

Quanto ao teor de N na parte aérea, há diferença estatística significativa a ( $p < 0,05$ ), para método de aplicação do inoculante (Figura 1). De acordo com o teste de média a 5%, as aplicação via inoculante na Semente + Pulverização 20 DAG na dose de  $40 \text{ Kg.ha}^{-1}$ , foram as que apresentaram diferentes das demais, no entanto elas são semelhante ao sem inoculante, fazendo com que esse efeito não seja considerado. Os valores médios que variaram entre 1,09 N(%) para aplicação via Pulverização 10 DAG + 20 DAG na dose 0 a 1,32 N (%) com inoculação via semente + Pulverização 20 DAG na dose de  $40 \text{ Kg.ha}^{-1}$ .

Análises para verificação do peso de 100 grão dos diferentes métodos de aplicação do inoculante apresentou valores médios de 24,85g, para o tratamento controle e 28,74g, para a inoculação via Pulverização 10 DAG na dose de  $80 \text{ Kg.ha}^{-1}$ , não sendo significativo a ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). O que foi observado também para a produtividade de grãos, que alcançou valores médios de  $4.871 \text{ kg.ha}^{-1}$  a  $7.337 \text{ Kg.ha}^{-1}$ , para o tratamento com inoculação via Pulverização 10 DAG na dose 0, e com a inoculação por Sulco na dose de  $40 \text{ Kg.ha}^{-1}$ . Mesmo na análise de variância não sendo encontradas diferenças estatísticas é possível observar que a produtividade relativa de grãos (PRG) com a inoculação na sulco na dose  $40 \text{ Kg.ha}^{-1}$  aumentou 32% em relação ao controle (Tabela 2)

Os métodos de aplicação apresentam comportamentos diferentes dependendo da dose de N, algumas apresentaram decréscimo e outras acréscimo. O método de aplicação de inoculante no sulco, semente, Pulverização 10 DAG +20 DAG e Sem inoculante apresentaram um melhor acréscimos na produção já na dose de  $40 \text{ Kg.ha}^{-1}$  com incrementos de 32, 19, 27 e 27% respectivamente, não tendo o mesmo desempenho na dose de  $80 \text{ Kg.ha}^{-1}$ .

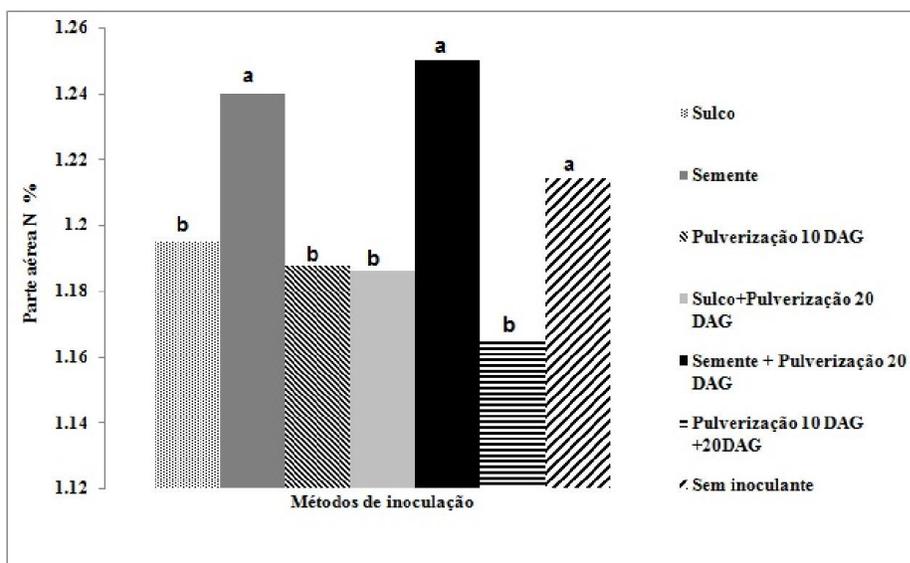


Figura 1- Valores médios de teor de N na parte aérea (N%) para os diferentes métodos de inoculação com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Scott Knott.

#### 4.1.2. Teor de N, Acúmulo de N e Proteína nos Grãos

Os dados obtidos com a análise do teor de N nos grãos obteve valores de 1,65 % com inoculação via sulco+Pulverização 20 DAG na dose de 40 Kg. ha<sup>-1</sup> a 1,92%, no método semente+ Pulverização 20 DAG. Porém, não foram significativos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3).

Quanto a característica de acúmulo de N nos grãos foi possível verificar que de acordo com análise realizada, não teve efeitos significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. As médias observadas foram de 8.61 Kg.ha<sup>-1</sup> a 13.83 Kg.ha<sup>-1</sup> para inoculação via Pulverização 10 DAG na dose 0 e aplicação do inoculante no Sulco na dose de 40 Kg.ha<sup>-1</sup> de N respectivamente (Tabela 3).

Os tratamentos também foram avaliados quanto ao teor de proteína nos grãos, as médias apresentaram variações entre 10,28 gKg.ha<sup>-1</sup>, para a inoculação no Sulco + Pulverização 20 DAG na dose de 40Kg.ha<sup>-1</sup>, a 12,00 gKg.ha<sup>-1</sup>, para o tratamento com inoculação na Semente + Pulverização 20 DAG na dose 0. Os

resultados não foram considerados significativos ( $p < 0,05$ ) de acordo com a análise de variância (Tabela 3).

Tabela 2- Médias dos tratamentos para as características Massa seca-MASP ( $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ ), Peso de 100 grãos (g), Produtividade ( $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ ) e Produtividade relativa (PGR/controlado=100)

Metódo de aplicação	Dose	MASP ( $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ )	Peso de 100 grãos (g)	Produtividade ( $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ )	PGR (controlado=100)
Sulco	0	7.032a	26a	6.258a	112%
Semente	0	4.986a	25a	5.831a	105%
Pulverização 10 DAG	0	6.305a	26a	4.872a	87%
Sulco+Pulverização 20 DAG	0	6.763a	26a	6.142a	110%
Semente + Pulverização 20 DAG	0	5.796a	26a	5.012a	90%
Pulverização 10 DAG +20DAG	0	7.570a	25a	6.124a	110%
Sem inoculante/ controle	0	6.307a	27a	5.575a	100%
Sulco	40 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	7.055a	27a	7.338a	132%
Semente	40 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	5.875a	28a	6.632a	119%
Pulverização 10 DAG	40 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	6.154a	27a	5.722a	103%
Sulco+Pulverização 20 DAG	40 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	6.866a	27a	6.336a	114%
Semente + Pulverização 20 DAG	40 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	5.692a	28a	6.503a	117%
Pulverização 10 DAG +20DAG	40 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	6.192a	27a	7.071a	127%
Sem inoculante	40 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	7.221a	27a	7.067a	127%
Sulco	80 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	5.615a	27a	5.592a	100%
Semente	80 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	4.888a	27a	5.836a	105%
Pulverização 10 DAG	80 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	6.804a	27a	6.598a	118%
Sulco+Pulverização 20 DAG	80 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	6.060a	28a	6.868a	123%
Semente + Pulverização 20 DAG	80 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	6.565a	29a	7.212a	129%
Pulverização 10 DAG +20DAG	80 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	6.430a	27a	5.767a	103%
Sem inoculante	80 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	6.905a	28a	6.588a	118%

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si a 5% pelo teste de Scott e Knott.

Tabela 3- Médias dos tratamentos para as características Teor de N no grãos(%), Acúmulo de N no grão (kg.ha<sup>-1</sup>) e Proteína (g Kg)

Metódo de aplicação	Dose	Teor de N no grão (%)	Acúmulo de N no grão (Kg.ha <sup>-1</sup> )	Proteína (g kg)
Sulco	0	1,88a	12a	12a
Semente	0	1,85a	11a	12a
Pulverização 10 DAG	0	1,76a	9a	11a
Sulco+Pulverização 20 DAG	0	1,86a	11a	12a
Semente + Pulverização 20 DAG	0	1,92a	10a	12a
Pulverização 10 DAG +20DAG	0	1,77a	11a	11a
Sem inoculante/ controle	0	1,72a	9a	11a
Sulco	40Kg.ha <sup>-1</sup>	1,88a	14a	12a
Semente	40Kg.ha <sup>-1</sup>	1,90a	13a	12a
Pulverização 10 DAG	40Kg.ha <sup>-1</sup>	1,68a	10a	11a
Sulco+Pulverização 20 DAG	40Kg.ha <sup>-1</sup>	1,65a	10a	10a
Semente + Pulverização 20 DAG	40Kg.ha <sup>-1</sup>	1,86a	12a	12a
Pulverização 10 DAG +20DAG	40Kg.ha <sup>-1</sup>	1,74a	12a	11a
Sem inoculante	40Kg.ha <sup>-1</sup>	1,70a	12a	11a
Sulco	80Kg.ha <sup>-1</sup>	1,77a	10a	11a
Semente	80Kg.ha <sup>-1</sup>	1,70a	10a	11a
Pulverização 10 DAG	80Kg.ha <sup>-1</sup>	1,81a	12a	11a
Sulco+Pulverização 20 DAG	80Kg.ha <sup>-1</sup>	1,80a	12a	11a
Semente + Pulverização 20 DAG	80Kg.ha <sup>-1</sup>	1,79a	13a	11a
Pulverização 10 DAG +20DAG	80Kg.ha <sup>-1</sup>	1,74a	10a	11a
Sem inoculante	80Kg.ha <sup>-1</sup>	1,67a	11a	10a

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si a 5% pelo teste de Scott e Knott.

## 4.2. PARÂMETROS ECOLÓGICOS DA COMUNIDADE MICROBIANA DA RIZOSFERA DAS PLANTAS

### 4.2.1. Análise Quantitativa de Fungos e Bactérias Totais

A análise de microrganismo da rizosfera através de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) totais a partir de amostras de solo em diferentes meios de cultura, demonstram que não existe diferenças significativas  $p < (0,05)$  entre as colônias presentes em meio de cultura para bactérias e fungos, conforme pode ser

observado na (Tabela 4). Os métodos de inoculação e as doses de N aplicados não influenciaram microrganismo provenientes da rizosfera, pois todos os métodos apresentaram números de colônias log UFC g<sup>-1</sup> entre 4,38 e 6,89, próximos ao controle 6,79.

Tabela 4- Número de Unidades Formadoras de Colônias para bactéria e e fungos totais (log UFC/g) em meio BDA e Martin, presentes na rizosfera de milho, inoculados sob diferentes métodos de aplicação e doses de N.

Método de inoculação	Densidade log (UFC g <sup>-1</sup> de solo)					
	Dose de N em cobertura (Kg.ha <sup>-1</sup> )					
	0	40	80	0	40	80
	BDA/Bactérias			MARTIN/ Fungos		
Sulco	6,80a	6,79a	6,72a	4,49a	4,65a	4,62a
Semente	6,87a	6,79a	6,54a	4,60a	4,30a	4,38a
Pulverização 10 DAG	6,72a	6,69a	6,69a	4,30a	4,49a	4,51a
Sulco+Pulverização 20 DAG	6,76a	6,64a	6,75a	4,51a	4,46a	4,44a
Semente + Pulverização 20 DAG	6,73a	6,60a	6,84a	4,67a	4,33a	4,57a
Pulverização 10 DAG +20DAG	6,80a	6,67a	6,80a	4,69a	4,49a	4,71a
Sem inoculante	6,79a	6,70a	6,60a	4,64a	4,57a	4,56a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a (p<0,05) de acordo com o teste Scott Knott.

#### 4.2.2. Análise Quantitativa de Bactérias Diazotróficas

A população microbiana também foi avaliada através de bactérias diazotróficas realizada através NMP (número mais provável). Onde os resultados demonstram que existe diferenças a p<(0,05) para os métodos de aplicação de inoculação e para a interação modo de aplicação x dose. De acordo com os resultados obtidos, os modos de aplicação via Pulverização 10 DAG e Pulverização 10 DAG + 20 DAG, diferem dos demais pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade (Figura 2), sendo que estes tratamentos apresentaram valores de densidade de 59 e 51 x 10<sup>3</sup> bactérias g<sup>-1</sup> solo (Figura 2). Em relação a interação

modo de aplicação inoculante x dose, que também foi significativa, elas aconteceram dentro de todas as doses (Tabela 5), na dose 0, a inoculação via sulco+ pulverização 20 DAG, Pulverização 20 DAG + 20 DAG e sem inoculante (controle) formaram um grupo com valores de densidade de bactérias  $\text{g}^{-1}$  solo mais elevados que para os outros tratamentos, sendo que esses valores ficaram entre  $72,83$  e  $63 \times 10^3$ . Na dose de  $40 \text{ Kg.ha}^{-1}$  de N em cobertura, a inoculação por pulverização 10 DAG e por pulverização 10 DAG + 20 DAG, com valores de densidade de bactérias de  $68$  e  $57 \times 10^3$ , respectivamente, alocaram-se em um grupo diferente dos demais métodos de aplicação, apresentando valores maiores que o controle. Na dose de  $80$ , os métodos de inoculação que apresentaram densidades mais elevadas, foram os tratamento com inoculação na semente  $56 \times 10^3$  e Pulverização 10 DAG com  $94 \times 10^3$ , sendo estes superiores aos demais métodos e ao controle (sem inoculação).

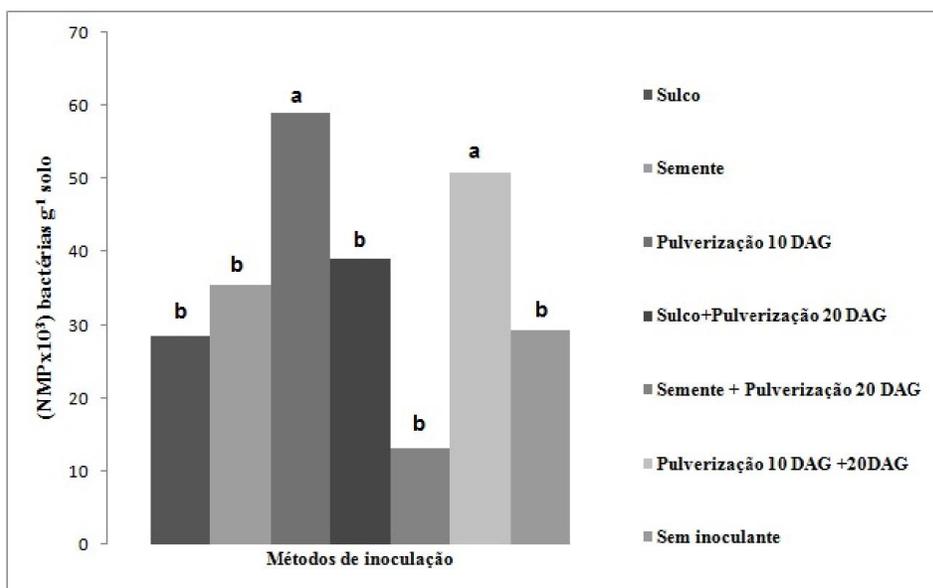


Figura 2- Valores médios densidade de Número mais provável (NMPx10<sup>3</sup>) de bactérias diazotróficas da rizosfera de milho sob diferentes métodos de aplicação de inoculante *Azospirillum brasilense*. e doses de N em cobertura. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Scott Knott.

Tabela 5- Densidade de bactérias diazotróficas da rizosfera de plantas de milho sob diferentes métodos de aplicação do inoculante e doses de N em cobertura quantificadas Número Mais Provável (NMP x 10<sup>3</sup>) bactérias g<sup>-1</sup> solo.

Método de inoculação	(NMP x 10 <sup>3</sup> ) bactérias g <sup>-1</sup> solo		
	Dose de N em cobertura (Kg.ha <sup>-1</sup> )		
	0	40	80
	(NMP x 10 <sup>3</sup> ) bactérias g <sup>-1</sup> solo		
Sulco	41Ab	15Ad	30Af
Semente	26Ab	24Ad	56A e
Pulverização 10 DAG	15Ab	68Ac	94Ae
Sulco+Pulverização 20 DAG	72Aa	7Ad	38Af
Semente + Pulverização 20 DAG	21Ab	13Ad	5Af
Pulverização 10 DAG +20 DAG	83Aa	57Ac	14Af
Sem inoculante	63Aa	3Ad	22Af

Médias seguidas pelas mesmas letra na coluna não diferem entre si a ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Scott Knott.

#### 4.2.3 Análises Enzimáticas em Amostras de Solo da Rizosfera

##### 4.2.3.1. Enzimas Arginase e Urease

Entre as enzimas analisadas, a arginase apresentou sensibilidade para os tratamentos, onde foi observado diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para a interação inoculação x dose. As médias para essa característica apresentou valores de 19,81 e 36,78  $\mu\text{gN-H}_4\text{+h}^{-1}\text{g}^{-1}$ , para os métodos inoculação na semente + inoculação via foliar 20 DAG na dose de 80  $\text{kg.ha}^{-1}$  e para a inoculação via foliar 10 DAG + 20 DAG sem adubação de cobertura respectivamente. A análise do teste de Scott-Knott a ( $p < 0,05$ ) demonstra que houve diferença entre as médias dos tratamentos na dose em que não ocorreu a adubação de cobertura e na dose de 80  $\text{Kg.ha}^{-1}$ . Na dose sem adubação de N, o método via foliar 10 + 20 DAG diferiu dos demais tratamentos, apresentando o valor da atividade da arginina mais elevado, com média de 36,78

$\mu\text{gN-NH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ . Na dose de  $80\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  a inoculação sulco, semente, pulverização 10 DAG, Sulco + pulverização 20DAG, pulverização 10 DAG+20DAG diferiram das demais (Figura 3).

Já em relação a urease, outra enzima envolvida na ciclagem de N não houve diferença significativa entre os tratamentos. As médias dos valores observados para a atividade desta enzima variaram entre  $217,69 \mu\text{gN-NH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$  para a aplicação de inoculante na semente + inoculação via foliar 20 DAG, sem adubação de cobertura, a  $387,62 \mu\text{g N-NH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ , para inoculação na semente e adubação de cobertura de  $80 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$  (Figura 4).

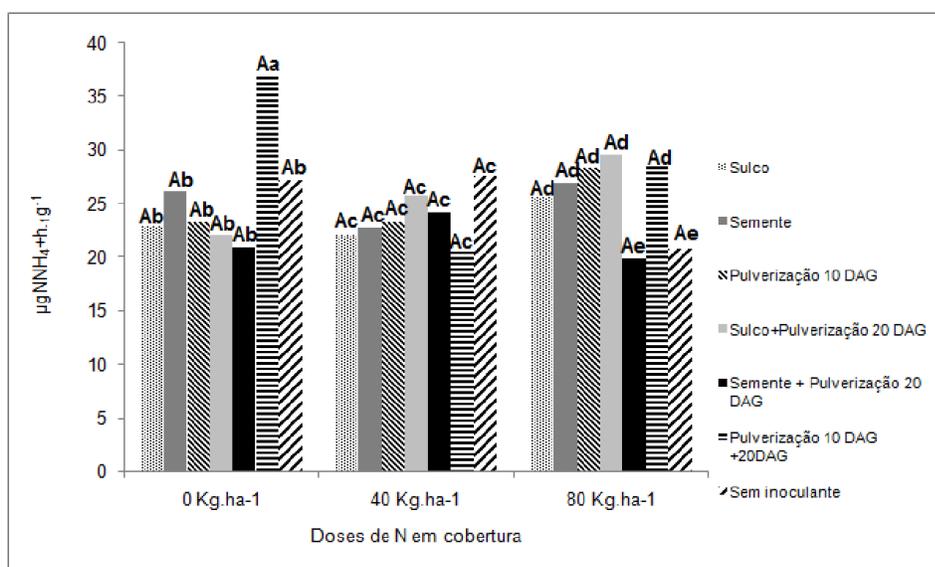


Figura 3- Valores médios para atividade da arginase das amostras ( $\mu\text{gN-NH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ . Solo) para os diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio. Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott-Knott para a interação dose inoculação.

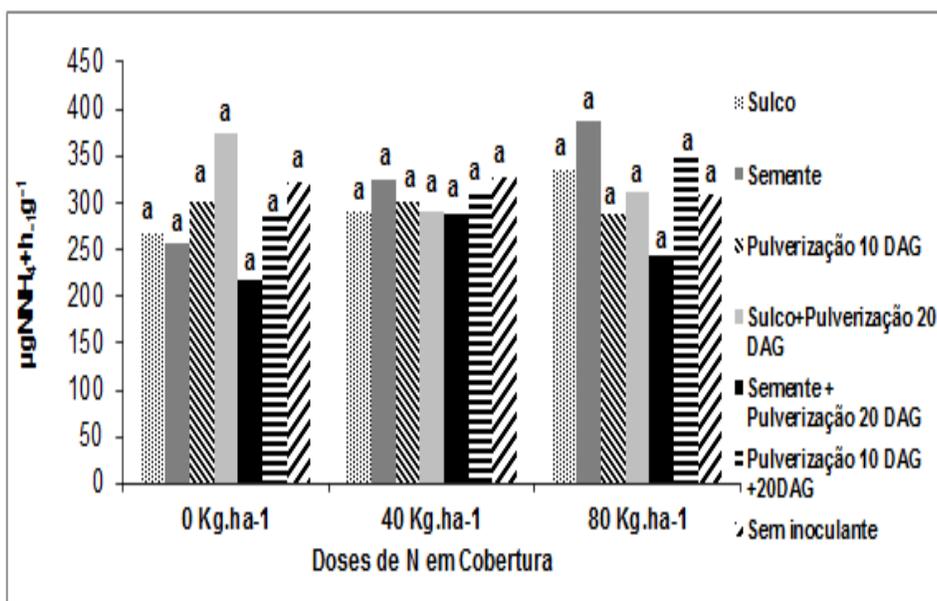


Figura 4- Valores médios da atividade da urease das amostras ( $\mu\text{gN-NH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ . Solo) nos para os diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio. Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si 5% pelo teste de Scott-Knott.

#### 4.2.3.2. Enzimas Fosfatase Ácida e Alcalina

Os dados obtidos para as enzimas da ciclagem de fósforo, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos analisados. As médias dos valores para a fosfatase ácida variaram entre 1551 a 2508  $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$  para a inoculação via Semente + Pulverização 20 DAG dose 0 de N e inoculação Sulco + Pulverização 20 DAG dose de 80  $\text{Kg.ha}^{-1}$  de N respectivamente. (Figura 5). A fosfatase alcalina apresentou variações entre 2148  $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$  solo, para a inoculação no sulco na dose onde não houve adubação, a 2867  $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$  solo, para o tratamento sem inoculação na dose de 80  $\text{Kg.ha}^{-1}$  N (Figura 6)..

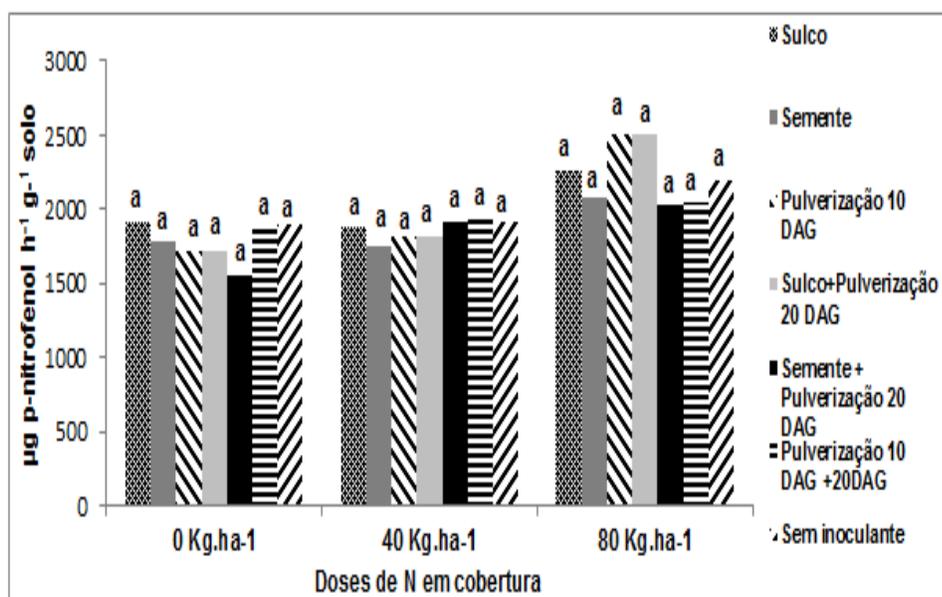


Figura 5- Valores médios da atividade da fosfatase ácida ( $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ solo}$ ) nos tratamentos de diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio. Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si 5% pelo teste de Scott-Knott.

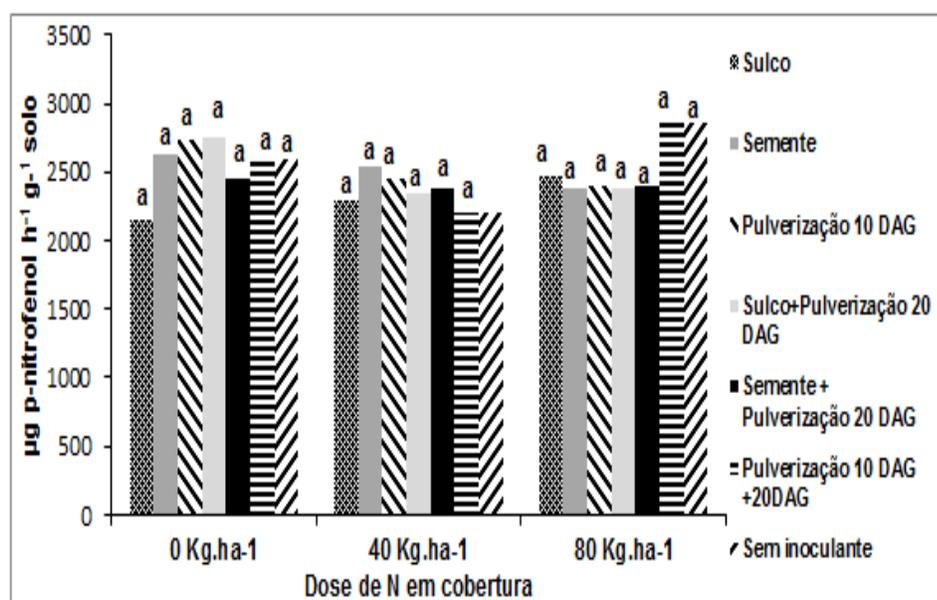


Figura 6- Valores médios atividade da fosfatase alcalina ( $\mu\text{g p nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ solo}$ ) nos tratamentos de diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio. Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si 5% pelo teste de Scott-Knott

#### 4.2.4. Diversidade Funcional da População Bacteriana

Buscando compreender melhor as populações de microrganismos da rizosfera de milho, sob diferentes métodos de aplicação do inoculante e doses de N, foi verificada a diversidade funcional desses microrganismos. Através do uso do sistema Biolog foi possível verificar que a soma da atividade de utilização de fontes de carbono expresso em AWCD, teve variações ao longo do tempo de incubação (Figura 7). As análises de variâncias realizadas no tempo de incubação de 72 horas mostrou que existem diferenças significativas  $p < (0,05)$  para a dose de N aplicada, o que gerou uma regressão linear (Figura 8), mostrando que a atividade de utilização dos substratos aumentou de acordo, conforme ocorria o aumento da dose N aplicada.

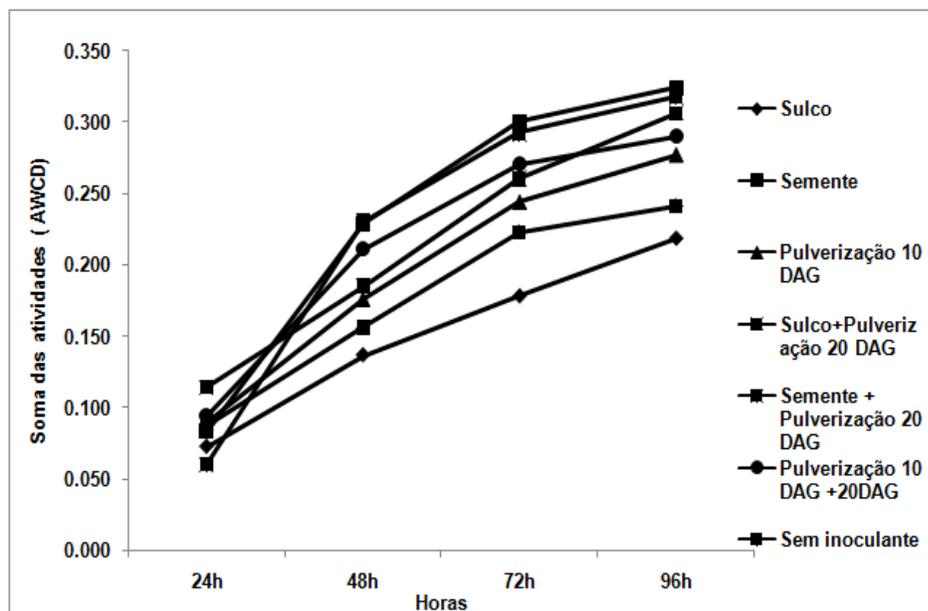


Figura 7- Soma da atividade total /AWCD (leitura de 590 nm) de utilização de fontes de carbono do extrato microbiano em cada amostra de solo rizosferico com diferentes métodos de aplicação do inoculante e doses de N em cobertura.

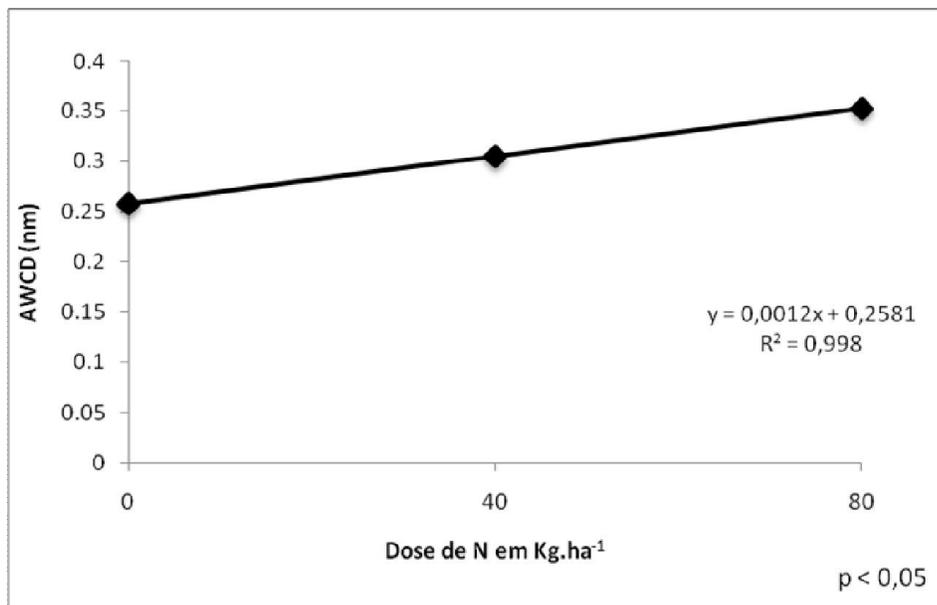


Figura 8- Regressão linear do efeito significativo da dose  $p < 0,05$ . Soma da atividade total /AWCD (leitura de 590 nm) de utilização de fontes de carbono do extrato microbiano em cada amostra de solo rizosférico inoculadas com diferentes método de aplicação do inoculante e doses de N em cobertura.

O índice de Shannon (H) que verifica a diversidade de espécies, nesse trabalho apresentou variações 2,85 a 3,23, indicando que existe a presença de grande diversidade nos 31 substratos de fontes de carbono. A utilização dos substratos (S) os valores foram de 18 a 28, com uma utilização que pode ser considerada alta. Esses parâmetros não foram influenciados pelo método de inoculação e doses de N ( Tabela 6).

Tabela 6- Índice de Shannon (H) e utilização dos substratos (S) da diversidade funcional de amostras da rizosfera de milho sob diferentes forma de aplicação do inoculante e doses de N.

Dose de N em cobertura	Método de Inoculação	S	H
0 Kg.ha <sup>-1</sup>	Sulco	23,00a	3,03a
	Semente	26,00a	3,17a
	Pulverização 10 DAG	27,67a	3,21a
	Sulco+Pulverização 20 DAG	20,33a	2,85a
	Semente + Pulverização 20 DAG	24,33a	3,11a
	Pulverização 10 DAG +20DAG	22,33a	3,07a
	Sem inoculante	19,67a	2,95a
	40 Kg.ha <sup>-1</sup>	Sulco	18,00a
Semente		22,00a	3,07a
Pulverização 10 DAG		23,67a	3,12a
Sulco+Pulverização 20 DAG		21,67a	3,07a
Semente + Pulverização 20 DAG		23,33a	3,14a
Pulverização 10 DAG +20DAG		23,00a	3,08a
Sem inoculante		22,33a	3,08a
80 Kg.ha <sup>-1</sup>		Sulco	27,67a
	Semente	24,33a	3,17a
	Pulverização 10 DAG	26,00a	3,19a
	Sulco+Pulverização 20 DAG	18,67a	3,20a
	Semente + Pulverização 20 DAG	24,67a	3,19a
	Pulverização 10 DAG +20DAG	27,67a	3,23a
	Sem inoculante	28,00a	3,27a

Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si 5% pelo teste de Scott-Knott

#### 4.2.5. Diversidade Genéticas da População Bacteriana em Solo Rizosférico

O perfil de bandas do DGGE da população microbiana existente nas amostras de solo rizosférico de milho apresentou diferenças quanto a sua diversidade, sendo possível observar a formação de 4 grupos com distância genética distinta (Figura 9).

O grupo 1 e 2 apresentam padrão de bandas diferentes, sendo que o grupo 2 apresenta um maior número de bandas, indicando maior diversidade em relação ao 1. Esses grupos em geral, são formados por microrganismos que sofreram

somente a influência da inoculação e da dose 0 e de 40 kg.ha<sup>-1</sup> de N. O grupo 3 apresenta sua composição diferenciada do padrão de bandas dos demais, tendo sua diversidade formada a partir de formas de aplicação de inoculante e da dose de 80kg.ha<sup>-1</sup> e o grupo 4, que também apresenta um padrão de bandas diferenciado, entretanto com menor diversidade que o demais grupos. Os padrões de bandas encontrados com exceção do grupos 1 sempre se agrupavam com o tratamento controle, sem inoculação. Esses resultados indicam influência da dose de nitrogênio aplicada na comunidade microbiana.

Quadro1- Legenda para amostras utilizadas no dendrograma.

Legenda no dendrograma Dendrograma		Dose	Método de inoculação
A201_N0_pulv10	A101_N0_pulv10	0	Pulverização 10 DAG
A202_N0_seme+pulv20	A102_N0_seme+pulv20	0	Semente + Pulverização 20 DAG
A203_N0_seme	A103_N0_seme	0	Semente
A204_N0_sulco	A104_N0_sulco	0	Sulco
A206_N0_sulco+pulv20	A106_N0_sulco+pulv20	0	Sulco+Pulverização 20 DAG
A207_N0_controle	A107_N0_controle	0	Sem inoculante/ controle
A209_N1_seme	A109_N1_seme	40Kg.ha <sup>-1</sup>	Semente
A210_N1_controle	A110_N1_controle	40Kg.ha <sup>-1</sup>	Sem inoculante/ controle
A211_N1_pulv10	A111_N1_pulv10	40Kg.ha <sup>-1</sup>	Pulverização 10 DAG
A212_N1_sulco+pulv20	A112_N1_sulco+pulv20	40Kg.ha <sup>-1</sup>	Sulco+Pulverização 20 DAG
A213_N1_seme+pulv20	A113_N1_seme+pulv20	40Kg.ha <sup>-1</sup>	Semente + Pulverização 20 DAG
A214_N1_sulco	A114_N1_sulco	40Kg.ha <sup>-1</sup>	Sulco
A216_N2_sulco	A116_N2_sulco	80Kg.ha <sup>-1</sup>	Sulco
A217_N2_seme+pulv20	A117_N2_seme+pulv20	80Kg.ha <sup>-1</sup>	Semente + Pulverização 20 DAG
A218_N2_controle	A118_N2_controle	80Kg.ha <sup>-1</sup>	Sem inoculante/ controle
A219_N2_sulco+pulv20	A119_N2_sulco+pulv20	80Kg.ha <sup>-1</sup>	Sulco+Pulverização 20 DAG
A220_N2_pulv10	A120_N2_pulv10	80Kg.ha <sup>-1</sup>	Pulverização 10 DAG
A221_N2_seme+pulv20	A121_N2_seme+pulv20	80Kg.ha <sup>-1</sup>	Semente + Pulverização 20 DAG

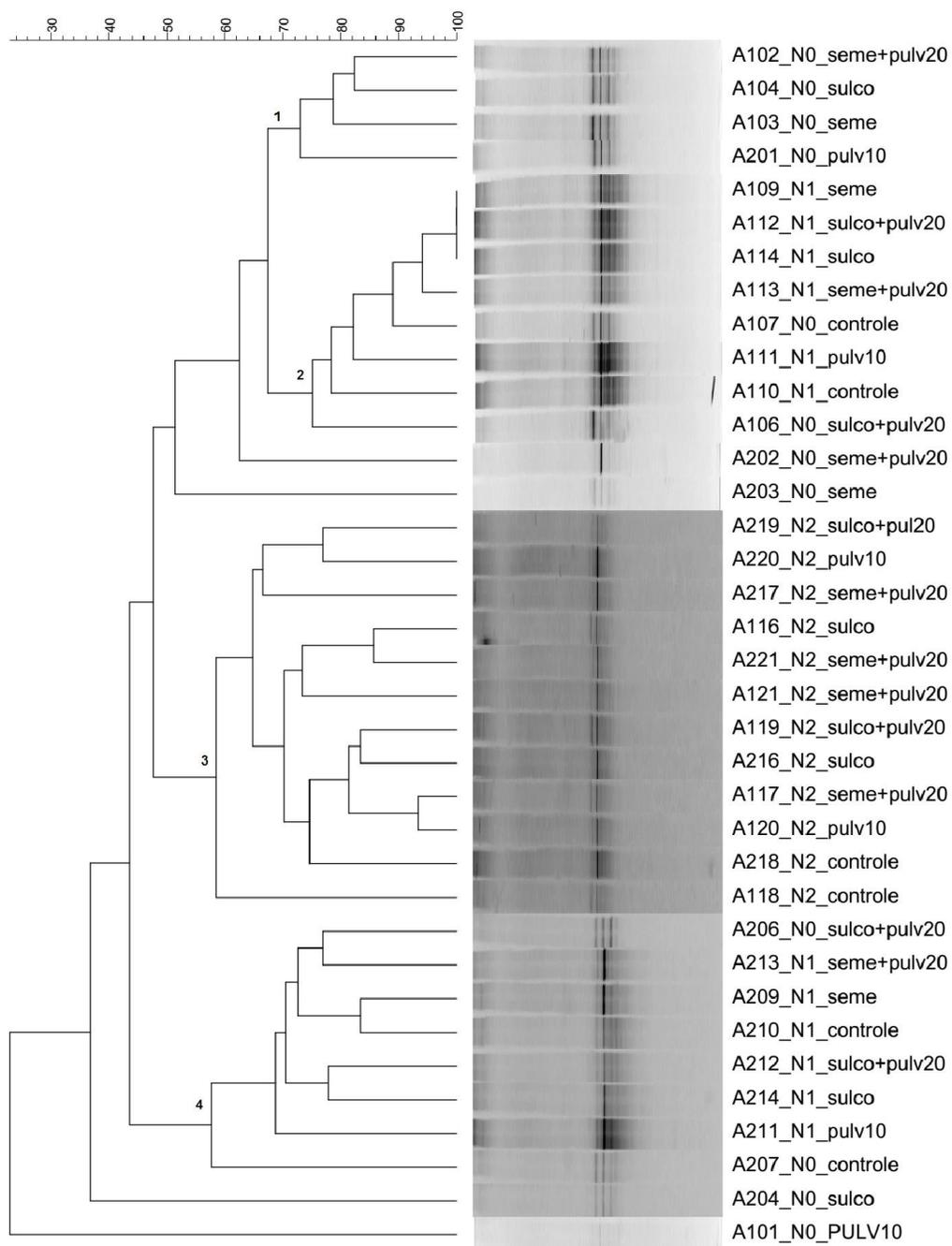


Figura 9- Dendrograma representando a diversidade de espécies alocadas em grupos provenientes da rizosfera de plantas de milho sob diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio.

## 5 .DISCUSSÃO

Efeitos da inoculação podem estar relacionadas ao grande número de fatores que influenciam o processo de interação entre planta e bactéria, entre eles a escolha da estirpe, estado nutricional da planta e da bactéria, genótipo da planta, condições edafoclimáticas, técnicas utilizadas e as próprias interações do *Azospirillum* com a população nativa do solo (Chotte *et al.* 2002; Quadros, 2009). Assim, todos esses fatores podem influenciar de forma indireta no processo de FBN e na produção de reguladores de crescimento pelas bactérias e conseqüentemente os parâmetros de crescimento de planta (Gadagi *et al.* 2004).

A maioria das pesquisas que levaram à identificação de estirpes de *Azospirillum* no Brasil foram conduzidas em grande parte na região sul do país (Hungria 2011). É de grande importância a realização de experimentos de inoculação no cerrado, assim como estudos para viabilizar outros métodos de inoculação. No intuito de elucidar as respostas do uso de métodos de inoculação com *Azospirillum* em milho e na microbiologia do solo, foram realizadas análises das características agronômicas e da ecologia da rizosfera.

A análise de massa seca na parte aérea da planta demonstra que não ocorreu influência de nenhum método aplicado. Aumento na massa seca de plantas de milho tem sido descrito Reis Junior *et al.* (2008) em sementes de milho inoculadas com *Azospirillum*. E inoculações (semente, sulco, pulverização aérea) e diferentes doses de N, já foi observado ganhos de Massa seca (Fukami *et al.* 2013). Segundo Majerowicz *et al.* (2002), o aumento na dose de N proporciona o maior teor de massa seca. Aumentos na massa seca ocorre devido a liberação de substâncias promotoras de crescimentos produzidas pelas bactérias (Reis Junior *et al.* 2008) e por ocorrer uma maior assimilação de N e aumento da taxa fotossintética (Didonet 1996).

Avaliações do teor de N mesmo sendo afetada pelo método de inoculação não deve ser levada em consideração, uma vez que não é possível observar seu real efeito por terem apresentado valores estatisticamente iguais ao controle. O que pode ter ocorrido pela escolha da estirpe utilizada e genótipo. Alves (2007) ao trabalhar com estirpes de *Herbaspirillum* e diferentes genótipos relata contribuição

da FBN e de mecanismos de promoção de crescimento. O teor de N foliar pode variar linearmente com o a incrementação da adubação Nitrogenada (Aratani *et al.* 2006). Ele é importante pois plantas que o apresentam em maiores quantidades possuem a capacidade de crescer e se desenvolver mais, assegurando maior índice de área foliar e conseqüentemente, alta síntese de carboidratos através da fotossíntese favorecendo o desenvolvimento do sistema radicular que poderá explorar melhor o N do solo ou proveniente do fertilizante (Santos & Pereira, 1994).

Sendo a massa de grãos um dos componentes mais importantes no rendimento de grãos (Fancelli & Dourado Neto, 2000). Foi avaliado o peso de 100 grãos de cada método e dose de N, onde os resultados não sofreram influência dos tratamentos. O que já foi relatado em inoculações realizadas em sementes e adubação de N (Farinelli *et al.* 2012)

Aumentos em torno 20-30% na produtividade de grãos de milho devido a inoculação com *Azospirillum* já foram descritos, Fonseca (2014) ao avaliar diferentes inoculantes e doses de N em experimento conduzido em Minas Gerais, encontrou aumentos de até 20% na presença do inoculante. E de acordo com Hungria *et al.* (2010), inoculantes a base de *Azospirillum* são comercializados para a inoculação em trigo e milho com aumentos de 31 e 26 % na produtividade de grãos . No sul do país, dependendo da estirpe bacteriana, a inoculação pode gerar ganhos de produtividade de grãos de milho de até 30%.

A produtividade relativa de grãos nesse trabalho teve incrementos favoráveis de acordo com o método e dose utilizada. Assim, deve se atentar para os benefícios econômicos e ambientais da FBN. Uma vez que se levar em consideração uma produtividade de 150 sacas por hectare e o custo da tecnologia para uma saca, ganhos de 20% implicam em um retorno de 29 sacas. O que proporciona benefícios ambientais por utilizar uma menor quantidade de insumos nitrogenados, que demanda em torno de 1,3 tonelada energia fóssil para fabricação de 1 tonelada de N (Marin *et al.* 2003).

Associação de bactérias diazotróficas e plantas depende do genótipo do vegetal e de condições específicas do solo, sendo mais expressivas em híbridos (Hungria *et al.* 2010; Morô *et al.* 2014; Quadros *et al.* 2014). Onde o efeito da inoculação pode ter efeito positivos, negativos e nulos ( Basi 2013). Morô *et al.*

(2014) ao analisar diferentes genótipos de milho e métodos de aplicação, encontraram diferenças significativas entre os métodos que receberam adubação de cobertura. Segundo seus estudos há um melhor desempenho de produtividade quando ocorre a inoculação diretamente na semente ou em pulverização no solo quando as plantas estão nos estádios fenológicos entre V3 e V5. De forma que os resultados não significados desse trabalho pode ter ocorrido pela época de aplicação e genótipo usado.

Características de grãos como teor de N, Acúmulo de N e proteína são importantes na cultura do milho, porque estão ligados a disponibilidade de nitrogênio e grande parte dele encontra-se nos grãos (Silva *et al.* 2006). A não influência dos métodos nesse trabalho pode ter ocorrido pelo gênero de bactéria usado. Assim como verificado para o teor de N por Zamariolli & Galvão (2012), e teor de proteínas Basi (2013) efeitos não benéficos de *Azospirillum*. No entanto, Dotto e *et al.* (2010) encontrou resposta positivas no teor de N ao usar semente de milho inoculadas *Herbaspirillum* e doses de N.

Bactérias diazotróficas além da capacidade de fixar nitrogênio, precisam apresentar potencial para competir com a população nativa do solo (Moreira & Siqueira, 2006). Desta forma é importante verificar seus impactos na ecologia da rizosfera. No entanto devido a complexidade de reações que ocorrem no solo é necessária um conjunto de mínimos de indicadores (Doran & Parkin, 1994)

Bactérias e fungos apresentam uma dinâmica natural e suas reações com o meio proporcionam a eles serem sensíveis a perturbações ambientais, assim são potenciais indicadores. Outro fator de grande contribuição é devido a sua grande diversificação que mesmo pouco conhecida, vivem constantemente em relações positivas e negativa ao meio em que vivem. Em sua maioria proporcionam o equilíbrio ecológico do solo onde são principais responsáveis pelo seu funcionamento.

A avaliações através de UFC de fungos e bactérias não apresentaram alterações diante dos tratamentos utilizados. A presença de um maior número de bactérias pode ser explicado pelo fato que elas apresentam maior quantidade e diversidade entre outros organismos (Ward *et al.* 1992). Já as diazotróficas, apresentaram variações tanto com o uso do inoculante, como na interação dose x

inoculante. O nitrogênio não inibiu a presença de bactérias diazotróficas, apresentando comportamentos distintos em relação a dose de N, o que não foi encontrado por Röesch (2003) ao testar diferentes partes da planta (solo, raiz e colmo) onde o nitrogênio diminuiu a população de diazotróficas em todas as partes das plantas analisadas 30 DAG. Segundo relata Kolb & Martin (1998), a presença de N faz com que ocorra o aumento no número de bactérias heterotróficas na rizosfera de plantas de milho diretamente ligadas a ciclagem de N no solo.

A atividade enzimática da arginase e urease está diretamente ligada a conversão de compostos nitrogenados em amônio (Skoulobris *et al.* 2001), sendo bioindicadoras sensíveis da qualidade do solo. Nas avaliações realizadas uma maior sensibilidade foi verificada na arginase com uma maior capacidade de detectar diferenças entre os tratamentos. Esses dados corroboram com os encontrados por Fonseca (2014) ao analisar diferentes inoculantes de *Azospirillum* ele encontrou elevação da arginase. Já a urease pode apresentar pouca sensibilidade e porta-se como uma enzima constitutiva de forma que sua síntese ocorre de maneira independente do microambiente (Lubbers 1993)

A alta sensibilidade da enzima envolvida na ciclagem de N não foi observada na fosfatase ácida e alcalina. No entanto aumento na atividade dessas enzimas já foi relatado por Morais (2012), onde ocorreu aumento na atividade enzimática da fosfatase ácida ao utilizar inoculantes a base de *Azospirillum* e adubação nitrogenada em milho. O aumento da atividade das fosfatases ácida e alcalina está ligado ao aumento da comunidade de fungos e bactérias na rizosfera de várias plantas (Tarafdar & Jungk 1987)

A análise da estrutura das comunidades microbianas por meio de técnicas como PCR-DGGE e sequenciamento do gene responsável pela codificação da subunidade 16s do RNA ribossômico (gene rRNA 16S) e o perfil metabólico microbiano, medido pela capacidade de utilização de fontes de C tem se tornado cada vez mais difundidas, criando uma ferramenta útil no monitoramento de mudanças ambientais em função dos diferentes uso da terra (Morais, 2008).

Os resultados do perfil da diversidade genética de populações bacterianas com o uso de DGGE e análise de dendrograma (agrupamento), permitiu identificar diferentes grupos que apresentam diferentes perfis de bandas onde a formação de

um grupo sofre ação da maior dose de N. Para Rösch *et al.* (2005) a diversidade de bactérias presentes nos ambientes pode variar de acordo com os habitat, como é o caso da região próximo as raízes que apresentam uma maior abundância em relação ao solo (Rösch *et al.* 2005). De forma que o número de bactérias presentes por grama de solo podem sofrer variações entre 2.000 e 8,3 milhões (Rösch 2007).

Em relação diversidade funcional foi possível verificar que a atividade de utilização de substratos (AWCD) aumenta linearmente com de acordo com a dose de N aplicada. Não influenciando a diversidade e utilização de substratos que já foi relatada, que em doses maiores de N, apresentam variações em utilização (Lupwayi *et al.* 2012). As mudanças no perfil funcional nesse trabalho em relação AWCD, pode ser explicada pela diversidade genética, pelos efeitos ambientais na expressão gênica e das interações ecológicas entre as diferentes populações (ZAK *et al* 1994). São necessários estudos adicionais para que se confirme os resultados encontrados nesse trabalho.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho mostra que a produtividade relativa de grãos em função da inoculação atingiram valores de até 32% quando aplicado no sulco e na presença de  $40\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de N em comparação ao tratamento controle.

A análise de população de bactérias diazotróficas pode ser influenciada pelos métodos de inoculação e da interação dele com as doses de N.

Alterações na ciclagem de nitrogênio na rizosfera de plantas de milho determinada pela enzima arginase podem ser influenciada pela interação inoculante x dose.

A diversidade genética de bactérias, via PCR/DGGE sofre influência do método de aplicação do inoculante e da disponibilidade de nitrogênio no solo.

A maior disponibilidade de nitrogênio no solo estimula a diversidade metabólica da comunidade bacteriana, com base na atividade total (AWCD)

A realização de estudos adicionais, como o uso de outro genótipo e outras espécies bacterianas, são necessários para uma melhor elucidação sobre o efeito da aplicação de métodos de inoculação e seu impacto na ecologia da rizosfera.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEF, K & KEINER, D. (1986). Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. *Soil Biol, Biochem.*, 18: 233-235.
- ALVES, G. C. Efeito da inoculação de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do milho. 14 de fevereiro de 2007, 63p. Dissertação - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 14 de fevereiro de 2007
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DOS ADUBOS.-ANDA <<http://www.anda.org.br/>> Acesso em 10 de fev, 2015.
- ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M. A. (2005). Bioindicadores para uma análise de risco ambiental. *Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento.*, 34: p,11-19.
- ARATANI, R. G.; FERNANDES, F. M.; MELLO, L. M. M. (2006) Adubação nitrogenada de cobertura na cultura do milho irrigado, em sistema de plantio direto. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*. Publicação científica da faculdade de agronomia e engenharia florestal de Garça/FAEF, ano V, n. 9.
- ARAUJO, A. S. F.; ARAUJO, R. S. (2006) Sobrevivência e nodulação do *Rhizobium tropici* em sementes de feijão tratadas com fungicidas. *Ciência Rural.*, 36: p. 973-976.
- ARAUJO, E. O.; MERCANTE, F. M.; VITORINO, A. C. T.; NUNES, D. P.; PAIM, L. R.; MENDES, D. A. E. (2013). Absorção de nitrogênio por genótipos de milho inoculados com *Herbaspirillum Seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. XII SEMINÁRIO DE MILHO DE MILHO SAFRINHA - Dourados, MS.
- ARNON, I. (1975). Mineral nutrition of maize. Bern: International Portash Institute. 452p.
- BASI, S. Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. 14 de fevereiro de 2013, 63p. Dissertação - Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 14 de fevereiro de 2013
- BASHAN, Y HOLGUIN, G AND DE BASHAN, L. E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology.*, 50: p. 521- 577.

- BASTOS E. A.; CARDOSO, J. M.; MELO. F. B.; RIBEIRO, V. Q.; ANDRADE JUNIOR, A. S. (2008) Doses e formas de parcelamento de nitrogênio para a produção de milho sob plantio direto. *Revista Ciência Agronômica.*, 39:p. 275-280.
- BERGAMASCHI, C. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas às raízes e colmos de cultivares de sorgo. fevereiro de 2003, 71p. Dissertação - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, fevereiro de 2003.
- BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. (1995). Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research*, Oxford., 42:p.241-250.
- Borlaug, N.E. 2002. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. *In*: R. Bailey (Eds.). *Global warming and other eco-myths*. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA. p. 29-60.
- CAMPANHOLA, C.; LUIZ, A. J. B.; RODRIGUES, G. S. (1997). Agricultura e impacto ambiental. *In*: Simpósio sobre os Cerrados do Meio Norte, 1., 1997, Teresina. Anais. Teresina: EMBRAPA, CPAMN, 1997. p. 159 – 169.
- CHOTTE, J.; Schwartzmann, A.; Bally, R.; Monrozier, L. J.; (2002) Changes in bacterial communities and Azospirillum diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. *Soil Biology and Biochemistry*. Elmsford., 34:1083-1092.
- COELHO, A.M.; FRANÇA, G. E. Nutrição e adubação do milho. *In*: CRUZ, J.C. (eds.) Sistema de Produção. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, Versão eletrônica. (Documentos EMBRAPA-CNPMS). <[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_6\\_ed/feraduba.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/feraduba.htm)>. Acesso em: 20 de out 2014
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. CONAB <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_09\\_10\\_14\\_35\\_09\\_boletim\\_graos\\_setembro\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_10_14_35_09_boletim_graos_setembro_2014.pdf)> acesso em 15 out . 2014
- COSTA, R. R.; GOTZ, M.; MROTZEK, N.; LOTTMANN, J; BERG, G & SMALLA, K. (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol Ecol.*; 56: p. 236-249.

- DORAN, J. W. PARKIN, T. B. (1994) Defining and assessing soil quality. *In* DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Eds). Defining soil quality for a sustainable environment. Madison: Soil Science Society of America. p. 107-124
- DIDONET, A. D.; LIMA, A. S.; CANDATEN, A. A.; RODRIGUES, O. (2000). Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos em trigo submetidos à inoculação de *Azospirillum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35: p. 401-411.
- DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O; KENNER, M. H. ( 1996). Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 16: p.645-651.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: Embrapa- SPI: Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 60p.
- EHRENFELD, J. G.; RAVIT, B.; ELGERSMA, K. (2005). Feedback in the plant-soil system. *Annual Review of Environment and Resources*, 30: p.75-115.
- FAGERIA, N. K.; SLATON, N. A.; BALIGAR, V. C. (2003) Nutrient management for improving lowland rice productivity and sustainability. *Advances in Agronomy*, 80, p. 63-152.
- FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V.C. (2005). Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. *Advances in Agronomy*, 88: p. 97-185.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. (2000). Produção de milho. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.
- FARINELLI, R.; HANASHIRO, R. K.; AMARAL, C. B.; FORNASIERI FILHO, D. (2012). Reposta da Cultura do Milho à Inoculação de Sementes e Adubação Nitrogenada em Cobertura. XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO - Águas de Lindóia, p. 1674-1678
- FERREIRA, D. F. (2010) SISVAR- Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras: UFLA.
- FERREIRA, E. A. B.; RESCK, D. V. S.; GOMES, A. C.; RAMOS, M. L. G. (2007) Dinâmica do carbono da biomassa microbiana em épocas do ano em diferentes sistemas de manejo do solo no cerrado. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 31: p. 1625-1635.

- FONSECA, L. M. F. Inoculação com estirpes de *Azospirillum* e Adubação Nitrogenada No Acúmulo De Nutrientes E Produtividade De Milho. agosto 21 de agosto de 2014, 47f. Dissertação Universidade Federal de São João del Rei, s Sete lagoas. Sete Lagoas, 21 de agosto de 2014.
- FORNAZIERI, A. J. (1999). Manual Brasil agrícola: principais produtos agrícolas. - São Paulo. 527p.
- FORNASIERI FILHO, D. (2007). Manual da cultura do milho. Jaboticabal: Funep, 576p.
- FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. (2013). Estratégia de Inoculação com *Azospirillum brasilense* na Cultura do Milho (*Zea mays* L.). XXVII CONGRESSO BRASILEIRO MICROBIOLOGIA -NATAL,
- GADAGI, R. S., et al.; (2004). The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. *Scientia Horticulturae.*, 100:p.323-332..
- GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J.; DUARTE, J. O. (2006). Importância do milho em Minas Gerais. *Informe Agropecuário.*, .27: p. 7-12.
- GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology.*, 57: p.2351-2359.
- GAUT, B. S.; D'ENNEQUIN, M. T.; PEEK, A. S.; SAWKINS, M. C. (2000). Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.*, 97: p.7008-7015.
- GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, R. J.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D. MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S. THOMAS, S. M. TOULMIN, C.( 2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science.*, 327: p.812-818.
- HABTE, M. (1995). Soil acidity as a constraint to the application of vesicular-arbuscular mycorrhizal technology. *Molecular biology and biotechnology*, p. 593-605.

- HÄNE, B. G.; JÄGER, K.; DREXLER, H. G. (1993). The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. *Electrophoresis*, Weinheim., 14: p. 967-972.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. (2005). The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South American. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E.; eds. *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York. p. 25-42.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. (2007). A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- HUNGRIA, M. (2011). Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina. Embrapa Soja, 2011 (Embrapa Soja. Documentos, 325).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M. S.; PEDROSA, F. O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil.*, 33: p. 413–425.
- JETIYANON, K.; KLOEPPER, J. W. (2002). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control.*, 24: p.285-291.
- KANDELER, E.; GERBER, H. (1988). Short term assay of soil urease activity using colorimetric determination ammonium. *Biology and Fertility of Soils.*, 6: p. 68-72.
- LUBBERS, M. W. Genetic and biochemical studies on the urease enzyme system of *Schizosaccharomyces Pombe*. 1993, 196 f. Thesis Massey University, New Zealand, 1993.
- LUPWAYI, N. Z.; LAFOND, ZIADI, N.; GRANT, C. A.; (2012). Soil microbial response to nitrogen fertilizer and tillage in barley and corn., 118:p.139–146.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B., TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. (2002). Endophytic bacteria and 49 their potential applications. *CRC Critical Reviews in Plant Science.*, 21: p. 583-606.

- MAJEROWICZ, N.; PEREIRA, J. M. S.; MEDICI, L. O.; BISON, O.; PEREIRA, M. B.; SANTOS JUNIOR, U. M. (2002). Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. *Revista Brasileira de Botânica.*, 25: p.129-136
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S.A.(1997). Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba. Potafós. 319p.
- MARTHA JR. G. B.; EUCLIDES FILHO, K.; GAZZONI, D. L.; PENA JUNIOR, M. A. G.; CAMPOS, F.; BELTRÃO, S. L. L.; TORRES, L. A.; VALETIM, J. F.; MIRANDA, E.; PEREIRA, R. M.; DANTAS, J. O.; ARRUDA, R. G.; SILVA, A. R.; BERTIN, P. R. B.; BALSADI, O. V.; ARAÚJO, S. C. B. GUIDUCCI FILHO, E.; PEREIRA, V. F. (2014). Visão 2014-2034. O futuro do desenvolvimento tecnológico da agricultura brasileira. 54p.
- MARTINS, A. O.; MAGALHÃES, P. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; Durães, F. O. M.; MARRIEL, I. E.; TORRES NETTO, A. (2008) Nitrogen-use efficiency of maize genotypes in contrasting environments. *Crop Breeding and Applied Biotechnology.*,8: p.291-298.
- MORAIS, M. Diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana de açúcar. 2008, 87f. Tese - Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.
- MORAIS, T. P. Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense* em Híbridos de milho. 27 de fevereiro de 2012, 71p. Dissertação - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia,
- MOREIRA, F. M.; SILVA, K.; NOBREGA, R. S.A.; CARVALHO, F. (2010). Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae.*, 1: p. 74-99.
- MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica do nitrogênio.(2006) *In*: MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. (Ed.). *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2.ed. p.501-529.
- MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O. (2002). *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Ed. UFLA, 626p.
- MORÔ, G. V.; REVOLTI, L. T. M.; BUZINARO, R.; CHARNAI, K.; PEREIRA, L. M.; SILVA, T. H. S. (2014). Efeito do *Azospirillum brasilense* na Produtividade de

- Genótipos de Milho. XXX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Salvador, 1659-1664.
- OHLAND, R. A. A.; SOUZA, L. C.; HERNANI, L. C.; MARCHETTI, M. E.; GONÇALVES, M. C. (2005). Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. *Ciência e Agrotecnologia.*, 29: p.538-544.
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. (1997) Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *Applied and Environment Microbiology.*, 6: p.366-370.
- OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E. A.; MATTOS, B. B.; TEIXEIRA, J. M. A.; CRISTELLI, E. A.; DIAS, F. E. S.; BARACHO, A. O.; MARRIEL, I. E (2012) Utilização de bioinoculantes para cultivo de milheto (*Pennisetum glaucum*) com fontes naturais de fosfato. *FertBio 2012 - Maceio*.
- PIPERNO, D. R. & FLANNERY, K. V. (2001). The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.*, 98: p. 2101-2103.
- QUADROS, P. D. Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul. 2009 74f. Dissertação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- RESENDE, L. M F & GUIMARÃES, L. L. Inventários da Biodiversidade do Bioma Cerrado: Biogeografia de Plantas. <  
[ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursos\\_naturais/levantamento/biogeografia.pdf](ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/levantamento/biogeografia.pdf)  
> Acesso em 10 fev. 2015.
- REZENDE, G. C. (2002). Ocupação agrícola e estrutura agrária no cerrado: o papel do preço da terra, dos recursos naturais e da tecnologia. Rio de Janeiro, IPEA, 23p.
- REIS JUNIOR, F. B. MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. (2008). Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo.*, 32: p.1139-1146.
- REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M. de; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. (2006). Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. *In:*

- FERNANDES, M. S. (Ed.). Nutrição mineral de plantas. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo . p. 153- 174.
- RÖESCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K. M. ; KENT, A. D. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.*, 1: p. 283-290.
- RÖESCH. L. F. Ocorrência e Distribuição de Bactérias Diazotróficas Associadas A Cultivares De Milho. fevereiro, 2003,78f. Dissertação -Universidade Federal do Rio Grande do Sul,Porto Alegre, fevereiro de 2003.
- SCHRÖDER, J. J.; NEETSON, J. J.; OENEMA, O.; STRUIK, P. C.(2000). Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production? Reviewing the state of the art. *Fields Crops Research.*, 66: p.151-164.
- SOUSA, D. M. G. de & LOBATO, E. (2004). Adubação com nitrogênio. *In*: SOUSA, D. M. G. de & LOBATO, E. (eds). Cerrado: Correção do solo e adubação. Embrapa, Brasília. p. 129-145.
- SANTOS, H.P.; PEREIRA, L.R. (1994). Efeito de sistemas de sucessão de cultura de inverno sobre algumas características agrônômicas de milho em plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo.*, 29: p.1691-1694.
- SILVA, D. A.; VITORINO, A. C. T.; SOUZA, L. C. F.; GONÇALVES, M. C.; ROSCOE, R. (2006) Culturas antecessoras e adubação nitrogenada na cultura do milho, em sistema plantio direto. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo.*, 5:p. 75-88.
- SKOULOBRIS, S.;LABIGNE, A.; DE REUSE, H.(2001) The amie aliphatic amidase and AmiF formamidase of *Helicobacter pylori*: natural evolution of two enzyme paralogues. *Mol. Microbiol.*, v. 40, p. 596-609.
- SOARES, E. A. C.; Araújo, J. M. GOMES, E. A.; SILVA, P. G.; MATTOS, B. B.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, C. A. (2012) Alterações na Atividade das Enzimas Fosfatases Ácidas e Alcalinas, em Solo Cultivado com Milheto Adubado com Fosfatos e Inoculado com Microrganismos Solubilizadores XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo- Águas de Lindóia, p. 1770-1777.
- SOUZA, J. A. (2006). Manejo da fertilidade de solo para a cultura do milho. *Informe Agropecuário.*, 27: p.26-37.

- SOUZA, S. R.; FENANDES, M. S. NITROGÊNIO. (2006). *In*: FERNANDES, M. S. (Ed). *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 215-252.
- SILVA, S. M. Atividade da enzima redutase do nitrato em milho cultivado sob diferentes níveis de nitrogênio e potássio. Junho 2009, 43p. Dissertação - Universidade Federal de Goiás, Jataí, junho 2009.
- TABATABAI, M. A. (1994). Soil enzymes. *In*: WEAVER, R. W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P. J., (Ed.) *Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*, Soil Science Society of America, Madison, p. 775 - 833.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004) *Nutrição Mineral*. *In*: TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, p.96-101.
- TARAFDAR, J.C.; JUNGK, A. (1987) Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biology and Fertility of Soils*, 3: p.199-204.
- TRENTINI, D. B. Identificação dos alvos celulares das proteínas de transdução de sinal PII do diazotrófico de vida livre *Azospirillum amazonense*. 2010, 122p. Dissertação - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE -USDA (2014). <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>> Acesso em: 15 de out 2014.
- VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth-promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91: p.127-141.
- WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. ( 1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 95: p. 6578-6583.
- WILLIAMS, L. E. & MILLER, A. J. (2001). Transporters responsables for the uptake and Partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology*, 52: p. 659-688.
- ZAK, J. C.; WILLIG, D. L.; WILDMAN, H. G. (1994). Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.*, 26: p1101-1108.
- ZAMARIOLLI, L. E. R.; GALVÃO, M. A. K. (2012). Efeitos de métodos de aplicação do inoculante *Azospirillum* brasileiro sobre o acúmulo de nitrogênio e

produtividade do milho safrinha. *In*: Encontro de Mecanização da agricultura de precisão. Anais. p.120-129.