

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA**  
**MESTRADO EM AGROECOLOGIA**

**MARCELO MARINHO VIANA**

**PRODUTIVIDADE E EFICIÊNCIA DO USO DO NITROGÊNIO NA CULTURA**  
**DO MILHO INOCULADO COM *Azospirillum brasilense***

**São Luís - MA**  
**2017**

MARCELO MARINHO VIANA  
**Engenheiro Agrônomo**

**PRODUTIVIDADE E EFICIÊNCIA DO USO DO NITROGÊNIO NA CULTURA  
DO MILHO INOCULADO COM *Azospirillum brasilense***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Maranhão, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Orientador: Prof. Dr. Heder Braun

**São Luís - MA  
2017**

Viana, Marcelo Marinho

Produtividade e eficiência do uso do nitrogênio na cultura do milho inoculado com *Azospirillum brasiliense* / Marcelo Marinho Viana. – São Luís, 2017.

51 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Helder Braun

1. *Zea mays*. L. 2. Inoculante produção. 3. Bacterias diazotroficas. 4. Fixação de nitrogênio. I. Título.

CDU:631.52:633.15

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA**

**MARCELO MARINHO VIANA**

**PRODUTIVIDADE E EFICIÊNCIA DO USO DO NITROGÊNIO NA CULTURA**  
**DO MILHO INOCULADO COM *Azospirillum brasilense***

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Heder Braun** (Orientador)

Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Antônia Alice Costa Rodrigues**

Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

---

**Pesquisador Dr. João Batista Zonta**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

***DEDICO!***

*A Deus.*

*Aos meus pais José de Jesus Neves Viana e Maria José Marinho Viana, por todo amor,  
carinho e ensinamentos passados em todos os dias da minha vida.*

*Aos meus irmãos pelo incentivo e confiança.*

*À minha namorada Bruna Sena, pelo encorajamento, carinho e companheirismo e aos  
meus amigos pelo incentivo, força e ajuda nessa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

Máxime a Deus, pela sua bondade e misericórdia, por me conceder saúde e proteção divina. Obrigado por mais esta conquista.

Aos meus pais, José de Jesus Neves Viana e Maria José Marinho Viana, por todos os ensinamentos, carinho, zelo, amor, companheirismo, incentivo, pela força que me deram durante toda a caminhada, enfim, por tudo. Nada teria sido possível sem vocês!

Agradeço a todos os meus familiares, mas em especial aos meus irmãos Leonardo de Jesus Marinho Viana, Higo Bruno Brito Marinho e Ana Leticia Garcia Viana, pelo apoio e credibilidade que sempre me impulsionaram a ir mais longe, a fazer mais, a ser melhor. Sintam-se parte de mais esta conquista.

À minha namorada Bruna Campos Sena e toda sua família, pelo companheirismo, força, incentivo, paciência e todo amor, ao qual me capacita a ser uma pessoa melhor e enfrentar os percalços caminhada que se chama vida.

Ao meu anjo da guarda Mariana da Silva Corrêa (*in memoriam*), pelo primeiro incentivo, encorajamento, ensinamentos de vida, sei que apesar da distância continua a torcer e me fortalecer para as batalhas do dia a dia. Essa vitória é sua também.

À minha segunda mãe Maria José Gomes da Silva, por todo amor, carinho, incentivo, em todos os momentos, que possibilitaram chegar ao final desse objetivo.

À Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) e ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, pela oportunidade de realização deste sonho em minha vida e alastrar meus conhecimentos

Ao meu nobre amigo e orientador Dr. Heder Braun, serei eternamente grato por tudo, tornou-se um grande amigo, com seus conselhos e ensinamentos profissionais e de vida, agradeço pela paciência infinita para me aturar todo esse tempo e pela confiança depositada.

A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, especialmente ao professor Dr. Fabricio de Oliveira Reis e à professora Dr<sup>a</sup>. Antônia Alice Costa Rodrigues pela colaboração e disponibilidade sempre.

Agradeço carinhosamente à Rayanne Cristine, secretária do Programa de Pós-Graduação, por sua prontidão em servir e ajudar, sem medir esforços.

Aos pesquisadores Dr. Marlon Gomes da Costa e Dr<sup>a</sup>. Camila Nobre Pinheiro por todo incentivo e ajuda.

Aos funcionários Joãozinho e Neto, por toda ajuda com a realização do trabalho em campo.

A todos os amigos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho. Especialmente a Luís Carlos Ferreira Reis, Werlen Barbosa, Ester de Paiva Alves, Erivaldo Plinio, Hellen Andrade, Assistone Costa, Marcela Uli, Eduardo Marques, Benjamim Valentim.

Aos meus irmãos de pai científico: Karen Alessandra e Lincon Matheus, pelos incontáveis dias de trabalho, alegria, discussões e parceria.

A todos os colegas do mestrado em especial a Henry Reyes, Eduardo Mendonça, Hélio Dantas, Léo Vieira, Josilene Cantanhede, Rones Castro, Carol Rabelo, Jailson Moreira, Zélia Nunes, Luciana Lins, por todos os momentos difíceis e alegres que passamos, nunca desanimando.

À FAPEMA pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro na execução do projeto.

**Obrigado a todos!**

*“Tudo posso naquele que me fortalece”*

***Filipenses 4, 13***

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>CAPÍTULO I</b> .....	14
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
1.1. Cultura do milho.....	17
1.2. Nitrogênio.....	17
1.3. Eficiência do Uso do Nitrogênio (EUN) .....	18
1.4. Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) .....	19
1.5. <i>Azospirillum brasilense</i> .....	20
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	22
<b>CAPÍTULO II</b> .....	27
<b>MILHO INOCULADO COM <i>Azospirillum brasilense</i> E NITROGÊNIO EM COBERTURA AUMENTA A PRODUTIVIDADE E EFICIÊNCIA DO USO DO NITROGÊNIO</b> .....	28
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	29
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
<b>CONCLUSÃO</b> .....	39
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	39
<b>ANEXO</b> .....	47

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Dados de precipitação e temperatura durante o período experimental em 2015 e 2016.....46
- Figura 2.** Produtividade de grãos de milho em função de doses de N ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), em 2015 (A) e 2016 (B) \*\* e \* .....46

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Produtividade de grãos (PG), índice de colheita do nitrogênio (ICN) e índice de colheita (IC) em função das formas de inoculação (I), em 2015 e 2016.....44
- Tabela 2.** Remobilização de nitrogênio (RN), eficiência de remobilização do nitrogênio (ERN) em função das formas de inoculação (I), em 2015 e 2016.....44
- Tabela 3.** Eficiência agronômica (EA), eficiência de utilização do N (EUtN), eficiência de absorção do N (EAN) e eficiência do uso do N (EUN) em função das formas de inoculação (I) e doses de N (DN, kg ha<sup>-1</sup>), em 2015 e 2016.....45

## RESUMO

A associação do nitrogênio com bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum brasilense* pode garantir uma maior capacidade produtiva e eficiência do uso do N para a cultura do milho. No sentido de testar essa hipótese avaliou-se a associação entre formas de inoculação de *Azospirillum brasilense* e doses de N sobre a produtividade de grãos e eficiência do uso do N pela cultura do milho. Para esse fim, foram realizados dois experimentos de campo (2015-2016). O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos pela combinação de quatro doses de N (0, 45, 90 e 180 kg ha<sup>-1</sup>), aplicadas em cobertura, na forma de ureia (45 % de N) com três formas de inoculação de *A. brasilense* (sementes, foliar e controle). O Nitro 1000 Gramíneas® foi o inoculante utilizado nos tratamentos. Foi aplicado 100 mL ha<sup>-1</sup> do produto comercial no tratamento de semente antes do plantio e 200 mL ha<sup>-1</sup> no tratamento via foliar. As doses de N e a aplicação do tratamento via foliar foram realizadas na fase V4. As variáveis avaliadas foram: produtividade de grãos (PG, kg ha<sup>-1</sup>), índice de colheita (IC) e de N (ICN), remobilização do N (RN, kg ha<sup>-1</sup>), eficiência de remobilização do N (ERN, %), eficiência do uso do N (EUN, kg kg<sup>-1</sup>), eficiência agrônômica (EA, kg kg<sup>-1</sup>), eficiência de utilização do N (EUtN, kg kg<sup>-1</sup>) e eficiência de absorção do N (EAN, kg kg<sup>-1</sup>). Com os nossos resultados podemos concluir que houve incremento de 50 e 20 % na PG e 50 e 42 % na EUN onde recebeu inoculação com *A. brasilense* via semente em relação ao tratamento que não foi inoculado, em 2015 e 2016, respectivamente. As doses de N influenciam positivamente a PG e reduzem a EUN e dos seus componentes.

**Palavras-chave:** *Zea Mays* L., inoculante, produção, bactérias diazotróficas, fixação de nitrogênio.

## ABSTRACT

The Association of nitrogen with diazotrophic bacteria of the *Azospirillum brasilense* genus can ensure greater productive capacity and nitrogen use efficiency to the culture of corn. In order to test this hypothesis was evaluated the association between *Azospirillum brasilense* forms inoculation and rate of N on the grain productivity and nitrogen use efficiency by corn cultivation. Two experiments were carried out in the field (2015 and 2016), in a randomized complete block design, with four replications. The treatments were performed in factorial arrangement 4 x 3: four N fertilization rates (0, 45, 90 and 180 kg ha<sup>-1</sup>), applied as top-dressing with three inoculation way (seeds, leaf and control). Urea (45% of N) was N source. Nitro 1000 Gramíneas<sup>®</sup> was the inoculant used in the treatments. It was performed with 100 mL ha<sup>-1</sup> of the commercial product in seed-inoculant before planting and 200 mL ha<sup>-1</sup> in leaf-inoculant spraying application. The N fertilization rates and *A. brasilense* leaf-inoculant spray were applied at the corn growth stage V4. The variable evaluated were: grain yield (GY, Mg ha<sup>-1</sup>), N harvest index (NHI), harvest index (HI), N remobilization (NR, kg ha<sup>-1</sup>), N remobilization efficiency (NRE, %), N utilization efficiency (NUE, kg kg<sup>-1</sup>), N uptake efficiency (NUpE, kg kg<sup>-1</sup>) and agronomic efficiency (AE, kg kg<sup>-1</sup>). With these results we can conclude that there was increase of 50 and 20% in GY and 50 and 42% in NUE in seed-inoculant treatment when compared with control, in 2015 and 2016, respectively. N fertilization rates affect positively the GY and reduce NUE and its components.

**Keywords:** *Zea Mays* L, inoculant, production, diazotrophic bacteria, nitrogen fixation.

---

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de importância global em virtude da sua diversidade de utilização, extensão da área cultivada e elevada capacidade produtiva. Os maiores produtores mundiais são os Estados Unidos, Canadá e o Brasil. Porém, o manejo inadequado da adubação nitrogenada ainda é um dos principais fatores que contribuem para que não ocorra aumento da produtividade (USDA, 2017).

O Brasil na safra de 2015/2016 obteve uma produtividade média de 4,18 Mg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2017), grande parte da produção de milho é realizada por pequenos e médios agricultores e com algum tipo de estresse ambiental, devido à necessidade de nutrientes que a cultura do milho exige. A cultura do milho é exigente em nutrientes, principalmente o nitrogênio (N), cuja deficiência pode reduzir de 10% a 22% o rendimento de grãos (SUBEDI et al., 2009).

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes mais importantes e exigidos pela cultura do milho, pois faz parte de várias moléculas, tais como proteínas, enzimas, aminoácidos e o que mais onera o custo de produção agrícola, devido seu alto valor de mercado. Este nutriente, na maioria dos solos agricultáveis, não está disponível em quantidades necessárias para altas produtividades, sendo necessária aplicações suplementares. A maioria dos solos das regiões tropicais é deficiente em N e, geralmente, apenas 50% do N-fertilizante aplicado nesses solos é aproveitado pelas plantas, sendo o restante perdido por lixiviação e volatilização, entre outras causas (MÜLLER, 2016). O aumento da demanda por fertilizantes nitrogenados, aliado ao seu elevado custo, tem direcionado as pesquisas para o processo de fixação natural (SAIKIA; JAIN, 2007). No Estado do Maranhão, muitos plantios de milho ainda são realizados no sistema de corte e queima o que colabora para uma maior perda de N.

Desta forma os sistemas de produção de bases agroecológicas, possuem como alternativa a substituição do fertilizante nitrogênio mineral, por bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a fertilizantes naturais como o biofertilizante, que contribuem para um equilíbrio nutricional das plantas.

A fixação biológica de N é uma alternativa benéfica para o equilíbrio nutricional das plantas de milho. Na natureza, alguns organismos procariotos conseguem assimilar o N atmosférico e transformá-lo em NH<sub>3</sub>, processo denominado de fixação biológica, realizado através do complexo enzimático nitrogenase. Esse complexo é responsável por aproximadamente 65% do total de N fixado na Terra, sendo, assim, o segundo processo biológico mais importante depois da fotossíntese (CANTARELLA, 2007).

Nas gramíneas o processo de fixação biológica (FBN) ocorre por meio de bactérias diazotróficas. Especificamente para o milho as estirpes (AbV5 e AbV6) de *Azospirillum brasilense* vem proporcionando resultados positivos. Esses microrganismos pertencem à subclasse  $\alpha$  das proteobactérias, a qual comporta um grande número de bactérias simbióticas e associativas às plantas, tais como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Gluconacetobacter*. Essas bactérias são gram-negativas de vida livre, com metabolismo de carbono e nitrogênio bastante versáteis, conferindo-lhes competitividade durante o processo de colonização. Utilizam no seu metabolismo fontes de N como amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular. A forma de ação de bactérias do gênero *Azospirillum* ainda não foi totalmente compreendida. Até o momento, sabe-se que possuem capacidade de fixar N atmosférico quando associadas com gramíneas, podendo atuar na solubilização do fosfato inorgânico. *Azospirillum* spp. apresenta ampla distribuição nos solos tropicais e subtropicais (ELMERICH; NEWTON, 2007).

Conforme relatado por Hungria et al. (2010), em gramíneas a adoção desta tecnologia pode proporcionar redução de 50% no uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos. Além disso, a inoculação em gramíneas poderia acelerar a taxa de germinação de sementes e incrementar a produção de matéria seca e o acúmulo de N na planta, aumentar a produção de grãos (MARINI et al, 2015; MÜLLER et al, 2016; PORTUGAL et al, 2016).

Diante dos relatos apresentados, são escassas as informações sobre o uso de bactérias do gênero *Azospirillum* associadas à redução parcial da dosagem N-mineral e sobre os benefícios desta tecnologia para a cultura do milho, principalmente para as condições financeiras adversas dos produtores rurais do Estado do Maranhão. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a relação entre formas de inoculação de *A. brasilense* e doses de N sobre a produtividade e eficiência do uso do N pela cultura do milho.

## 1.1. Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta monoica, da família Poaceae, de porte ereto, de ciclo anual, classificada no grupo das plantas C4, ou seja, mais econômica quanto ao uso da água, perdendo menor quantidade de água durante a fixação do CO<sub>2</sub> (TAIZ; ZEIGER, 2009), o que a torna mais adaptável às diferentes condições ambientais, sobretudo na região tropical. As raízes são fasciculadas, podem crescer bastante dependendo das condições e tipos do solo e ainda produzir grandes quantidades de matéria seca, de 30 a 40 toneladas por hectare (BARROS; CALADO, 2014).

A cultura do milho, possui papel incontestável na economia mundial e brasileira devido a sua posição entre as espécies agrícolas com maior área de cultivo (MÔRO; FRI-TSCHE, 2015). No Brasil, os maiores estados produtores de milho na safra de 2015/2016 foram: Mato Grosso, Paraná e Goiás, respondendo por 54% da produção brasileira. O estado do Maranhão está situado com uma produção mediana de aproximadamente 874,4 mil ton (CONAB, 2017).

O milho vem sendo utilizado tradicionalmente na alimentação, seja em forma direta (consumo humano direto), ou indireta (na alimentação de animais). O uso na alimentação humana direta, na forma de grãos, é relativamente pequeno, estando presente na dieta das pessoas através dos derivados do milho. Ainda assim para várias regiões do mundo, é a principal fonte de energia diária de alimentação, como por exemplo, no Nordeste do Brasil, principalmente para as pessoas que vivem no semiárido.

Os principais fatores que contribuem para os baixos níveis de produtividade do milho no Brasil, são as condições climáticas desfavoráveis de algumas regiões, a utilização de variedades ou híbridos não adaptados a determinadas condições edafoclimáticas, o uso de sementes não certificadas, o manejo inadequado da população de plantas (espaçamento), ausência de pureza genética e o manejo incorreto da adubação nitrogenada, que com as elevadas perdas de N, reduz a eficiência de uso do N (EUN), principalmente para o agricultor familiar.

## 1.2. Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um dos mais importantes nutrientes utilizados para desenvolvimento das plantas. Nos sistemas de produção agrícolas, a sua oferta é naturalmente limitada no solo, o que restringe os rendimentos produtivos das plantas (ROBERTSON; VITOUSEK, 2009)

Atualmente, o manejo da adubação nitrogenada é realizado com o intuito de garantir boa produtividade. Em função da dinâmica do N no solo, para isso são adicionadas grandes quantidades deste nutriente. Tendo em vista a crescente demanda por fertilizantes nitrogenados e a preocupação com as possíveis perdas e contaminação do ambiente (FERNANDES; LIBARDI, 2007), torna-se necessária aplicação de N na forma parcelada em cobertura (YAMADA; ABDALA, 2000) leva a buscarem alternativas de suprimento de N via fixação biológica ou fertilizantes alternativos.

O N possui papel fundamental no metabolismo vegetal por participar diretamente na biossíntese de proteínas e clorofilas (ANDRADE et al., 2003). No entanto, encontra-se em quantidades insuficientes na maioria dos solos brasileiros, tornando-se crucial um fornecimento externo em concentração adequada para garantir o crescimento, desenvolvimento e a produtividade das plantas de milho (BELARMINO et al., 2003). Com esse conhecimento, minimizam-se as perdas e aumenta-se a eficiência do uso do N (BOTREL et al., 1999). A maioria dos fertilizantes nitrogenados empregados na cultura milho são hidrossolúveis, e rapidamente liberam para o solo  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , sendo desta forma prontamente assimiláveis pela planta, no entanto, por sua alta mobilidade o N está susceptível a perdas, e pode ocasionar riscos ambientais (MENDES, 2016).

Diante da crescente demanda por fertilizantes nitrogenados, surge a necessidade de buscar alternativas para diminuir as perdas através do parcelamento da adubação de cobertura, assim como buscar alternativas de suplementação de N, sendo a fixação biológica de nitrogênio uma opção para incrementar o rendimento da cultura do milho e sem prejuízos aos recursos naturais (BASI, 2013).

### **1.3. Eficiência do Uso do Nitrogênio (EUN)**

Nas últimas décadas, os esforços têm sido direcionados no sentido de otimizar a eficiência de utilização de nutrientes pelas plantas, visando reduzir os custos de produção, evitar a degradação dos recursos ambientais e aumentar o rendimento das culturas (KOLCHINSKI; SCHUCH, 2003). Nesse sentido, existem diversos caminhos possíveis para aumentar a EUN. Um dos mais simples é a diminuição nas doses de adubos para níveis que sejam produtivos e seguros (FERNÁNDEZ et al. 1998).

O uso de fertilizantes em culturas de grãos e fibras também é importante na manutenção das reservas de N do solo. Alta produtividade com doses baixas de N, normal-

mente significa que a quantidade de N exportada com a colheita é maior do que a adicionada, o que contribui para empobrecer o solo (ALVES et al., 2006). Fernandes et al. (2005) estudando doses de N em seis cultivares de milho e a eficiência de uso desse nutriente pela cultura, em região de cerrado, verificaram que a eficiência do uso de nitrogênio de todos os híbridos testados diminui quando se aumentou a dose de N aplicada. Além disso, observaram que as doses de N influenciaram principalmente a massa de 100 grãos e a produtividade de grãos. Dessa forma, nos estudos sobre a dinâmica do N no sistema solo-planta, muitas vezes, é difícil quantificar a origem deste nutriente (SCIVITTARO et al., 2000).

Especificamente em milho, Moll et al. (1982) definiram a eficiência no uso do N (EUN) como a massa de grãos dividida pela massa de N aplicado no solo (Gw/Ns), ambas expressas na mesma unidade, como por exemplo, gramas por planta. Contudo, pode ser destacado também como um bom parâmetro da eficiência de utilização de N a produtividade de grãos (CARVALHO, 2008). Fageria (1998) em suas pesquisas argumenta que em experimentos de campo, a produção de grãos é o melhor parâmetro para avaliação da eficiência nutricional em culturas anuais.

Nesse contexto, o uso racional da adubação nitrogenada é fundamental, não somente para aumentar a eficiência de recuperação, mas também para aumentar a produtividade da cultura e diminuir o custo de produção (FAGERIA et al., 2007).

#### **1.4. Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)**

O nitrogênio ainda que mais abundante na atmosfera, não pode ser prontamente assimilado pelas plantas. A forma que as mesmas assimilam difere entre espécies vegetais, absorvendo principalmente as formas inorgânicas, como nitrato ou amônio (WILLIAMS; MILLER, 2001; FAGERIA et al. 2003; SOUZA; FERNANDES, 2006).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN), é um processo de transformação do  $N_2$  na forma inorgânica combinada  $NH_3$ . A capacidade de reduzir nitrogênio atmosférico a amônia, está restrita a um pequeno grupo de microorganismos denominados diazotróficos, ou fixadores de  $N_2$  (NOVAKOWISKI et al., 2011).

Pesquisas sobre as bactérias diazotróficas tiveram início no Brasil há mais de 40 anos. Essas foram realizadas pela pesquisadora Johanna Döbereiner e seus colaboradores (MOREIRA et al. 2010).

Esses microorganismos estão distribuídos em diversos grupos filogenéticos e habitam vários ecossistemas em vida livre, em simbiose com leguminosas como o feijoeiro

e o feijão caupi, ou endofiticamente em raízes ou parte aérea de poaceae como milho, bem como de espécies forrageiras como *Brachiaria* ssp., *Paspallum notatum* F. entre outras (WEBER et al., 2000; MOREIRA et al., 2010).

Dentre as diazotróficas, bactérias do gênero *Azospirillum* associam-se à rizosfera da planta de milho e podem contribuir com a nutrição nitrogenada da cultura (FIGUEIREDO et al., 2009). Pesquisas realizadas por Novakowski et al. (2011), demonstram que essas bactérias podem promover o crescimento vegetal através da produção de fitoreguladores e sideróforos ou por aumentar a disponibilidade de fósforo.

A FBN também pode ter contribuições em agroecossistemas. A maior parte dessa contribuição ocorre pela associação simbiótica de plantas leguminosas 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 processo de FBN realizado em gramíneas, é secretado somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada suprimindo apenas parcialmente as necessidades das mesmas. Sendo assim, ao contrário das leguminosas, a inoculação dessas culturas com microrganismos, ainda que fixem nitrogênio, não conseguem suprir totalmente as necessidades das plantas em relação ao N (HUNGRIA, 2011).

### **1.5. *Azospirillum brasilense***

As bactérias do gênero *Azospirillum* são de vida livre, rizobactérias capazes de promover o crescimento das plantas e aumentar as colheitas em muitas culturas de importância econômica. Essas bactérias podem atuar no crescimento da planta através da produção de substâncias promotoras de desenvolvimento (auxinas, giberelinas e citocininas) as quais proporcionam melhor crescimento radicular (OKON; VANDERLEYDEN, 1997) e por consequência maior absorção de água e nutrientes (CORREA et al., 2008) resultando em uma planta mais vigorosa e produtiva (BASHAN et al., 2004; HUNGRIA, 2011).

A bactéria foi descoberta no início da década de 1970 pela pesquisadora da Embrapa Dra. Johanna Döbereiner. Essas bactérias auxiliam por diversos mecanismos na nutrição nitrogenada das culturas. Dentre esses mecanismos, destacam-se a produção de hormônios, que interferem no crescimento das plantas e podem alterar a morfologia das raízes, possibilitando a exploração de maior volume de solo (BASHAN; HOLGUIN, 1997; ZAIED et al., 2003), o aumento do processo da redução assimilatória de nitrato

disponível no solo (BODDEY et al., 1986) e a fixação biológica do N<sub>2</sub> (INIGUEZ et al., 2004). Entre esses mecanismos, o aumento do sistema radicular, estimulado pela presença de bactérias, através da produção de substâncias promotoras do crescimento radicular, pode resultar em maior absorção de minerais e de água (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

As características benéficas destas bactérias podem ser resumidas em: capacidade de penetrar na raiz das plantas, antagonismo a agentes patogênicos, associação com várias gramíneas e com não gramíneas (morango, tabaco, café e outras), produção de hormônios promotores de crescimento e desenvolvimento, baixa sensibilidade às variações de temperatura e ocorrência em todos os tipos de solo e clima (ARAÚJO, 2008).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L., FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. (EMBRAPA AGROBIOLOGIA) **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, n.3, p.449-456, 2006.

ANDRADE, A. C.; FONSECA, D. M.; QUEIROZ, D. S.; SALGADO, L. T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*pennisetum purpureum schum.* cv. napier). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p.1643-1651, 2003.

ARAÚJO, S.C; **Realidade e perspectivas para o uso de *Azospirillum* na cultura do milho**. IPNI – International Plant Nutrition Institute Brazil. (IPNI. Informações Agrônômicas, v. 122), 32p. 2008.

BARROS, J. F. C.; CALADO, J.G. A cultura do milho. 1. ed. Évora, 52 p., 2014.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G; DE-BASHAN, L .E. *Azospirillum* - plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances .**Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.

BASI, S. Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Centro-Oeste, Guarapuava, 50 p., 2013

BELARMINO, M. C. J.; PINTO, J. C.; ROCHA, G. P.; FERREIRA NETO, A. E.; MORAIS, A. R. de. Altura de perfilho e rendimento de matéria seca de capim-tanzânia em função de diferentes doses de superfosfato simples e sulfato de amônio. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, p. 879-885, 2003.

BODDEY, R. M., BALDANI, V. L. D., BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on the nitrogen assimilation of field grown wheat. **Plant and Soil**, v. 95, p. 109 – 121, 1986.

BOTREL, M. A.; ALVIM, M. J.; MARTINS, C. E. Aplicação de nitrogênio em acessos de Brachiaria. 2. Efeito sobre os teores de proteína bruta e minerais. **Pasturas Tropicais**, Cali, v. 12, n. 2, p. 7-10, ago. 1999.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.) Fertilidade do solo. 2.ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.375-470.

CARVALHO, R. P. de. Eficiência na absorção e uso de nitrogênio em cultivares de milho. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 65 p. 2008.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. 4º Levantamento. Brasília, DF: 2017. Acesso em 28 de janeiro de 2017. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_01\\_11\\_11\\_30\\_39\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_01_11_11_30_39_boletim_graos_janeiro_2017.pdf)

CORREA, O. S.; ROMERO, A. M.; SORIA, M. A.; DEESTRADA, M. *Azospirillum brasilense* – plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. **Asociación Argentina de Microbiología**, p.87-95, 2008.

ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. Associative and eudoplytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. **Dordrecht: Springer**, (Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress) v. 5, 321 p. 2007.

FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. **Revista Brasileira de Engenharia Ambiental**, Campina Grande, v.2, n.1, p 6-16, 1998.

FAGERIA, N. K.; SLATON, N. A.; BALIGAR, V. C. Nutrient management for improving lowland rice productivity and sustainability. **Advances in Agronomy**, v. 80, p. 63-152, 2003.

FAGERIA, N. K.; SANTOS, A. B.; CUTRIM, V. A. Produtividade de arroz irrigado e eficiência de uso do nitrogênio influenciadas pela fertilização nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 07, p. 1029-1034, 2007.

FANCELLI, A. L. **Boas práticas para o uso eficiente de fertilizantes na cultura do milho**. IPNI-International Plant Nutrition Institute Brazil, (IPNI. Informações Agronômicas) v. 131, 16 p. 2010.

FERNANDÉZ, J. E.; MURILLO, J. M.; MORENO, F.; CABRERA, F.; FERNANDÉZ-BOY, E. 1998. Reducing fertilization for maize in southwest Spain. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 29, p. 2829-2840, 1998.

FERNANDES, F. C. S.; BUZZETI, S.; ARF, O.; ANDRADE, J. A. C. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 4, n. 2, p. 195-204, 2005.

FERNANDES, F. C. S.; LIBARDI, P. L. Percentagem de recuperação de nitrogênio pelo milho, para diferentes doses e parcelamentos do fertilizante nitrogenado. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.6, n. 3, p. 285-296, 2007.

FIGUEIREDO, M.V.B.; JUNIOR, M. A. L.; MESSIAS, A. S.; MENEZES, R. S. C. Potential Impact of biological nitrogen fixation and organic fertilization on corn growth and yield in low external input systems. In: DANFORTH, A.T. (Ed.). **Corn crop production growth, fertilization and yield**. New York: Nova Science Publisher, p.227-255, 2009.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Embrapa Soja Documentos**, v. 283, 2007.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.S.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, n.1-2, p. 413–425, 2010.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja Documentos**, v. 325, 2011.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant Microbiology**, v.17, p.1078-1085. 2004.

KOLCHINSKI, E. M; SCHUCH, L. O. B. Eficiência no uso do nitrogênio por cultivares de aveia branca de acordo com a adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 1033-1038, 2003.

MARINI, D., GUIMARÃES, V. F., DARTORA, J., LANA, M. C., JÚNIOR, A. S. P. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**. v. 62, n. 1, p.117-123, 2015.

MENDES, E. G. R. Uso do inibidor de urease para aumentar a eficiência do nitrogênio na cultura do milho. **Dissertação** (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís. 46 p. 2016.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors which contribute of efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, v.74, n. 3, p. 562-564, 1982.

MÔRO, G. V.; FRITSCHÉ, N. R. Importância e uso do milho no Brasil. In: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. (Eds.). **Milho: do plantio à colheita**. 1°.ed. Viçosa: UFV: p. 09-25, 2015.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MÜLLER, T. M., SANDINI, I. E., RODRIGUES, J. D., NOVAKOWISKI, J. H., BASI, S., KAMINSKI, T. H. Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases corn yield. **Ciência Rural**. V.46, n.2, p.210-2015, 2016.

NOVAKOWISKI, J.H.; DANDINI, I.E.; FALBO, M.K.; MORAES, A.; CHENG, N.C. Efeito Residual da Adubação Nitrogenada e Inoculação de *Azospirillum brasilense* na Cultura do Milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, suplemento 1, p. 1687-1698, 2011.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1591-1601. 1994

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate 48 plants. **Applied and Environment Microbiology**, v.6, n.7, p.366-370, 1997.

PORTUGAL, J. R., ARF, O., PERES, A. R., GITTI, D. C., RODRIGUES, R. A. F., GARCIA, N. F. S. G., GARÉ, L. M. *Azospirillum brasilense* promotes increment in corn production. **African Journal Agricultural Research**, v. 11, n. 19, p.1688-1698, 2016.

ROBERTSON, G. P.; VITOUSEK, P. M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. **Annual Review of Environment and Resources**. v. 34, p. 97–125, 2009.

SAIKIA S.P.; JAIN V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma?, **Current Science**. v. 92, p. 317–322, 2007.

SOUZA, S. R.; FENANDES, M. S. In: FERNANDES, M. S. (Ed). *Nutrição Mineral de Plantas*. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. p. 215-252, 2006.

SUBEDI, K. D.; MA, B. L. Assessment of some major yield-limiting factors on maize production in a humid temperate environment. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 21-26, 2009.

SCIVITTARO, W.B. et al. Utilização de nitrogênio de adubos verdes e mineral pelo milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, n.4, p.917-926, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre, Artmed, 848p, 2009.

USDA. **Grain: World Markets and Trade**. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. p. 1-56. 2017. Acesso em 28 de janeiro de 2017. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/downloads>.

YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. Como melhorar a eficiência da adubação nitrogenada do milho. **Informações Agronômicas**, Piracicaba: POTAFOS, n.91, p.1-5, 2000.

WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n.11, p. 2277- 2285, 2000.

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsables for the uptake and Partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 52, p. 659-688, 2001.

ZAIED, K. A.; EL HADY, A. H.; AFIFY, A. H.; NASSEF, M. A. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. Pakistan. **Journal of Biological Sciences**, v.4, p.344-358. 2003.

---

## **CAPÍTULO II**

1 **MILHO INOCULADO COM *Azospirillum brasilense* E NITROGÊNIO EM COBERTURA**  
2 **AUMENTA A PRODUTIVIDADE E EFICIÊNCIA DO USO DO NITROGÊNIO**

3  
4 **RESUMO:** O manejo do nitrogênio (N) é essencial para maximizar a eficiência do uso do N (EUN)  
5 e sustentar a produção agrícola bem como reduzir os impactos ambientais. Hipotetizamos que a  
6 combinação de N e inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal da espécie  
7 *Azospirillum brasilense* pode aumentar o rendimento produtivo e a EUN para a cultura do milho.  
8 Devido a necessidade de informações sobre a fixação biológica do N por plantas não leguminosas,  
9 avaliou-se a relação entre formas de inoculação de *A. brasilense* e doses de N na produtividade de  
10 grãos e eficiência do uso do N. Foram realizados dois experimentos em campo (2015-2016), no  
11 delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos  
12 pelo arranjo fatorial 4 x 3: quatro doses de N (0, 45, 90 e 180 kg ha<sup>-1</sup>), aplicadas em cobertura, na  
13 forma de ureia (45 % de N) com três formas de inoculação de *A. brasilense* (sementes, foliar e  
14 controle). O Nitro 1000 Gramíneas<sup>®</sup> foi o inoculante utilizado nos tratamentos. Foi aplicado 100  
15 mL ha<sup>-1</sup> do produto comercial no tratamento via semente antes do plantio e 200 mL ha<sup>-1</sup> no  
16 tratamento via foliar. As doses de N aplicadas em cobertura e a aplicação do tratamento via foliar  
17 foram realizadas na fase V4. As variáveis avaliadas foram: produtividade de grãos (PG, Mg ha<sup>-1</sup>),  
18 índice de colheita (IC) e de N (ICN), remobilização do N (RN, kg ha<sup>-1</sup>), eficiência de remobilização  
19 do N (ERN, %), eficiência do uso do N (EUN, kg kg<sup>-1</sup>), eficiência agrônômica (EA, kg kg<sup>-1</sup>),  
20 eficiência de utilização do N (EUtN, kg kg<sup>-1</sup>) e eficiência de absorção do N (EAN, kg kg<sup>-1</sup>). Com os  
21 nossos resultados podemos concluir que houve incremento de 50 e 20 % na PG e 50 e 42 % na EUN  
22 onde recebeu inoculação com *A. brasilense* via semente em relação ao tratamento que não foi  
23 inoculado, em 2015 e 2016, respectivamente. As doses de N influenciam positivamente a PG e  
24 reduzem a EUN e dos seus componentes.

25  
26 **Palavras-chave:** *Zea Mays* L., inoculante, produção, bactérias diazotróficas, fixação de nitrogênio.

27  
28 **MAIZE CROP INOCULATED WITH *Azospirillum brasilense* AND NITROGEN TOP-**  
29 **DRESSING INCREASE GRAIN YIELD AND NITROGEN USE EFFICIENCY**

30  
31 **ABSTRACT:** Nitrogen (N) management is essential to maximize Nitrogen use efficiency (NUE)  
32 and sustain agricultural production as well as reduce environmental impacts. We hypothesized that  
33 the combination of N and inoculants containing plant growth promoting bacteria (*Azospirillum*  
34 *brasilense*) can increase grain yield and NUE for the maize crop. Due to the need for information on

35 the biological fixation of N by non-leguminous plants, the present study aimed evaluate the  
36 relationship between inoculation way of application of *A. brasilense* and N fertilization rates on  
37 grain yield and NUE on maize crop. Two experiments were carried out in the field (2015 and 2016),  
38 in a randomized complete block design, with four replications. The treatments were performed in  
39 factorial arrangement 4 x 3: four N fertilization rates (0, 45, 90 and 180 kg ha<sup>-1</sup>), applied as top-  
40 dressing with three inoculation way (seeds, leaf and control). Urea (45% of N) was N source. Nitro  
41 1000 Gramíneas<sup>®</sup> was the inoculant used in the treatments. It was performed with 100 mL ha<sup>-1</sup> of  
42 the commercial product in seed-inoculant before planting and 200 mL ha<sup>-1</sup> in leaf-inoculant  
43 spraying application. The N fertilization rates and *A. brasilense* leaf-inoculant spray were applied at  
44 the corn growth stage V4. The variable evaluated were: grain yield (GY, Mg ha<sup>-1</sup>), N harvest index  
45 (NHI), harvest index (HI), N remobilization (NR, kg ha<sup>-1</sup>), N remobilization efficiency (NRE, %), N  
46 utilization efficiency (NUtE, kg kg<sup>-1</sup>), N uptake efficiency (NUpE, kg kg<sup>-1</sup>) and agronomic  
47 efficiency (AE, kg kg<sup>-1</sup>). With these results we can conclude that there was increase of 50 and 20%  
48 in GY and 50 and 42% in NUE in seed-inoculant treatment when compared with control, in 2015  
49 and 2016, respectively. N fertilization rates affect positively the GY and reduce NUE and its  
50 components.

51

52 **Keywords:** *Zea Mays* L., inoculation, production, diazotrophic bacteria, nitrogen fixation.

53

## 54 INTRODUÇÃO

55 O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais produzido no mundo e possui uma sólida importância para a  
56 economia global (USDA, 2017). Dada sua importância, é necessário fornecer nutrientes às plantas,  
57 dentre eles está incluído o nitrogênio (N), para aumentar a produtividade da cultura do milho. O N é  
58 o nutriente essencial para o desenvolvimento e é um fator limitante para o crescimento das plantas.  
59 A sua deficiência pode acarretar perdas de produtividade das culturas. A adubação nitrogenada  
60 representa grande parte do custo de produção do milho e pode variar de acordo com a produtividade  
61 que se deseja alcançar (Dartora et al., 2013). Em regiões que apresentam solos de baixa fertilidade,  
62 o N torna-se o fator limitante para a produção agrícola. Diante dessa situação, os agricultores, com  
63 intuito de aumentar o rendimento das culturas, aumentam demasiadamente a quantidade de N  
64 fornecida sem qualquer critério (Braun et al., 2015). Nessa situação, apenas 30 a 40 % do N  
65 fornecido é utilizado pelas culturas e 60 a 70 % do N é perdido por lixiviação, volatilização e  
66 desnitrificação, os quais contribuem para aumentar a poluição ambiental (Hirel et al., 2007; Rimski-  
67 Korsakov et al., 2012; Xu et al., 2012; Kong et al., 2016).

68 Dentre outros fatores, as perdas do N contribuem para a baixa eficiência do uso do N (EUN, kg kg<sup>-1</sup>)  
69 <sup>1</sup>), que é obtida pela relação entre a produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) e a quantidade de N aplicado  
70 (kg ha<sup>-1</sup>). Dois componentes fisiológicos contribuem para aumentar a EUN nas plantas: a eficiência  
71 de absorção de N (EAN), definida como a capacidade da planta absorver N; e a eficiência de  
72 utilização de N (EUtN), definida como a capacidade da planta usar o N para a produção de grãos  
73 (Moll et al., 1982; Xu et al., 2012; Gaju et al., 2014). Com a baixa EUN e a elevada demanda de N  
74 pelas culturas, a fixação biológica de N (FBN) por plantas não leguminosas é uma boa estratégia de  
75 manejo do N para aumentar a EUN e a produtividade de grãos. Além disso, a cultura pode se  
76 beneficiar com a FBN e reduzir a necessidade de N de fontes sintéticas.

77 As plantas não são capazes de absorver o N da atmosfera, portanto, outras fontes de N devem ser  
78 adicionadas para suprir as necessidades das plantas. Dentre as alternativas, o uso de bactérias que  
79 fixam N e promovem o crescimento de plantas é uma vantagem para os sistemas de produção. A  
80 FBN com *Azospirillum brasilense* pode fornecer 20-25 % das necessidades de N total exigidas pela  
81 cultura do arroz e milho (Saikia e Jain, 2007; Montanez et al., 2012).

82 As bactérias responsáveis pela FBN são chamadas diazotróficas e realizam a conversão do N<sub>2</sub>  
83 atmosférico em amônia (N-NH<sub>3</sub>), com gasto de 16 ATP e 8 elétrons (Franche et al., 2009). A  
84 enzima nitrogenase é o complexo enzimático responsável para catalisar a conversão do N<sub>2</sub>  
85 atmosférico em N-NH<sub>3</sub> (Santi et al., 2013) e é uma forma que pode ser utilizada pelas plantas.

86 As bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* têm sido amplamente estudadas, por causa de sua  
87 eficiência em promover o crescimento das plantas de interesse agrônômico. Nas plantas, são  
88 encontradas na rizosfera em associação com as raízes. Esta associação é capaz de potencializar o  
89 crescimento da planta pelo fato de proporcionar a produção de hormônios como auxinas,  
90 citocininas, giberelinas e atuar como agentes de controle biológico de patógenos (Cassán et al.,  
91 2014; Glick, 2014). Ademais, elevadas concentrações de ácido indolacético (AIA) em raízes de  
92 plantas de milho colonizadas com *Azospirillum* foram reportadas por Fallik et al. (1989); no  
93 entanto, neste estudo não foi possível concluir se o aumento de AIA foi produzido pela planta, pela  
94 ação bacteriana ou por ambos. Nesse mesmo contexto, esses microorganismos promovem o  
95 crescimento das plantas por meio da solubilização de fósforo (Hungria et al., 2010; Bakhshandeh et  
96 al., 2014) e pela redução dos níveis de etileno nas raízes pela ação da enzima 1-aminociclopropano-  
97 1-ácido carboxílico- deaminase (ACC-deaminase) (Prigent-Combaret et al., 2008; Glick, 2014).

98 Estes últimos autores relataram que essa enzima é responsável pela hidrólise do ACC, que é o  
99 precursor imediato para síntese de etileno nas plantas. Em geral, Dobbelaere et al. (2003) relataram  
100 que as bactérias promotoras de crescimento beneficiam o crescimento das plantas e a produtividade  
101 de grãos pela combinação de todos esses mecanismos.

102 Na literatura especializada há trabalhos em que foi estudada a relação de *A. brasilense* e N sobre o  
103 crescimento de plantas (Repke et al., 2013; Costa et al., 2015), na atividade enzimática no solo  
104 (Morais et al., 2016) e no conteúdo de clorofila (Pereira et al., 2015). Com base nos benefícios das  
105 bactérias promotoras de crescimento, Müller et al. (2016) relataram que a inoculação com *A.*  
106 *brasilense* proporcionou incremento na produtividade de 702 kg ha<sup>-1</sup> para inoculação no sulco de  
107 semeadura e de 432 kg ha<sup>-1</sup> no tratamento de sementes, comparado com o tratamento que não  
108 recebeu a bactéria. Da mesma forma, Marini et al. (2015) relataram que a inoculação com *A.*  
109 *brasilense* proporcionou incrementos de 11 % na área foliar e 12 % na massa de matéria seca da  
110 parte aérea do milho.

111 Estudos sobre o uso de bactérias simbióticas para o crescimento de plantas não-leguminosas são  
112 relativamente recentes e raros. No Brasil também são escassos os estudos onde relacionam a  
113 interação entre o N e *A. brasilense* na produtividade de grãos e na EUN na cultura do milho. Além  
114 disso, são insuficientes as informações sobre qual é a melhor forma de inoculação de *A. brasilense*  
115 para a região do trópico úmido.

116 Devido a necessidade de informações sobre a fixação biológica do N por plantas não leguminosas, o  
117 presente estudo teve como objetivo avaliar a relação entre formas de inoculação de *Azospirillum*  
118 *brasilense* e doses de N em cobertura sobre a produtividade de grãos e a eficiência do uso do N pela  
119 cultura do milho.

120

## 121 MATERIAL E MÉTODOS

122 Os experimentos foram conduzidos em condições de campo, durante o período de novembro de  
123 2015 a março de 2016 e de junho a setembro de 2016, localizado nas coordenadas geográficas 2°35'  
124 S e 44°12' W, com altitude de 4 m e com irrigação suplementar. A região possui clima tropical  
125 quente e úmido, com temperaturas médias anuais de 26 °C e precipitações médias anuais de 2100  
126 mm e duas estações bem definidas: uma estação chuvosa que estende de janeiro a junho e uma  
127 estação seca com déficit hídrico de julho a dezembro. As médias das temperaturas mensais e as  
128 precipitações acumuladas obtidas durante o período experimental estão apresentadas na figura 1  
129 (Inmet, 2016). O solo foi classificado como argissolo vermelho amarelo distrófico (Embrapa, 2013)  
130 e textura franco arenosa. As características químicas e físicas do solo na camada de 0-20 cm, antes  
131 da instalação dos experimentos, em 2015, foram: pH = 4,5 (CaCl<sub>2</sub>); matéria orgânica = 13 g dm<sup>-3</sup>; P  
132 = 18 mg dm<sup>-3</sup>; K = 0,5mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca = 12 mmol<sub>c</sub>dm<sup>-3</sup>; Mg = 8 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H + Al<sup>3+</sup> = 15mmol<sub>c</sub>  
133 dm<sup>-3</sup>; soma de base = 20,5mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; CTC = 35,5 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; V = 58 %; areia grossa = 230 g kg<sup>-1</sup>;  
134 areia fina = 630 g kg<sup>-1</sup>; silte = 20 g kg<sup>-1</sup>; argila = 120 g kg<sup>-1</sup>; relação silte/argila = 0,16;  
135 condutividade a 25 °C = 0,07 mmhos cm<sup>-1</sup>.

136 Antes da realização dos experimentos, foi efetuada a limpeza da área experimental com roçagem  
137 mecanizada e os resíduos deixados sob a superfície do solo. Posteriormente, foi aplicado 0,77 t ha<sup>-1</sup>  
138 de calcário agrícola (PRNT= 91 %, teor de CaO = 32 % e de MgO = 15 %) distribuído  
139 manualmente, a lanço e de maneira uniforme em toda a área experimental. No suco de plantio  
140 foram aplicados 45 kg ha<sup>-1</sup> de ureia (45 % de N), 555 kg ha<sup>-1</sup> de superfosfato simples (18 % de  
141 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e 134 kg ha<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (60 % de K<sub>2</sub>O).

142 A parcela experimental foi constituída de quatro fileiras de 1,0 m de comprimento, espaçadas de  
143 0,80 m. A densidade de semeadura adotada foi de quatro plantas m<sup>-1</sup>, obtidas por meio de desbaste  
144 após 10 dias da emergência das plantas para atingir o estande de 50.000 plantas ha<sup>-1</sup>. As duas  
145 fileiras laterais e 0,5 m de cada extremidade das fileiras centrais serviram como bordadura. O milho  
146 utilizado foi o híbrido AG-1051.

147 O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, em  
148 esquema fatorial. Os tratamentos foram constituídos pela combinação das quatro doses de N (0, 45,  
149 90 e 180 kg ha<sup>-1</sup>) com três formas de inoculação de *A. brasilense* (sementes, foliar e controle). No  
150 estádio V4 (com a quarta folha completamente desenvolvida) foram realizadas as aplicações do N  
151 em cobertura e do inoculante via foliar. A fonte de N foi ureia (45% de N). A ureia foi aplicada  
152 manualmente em fila contínua, superficial a 0,10 m do sulco de plantio. Após a aplicação foi  
153 realizada a cobertura com solo para diminuir os efeitos da volatilização do N.

154 O Nitro 1000 Gramíneas<sup>®</sup> (inoculante líquido para milho com estirpes AbV5 e AbV6) contém 2,0 x  
155 10<sup>-8</sup> células mL<sup>-1</sup> e foi o inoculante utilizado nos tratamentos. Foi aplicado 100 mL ha<sup>-1</sup> do produto  
156 comercial no tratamento de inoculação via sementes, conforme as recomendações do fabricante e  
157 200 mL ha<sup>-1</sup> no tratamento via foliar.

158 A inoculação via semente foi feita minutos antes da semeadura. Foram utilizados sacos plásticos  
159 onde as sementes receberam a dose do produto comercial. As sementes foram agitadas por  
160 aproximadamente 5 min após a aplicação do produto para homogeneizar a distribuição da solução  
161 às sementes. Para a inoculação via foliar foi utilizado pulverizador costal equipado com bico tipo  
162 cone vazio, modelo JA-2 com consumo de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>. Para evitar a deriva do produto,  
163 todas as parcelas que receberam a o inoculante via foliar foram protegidas com lonas plásticas.

164 Os tratos culturais foram realizados de acordo com a necessidade da cultura. Foi adotada a irrigação  
165 suplementar por aspersão duas vezes por semana para evitar a ocorrência de estresse hídrico.

166 Foram coletadas plantas representativas, aleatoriamente, tanto na antese (50 dias após o plantio,  
167 para os dois experimentos) quanto na maturação fisiológica (95 dias após o plantio, em 2015; 77  
168 dias após o plantio, em 2016). Em 2016, houve a necessidade de antecipar a colheita do milho  
169 devido ao ataque de pássaros da espécie *Psittacara leucophthalma*. Foi considerada a fase de antese

170 quando 50 % das plantas das duas linhas centrais da parcela estavam com inflorescência visível.  
171 Nessas fases, a parte aérea das plantas foi cortada rente ao solo, colocada em saco de papel e  
172 identificada. Na maturação fisiológica, foram selecionadas as espigas dessas plantas e colhidas. O  
173 teor de água dos grãos foi padronizado para 130 g kg<sup>-1</sup>, para determinar a produtividade de grãos  
174 (PG, Mg ha<sup>-1</sup>). Posteriormente, as plantas e os grãos foram acondicionados em sacos de papel e  
175 colocados em estufa de ventilação forçada de ar a 70 °C, até atingirem massa constante. Após a  
176 secagem, determinou-se o conteúdo de matéria da planta seca (CMPS, kg ha<sup>-1</sup>) e dos grãos secos  
177 (CMGS, kg ha<sup>-1</sup>). Na matéria seca dessas amostras foi quantificado o teor de N total pelo método de  
178 Kjeldahl, conforme metodologia descrito por Tedesco et al. (1995). O conteúdo de N total na planta  
179 [antese (CNA, kg ha<sup>-1</sup>) e maturidade fisiológica (CNM, kg ha<sup>-1</sup>)] bem como nos grãos (CNG, kg ha<sup>-1</sup>)  
180 <sup>1</sup>) foi determinado pela multiplicação do teor de N em cada fração pela matéria da planta seca e dos  
181 grãos secos, respectivamente.

182 Diante desses dados foram calculadas as seguintes variáveis: remobilização do N (RN, kg ha<sup>-1</sup>) =  
183 CNA – CNM; eficiência de remobilização do N (ERN, %) = [(CNA – CNM)/CNA] x 100; índice  
184 de colheita de N (ICN) = CNG/CNM; índice de colheita (IC) = CMGS/CMSP. De acordo com  
185 metodologia proposta por Moll et al. (1982) foram calculadas as seguintes variáveis:  
186 eficiência agrônômica (EA, kg kg<sup>-1</sup>) = [(PG<sub>x</sub> – PG<sub>0</sub>)/N<sub>x</sub>], em que: PG<sub>x</sub>, PG<sub>0</sub> e N<sub>x</sub> são as  
187 produtividades de grãos (PG, kg ha<sup>-1</sup>) obtidas no tratamento com N e no tratamento sem N; N<sub>x</sub> é a  
188 quantidade em kg de N aplicado; eficiência de absorção do N (EAN, kg kg<sup>-1</sup>) = CNM/N<sub>x</sub>; eficiência  
189 de utilização do N (EUtN, kg kg<sup>-1</sup>) = PG/CNM; eficiência do uso do N (EUN, kg kg<sup>-1</sup>) = EAN x  
190 EUtN.

191 Para cada característica avaliada, procedeu-se à análise de variância (ANOVA), com o objetivo de  
192 desdobrar a soma de quadrados de tratamentos para cada fator e para a interação entre os fatores.  
193 Foi adotado  $p \leq 0,25$  para a interação e  $p \leq 0,05$  para o teste de Tukey, como recomendado por Perecin  
194 e Cargnelutti Filho (2008). Quando a interação entre os fatores não foi significativa, realizou-se à  
195 comparação entre as médias marginais dos níveis de inoculação e análise de regressão para as doses  
196 de N. Quando a interação entre os fatores foi significativa, em cada nível de inoculação, procedeu-  
197 se à análise de regressão para as doses de N; e foi realizada a comparação entre as médias marginais  
198 dos níveis de inoculação. Os modelos de regressão ajustados foram escolhidos com base no sentido  
199 biológico, na significância dos coeficientes de regressão, pelo teste “t” de Student ( $p \leq 0,05$ ), e no  
200 coeficiente de determinação, calculado pela relação ( $R^2 = \text{SQRegressão}/\text{SQTratamento}$ ). A dose de  
201 N que proporcionou a máxima PG foi obtida igualando-se a primeira derivada da equação da  
202 produtividade de grãos (PG) em resposta a dose de N a zero. Para a execução das análises  
203 estatísticas foi utilizado o Software R com a interface RStudio (<http://www.R-project.org/>).

## 204 **RESULTADOS**

### 205 **Produtividade de grãos e os componentes de produção**

206 A interação doses de N x formas de inoculação do *A. brasilense* influenciou a produtividade de  
207 grãos ( $p=0,0381$ ) em 2015 e não influenciou significativamente em 2016 ( $p=0,5444$ ) (Tabela 1), o  
208 que demonstra o comportamento diferencial quanto às doses de N e a influência do fator forma de  
209 inoculação na produtividade de grãos (PG) da cultura. Nos dois experimentos, as médias da PG  
210 foram influenciadas pelas formas de inoculação ( $p<0,0001$ ) (Tabela 1).

211 Em 2015, a média da PG com inoculação via semente foi 8,0 % maior que a média da PG com  
212 inoculação via foliar e 50 % maior que a média da PG onde não recebeu o inoculante com *A.*  
213 *brasilense*. Em 2016, não houve diferença significativa entre as médias da PG no tratamento de  
214 inoculação via semente e o tratamento controle, as quais diferiram da média da PG no tratamento de  
215 inoculação via semente. A média da PG com inoculação via semente foi 20 % maior que a média da  
216 PG com inoculação via foliar e 20 % maior que o tratamento sem inoculação (Tabela 1). No ano de  
217 2015, nas três formas de inoculação do *A. brasilense*, a PG aumentou de forma quadrático crescente  
218 com o aumento das doses de N (Figura 2). A PG aumentou até a dose ótima de N de 114,07 kg ha<sup>-1</sup>  
219 de N, 115,45 kg ha<sup>-1</sup> de N e 88,54 kg ha<sup>-1</sup> de N e proporcionaram a máxima PG de 6,01 Mg ha<sup>-1</sup>;  
220 5,58 Mg ha<sup>-1</sup> e 3,95 Mg ha<sup>-1</sup>, para a inoculação com *A. brasilense* via semente, via foliar e controle,  
221 respectivamente (Figura 2A). Em 2016, a PG aumento de forma quadrático crescente com o  
222 aumento das doses de N (Figura 2B). A PG aumentou até a dose ótima de N de 96,43 kg ha<sup>-1</sup> de N e  
223 proporcionou a máxima PG de 3,34 Mg ha<sup>-1</sup>.

224 A interação doses de N x formas de inoculação não influenciou significativamente, em 2015 e 2016,  
225 o ICN ( $p=0,8316$ ;  $p=0,9339$ ) e IC ( $p=0,5367$ ;  $p=0,8884$ ) (Tabela 1). As formas de inoculação  
226 influenciaram tanto em 2015 quanto em 2016 o ICN ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ) e IC ( $p<0,0001$ ;  $p<0,01$ ). O  
227 ICN e o IC apresentaram as menores médias no tratamento sem inoculação com *A. brasilense*  
228 quando comparadas com o tratamento de inoculação via semente (Tabela 1). Em 2015, as doses de  
229 N não influenciaram o ICN (média=0,48) e o IC (média=0,60); mas em 2016, o ICN ( $\hat{Y}=0,3295-$   
230  $0,0002662^{**}N$ ,  $r=0,90$ ) reduziu de forma linear e o IC ( $\hat{Y}=0,37272+0,0004604^{*}N-0,00000406^{*}N^2$ ,  
231  $R^2=0,98$ ) aumentou de forma quadrática crescente com o aumento das doses de N.

232

### 233 **Eficiência do uso do N e seus componentes**

234 Nos dois experimentos, a interação doses de N x formas de inoculação não influenciou a  
235 remobilização do N (RN) ( $p=0,9166$ ;  $p=0,9276$ ) e a eficiência de remobilização do N (ERN)  
236 ( $p=0,9979$ ;  $p=0,6009$ ). As formas de inoculação do *A. brasilense* não influenciaram a RN  
237 ( $p=0,1517$ ;  $p=0,4470$ ) e ERN ( $p=0,0989$ ;  $p=0,8304$ ) (Tabela 2). Em 2015 e 2016, a RN

238 ( $\hat{Y}=61,47938+0,48343**N-0,0020637**N^2$ ,  $R^2 = 0,99$ ;  $\hat{Y}=84,4055+0,6618*N-0,003505*N^2$ ,  $R^2=$   
239  $0,97$ ) aumentou de forma quadrática crescente com o aumento das doses de N. A ERN não foi  
240 influenciada pelas doses de N tanto em 2015 (média=65,69) quanto em 2016 (média=51,82).  
241 Em 2015, a interação entre as doses de N e as formas de inoculação com *A. brasilense* foi  
242 significativa sobre a EAN ( $p<0,0001$ ) e a EUN ( $p<0,0001$ ), mas não foi significativa sobre a EA  
243 ( $p=0,4287$ ) e a EUtN ( $p=0,6683$ ) (Tabela 3). Em 2016, a interação entre as doses de N e as formas  
244 de inoculação com *A. brasilense* influenciaram significativa a EUN ( $p=0,0003$ ), mas não  
245 influenciaram significativa a EA ( $p=0,5822$ ), a EUtN ( $p=0,7955$ ) e a EAN ( $p=0,6396$ ) (Tabela 3).  
246 Em 2015, as formas de inoculação influenciaram a EAN ( $p<0,0001$ ), EUN ( $p<0,0001$ ), EA  
247 ( $p<0,0001$ ) e a EUtN ( $p<0,05$ ). Em 2016, as formas de inoculação do *A. brasilense* influenciaram a  
248 EAN ( $p=0,0285$ ) e a EUN ( $p<0,0001$ ), mas não influenciaram significativamente a EA ( $p=0,3087$ ) e  
249 a EUtN ( $p=0,2067$ ) (Tabela 3).  
250 Houve aumento de 50 e 43 % na EUN onde recebeu a inoculação com *A. brasilense* via semente em  
251 relação ao tratamento que não foi inoculado, em 2015 e 2016, respectivamente. A EAN aumentou  
252 62 % quando recebeu a inoculação com *A. brasilense* via semente em relação ao tratamento que não  
253 foi inoculado, em 2015.  
254 Nos experimentos realizados em 2015 e 2016, dentro das formas de inoculação com *A. brasilense*,  
255 as doses de N influenciaram a EA ( $p<0,0001$ ;  $p<0,0001$ ), EAN ( $p<0,0001$ ;  $p<0,0001$ ), EUN  
256 ( $p<0,0001$ ;  $p<0,0001$ ). Em 2015, as doses de N não influenciaram a EUtN ( $p=0,6180$ ); em 2016, as  
257 doses de N influenciaram a EUtN ( $p<0,0001$ ) (Tabela 3).  
258 A EA reduziu 76 % em 2015 e 91 % em 2016 com o aumento da dose de 45 kg ha<sup>-1</sup> de N para 180  
259 kg ha<sup>-1</sup> de N. Em 2016, houve redução de 26 % na EUtN e 70 % na EAN com o aumento da dose de  
260 45 kg ha<sup>-1</sup> de N para 180 kg ha<sup>-1</sup> de N.

261

## 262 **DISCUSSÃO**

263 A nossa hipótese foi que as formas de inoculação de bactérias diazotróficas da espécie *Azospirillum*  
264 *brasilense* associadas a doses de N poderiam aumentar a produtividade de grãos e a eficiência do  
265 uso do N (EUN) pela cultura do milho. Diante dos nossos resultados, essa hipótese foi confirmada  
266 com a realização dos dois experimentos.

267 A média da PG (4,61 Mg ha<sup>-1</sup>; n=48) em 2015 foi 57% maior que a média da PG em 2016 (2,93  
268 Mg ha<sup>-1</sup>; n=48) (Tabela 1). Podemos relatar como um ponto negativo do trabalho, a redução na PG  
269 em 2016, que foi devido a necessidade de antecipar a colheita do milho pelo ataque de pássaros.

270 Nos dois experimentos, o *A. brasilense* inoculado via semente proporcionou a maior média de PG  
271 em relação ao tratamento inoculado via foliar e controle (Tabela 1). A média da PG com inoculação

272 via semente foi 50 % em 2015 e 20 % em 2016 maior que a média da PG em relação ao controle  
273 sem inoculante. Nossos resultados estão em conformidade com Hungria et al. (2010), onde  
274 avaliaram o uso de *A. brasilense* sobre o milho e encontraram aumento em 30 % na produtividade  
275 de grãos em relação ao controle sem inoculação. Por outro lado, Godoy et al. (2011), Repke et al.  
276 (2013) e Vogt et al. (2014) não relataram efeito significativo do inoculante à base de *Azospirillum*  
277 spp. sobre a produtividade de grãos de milho. A resposta da inoculação pode variar de acordo com o  
278 genótipo da planta, estirpe bacteriana, condições ambientais, práticas agrícolas, bem como com a  
279 quantidade e qualidade das células bacterianas utilizadas como inoculante (Matsumura et al., 2015).  
280 Houve interação significativa entre formas de inoculação de *A. brasilense* e doses de N sobre a PG  
281 apenas para 2015 (Tabela 1). Interação significativa demonstra que houve comportamento  
282 diferenciado do milho para a PG pelo uso da forma de inoculação e das doses de N. Houve  
283 incremento quadrático crescente na PG em resposta às doses de N em cobertura (Figura 2A e 2B).  
284 Isso comprova que os resultados obtidos na maioria dos trabalhos com aplicação de N em cobertura  
285 no milho (Araújo et al., 2014; Costa et al., 2015; Müller et al., 2016). Esse fenômeno demonstra ser  
286 uma cultura exigente em N e responsiva à aplicação desse nutriente. Houve aumento na PG pela  
287 cultura do milho inoculado com *A. brasilense* (Tabela 1), mas ainda não foi possível reduzir a  
288 quantidade de N aplicada. Araújo et al. (2014) relataram aumento na PG e redução de 22 kg ha<sup>-1</sup> de  
289 N onde aplicou o *A. brasilense* em relação ao controle sem inoculação. Da mesma forma, Saikia e  
290 Jain (2007) e Montanez et al. (2012) relataram que o uso do *A. brasilense* pode fornecer 20-25 %  
291 das necessidades de N total exigidas pela cultura do arroz e milho.

292 Não deve haver uma substituição total da adubação nitrogenada por inoculação com *A. brasilense*,  
293 mas é preciso aperfeiçoar a partição do N, o que pode resultar em aumento de produtividade,  
294 mesmo em níveis baixos de N. Essas respostas dependem das concentrações das bactérias, das  
295 condições de solo e clima de cada ecossistema, e também sobre a tecnologia de inoculação a ser  
296 utilizada.

297 O índice de colheita de (ICN) representa a capacidade pelas plantas de milho de translocar o N  
298 presente nas folhas e colmo para os grãos. Em nosso estudo, em 2016, o ICN reduziu de forma  
299 linear com o aumento das doses de N aplicadas em cobertura. Já no estudo de Caviglia et al. (2014)  
300 relataram aumento no ICN com o aumento na dose de N de 0 para 200 kg ha<sup>-1</sup>. Com base nos  
301 relatos de Fageria (1998), os resultados encontrados no presente estudo se explicam, pois, a  
302 eficiência nutricional diminui com o aumento dos níveis de um nutriente, caso tenha havido  
303 resposta da cultura, em virtude da diminuição relativa da produção com sucessiva adição de  
304 nutriente, assim, a melhor eficiência nutricional é aquela determinada sob nível de nutriente  
305 adequado em que a produtividade máxima é obtida.

306 O índice de colheita (IC) é aplicado como uma medida de eficiência da planta, isto é, qual a  
307 proporção dos fotoassimilados foi direcionada aos grãos. Segundo Magalhães et al. (2009) o IC  
308 médio da cultura do milho é de 0,60, resultado esse que foi similar ao encontrado no experimento  
309 de 2015, com IC variando próximos a média citada. Porém no experimento de 2016, os valores  
310 foram aproximadamente a metade dos observados em 2015. Duarte et al. (2013) demonstrou que o  
311 IC de uma cultura é altamente influenciado pela densidade de semeadura, disponibilidade de água,  
312 nutrientes e temperatura. O alto valor do IC indica um maior direcionamento e aproveitamento de  
313 fotoassimilados para o rendimento de grãos, ou seja, é status de N que maximiza o crescimento da  
314 cultura (Lemaire e Gastal, 2009).

315 A remobilização de N foi influenciada positivamente pelas doses de N apenas no experimento de  
316 2015. A máxima remobilização de N foi obtida na dose ótima de 117,12 e 94,40 kg ha<sup>-1</sup> de N para  
317 os anos de 2015 e 2016. A remobilização de N ocorre durante todo o período de desenvolvimento  
318 da planta, principalmente entre os órgãos reprodutivos e os vegetativos, na qual há uma  
319 predominância da redistribuição de N do colmo e de folhas para os grãos (Didonet et al., 2000).  
320 Hirel et al. (2001) estudando as bases genéticas e fisiológicas na eficiência do uso de nitrogênio  
321 pela cultura do milho, correlacionaram a assimilação e a remobilização de nitrogênio com a  
322 produção. Concluíram que o aumento da produção de grãos observada não foi apenas devido ao  
323 aumento na assimilação de N, mas também devido à melhor EUN como resultado de uma  
324 remobilização mais eficiente deste nutriente, relato esse que corrobora com os dados do presente  
325 estudo.

326 Os fatores individuais (formas de inoculação de *A. brasilense* e doses de N) e a interação não  
327 influenciaram significativamente a eficiência de remobilização de N (Tabela 2). No sentido  
328 biológico, segundo Todeschini et al. (2016), grande parte do N encontrado nos grãos é proveniente  
329 da remobilização do N armazenado na parte aérea e raízes da planta antes da antese, como  
330 consequência menor taxa de N acumulado serão encontrados na maturação das plantas. Deste  
331 modo, existe uma relação fonte/dreno, em que as folhas maduras em senescência e o colmo servem  
332 como fonte de N, enquanto os grãos são os drenos para onde o nutriente é remobilizado, devido  
333 principalmente à sua elevada mobilidade (Taiz e Zeiger, 2009).

334 A eficiência agrônômica (EA) apresentou os melhores rendimentos nos experimentos de 2015 e  
335 2016 quando se aplicou a dose de 45 kg ha<sup>-1</sup> de N e utilizou a inoculação via semente de *A.*  
336 *brasilense*. Os resultados reportados na literatura sobre os efeitos do *Azospirillum* spp. na eficiência  
337 agrônômica do milho são bastante variados. Roesch et al. (2007) verificaram que a colonização de  
338 plantas de milho por bactérias diazotróficas foi inibida por altas doses de N. Isso ocorre porque o N  
339 mineral altera o estado fisiológico da planta e, por consequência, a sua associação às bactérias

340 diazotróficas. Quadros et al. (2014) relataram que o sistema planta-bactéria tem se mostrado mais  
341 eficiente quando a inoculação de *A. brasilense* é realizada na presença de pequenas doses de N  
342 mineral que promovem o fornecimento de fontes de carbono às bactérias através dos exsudatos, o  
343 que contribui para a efetivação da inoculação promovendo ganhos produtivos a cultura.  
344 A eficiência de utilização do nitrogênio (EUtN) representa a quantidade de grãos produzidos por  
345 unidade de N absorvido. No presente estudo as doses de N influenciam a EUtN apenas no  
346 experimento de 2016 em que a máxima EUtN, foi obtida na dose de 45 kg ha<sup>-1</sup> de N (Tabela 3).  
347 Resultados semelhantes foram obtidos por Presterl et al. (2002), quando avaliaram 25 híbridos de  
348 milho europeus e observaram aumento na EUtN de 41 para 51 % em baixos níveis de N. O  
349 aproveitamento de N diminui com o incremento das doses aplicadas devido o fornecimento de N  
350 exceder as necessidades da cultura (Moll et al., 1982). Esse comportamento deve-se ao fato de que  
351 em altos níveis de N ocorrem perdas mais acentuadas deste nutriente no agroecossistema, reduzindo  
352 a capacidade de utilização de N da própria cultivar (Fernandes et al., 2005).

353 A eficiência de absorção (EAN) nos experimentos de 2015 e 2016 sofreu influência das doses de N  
354 e das formas de inoculação de *A. brasilense*. A EAN depende da capacidade da cultivar em  
355 recuperar o N aplicado. Oliveira et al. (2013) observaram que a EAN em baixo nível de N foi 3,18  
356 vezes maior que em alto nível. No presente estudo para os anos de 2015 e 2016 a EAN em baixo  
357 nível de N foi 1,61 e 3,31 vezes maior que em alto nível de N. Quando há resposta da cultura a  
358 aplicação de N, em geral, ocorre à diminuição da EAN com o incremento das doses de N (Fageria,  
359 1998). Os resultados indicam que este genótipo é eficiente em absorver N em baixas concentrações  
360 no solo e remobilizá-lo para a produção de matéria seca e de grãos (Hirel et al., 2007). No entanto  
361 diversos fatores afetam a EAN, tais como as características físico-químicas e microbiológicas do  
362 solo, condições climáticas e adubação nitrogenada, afetando diretamente as perdas de N (Masclaux-  
363 Daubresse et al., 2010).

364 A eficiência do uso do nitrogênio (EUN) nas plantas é complexa, já que cada etapa, desse processo,  
365 como a absorção de N, translocação, assimilação e remobilização é governada por múltiplos fatores  
366 como os genéticos e ambientais que interagem influenciando diretamente na EUN (Xu et al., 2012).  
367 A EUN reflete a quantidade de grãos produzidos por unidade de N aplicado (Good et al., 2004). Os  
368 resultados obtidos neste trabalho sugerem que sob altas doses de N, a planta não utiliza de forma  
369 eficaz esse nutriente. Isso ocorre porque em elevados níveis de N aplicados, a planta mobiliza o  
370 nutriente para as partes vegetativas e não o remobiliza eficientemente para os grãos durante o  
371 enchimento (Chen et al., 2015). Em geral, EUN e ERN são maiores em baixos suprimentos N do  
372 que em suprimentos de N elevados (Xu et al., 2012). No experimento de 2015, o aumento da  
373 disponibilidade de N reduziu a EUN (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Nemati

374 e Sharifi (2012) em que obtiveram máxima EUN com a dose de 75 kg ha<sup>-1</sup> de N e a menor  
375 eficiência quando foi aplicado 225 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura, na cultura do milho. No experimento  
376 de 2016, a EUN também aumentou quando se utilizou as menores doses de N, porém as condições  
377 climáticas da estação de cultivo podem ter interferido diretamente na EUN. Dessa forma, Bertic et  
378 al. (2007) relataram que a EUN pela cultura é dependente das condições meteorológicas,  
379 especialmente chuva e disponibilidade de N.

380

## 381 **CONCLUSÃO**

382 - As doses de N influenciam de forma positiva a produtividade de grãos e de forma negativa sobre a  
383 eficiência do uso do N e dos seus componentes.

384 - Houve aumento de 1,77 Mg ha<sup>-1</sup> no tratamento inoculado via semente e 1,38 Mg ha<sup>-1</sup> no  
385 tratamento inoculado via foliar em relação ao tratamento sem inoculação, mas não houve redução  
386 na quantidade de N aplicada em cobertura.

387 - A inoculação de *A. brasilense* nas sementes proporciona aumento na produtividade e maior  
388 eficiência do uso do N e dos seus componentes, o que comprova a eficiência para as condições do  
389 tropico úmido maranhense.

390

## 391 **AGRADECIMENTOS**

392 À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão  
393 (FAPEMA), pelos recursos financeiros disponibilizados para a execução do projeto e pela  
394 concessão da bolsa de produtividade em pesquisa ao autor correspondente; ao Conselho Nacional  
395 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo; a  
396 empresa Nitro 1000, pela disponibilidade do produto comercial Nitro 1000 Gramíneas®.

397

## 398 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

399 Bakhshandeh E, Rahimian H, Pirdashti H, Nematzadeh GA. Phosphate solubilization potential  
400 and modeling of stress tolerance of rhizobacteria from rice paddy soil in northern Iran. World J  
401 Microbiol Biotechnol. 2014;30:2437-47. doi:10.1007/s11274-014-1669-1

402

403 Bartchechen A, Fiori, CCL, Watanabe SH, Guarido RC. Efeito da inoculação de *Azospirillum*  
404 *brasiliense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L.). Cam Dig. 2010;5:56-9.

405

406 Bashan Y, De-Bashan LE. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant  
407 growth - A critical assessment. Adv. in Agro. 2010;108:77-136.

408

409 Bertic B, Loncaric Z, Vukadinovic V, Vukobratovic Z, Vukadinovic V. Winter wheat yield  
410 responses to mineral fertilization. Cer Res Com. 2007;35:245-248.

411

412 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instituto Nacional de Meteorologia  
413 (INMET), Banco de Dados Meteorológico para Ensino e Pesquisa (BDMEP). [internet]. Brasília,  
414 DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2016 [acesso em 20out 2016]. Disponível  
415 em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>  
416

417 Braun H, Silva MCC, Fontes PCR, Coelho FS, Cecon PR. Top-dressing nitrogen management  
418 decision in potato using the “UFV-80” color chart and SPAD readings. *Af J of Agri Res.*  
419 2015;10:3494-3501.  
420

421 Cassán F, Vanderleyden J, Spaepen S. Physiological and agronomical aspects of phytormone  
422 production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus  
423 *Azospirillum*. *J of Plant Gro Reg.* 2014;33:440-459.  
424

425 Caviglia OP, Melchiori RJM, Sadras VO. Nitrogen utilization efficiency in maize as affected by  
426 hybrid and N rate in late-sown crops. *Field Crops Res.* 2014;168:27–37.  
427 doi:10.1016/j.fcr.2014.08.005  
428

429 Costa RRGF, Quirino GSF, Naves DCF, Santos CB, Rocha AFS. Efficiency of inoculant with  
430 *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize1. *Pes Agro Trop.* 2015;  
431 5:304-311.  
432

433 Companhia Nacional De Abastecimento - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. 4º  
434 Levantamento [internet]. Brasília, DF: 2017 [acesso em: 28 janeiro 2017]. Disponível em:  
435 [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_01\\_11\\_11\\_30\\_39\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_01_11_11_30_39_boletim_graos_janeiro_2017.pdf)  
436  
437

438 Chen Y, Xiao C, Wu D, Xia T, Chen Q, Chen F, Yuan L, Mi G. Effects of nitrogen application rate  
439 on grain yield and grain nitrogen concentration in two maize hybrids with contrasting nitrogen  
440 remobilization efficiency. *Eur Jo of Agro.* 2015;62:79-89.  
441

442 Dartora J, Guimarães VF, Marini D, Sander G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com  
443 *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *R Bra de Eng Agr e Amb.*  
444 2013;17:1023-1029.  
445

446 Didonet DA, Lima OS, Candaten MH, Rodrigues O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para  
447 os grãos, em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. *Pes Agro Bra.* 2000;35:401–411.  
448

449 Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the  
450 rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci.* 2003;22:107-49.  
451

452 Duarte EAA, Melo Filho PDA, Santos RC. Agronomic characteristics and harvest index of  
453 different peanut genotypes submitted to water stress. *Rev Bra de Eng Agr e Amb.* 2013;17:843-847.  
454

455 Embrapa. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, Brasília, DF, 2013, 3:353 p.  
456

457 Fageria NK. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. *Rev Bra de Eng Agr e*  
458 *Amb.* 1998;2:6-16.  
459

460 Fageria NK, Santos AB. Yield physiology of dry bean. *Jou of Plant Nut.* 2008;31:983-1004.  
461

462 Fallik E, Okon Y, Epstein E, Goldman A, Fischer M. Identification and quantification of IAA and  
463 IBA in *Azospirillum brasilense* inoculated maize roots. *Soil Biol Biochem.* 1989;21:147–153.  
464

465 Fernandes FCS, Buzetti S, Arf O, Andrade JAC. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis  
466 cultivares de milho. *Rev Bras de Mil e Sor.* 2005;4:195-204.  
467

468 Franche C, Lindström K, Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous  
469 and non-leguminous plants. *Plant and Soil.* 2009;321: 35–59.  
470

471 Gaju O, Allard V, Martre P, Le Gouis J, Moreau D, Bogard M, Hubbart S, Foulkes MJ. Nitrogen  
472 partitioning and remobilization in relation to leaf senescence, grain yield and grain nitrogen  
473 concentration in wheat cultivars. *F Cro Res.* 2014;155:213-223.  
474

475 Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world.  
476 *Microbiological Research.* 2014;169:30–39.  
477

478 Godoy JCS, Watanabe SH, Fiori CCL, Guarido RC. Produtividade de milho em resposta a doses de  
479 nitrogênio com e sem inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*. *Cam Dig.* 2011;6:26-  
480 30.  
481

482 Good AG, Shrawat AK, Muench DG. Can less yield more? Is reducing  
483 nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Tre in Plant Sci.*  
484 2004;9:597–605.  
485

486 Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop  
487 plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated  
488 approaches. *J Exp Bot.* 2007;58:2369-2387.  
489

490 Hirel B, Bertin P, Quillere I, Bourdoncle W, Attagnant C, Dellay C, Gouy A, Cadiou S, Retalliau  
491 C, Falque M, Gallais A. Towards a Better Understanding of the Genetic and Physiological Basis for  
492 Nitrogen Use Efficiency in Maize. *Plant Phys.* 2001;125:1258-1270. doi:10.1104/pp.125.3.1258.  
493

494 Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedroza FO. Inoculation with selected strains of *Azospirillum*  
495 *brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil.*  
496 2010;331:413-425.  
497

498 Junior RAP. Controle Genético do Índice de Colheita no Feijoeiro [Dissertação]. Lavras:  
499 Universidade Federal de Lavras; 2016.  
500

501 Kong L, Xie Y, Hu L, Feng B, Li S. Remobilization of vegetative nitrogen to developing grain in  
502 wheat (*Triticum aestivum* L.). *F Cro Res.* 2016;196:134-144.  
503

504 Lemaire G, Gastal F. Quantifying crop responses to nitrogen deficiency and avenues to  
505 improve nitrogen-use efficiency. In: Sadras VO, Calderini DF. (Eds.), *Crop Physiology: Applications*  
506 *for Genetic Improvement and Agronomy.* Acad Press. 2009:171–211.  
507

508 Magalhães PC, Souza TC, Albuquerque PEP, Karam D, Magalhães MM, Cantão FRO.  
509 Caracterização ecofisiológica de linhagens de milho submetidas a baixa disponibilidade hídrica  
510 durante o florescimento. *Rev Bra de Mil e Sor.* 2009;8:223–232.

511 Marini D, Guimarães VF, Dartora J, Lana MC, Júnior ASP. Growth and yield of corn hybrids in  
512 response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. Rev Ceres. 2015;  
513 62:117-123.  
514

515 Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. Nitrogen  
516 uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive  
517 agriculture. Annals of Bot. 2010;105:1141–1157.  
518

519 Matsumura EE, Secco VA, Moreira RS, Santos OJP, Hungria M, Oliveira ALM. Composition and  
520 activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated  
521 with *Azospirillum brasilense*. Ann of Micro. 2015;1:1-14. doi:10.1007/s13213-015-1059-4.  
522

523 Moll RH, Kamprath EJ, Jackson WA. Analysis and interpretation of factors which contribute to  
524 efficiency of nitrogen utilization. Agro Jou. 1982;74:562-564.  
525

526 Montanez A, Rodriguez Blanco A, Barlocco C, Beracochea M, Sicardi M. Characterization of  
527 cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea*  
528 *mays* L.) and their inoculation effects in vitro. Appl Soil Ecol. 2012;58: 21-28.  
529

530 Morais TP, Brito CH, Brandão AM, Oliveira JPR, Rezende WS. Yield of maize hybrids: Is there any  
531 association among nitrogen rate, *Azospirillum* inoculation and fungicide treatment?. Afr J Agric Res.  
532 2016;11:1150-1158.  
533

534 Müller TM, Sandini IE, Rodrigues JD, Novakowski JH, Basi S, Kaminski TH. Combination of  
535 inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases  
536 corn yield. Ci Rural. 2016;46:201-2016.  
537

538 Nemati AR, Sharifi RS. Effects of rates and nitrogen application timing on  
539 yield, agronomic characteristics and nitrogen use efficiency in corn. Int Jou of Agri and Crop Sci.  
540 2012;4:534-539.  
541

542 Oliveira LR, Miranda GV, De Lima RO, Fritsche-Neto R, Galvão JCC. Eficiência na absorção e  
543 utilização de nitrogênio e atividade enzimática em genótipos de milho. Rev Ci Agro. 2013;44:614-  
544 621.  
545

546 Perecin, D, Cargnelutti Filho A. Efeitos por comparações e por experimento em interações de  
547 experimentos fatoriais. Ciên e Agrot. 2008;32: 68–72.  
548

549 Pereira LM, Pereira EM, Revolti LTM, Zingaretti SM, Môro GV. Seed quality, chlorophyll  
550 content index and leaf nitrogen levels in maize inoculated with *Azospirillum brasilense*. Rev Ci  
551 Agro. 2015;46:630-637.  
552

553 Presterl T, Groh S, Landbeck M, Seitz G, Schmidt W, Geiger HH. Nitrogen uptake and utilization  
554 efficiency of European maize hybrids developed under conditions of low and high nitrogen input. Pla  
555 Bre. 2002;121:480-486.  
556

557 Prigent-Combaret C, Blaha D, Pothier JF, Vial L, Poirier MA, Wisniewski-Dye F, Moënne-locooz  
558 Y. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-  
559 aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum*

560 4B and other Proteobacteria. FEMS Microbiol Ecol. 2008;65:202–19. doi:10.1111/j.1574-  
561 6941.2008.00474

562

563 Quadros PD, Roesch LFW, Silva PRF, Vieira VM, Roehrs DD, Camargo FAO. Desempenho  
564 agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. Rev Ceres. 2014;61:209-  
565 18. doi:10.1590/S0034-737X2014000200008

566

567 Repke RA, Cruz SJS, Da Silva CJ, Figueiredo PG, Bicudo SJ. Eficiência da *Azospirillum brasilense*  
568 combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. Rev Bra de Mil e Sor.  
569 2013;12:214-226.

570

571 Rimski-Korsakov H, Rubio G, Lavado RS. Fate of the nitrogen from fertilizers in field-grown  
572 maize. Nut Cyc In Agro. 2012;93:253-263.

573

574 Roesch LFW, Passaglia LMP, Bento FM, Triplett EW, Camargo FAO. Diversidade de bactérias  
575 diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. Rev Bra de Ci do Solo, 2007;31:1367-1380.  
576 doi:10.1590/s0100-06832007000600015.

577

578 Saikia SP, Jain V. Biological Nitrogen Fixation with non-legumes: An achievable target or a  
579 dogma?. Curr. Sci. 2007;92:317-322.

580

581 Sangoi L, Da Silva LMM, Mota MR, Schmitt FPA, Souza NM, Giordani W, Schenatto DE.  
582 Desempenho agrônômico do milho em razão do tratamento de sementes com *azospirillum sp.* e da  
583 aplicação de doses de nitrogênio mineral. Rev Bras Ciênc Solo. 2015;39:1141-1150.

584

585 Santi C, Bogusz D, Franche C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Annal of Bot.  
586 2013;111:743-767.

587

588 Tedesco MJ, Gianello C, Bissani, CA, Bohnen, H, Volkweiss SJ. Análise de solos, plantas e outros  
589 materiais. UFRGS, Porto Alegre. 1995.

590

591 Taiz L, Zeiger E. Fisiologia vegetal. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

592

593 Todeschini MH, Milioli AS, Trevizan DM, Bornhofen E, Finatto T, Storck L, Benin G. Nitrogen  
594 use efficiency in modern wheat cultivars. Bragantia. 2016;75:351-361. doi:10.1590/1678-4499.385

595

596 USDA. Grain: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture. Foreign  
597 Agricultural Service. p. 1-56. 2017. Disponível em:  
598 <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/downloads>. Acesso em 28 de janeiro de  
599 2017.

600

601 Vogt GA, Balbinot Junior AA, Galotti GJM, Padolfo CM, Zoldan S. Desempenho de genótipos de  
602 milho na presença ou ausência de inoculação com *Azospirillum brasiliense* e adubação nitrogenada  
603 de cobertura. Agro Cat. 2014;27:49-54.

604

605 Xu G, Fan X, Miller AJ. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. A Rev of Plant Bio. 2012;  
606 63:153-182. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105532

**Tabela 1.** Produtividade de grãos (PG), índice de colheita do nitrogênio (ICN) e índice de colheita (IC) em função das formas de inoculação (I), em 2015 e 2016

Inoculação	2015			2016		
	PG (Mg ha <sup>-1</sup> )	ICN	IC	PG (Mg ha <sup>-1</sup> )	ICN	IC
Sementes	5,33 a	0,47 ab	0,61 a	3,29 a	0,33 a	0,38 a
Foliar	4,94 b	0,51 a	0,64 a	2,75 b	0,30 b	0,35 b
Controle	3,56 c	0,46 b	0,57 b	2,74 b	0,30 b	0,36 ab
Valores do teste F da Anova						
I	117,22 <sup>***</sup>	3,35 <sup>*</sup>	9,65 <sup>***</sup>	65,73 <sup>***</sup>	5,40 <sup>**</sup>	6,28 <sup>**</sup>
DN	24,67 <sup>***</sup>	0,50 <sup>ns</sup>	2,45 <sup>ns</sup>	63,47 <sup>***</sup>	3,92 <sup>*</sup>	4,79 <sup>***</sup>
I x DN <sup>¶</sup>	2,55 <sup>*</sup>	0,46 <sup>ns</sup>	0,85 <sup>ns</sup>	0,84 <sup>ns</sup>	0,30 <sup>ns</sup>	0,38 <sup>ns</sup>

Médias seguidas de mesma letra comparam as formas de inoculação (n=16) pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).  
<sup>ns</sup>, <sup>\*\*\*</sup>, <sup>\*\*</sup>, <sup>\*</sup>: não significativo, significativo a 0,1; 1 e 5 % de probabilidade, respectivamente.

**Tabela 2.** Remobilização de nitrogênio (RN) e eficiência de remobilização do nitrogênio (ERN) em função das formas de inoculação (I), em 2015 e 2016

Inoculação	2015		2016	
	RN	ERN	RN	ERN
Sementes	83,5 a	62,1 a	107,6 a	52,9 a
Foliar	76,9 a	66,9 a	97,4 a	51,8 a
Controle	72,4 a	68,0 a	92,8 a	50,7 a
Valores do teste F da Anova				
I	1,99 <sup>ns</sup>	2,48 <sup>ns</sup>	0,82 <sup>ns</sup>	0,18 <sup>ns</sup>
DN	6,38 <sup>**</sup>	0,45 <sup>ns</sup>	2,28 <sup>ns</sup>	2,24 <sup>ns</sup>
I x DN <sup>¶</sup>	0,32 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0,31 <sup>ns</sup>	0,76 <sup>ns</sup>

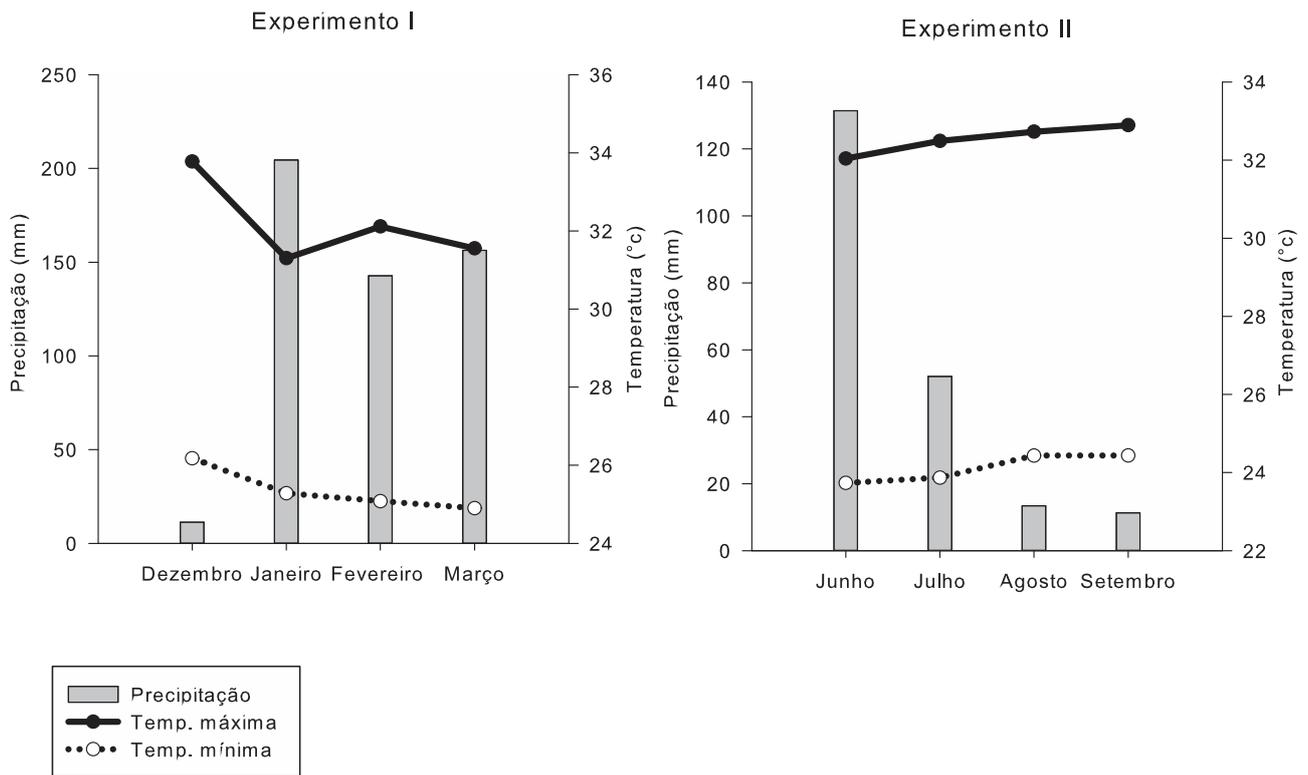
Médias seguidas de mesma letra comparam as formas de inoculação (n=16) pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).  
<sup>ns</sup>, <sup>\*\*\*</sup>, <sup>\*\*</sup>, <sup>\*</sup>: não significativo, significativo a 0,1; 1 e 5 % de probabilidade, respectivamente.

**Tabela 3.** Eficiência agrônômica (EA), eficiência de utilização do N (EUtN), eficiência de absorção do N (EAN) e eficiência do uso do N (EUN) em função das formas de inoculação (I) e doses de N (DN, kg ha<sup>-1</sup>), em 2015 e 2016

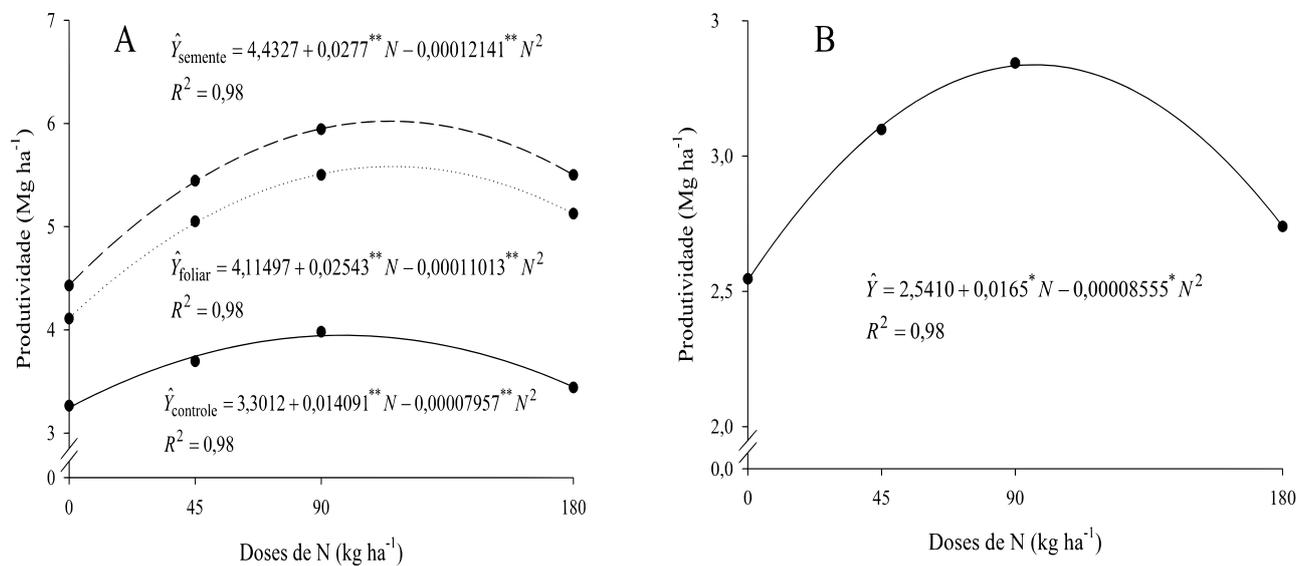
Inoculação	Doses de N kg ha <sup>-1</sup>	2015				2016			
		EA	EUtN	EAN	EUN	EA	EUtN	EAN	EUN
Semente	45	22,56	55,16	2,21 a	120,9 a	13,89	26,39	2,96	77,5 a
	90	16,83	55,19	1,21 b	66,1 b	8,54	24,78	1,64	40,35 b
	180	5,95	60,71	0,51 c	30,5 c	1,88	18,44	0,97	17,78 c
Foliar	45	20,94	66,87	1,70 a	112,2 a	11,81	24,44	2,67	64,72 a
	90	15,47	63,28	0,98 b	61,1 b	9,58	21,75	1,67	36,04 b
	180	5,65	65,67	0,44 c	28,5 c	0,66	17,82	0,79	13,89 c
Controle	45	9,56	61,60	1,33 a	82,1 a	11,11	24,77	2,64	64,30 a
	90	7,96	57,62	0,78 b	44,22 b	8,47	24,19	1,47	35,06 b
	180	0,98	58,69	0,33 c	18,1 c	0,69	19,41	0,74	14,00 c
Médias									
Semente	-	15,11 a	57,02 b	1,31 A	72,52 A	8,10 a	23,21 a	1,86 a	45,21 A
Foliar	-	14,02 a	65,27 a	1,04 B	67,27 B	7,35 a	21,34 a	1,71 ab	38,22 A
Controle	-	6,16 b	58,65 ab	0,81 C	48,47 C	6,76 a	22,79 a	1,61 b	31,70 B
	45	17,68 a	61,21 a	-	-	12,27 a	25,20 a	2,75 a	-
	90	13,42 a	58,70 a	-	-	8,87 b	23,57 a	1,59 b	-
	180	4,20 b	61,03 a	-	-	1,08 c	18,56 b	0,83 c	-
Valores do teste F da Anova									
I		15,28***	4,76*	49,0***	105,2***	1,23 <sup>ns</sup>	1,68 <sup>ns</sup>	4,14*	47,30***
DN		30,45***	0,49 <sup>ns</sup>	346,9***	1019,7***	89,80***	20,93***	257,89***	1980,13***
I x DN <sup>¶</sup>		0,99 <sup>ns</sup>	0,59 <sup>ns</sup>	8,30***	10,31***	0,72 <sup>ns</sup>	0,41 <sup>ns</sup>	0,63 <sup>ns</sup>	7,72***

<sup>¶</sup>Quando a interação entre as formas de inoculação e doses de N foi significativa, as médias seguidas de letras minúsculas comparam as doses de N (n=4) dentro das formas de inoculação e as médias seguidas de letras maiúsculas comparam as formas de inoculação (n=12) pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>ns</sup>, \*\*\*; \*\*, \*: não significativo, significativo a 0,1; 1 e 5 % de probabilidade, respectivamente.



**Figura 1.** Dados de precipitação e temperatura durante o período experimental.



**Figura 2.** Produtividade de grãos de milho em função de doses de N (kg ha<sup>-1</sup>), em 2015 (A) e 2016 (B). \*\* e \*.

## **ANEXO**

## ANEXO 1. Normas para a publicação à Revista Brasileira de Ciência do Solo

### INFORMAÇÕES GERAIS

**Artigo Científico:** Manuscrito fundamentado em uma hipótese científica original e ainda não esclarecida, que é validada, ou não, por meio de experimentação e, ou modelos teóricos, fundamentados no método científico consagrado, com adequado planejamento estatístico e discussão com adequada argumentação científica. Ele entra no mérito científico de um problema para o qual se procura uma solução, que é parcial ou totalmente apresentada. As comparações de métodos, de variedades, de tipos de manejo, etc. adequarão, excepcionalmente, à categoria de artigo científico apenas quando apresentarem base e, ou, justificativas científicas bem argumentadas e discutidas. O texto deve ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, quadros e referências.

#### Submissão do manuscrito

A submissão do manuscrito será por meio eletrônico utilizando os links disponíveis no site da SBCS ([www.sbcs.org.br](http://www.sbcs.org.br)) ou na página da R. Bras. Ci. Solo no SciELO [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_serial&pid=0100-0683&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0100-0683&lng=en&nrm=iso).

Para a submissão requer-se uma carta de apresentação do manuscrito (*cover letter*) na qual se destaca a relevância dos resultados para o ganho de conhecimentos e argumentos que justifiquem a adequação do manuscrito ao escopo da R. Bras. Ci. Solo. Solicita-se, ainda, que os autores indiquem três potenciais revisores para o manuscrito, com os respectivos endereços eletrônicos. No entanto, o Editor se reserva o direito de encaminhar ou não o manuscrito aos revisores indicados.

#### Preparo do manuscrito

O manuscrito deve ser digitado com fonte “Times New Roman 12” no espaço 1,5, alinhado à esquerda (não justificar com alinhamento à esquerda e à direita), com página em tamanho A4, com 2,5 cm nas margens superior e inferior e 2,0 cm nas margens direita e esquerda. As páginas devem ser numeradas no canto inferior à direita e as linhas do texto devem ser numeradas de forma contínua. O título de cada seção deve ser escrito em letras maiúsculas, em negrito. Subdivisões devem ter apenas a primeira letra maiúscula, com destaque em negrito.

O manuscrito deve ser estruturado com as seções: Resumo, *Abstract* (obrigatórios), Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão ou (preferencialmente) Resultado, Discussão, Conclusões, Agradecimentos (opcional) e Referências. Essa estrutura não se aplica, obrigatoriamente, aos manuscritos sobre Educação, Revisões de Literatura e Notas Científicas, embora estes devam conter, obrigatoriamente, o Resumo e o *Abstract*. O manuscrito submetido em inglês deve conter Resumo em português e aquele submetido em português deve conter o *Abstract* em inglês.

O manuscrito deve conter uma página de rosto com o título, nomes dos autores por extenso com a indicação da formação profissional, o vínculo profissional e o endereço eletrônico. O autor correspondente deverá ser marcado por um asterisco e o número de telefone para contato deve ser indicado. Devem-se incluir ainda chamadas que serão vinculadas ao título do manuscrito. A primeira página do manuscrito deve conter o título seguido imediatamente do texto de acordo com as seções.

#### Seções dos manuscritos

**Título:** Deve ser conciso e indicar o seu conteúdo, contendo no máximo 20 palavras escritas em letras maiúsculas e alinhado à esquerda (não justificar com alinhamento à esquerda e à direita).

**Resumo/Abstract:** Para artigos científicos e revisões de literatura, cada um deve conter até 400 palavras e, para notas científicas, até 150 palavras. Todos os resumos e *abstracts* devem iniciar com uma breve frase que justifique o trabalho. Para artigos e notas científicas, deve-se apresentar de

forma objetiva o material e método e os resultados mais importantes e conclusões. Não se devem incluir citações bibliográficas e símbolos ou siglas que requeiram a leitura do texto para sua decodificação.

**Palavras-chave/Keywords:** Usar no mínimo três e no máximo cinco termos diferentes daqueles constantes no título. Não utilizar termos compostos por mais de três palavras.

**Introdução:** Deve ser breve, mas suficiente para esclarecer o problema abordado ou a(s) hipótese(s) de trabalho, com citação da bibliografia específica e atualizada, e finalizar com a indicação do objetivo.

**Material e Métodos:** Deve conter informações necessárias e suficientes para percepção dos resultados e que possibilitem a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Deve conter informações sobre o(s) método(s) utilizados, o delineamento experimental, os tratamentos, números de repetições, unidades experimentais (número e tamanho) e os métodos estatísticos utilizados.

**Resultados e Discussão:** Deve conter uma apresentação concisa dos dados obtidos e podem ser apresentados conjuntamente ou, preferencialmente, em separado. Se apresentados em separado, a Discussão não deve conter repetição da descrição dos resultados.

**Conclusões:** Devem ser concisas e coerentes com os objetivos e com os dados apresentados no trabalho.

**Agradecimentos:** Opcionais. Devem ser sucintos e localizados após as conclusões. Incluem-se nesta seção as indicações de suporte financeiro ao projeto de pesquisa do qual originou o trabalho.

**Quadros:** Devem ser numerados sequencialmente com algarismos arábicos. O título deve aparecer acima do quadro e deve conter os elementos que possibilite a sua leitura e compreensão sem recorrer ao texto. Os quadros devem ser produzidos com a ferramenta “Tabela” do MS Word ou MS Excel, ou *softwares* equivalentes. Utilizar a fonte Times New Roman com tamanho não maior que 10. As unidades são colocadas no corpo do quadro, na linha acima dos valores numéricos. No corpo do quadro não devem aparecer linhas verticais e horizontais. Os quadros devem ser inseridos no formato editável (illustrator/eps/corel draw/jnb/excel, doc ou docx etc.), após as Referências, com quebra de página. Não serão aceitos manuscritos contendo quadros inseridos como imagem.

**Figuras gráficas:** Devem ser numeradas sequencialmente com algarismos arábicos. O título deve aparecer abaixo da figura e deve conter os elementos que possibilitem a sua leitura e compreensão sem a leitura do texto. As figuras serão inseridas após os quadros em formato editável (illustrator/eps/coreldraw/jnb/excel, etc.). Não serão aceitos manuscritos contendo figuras gráficas inseridas como imagem.

**Figuras fotográficas:** Fotografias devem ser apresentadas como arquivo “tagged image format [TIF]” com 500 dpi.

**Fórmulas e equações:** Devem ser escritas com ferramentas do editor que possibilitem sua edição. Não serão aceitas fórmulas e equações inseridas como imagem. Equações de regressões devem ser apresentadas com notação estatística ( $\hat{y} = \alpha + \beta_1^{**} x + \dots + \beta_n^{**} x$ ) e não na notação matemática, usual nos *softwares* ( $y = \beta_n x \alpha + \dots + \beta_1 x + \dots + \alpha$ ). A indicação de significância (\*\*) deve ser indicada sobrescrito aos coeficientes. Os coeficientes das equações de regressões devem ter um número adequado de decimais significativas.

**Referências:** Deve conter relação dos trabalhos citados no texto, quadro(s) ou figura(s) e inserida em ordem alfabética, obedecendo o estilo denominado Vancouver. Seguem modelos para as referências mais frequentes:

1. **a) Periódicos:** Nome de todos os autores. Título do artigo. Título abreviado do periódico.

Ano de publicação; volume; páginas inicial e final. Exemplo:

Fonseca JA, Meurer EJ. Inibição da absorção de magnésio pelo potássio em plântulas de milho em solução nutritiva. R. Bras Ci Solo. 1997;21:47-50.

Rodrigues DT, Novais RF, Alvarez V VH, Dias JMM, Villani EMA, Otoni WC. *In vitro* germination of *Cattleya intermedia* R. Graham by means of chemical disinfection and without laminar flow. Prop Ornament Plants. 2011;11:19-24.

Artigos com DOI:

Zirlewagen D, Raben G, Weise M. Zoning of forest health conditions based on a set of soil, topographic and vegetation parameters. For Ecol Manage. 2007;248:43-55. doi:10.1016/j.foreco.2007.02.038

A abreviatura dos periódicos pode ser verificada nos endereços:

<[http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISIabbr/C\\_abrvjt.html](http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISIabbr/C_abrvjt.html)>, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>>

1. **b) Livro:** Autores. Título da publicação. Número da edição. Local da publicação: Editora; ano de publicação. Exemplo:

Konhnke H. Soil physics. 2nd ed. New York: MacGraw Hill; 1969.

1. **c) Participação em obra coletiva:** Autor(es). Título da parte referenciada seguida de In: Nome(s) do(s) editor(es), editores. Título da publicação. Número da edição. Local de publicação: Editora; ano. Páginas inicial e final. Exemplos:

Jackson ML. Chemical composition of soil. In: Bear FE, editor. Chemistry of the soil. 2nd ed. New York: Reinhold; 1964. p.71-141.

Sharpley AN, Rekolainen S. Phosphorus in agriculture and its environmental implications. In: Tunney H, Carton OT, Brookes PC, Johnston AE, editors. Phosphorus loss from soil to water. New York, CAB International; 1997. p.1-53.

1. **d) Publicação em Anais:** Autor(es). Título do trabalho. In: Tipo de publicação, número e título do evento [CD-ROM, quando publicado em]; data do evento (dia mês ano); cidade e país de realização do evento. Cidade (da Editora): Editora ou Instituição responsável pela publicação; ano de edição (nem sempre é o mesmo do evento). Paginação do trabalho ou do resumo. Exemplos:

Ferreira DF. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Anais da 45ª. Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria; julho 2000; São Carlos. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2000. p.255-8.

Gomes SLR. Novos modos de conhecer: os recursos da internet para uso das bibliotecas universitárias. In: Anais do 10º. Seminário Nacional de Bibliotecas Universitárias [CD-ROM]; 25-30 out 1998. Fortaleza. Fortaleza: Tec Treina; 1998.

1. **e) Citação de fonte eletrônica:**

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Assessoria de Gestão Estratégica. Projeção do agronegócio 2009/2010 a 2019/2020 [internet]. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2011 [acesso em 10 nov 2010]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/MAIS%20DESTAQUES/Proje%C3%A7%C3%B5es%20Agroneg%C3%B3cio%202009-2010%20a%202019-020.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/MAIS%20DESTAQUES/Proje%C3%A7%C3%B5es%20Agroneg%C3%B3cio%202009-2010%20a%202019-020.pdf).

1. **f) Dissertações e teses:** Título da tese (inclui subtítulo se houver) [grau]. Cidade: Instituição onde foi defendida; ano.

Silveira AO. Atividades enzimáticas como indicadores biológicos da qualidade de solos agrícolas do Rio Grande do Sul [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ. Análises de solo, plantas e outros materiais. 2a ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1995. (Boletim técnico, 5).

### 1. h) Citação de citação

Citação de citação deve ser utilizada em situações estritamente necessárias. Neste caso, citar no texto o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano da publicação, seguido da expressão citado por seguida do sobrenome do autor do documento consultado e do ano da publicação (Abreu, 1940, citado por Neves, 2012). Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

### 1. i) Comunicação pessoal

Deve ser colocada apenas em nota de rodapé. Inclui-se o nome do informante, a data que a informação foi dada, nome, estado e país da Instituição de vínculo do informante seguido pela expressão: comunicação pessoal. Por exemplo: Comunicação pessoal Joaquim da Silva, em 22 de janeiro de 2011, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil – recebida por correio eletrônico.

### Citações das referências

As Referências no texto devem ser citadas em ordem cronológica e nos seguintes formatos: a) Um autor: (Autor, ano) ou Autor (ano), como (Silva, 1975) ou Silva (1975);

1. b) Dois autores: (Autor e Autor, ano) ou Autor e Autor (ano), como: (Silva e Smith, 1975) ou Silva e Smith (1975);
2. c) Quando houver mais de dois autores, usar a forma reduzida (Autor et al., ano) ou Autor et al. (ano), como (Souza et al., 1975) ou Souza et al. (1975);
3. d) Referências a dois ou mais artigos do(s) mesmo(s) autor(es), no mesmo ano, serão discriminadas com letras minúsculas (Ex.: Silva, 1975a,b).

### Informações complementares

A RBCS utiliza o Sistema Internacional de Unidades. Seguem alguns exemplos de apresentação de valores numéricos que a RBCS adota. Considerar como padrão da RBCS o formato à direita: 72 horas = 72 h; 5 minutos = 5 min; 3 segundos = 3 s; 10 l (litros) = 10 L; 20 ml = 20 mL; 3 toneladas = 3 t ou Mg; 25°C = 25 °C; 3 m × 3 m = 3 × 3 m; 5% = 5 %; 4%, 6% e 12% = 4, 6 e 12 %; 5 m e 16 m = 5 e 16 m; 1 M HCl = 1 mol L<sup>-1</sup> ou mol/L de HCl (as duas formas são aceitas, porém solicita-se que estejam padronizadas no texto e quadros/figuras); 1 mM NaOH = 1 mmol/L ou mmol L<sup>-1</sup>; grama por vaso = g/vaso; grama por planta = g/planta; plantas por frasco = plantas/frasco; tonelada por hectare por ano = t ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Concentrações apresentadas em Normalidade (N) devem ser convertidas para o equivalente em mol/L ou mol L<sup>-1</sup>.

A revista reserva-se o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua, respeitando, porém, o estilo dos autores.

As provas finais serão enviadas aos autores.

Sugere-se que os autores consultem artigos recentes publicados na RBCS para esclarecimento de dúvidas quanto à formatação do manuscrito.